(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-504110
(P2018-504110A)
(43)公表日　平成30年2月15日(2018.2.15)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B029
C12N	1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N	1/15	(2006.01)	C12N	1/15		
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 18 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-535708 (P2017-535708)
(86)(22)出願日　平成27年12月24日 (2015.12.24)
(85)翻訳文提出日　平成29年8月28日 (2017.8.28)
(86)国際出願番号　PCT/KR2015/014295
(87)国際公開番号　WO2016/108529
(87)国際公開日　平成28年7月7日 (2016.7.7)
(31)優先権主張番号　10-2014-0191302
(32)優先日　平成26年12月28日 (2014.12.28)
(33)優先権主張国　韓国 (KR)
(31)優先権主張番号　10-2015-0178234
(32)優先日　平成27年12月14日 (2015.12.14)
(33)優先権主張国　韓国 (KR)

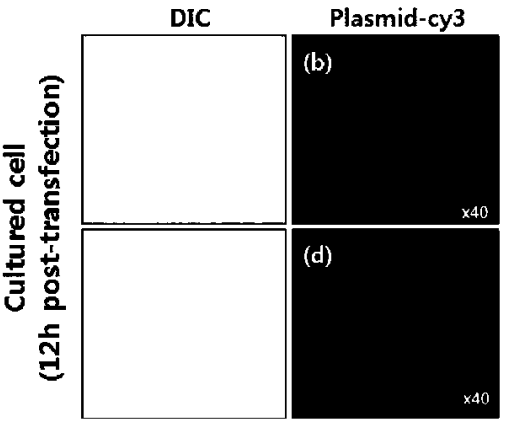
(71)出願人　517228711
フェムトファブ　カンパニー　リミテッド
大韓民国　３７６７３　ギョンサンブク－ド　ポハン－シ　ナム－グ　チョンアム－ロ　７７　シー５　ルームナンバー　７１６
(74)代理人　110000578
名古屋国際特許業務法人
(72)発明者　リー　サンギュン
大韓民国　３７５５８　ギョンサンブク－ド　ポハン－シ　ブク－グ　フンヘ－ウツ　チョゴ－リ　１４５－３３　フィールハーモニー　１０２

Fターム(参考)　4B029 AA24 BB01 GB10
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02

最終頁に続く

(54)【発明の名称】運搬体の使用なしで細胞に物質を注入して変換させた細胞（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｃｅｌｌ　ｂｙ　Ｐｕｔｔｉｎｇ　Ｍａｔｅｒｉａｌ　ｉｎｔｏ　ｔｈｅ　Ｃｅｌｌ　ｗｉｔｈｏｕｔ　Ｕｓｉ

(57)【要約】
本発明は、固体内部に形成され細胞が通過する第1通路;上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成された第2の通路;前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差または電位差を印加する電源を含む、物質注入装置を使用して、ベクトルのような運搬体を使用せず、遺伝子やタンパク質、リボザイム、染色体、有機または無機化合物、コラーゲン、細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソム、リボソーム、ナノ粒子またはこれらの混合物などを、単一の細胞に直接注入して変換させた、生きている変換細胞とそれを含有する細胞組成物のものである。本発明の変換細胞は、ベクターのような運搬体が含有されていないという特徴を持つ。
【選択図】図10



【特許請求の範囲】
【請求項１】
固体内部に形成され細胞が通過する第1通路;上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成される第2の通路;前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を含む、物質注入装置を使用して、前記第1通路に細胞を含有する流体を流入させながら、前記第2の通路には、物質を流入させて前記第2の通路に電位差を加え、前記第1の通路と第2通路が接続されてポイントを通過する単一の細胞に、上記の物質を運搬体の使用なしで注入して変換された細胞。
【請求項２】
請求項１の細胞において、前記物質が、タンパク質、ペプチド糖蛋白質、リポタンパク質、DNA、RNA、アンチセンスRNA、siRNA、ヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、染色体、ウイルス、薬物、有機化合物、無機化合物、ヒアルロン酸、コラーゲン、細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソム、リボソーム、ナノ粒子およびこれらの混合物の中から選択されるものであることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項３】
請求項１の細胞において、前記細胞が原核細胞または真核細胞を特徴とする、変換された細胞。
【請求項４】
請求項３の細胞において、前記原核細胞が細菌または古細菌であることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項５】
請求項３の細胞において、前記真核細胞が動物細胞または植物細胞であることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項６】
請求項５の細胞において、前記動物細胞が体細胞、生殖細胞、および幹細胞からなる群から選択されるものであることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項７】
請求項６の細胞において、前記体細胞が上皮細胞、筋肉細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、赤血球、白血球、リンパ球、および粘膜細胞からなる群から選択されるものであることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項８】
請求項６の細胞において、前記生殖細胞は卵子または精子であることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項９】
請求項７に細胞において、前記幹細胞が成体幹細胞または胚性幹細胞であることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項１０】
請求項９の細胞において、前記成体幹細胞が造血幹細胞、中葉幹細胞、神経幹細胞、繊維芽細胞、肝臓芽細胞、網膜芽細胞、脂肪由来幹細胞、骨髄由来の幹細胞、臍帯血由来の幹細胞、臍帯由来幹細胞、胎盤由来幹細胞、正由来幹細胞、末梢血管由来幹細胞と羊膜由来幹細胞からなる群から選択されることを特徴とする、変換された細胞。
【請求項１１】
固体内部に形成され細胞が通過する第1通路;上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成される第2の通路;前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を含む、物質注入装置を使用して、前記第1通路に細胞を含有する流体を流入させながら、前記第2の通路には、物質を流入させて前記第2の通路に電位差を加え、前記第1の通路と第2通路が接続されてポイントを通過する単一の細胞に、上記の物質を運搬体の使用なしで注入して、変換された細胞を含有する細胞の組成物。

【請求項１２】
請求項１１の細胞組成物において、前記組成物が、前記変換された細胞と細胞培養液成分を含んでいることを特徴とする、細胞の組成物。
【請求項１３】
請求項１１の細胞組成物において、前記細胞組成物が、前記変換された細胞と、天然または合成の細胞間物質を含むことを特徴とする、細胞の組成物。
【請求項１４】
請求項１３の組成物において、上記細胞間物質が、ゼラチン、セルリアン・ロス、ヒアルロン酸ポリマー、コラーゲン、脂質、エラスチン、多糖類、パックチンソン物質及びこれらの混合物からなる群から選択されるものであることを特徴とする、細胞組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、単一細胞にベクターのような運搬体を使用せず、遺伝子やタンパク質などの物質を注入して変換させた、生きている細胞と、これを含有する組成物に関するものである。本発明の変換された細胞は、ベクターのような運搬体を含有しないという特徴を持つ。
より詳細には、本発明は、固体内部に形成され細胞が通過する第1通路;上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成された第2の通路;前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差または電位差を印加する装置を含む、物質注入装置を使用して、ベクトルのような運搬体を使用せず、遺伝子やタンパク質、リボザイム、染色体、有機または無機化合物、コラーゲン、細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソム、リボソーム、ナノ粒子またはこれらの混合物などを、単一の細胞に直接注入して変換させた、生きている変換細胞とそれを含有する細胞組成物のものである。
【発明の背景となる技術】
【０００２】
バイオ分野、電気電子分野やナノ加工分野の技術の目覚しい発展により、これらの分野の融合を通じた新たなバイオ医療技術の研究が最近盛んに行われている。
細胞の変換技術分野では、in vitroでの患者の細胞を変換させた後、患者の体内に注入して治療目的のために使用しようとすると、人間の細胞を変換して、次世代の新薬開発とターゲットの検証に使用する研究が多数行われている。
最近の細胞変換技術は、有用な細胞治療剤の開発に焦点を当てているが、特に、山中因子（Yamanaka factor）を用いた逆分化誘導多能性幹細胞（iPS）を活用しようとする努力が大きく注目されている。
【０００３】
山中因子は、4つの遺伝子（Oct3 / 4、Sox2、cMycおよびKlf4）を指す。山中因子をウイルス由来ベクターを使用して、細胞の染色体に挿入すると、噴火はすでに終わった体細胞は、さまざまな種類の体細胞への分化が可能な多能性幹細胞に変換される。したがって、誘導多能性幹細胞は、胚性幹細胞の倫理と生産性の問題および、成体幹細胞の分化限界をすべて克服することができる革新的な技術で評価される。
【０００４】
しかし、ウイルス由来ベクターを細胞に使用することは安全性の懸念を発生させる。また、ウイルス由来のベクターを含有している誘導多能性幹細胞から分化された細胞や組織を人体に移植する場合、腫瘍を誘発させる危険もある。
これらの問題点を解決し、革新的な誘導多能性幹細胞を利用して、有用な細胞治療剤を開発するには、ウイルス由来ベクターのような伝達手段を使用していないままDNAやRNA、ポリペプチド、ナノ粒子などのような物質を、単一の細胞に直接注入することができる、新しい細胞の変換技術が必要である。
【０００５】

ウイルス由来のベクターのような伝達手段を使用していない細胞の変換のための従来の方法は、細胞に電界を加えたり、細胞を化学的に処理したり、機械的せん断力を加えて細胞膜に損傷を加え、細胞外液に含まれていされた遺伝子などの物質が細胞内に流入するようにして、細胞の自己治癒力に依存して、破損された細胞壁が復元され、細胞が死なずに生存することを期待する方法が主流となっている。

【０００６】

粒子の衝突方法やマイクロ注入方法、電気穿孔方法のような様々な細胞に変換する方法が開発されている。マイクロ注入方法を除いて、これらの方法は、多数の遺伝子やポリペプチドを多量に基づく統計確率的な（bulk stochastic）プロセスによって任意に細胞に流入させる方法に基づいている。

細胞を変換させるために、現在最も広く使用されているこのような従来のバルク電気穿孔（bulk electroporation）の方法では、注入量の精密な制御が不可能であるという短所がある。

【０００７】

したがって、個々の細胞にマイクロ流体力学に基づいて、電気穿孔に物質を注入する（microfluidics-based electroporation）の方法が、新しい技術として登場している。これらのマイクロ流体電気穿孔法は、バルク電気穿孔法に比べて穿孔するための電圧を下げることができるという点、細胞の変換効率が高い点、細胞生存率を大幅に引き上げることができるという点などを含む、いくつかの重要な利点がある。

【０００８】

2011年に、ナノチャンネルに隣接して位置する細胞膜の狭い領域を、非常に大きな局所的電界に露出させるナノチャンネル電気穿孔技術が一般に公開されたことがある（L. James Lee et al、"Nanochannel eletroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cell"、Nature Nanotechnology vol。6 November 2011、www.nature.com / naturenanotechnology published online 16、October、2011、）。

【０００９】

前記ナノチャンネル電気穿孔装置は、ナノチャネルを介して接続される2つのマイクロチャネルを含んでいる。変換させる細胞は、ナノチャンネルにかかっているマイクロチャネルに満たされて、別のマイクロチャネルは、注入される物質が満ちている。マイクロチャネル - ナノチャンネル - マイクロチャネルに関連する構造は、それぞれの細胞を正確な位置に置かれるようにする。数ミリ秒間持続される1つ以上の電圧パルスは、2つのマイクロチャンネル間に印加されて、細胞の変換を引き起こす。注入量の調節は、持続時間とパルスの数を調整することにより、行われる。

【００１０】

ところで、上記の先行技術論文に記載されたナノチャネルの電気穿孔注入装置は、チップの基板上に刻印されて形成された樹脂で製作されたマイクロチャネルとナノチャンネルを覆ってくれるポリジメチルシロキサンで製作されたカバープレートを含んでいる。

上記ネイチャーナノテクノロジーに掲載された先行技術論文に記載されたナノチャネルの電気穿孔装置は、刻印されて形成される高分子樹脂で製作されたマイクロチャネルとナノチャネル層とポリジメチルシロキサンカバープレートの間に隙間の発生を避けることができない。このような理由は、機械的物性が互いに異なる材料で作られたカバープレートとチャンネル形成層間のシールは絶対に完全できないからである。

【００１１】

また、ポリジメチルシロキサンで製作されたカバープレートと高分子樹脂で製作されたマイクロチャネルとナノチャンネルの機械的寸法安定性が非常に低いため、上記のカバープレートとチャンネル層間の密封は完全することができない。したがって、上記カバープレートとチャンネル層間に隙間を簡単に作成することができる。

このように発生する隙間は、溶液の浸透を可能にして、ナノチャンネル電気穿孔チップを汚染させる一方のチャネルとの間の細胞の移動と細胞との物質の注入のために加わる圧力チャイナ電界に、様々な誤差を発生させることができる。

【００１２】
したがって、この技術分野では、以上のような先行技術の問題点を克服するために、個々の細胞に運搬体の使用なしで物質を注入するに当たり、誤差なく多種の物質を個々の細胞ごとに一時に注入する新しい技術の開発が、この長い間期待されている。
本発明者は、ガラスのような硬い固体内部に、多数のマイクロチャネルと、これ接続されている多数のナノチャンネルを形成して、これらに電位差を与えることができる電極を設置することにより、使用される材料の寸法安定性問題や接合部位のシールの不完全なことにより発生する隙間に起因する従来の技術のいくつかの問題点を克服すれば、細胞の変換に必要な物質を、個々の細胞ごとに注入して細胞を必要に応じて変換させることがあることに着目して、本発明の変換された細胞と細胞を含有する組成物を発明するに至った。
【発明の概要】
【解決しようとする課題】
【００１３】
したがって、本発明の狙いは、細胞に物質を注入して細胞を変換させる過程で、ベクトルのような別の運搬体を使用しないことにより、運搬体が含有されていないまま変換された細胞とこれらの細胞を含有する組成物を提供するものである
【課題の解決手段】
【００１４】
以上、本発明の狙いは、固体内部に形成させた細胞が通過する第1通路;上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成される第2の通路;前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を含む、物質注入装置を使用して、前記第1通路に細胞を含有する流体を流入させながら、前記第2の通路には、タンパク質、ペプチド糖蛋白質、リポタンパク質、DNA、RNA、アンチセンスRNA、siRNA、ヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、染色体、ウイルス、薬物、有機化合物、無機化合物、ヒアルロン酸、コラーゲン、細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソム、リボソームまたはナノ粒子またはこれらの混合物から選択される物質を流入させて、前記第2の通路に電位差を加え、前記第1の通路と第2通路が接続されてポイントを通過する単一の細胞に、上記の物質を運搬体の使用なしで注入することにより、細胞に物質を注入して、変換された細胞とそれを含む組成物を提供することにより達成することができる。
運搬体なしに細胞に物質を直接注入して、変換された本発明の細胞は、原核細胞または真核細胞で変換された細胞であることができる。より詳細には、上記原核細胞は、細菌（bacteria）または古細菌（archaea）であることができ、上記真核細胞は、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞であることができる。
また、本発明の一つの実施例に基づいて担体なしで物質を注入して変換させた動物細胞は、体細胞、生殖細胞または幹細胞であることができる。具体的には、上記体細胞は、上皮細胞、筋肉細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、赤血球、白血球、リンパ球または粘膜細胞であることができる。また、前記生殖細胞は、卵子または精子であることができる。また、前記幹細胞は、成体幹細胞または胚性幹細胞であることができる。
【００１５】
また、本発明の一つの実施例に基づいて担体なしで物質を直接注入して、変換された成体幹細胞は、造血幹細胞、中葉幹細胞、神経幹細胞、繊維芽細胞、肝臓芽細胞、網膜芽細胞、脂肪由来幹細胞、骨髄由来幹細胞、臍帯血由来の幹細胞、臍帯由来幹細胞、胎盤由来幹細胞、正由来幹細胞、末梢血管由来幹細胞または羊膜由来幹細胞であることができる。
本発明の変換された細胞を製造するために、運搬体の使用なしで細胞内に物質を直接注入する装置を介して細胞に注入することができる物質は、タンパク質、ペプチド糖蛋白質、リポタンパク質、DNA、RNA、アンチセンスRNA、siRNA、ヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、染色体、ウイルス、薬物、有機化合物、無機化合物、ヒアルロン酸、コラーゲン、細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソム、リボソーム、ナノ粒子、またはこれらの混合物であることができる。

【００１６】
本発明の変換細胞の製造に使用することができる装置は、大韓民国特許出願第10-2014-0191302号と第10-2015-0178130号に詳細に記載されており、これらのデバイスを使用して、細胞に物質を注入する方法は、大韓民国特許出願第10-2015-0178183号に詳細に記載されている。本発明の変換細胞を製造するために使用される装置を製作するために、細胞を含有する流体が移動する多数のマイクロチャネルとナノチャンネルをフェムト秒レーザーを使用して、ガラス固体内部に形成させることができる。
【００１７】
2000年以降、最近急速に発展したマイクロ流体力学の分野では、バイオ及び医療用流体チップのことを核心内容に扱う分野である。これらの流体チップには、複雑なマイクロ流体通路が絡み合いており、様々な表面改質が加えられて、内部電極に電圧を印加して電気化学的現象を誘導し、圧力勾配、電気浸透圧現象で流体の流れが駆動される非常に複雑な機構である。
【００１８】
流体チップが満たさなければなら様々な条件は、特にガラス素材を使用したとき、最も理想的に満足させることができ、これは長い時間、医療分野での主要な材料として使用されてきて、安全性が検証されたからである。具体的には、ガラスは、バイオ適合性、耐薬品性、電気絶縁性、寸法安定性、構造剛性、接合強度、親水性、透明性などその利点は、非常に多様である。
【００１９】
ただし、従来の流体チップの製造が、半導体工程であるエッチング工程を通じてほとんど行われるため等方性エッチングによる加工の解像度の限界、縦横比の制限、加工断面を多様にすることができない制限、エッチング後の接合工程の難しさなど研究開発分野などの小規模多品種開発など困難が大きい。
これらの困難のために、液状で型枠に注い固めするPDMS（polydimethylsilocsane）シリコーンゴムを用いた流体チップの製造が広く行われていた。PDMS材料を使用する場合は、チップ製造が容易な利点があるが、医療用材料として適用するにバイオ適合性がガラス素材よりも劣り、耐薬品性が低く、寸法安定性、構造剛性、接合強度が非常に脆弱である。
【００２０】
特に、流体チップに適用する場合には、ガラスの床面との接合強度が低く、内部流体が漏れ出やすく、高い電界を加える場合、接合面に乗って電流がリークしやすく、電気化学的な適用をするには制限が大きく続く。また、疎水性表面特性により、バイオ適合性を高めるために、表面改質が必要だが、プラズマ酸化を介して一時的な親水表面への改質をすることは可能である。
【００２１】
このような理由から、医療目的の流体チップは、特に細胞を操作する場合のような高バイオ適合性が要求される場合は、ガラス素材の適用が大きく要求される。また、細胞操作のために必要な圧力と電圧の様々な適用を安全に実行するには、構造の剛性、接合面の接合強度、寸法安定性などの高い素材が要求され、ガラス素材と同様の特性を有する透明性固体を素材として適用する必要性が大きい。
【００２２】
特に、素材の価格と特性の両方を考慮すると、実際に上のガラス素材が最も理想的な素材であるため、ガラス素材の加工と接合の難しさと限界を克服するための新しい加工方法の開発が非常に重要である。
既存のガラスを用いた流体チップの製造は、一方のガラス板の素材にマイクロ流体チャンネルをエッチングにより加工し、また、他のガラス板（主にエッチングがない評判の構造）と接合を介して行われる。
【００２３】
これらのエッチングと接合工程による製造の限界は、1）等方性エッチングによる寸法

、アスペクト比、断面形状の制約と2）ガラス - ガラス間の接合の難しさと限界が最大の問題である。特に、1ミクロンレベルでナノメートルレベルの超微細形状の製造が、上記問題点に起因事実上不可能だが、これを解決するためには、接合工程が必要ない加工工程が最も必要である。

【００２４】

フェムト秒レーザー三次元ナノ加工工程は、2004年に米国ミシガン大学で初めてフェムト秒レーザーパルスを用いたナノ加工現象を発見し、この後、三次元ナノ加工工程へと発展した。本方法を利用すると、ナノスケールの三次元構造をガラス内部に直接加工することができるようになり、接合工程がなく、流体チップを製造することができるようになる。

【００２５】

加工の便宜上、流体チップの大部分を占めるマイクロスケールの2次元流体構造は、従来のエッチング工程と接合工程で製造し、ナノ構造だけフェムト秒レーザーを用いて三次元加工する方法がより効率的である。

ただし、ナノスケールの完全な三次元構造は、フェムト秒レーザー三次元ナノ工程でのみ可能であり、既存のエッチングと接合工程では、実際に上製造が不可能である。

【００２６】

本発明の変換された細胞を製造するために担体なしで物質を細胞に注入する装置に形成された第1の通路は、両末端の中間部分の方向に内径が徐々に減少する形状を有することができる。また、前記第1通路の両末端の内径は、10μm～200μmであり、前記第1の通路の中間狭くなっている部分の内径は、3μm乃至150μmであることができる。

本発明の変換された細胞を製造するために運搬体の使用なしで細胞に物質注入する装置に形成された第2の通路は、一つ以上することができる。また、前記第2の通路の内径は、10nmないし1,000nmであることができる。

【００２７】

本発明に使用される装置では、細胞は、前記第1通路の両末端との間の圧力差や電位差によって移動することができる。例えば、前記第1通路の両末端の間に圧力差を発生させるためのポンプを使用することができる。

また、前記第1通路の両末端の間に電位差を発生させるために直流電源または交流電源を使用することができて、パルス形態の電圧を適用することもできる。特に、前記第1通路の両末端の間の電位差は、好ましくは10Vから1,000V、より好ましくは15Vから500V、最も好ましくは20Vから200Vである。

【００２８】

また、前記第1の通路と前記第2通路に加わる電位差は、好ましくは0.5Vから100V、より好ましくは0.8Vから50V、最も好ましくは1.0Vから10Vである。

本発明の変換細胞を製造するために、顕微鏡を使って、第1の通路からの細胞の動きを確認しながら、圧力差または電位差を調整して、前記細胞の前記第1の通路への流入を効果的に制御することができる。

【００２９】

また、前記第1の通路と前記第2の通路との間に加わる電位差を調整して前記細胞の内部に注入される物質の量を調節することができる。

本発明の一つの実施例によると、細胞に注入される物質の量は、（i）注入する物質に蛍光物質を標識した後、蛍光強度を測定したり、（ii）物質を注入するときに発生する電流の量を測定して計算することができる。

【発明の効果】

【００３０】

本発明の変換細胞は、細胞に運搬体なしにタンパク質、遺伝子、薬物、ナノ粒子などの様々な物質が注入された単一細胞であり、生きている細胞である。本発明の変換細胞は、培養培地に混合された組成物で提供されることができるか、ゼラチンやセルリアン・ロス、またはヒアルロン酸ポリマー、コラーゲン、脂質、エラスチン、多糖類やパックチンソ

ン物質などの天然または人工の細胞間物質に分散された組成物で提供されることができる。

【００３１】

したがって、本発明の変換された細胞とそれを含む組成物は、数々の様々な細胞治療剤の研究開発に広く使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【００３２】

【図１】図1は、本発明の変換細胞の製造に使用される装置としては、1つの物質通路（第2通路）を有する細胞内での物質の注入装置（図1a）と、6つの第2の通路を有する細胞内での物質注入装置（図1b）の装置の概略図である。

【図２】図2は、本発明の変換細胞の製造に使用され、細胞内での物質注入装置の拡大概略図である。

【図３】図3は図2の細胞内に物質を注入する装置で、第1の通路と第2通路の3次元構造（図3a）と、第1の通路と第2通路が接続されている部分の拡大図（図3b）である。

【図４】図4は、本発明の変換細胞を製造するために細胞に物質を注入する過程を説明する図である。

【図５】図5は、細胞に物質を注入して、本発明の変換細胞の製造に使用された装置の20倍拡大顕微鏡写真である。

【図６】図6は、ガラス内部に形成させた本発明の変換細胞の製造に使用された物質注入装置の外観写真である。

【図７】図7は、実施例2で人間肺胞の基底上皮細胞（ATCC CCL-185）に赤色蛍光タンパク質を注入して、本発明の変換細胞を製造する過程を撮影した蛍光顕微鏡（TE2000-U、Nikon）の写真である。

【図８】図8は、実施例3で、人間臍帯血由来の幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入して、本発明の変換細胞を製造する過程を撮影した蛍光顕微鏡写真である。

【図９】図9は、実施例4でヒト胎盤由来幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入して、本発明の変換細胞を製造する過程を撮影した蛍光顕微鏡写真である。

【図１０】図10は、実施例5で人間肺胞の基底上皮細胞（ATCC CCL-185）にプラスミドDNA（cy3）を注入した後、12時間経過した後の本発明の変換細胞を撮影した写真である。

【図１１】図11は、実施例1で、本発明の変換細胞の製造に使用される使用される装置を製作するために使用された、ガラス（23）の内部に3次元構造のマイクロチャネルとナノチャンネルを形成時にはフェムト秒レーザー加工装置の分解斜視図である。

【発明を実施するための形態】

【００３３】

以下、次の図面及び実施例を挙げて本発明の方法をより具体的に説明する。ただし、以下の図面及び実施例の説明は、本発明の具体的な実施形態を特定し、説明しようと意図するものであるだけであり、本発明の権利範囲をこれらに記載された内容に限定したり、制限解釈しようと意図するものではない。

【実施例１】

【００３４】

フェムト秒レーザーを使用して、ガラスの内部にマイクロチャネルとナノチャンネルを形成させて、本発明の変換細胞を製造する装置を製作するプロセス。

図11に示したフェムト秒レーザー（21）（Pharos、4W、190fs、frequency doubled 510 nm、DPSS chirped pulse amplification laser system）のレーザーパルスを対物レンズ（22）（from 40×to 100×、NA from 0.5 - 1.3、 Olympus＆Zeizz）を介して単一のガラス素材（23）（borosilicate glass、Corning）の外側表面から内部まで焦点が形成されるようにした。ガラス素材は、3軸ナノ線形送り機構（100×100×100μm3、±1nm、Mad City Labs、Inc. Madison、WI）に設置して、レーザーの焦点に対して三次元的に動くようにした。

【００３５】

表面に形成されたレーザーの焦点がガラス素材の内部に入ると、フォーカスが通るパスをこのようにガラス素材が削除され、三次元構造が形成されるようした。三次元構造物は、数値コードを生成して3軸ナノ線形送り機構を制御するようにし、CCDカメラ（24）を設置して監視した。構造物を加工する最小サイズは理論上10nmまで可能であり、本実施例では、約200nmの大きさに加工した。光学操作を介して処理されるチャンネルの内径は、これよりも大きくなることがあり、より小さくなることもあった。透明材料であるガラス素材の内部に三次元チャンネルを形成したので、すべての三次元形状のチャンネルを制限せずに形成させることができた。

【実施例２】

【００３６】

人間肺胞の基底上皮細胞に赤色蛍光タンパク質を注入して、変換細胞を製造する過程。

赤色蛍光タンパク質（dsRed fluorescence protein、MBS5303720）を1mg / mlの濃度に希釈し（溶媒：PBS、Hyclone、SH30028.02、pH 7.4）して懸濁液を準備した。A549（ATCC CCL-185、human alveolar basal epithelial cells）細胞を10％FBS DMEM（high glucose）を使用してincubatorで継代培養（humidified 5％CO2、37℃）した。

【００３７】

T-flaskで培養された細胞をTrypLE（gibco）を利用して分離した。1 mM EDTA in D-PBS（gibco）solutionに交換した。Debris除去のために、40μm cell strainer（BD）を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37℃incubatorで15分間染色した。1mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計（hemocytometer）を利用して、2 x 106 cells / mlの濃度でA549細胞懸濁液を準備した。

【００３８】

A549細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質（RFP）の懸濁液を、それぞれ1ml注射器に入れた、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

【００３９】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込んだ後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置により電圧をかけ、物質注入通路に沿って1.76Vが形成されるようにして、3秒間の電圧をかけた。

【００４０】

オシロスコープ（VDS3102、Owon）を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡（TE2000-U、Nikon）を介して細胞の位置を把握し、赤色蛍光タンパク質注入過程を撮影して、図7に示した。

【実施例３】

【００４１】

人間臍帯血由来の中間葉幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入して、変換細胞を製造する過程。

赤色蛍光タンパク質（dsRed fluorescence protein、MBS5303720）を1mg / mlの濃度に希釈し（溶媒：PBS、Hyclone、SH30028.02、pH 7.4）して懸濁液を準備した。人間臍帯血由来の中間葉幹細胞は、ＣＨＡ病院で分譲受け構築した細胞株を使用した。培養培地は、MEM-alpha（Gibco）、10％FBS（Hyclone）、25 ng / ml FGF-4（Peprotech）、1 ug / ml Heparin（Sigma）を使用し、humidified 5％CO2、37℃incubatorで継代培養した。

【００４２】

T-flaskで培養された細胞をTrypLE（gibco）を利用して分離した。1mM EDTA in D-PBS（gibco）solutionに交換した。Debris除去のために、40μm cell strainer（BD）を用

いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37℃incubatorで15分間染色した。1mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計（hemocytometer）を利用して、2 x 106 cells / mlの濃度で臍帯血由来の幹細胞懸濁液を準備した。

【００４３】

臍帯血由来の幹細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質懸濁液をそれぞれ1ml注射器に入れ、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。

細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

【００４４】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込んだ後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置により電圧をかけ、物質注入通路に沿って電位差が1.45Vが形成されるようにして、3秒間の電圧をかけた。オシロスコープ（VDS3102、Owon）を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡（TE2000-U、Nikon）を介して細胞の位置を把握し、赤色蛍光タンパク質注入過程を撮影して図8に示した。

【実施例４】

【００４５】

人間の胎盤由来中間葉幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入して、変換細胞を製造する過程。

赤色蛍光タンパク質（dsRed fluorescence protein、MBS5303720）を1mg / mlの濃度に希釈し（溶媒：PBS、Hyclone、SH30028.02、pH 7.4）して懸濁液を準備した。人間の胎盤由来中間葉幹細胞は、ＣＨＡ病院から分譲受け構築された細胞株を使用した。培養培地は、MEM-alpha（Gibco）、10％FBS（Hyclone）、25 ng / ml FGF-4（Peprotech）、1 ug / ml Heparin（Sigma）を使用し、humidified 5％CO2、37℃incubatorで継代培養した。

【００４６】

T-flaskで培養された細胞をTrypLE（gibco）を利用して分離した。1mM EDTA in D-PBS（gibco）solutionに交換した。Debris除去のために、40μm cell strainer（BD）を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37℃incubatorで15分間染色した。1 mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計（hemocytometer）を利用して、2 x 106 cells / mlの濃度でヒト胎盤由来中間葉幹細胞懸濁液を準備した。

【００４７】

ヒト胎盤由来幹細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質懸濁液をそれぞれ1ml注射器に入れ、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。

細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

【００４８】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込んだ後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置により電圧をかけ、物質注入通路に沿って0.87Vが形成されるようにして、5秒間の電圧をかけた。オシロスコープ（VDS3102、Owon）を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡（TE2000-U、Nikon）を介して細胞の位置を把握し、赤色蛍光タンパク質注入過程を撮影して図9に示した。

【実施例５】

【００４９】
人間肺胞の基底上皮細胞にプラスミドDNA（cy3）を注入して、変換細胞を製造する過程。
プラスミドDNA（MIR7904、Mirus）が10μｇ/20μｌ濃度で含有された溶液を準備した。人間肺胞の基底上皮細胞（A549、ATCC CCL-185、human alveolar basal epithelial cells）を10％FBS DMEM（high glucose）を使用してincubatorで継代培養（humidified 5％CO2、37℃）した。
【００５０】
T-flaskで培養された細胞をTrypLE（gibco）を利用して分離した。1mM EDTA in D-PBS（gibco）solutionに交換した。Debris除去のために、40μｍ cell strainer（BD）を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37℃incubatorで15分間染色した。1mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計（hemocytometer）を利用して、2 x 106 cells / mlの濃度でヒト肺胞の基底上皮細胞A549の懸濁液を準備した。
【００５１】
A549細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質懸濁液をそれぞれ1ml注射器に入れた、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。
細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。
【００５２】
細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込んだ後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。
この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置により電圧をかけ、物質注入通路に沿って1Vが形成されるようにして、2秒間の電圧をかけた。オシロスコープ（VDS3102、Owon）を利用して電圧を測定した。
【００５３】
Plasmid DNA注入後、細胞を回収し、96 Well Plateに注入し、200μｌに該当する培養培地を添加してくれた。バッジ添加後humidified 5％CO2、37℃incubatorで12時間培養した。以後蛍光顕微鏡（TE2000-U、Nikon）を介して赤蛍光反応を確認し、これにより、plasmid DNAが発現されたことを確認した（図10）。
図1には、1つの物質注入通路（第2通路）を有する細胞内での物質の注入装置（図1a）と6つの第2の通路を含む（図1b）、細胞に物質をする注入するための本発明の変換細胞の製造に使用された装置を示す。
【００５４】
図1aを見ると、物質を注入しようとする細胞（8）が物質注入通路である第1通路（4）を介して移動する。外部電源（20）によって物質（2）を注入する通路（第2通路）（2a）と、第1通路（4）の間に電位差が発生し、上記細胞（8）が第1の通路の中間の狭くなった部分を通過する際に、上記の細胞にかかる電位差によって、第2通路（2a）の物質（2）が前記細胞（8）に注入される。このように物質が注入された変換細胞（11）は、第1通路の排出口（5）を介して回収される。
【００５５】
図1bには、6つの第2の通路が形成された本発明に使用された物質注入装置を示した。図1bに示した本発明の装置を利用すれば、6つの物質を一度に細胞に注入することができる。
図1a及び図1bで第2の通路と、第1の通路との間にかかるそれぞれの電位差を調節することにより、注入する各物質の量を制御することができる。
【００５６】
図2は、2つの第2の通路を備えた本発明に使用される物質注入装置の平面透視図である

。図2に、細胞を含む溶液の流入と流出通路（4）、前記細胞に注入する物質の流入と流出通路（6、7）、物質が注入された変換細胞を回収する通路（5）、上記細胞を含む溶液の流入と流出通路（4）と、前記物質が注入された細胞を回収する通路（5）のそれぞれと両末端が接続されており、中間部分が狭い第1通路（1）、前記第1通路（1）の中間部分で前記第1通路に接続された二つの第2通路（2,3）を示した。

【００５７】

細胞一つが第1通路（1）の中間の狭くなった部分を通過するとき、前記第1通路の内壁と密着される。これらの細胞と第1通路（1）の内壁との密着によって第1通路（1）と第2通路（2,3）の間の電位差が弱まることが最小限に抑えられる。第1通路の中央部分を過ぎると再び広くなりながら物質が注入された変換細胞が排出される。

第2通路（2,3）の末端は、細胞に物質を注入する注射針と同じような役割をする。つまり、外部電源により第2通路（2,3）に集中している伝える第2通路（2,3）と隣接する細胞の細胞膜（または細胞壁）を穿孔する機能をしながら、同時に物質を上記穿孔を介して細胞内部に浸透させる。

【００５８】

細胞を含む溶液の流入と流出通路（4）の圧力差（例えば、ポンプを使用）や電位差（外部電位差発生装置、例えば、直流電源または交流電源を使用）をかければ、細胞が第1通路（1）に流入される。第1通路（1）を通過しながら物質の注入が行われた変換細胞は、通路（5）を介して排出される。物質の流入と流出（6,7）通路には、細胞の内部に注入する物質が移動する。

【００５９】

図3は、図2に示した第1通路（1）と第2通路（2,3）を3次元的に描写した図である。図3bに示すように、第2の通路（2,3）は、第1通路（1）と接続されている。

図4は、単一の細胞に2つの物質を同時に注入する過程を示している。第1の通路の片側の入口に流入した細胞（8）は、第1の通路の中間の狭くなった部分（9）で第2通路（10）を介して2つの物質を注入された後、第1の通路の反対側流出口（11）を介して回収される。

【００６０】

図5は、本発明に使用される細胞に物質を注入する装置の20倍の顕微鏡写真である。（外部の電位差印加装置は示されていない）。

図5の左側の写真は、細胞を含む溶液の流入と流出通路（5）、前記細胞内に注入する物質の流入と流出通路（6、7）、および物質が注入された変換細胞を回収する排出通路（4）が形成された写真である。

【００６１】

図5の右側の写真は、上記図5の左側の写真に示された、細胞を含む溶液の流入と流出通路（5）と、前記物質が注入された変換細胞を回収する通路（4）のそれぞれの両末端に接続されていて、中間部分が狭い形態である第1通路（1）と、前記第1通路の中間部分で前記第1通路に接続され、物質の流入流出通路（6,7）と、それぞれ接続された二つの第2通路（2 、3）が形成されている本発明に使用されたデバイスの20倍拡大写真である。

【００６２】

図6は、ガラス状の固体内部に形成された本発明の変換細胞の製造に使用された物質注入装置の外観写真である。

図7は、人間肺胞の基底上皮細胞（A549、ATCC CCL-185）に赤色蛍光タンパク質（red fluorescence protein、RFP）を注入して、変換細胞を製造する過程を撮影した写真である。A459細胞をカルセインAM（Calcein AM）で処理して緑色蛍光を発生させる場合、タンパク質が注入された細胞が生きていると評価した。

【００６３】

図7aは、生きている（緑色蛍光）A549細胞が第1の通路の中央に位置することを示して、図7bは、第2の通路と、第1の通路との間に電位差を加えたときRFPが第2の通路を介して移動し、前記A549細胞内部に注入が開始された様子（赤色蛍光）を示し、図7cはA549細胞

内でRFPが注入されていることを明らかに示して（赤色蛍光）、図7dはRFPの注入後もA549細胞が生きていることを見せてくれ（緑色蛍光）、図7eおよび7fは、上記のプロセスを2回繰り返した場合でも、A549細胞内でRFPが正常に注入されたことを示す。

【００６４】

図8は、ヒト臍帯血の幹細胞の内部にRFPを注入して、変換細胞を製造する過程を撮影した写真である。カルセインAMを使用して、細胞が生存するかどうかを確認した。

図8aは緑色蛍光（14）を介して第1の通路の中央に位置し、ヒト臍帯血の幹細胞が生きていることを示して、図8bは、赤色蛍光（15）を介してRFPが第2の通路に入力されており、緑色蛍光を介してヒト臍帯血の幹細胞にRFP注入準備が整っていることを示しており、図8cは、第2通路の末端部分に、より明るい赤色蛍光（16）を介してRFPの注入のために電界をかけてくれた後、RFPの注入が開始されたことを示して、図8dは赤色蛍光（17）を介してヒト臍帯幹細胞内でRFPが注入されたことを示してくれて、図8eは赤色蛍光（18）を介してヒト臍帯幹細胞が第1の通路の排出口に向かって移動してことを示して、図8fは赤色蛍光（19）を介してヒト臍帯幹細胞が第1の通路から完全に排出されたことを示している。

【００６５】

図9は、ヒト胎盤由来中間葉幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入して、変換細胞を製造する過程を撮影した写真である。

図10は、人間肺胞の基底上皮細胞（ATCC CCL-185）にプラスミドDNA（cy3）を注入して12時間培養した後に撮影した変換された細胞の写真である。

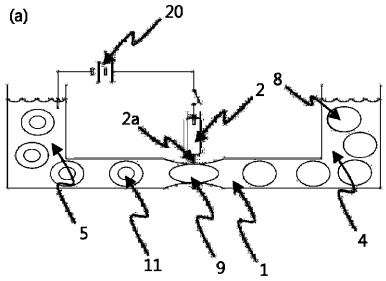
図11は、本発明の変換細胞の製造に使用された装置を製作するために使用されるフェムト秒レーザー加工装置の分解斜視図である。

【００６６】

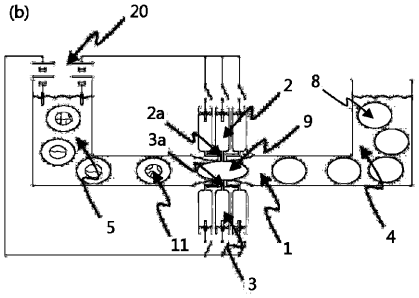
以上のように、実施例1～5と、図1～11を介して、本発明の方法を説明したが、これらはもっぱら説明をするためのもので、本発明の権利範囲をそれらのだけに限定するものではない。

次の特許請求の範囲に示した本発明の権利範囲を逸脱しなくても、多くの変形と技術的特徴の組み合わせが可能であることを、この技術分野における通常の知識を有する者であれば容易に知ることができるだろう。しかし、そのような変形は、本発明の範囲外と見なされることができず、そのようなすべての変形は、以下の請求項の権利範囲に含まれることを意図するものである。

【図１（ａ）】

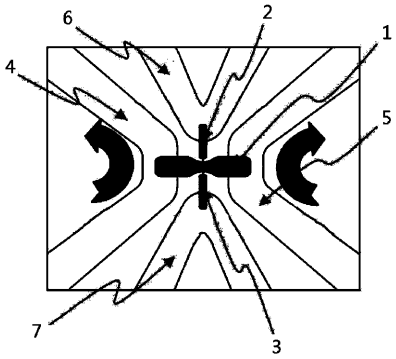


【図１（ｂ）】

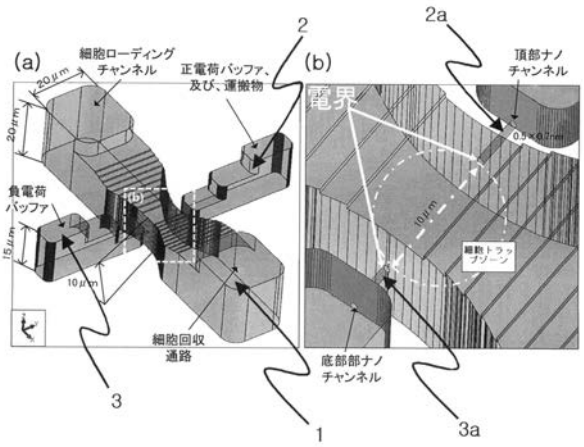


【図２】

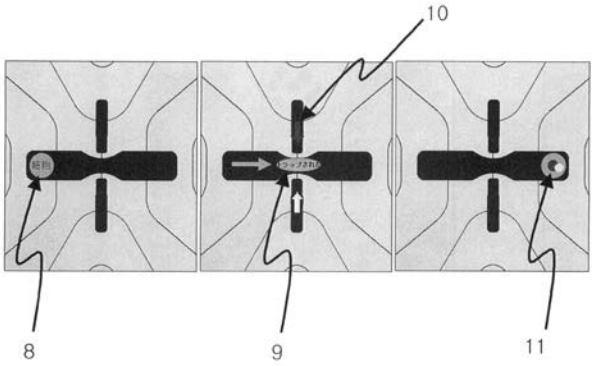
[Fig. 2]



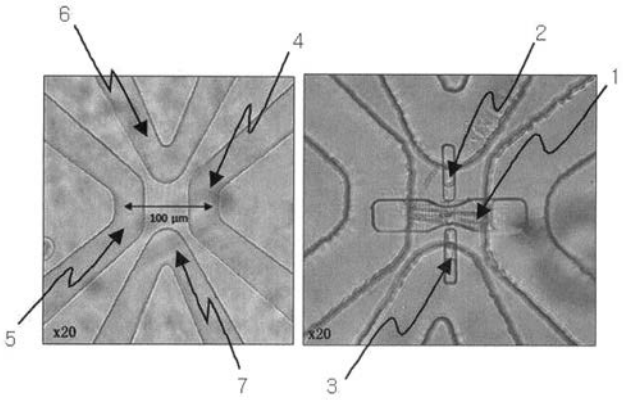
【図３】



【図４】

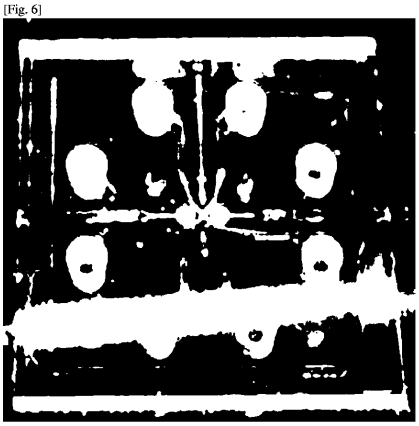


【図５】

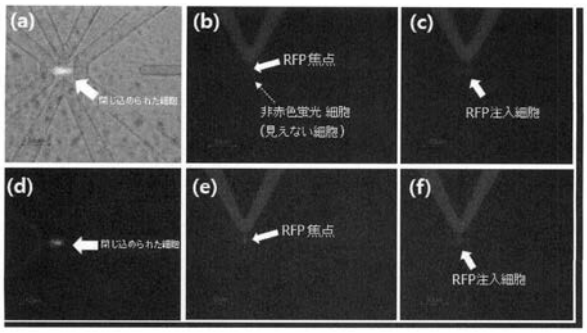


【図６】

[Fig. 6]

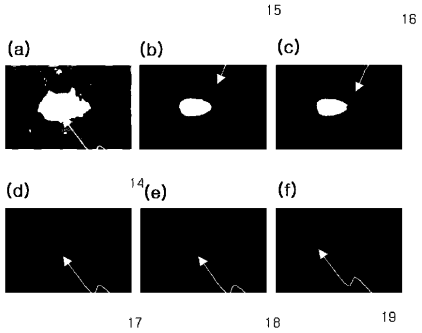


【図７】

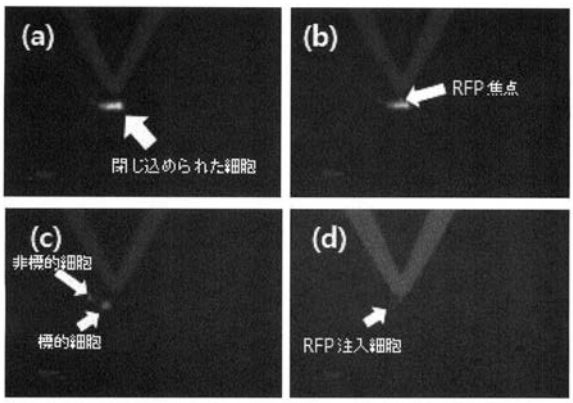


【図８】

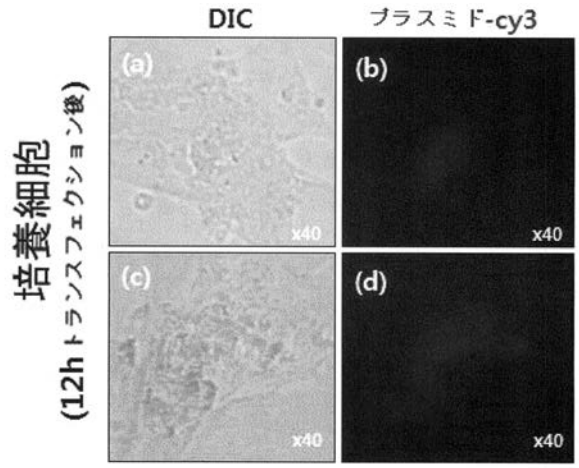
[Fig. 8]



【図９】

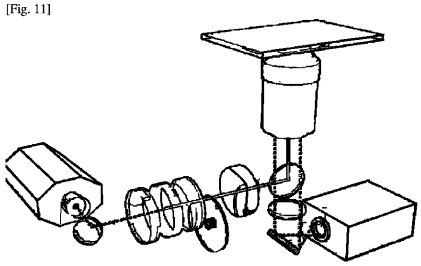


【図１０】



【図１１】

[Fig. 11]



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/014295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/87(2006.01)i, C12N 13/00(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12N 5/073(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/075(2010.01)i, C12N 5/076(2010.01)i, C12M 1/42(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N 15/87; C12N 13/00; C40B 60/12; C12N 1/20; C12N 5/073; C12N 5/074; C12N 5/075; C12N 5/076; C12M 1/42; B01L 3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: modified cell, first passage, second passage, pressure, electric potential, biomaterial

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0256047 A1 (THE OHIO STATE UNIVERSITY) 11 September 2014 See paragraphs [0042], [0056]-[0057], [0060] and [0071]; claims 1-14; figures 1-4 and 15-19.	1-14
X	BOUKANY, P. E. et al., `Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells', Nature Nanotechnology, 16 October 2011, Vol. 6, No. 11, pp. 747-754 See abstract; page 747, right column - page 750, left column; figures 1-6.	1-14
A	ZHU, T. et al., `Electroporation based on hydrodynamic focusing of microfluidics with low dc voltage', Biomedical Microdevices, February 2010, Vol. 12, No. 1, pp. 35-40 See abstract; figures 1-4.	1-14
A	WO 2012-158631 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 22 November 2012 See abstract; claims 1-10; figures 1 and 14-17.	1-14
A	US 2012-0004144 A1 (PERROUD, T. D. et al.) 5 January 2012 See abstract; claims 1-7; figures 1-3.	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	Date of mailing of the international search report
25 April 2016 (25.04.2016)	**25 April 2016 (25.04.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea	LEE, Dong Wook
Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No. +82-42-481-8163

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/014295

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014-0256047 A1	11/09/2014	None	
WO 2012-158631 A2	22/11/2012	AU 2012-255988 A1	09/01/2014
		CA 2873204 A1	22/11/2012
		CN 103649295 A	19/03/2014
		CN 103649295 B	16/09/2015
		CN 105132284 A	09/12/2015
		EP 2707474 A2	19/03/2014
		JP 2014-513984 A	19/06/2014
		KR 10-2014-0031943 A	13/03/2014
		US 2015-0044751 A1	12/02/2015
		US 2015-0197720 A1	16/07/2015
		WO 2012-158631 A3	10/01/2013
US 2012-0004144 A1	05/01/2012	US 8828736 B2	09/09/2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｍ 1/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｍ 1/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ

(54)【発明の名称】運搬体の使用なしで細胞に物質を注入して変換させた細胞（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｃｅｌｌ ｂｙ Ｐｕｔｔｉｎｇ Ｍａｔｅｒｉａｌ ｉｎｔｏ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ ｗｉｔｈｏｕｔ Ｕｓｉｎｇ Ｖｅｈｉｃｌｅ）［発明の詳細な説明］