

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 14일 (14.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/155167 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 13/00 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)
C12M 1/42 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12M 1/36 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/008755
- (22) 국제출원일: 2016년 8월 9일 (09.08.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0029707 2016년 3월 11일 (11.03.2016) KR
10-2016-0098754 2016년 8월 3일 (03.08.2016) KR
- (71) 출원인: 가톨릭관동대학교산학협력단 (CATHOLIC KWANDONG UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 25601 강원도 강릉시 범일로 579 번길 24 (내곡동, 가톨릭관동대학교), Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자: 김순학 (KIM, Soon Hag); 13589 경기도 성남시 분당구 중앙공원로 54, 214 동 1201 호(서현동, 시범우성아파트), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): 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, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

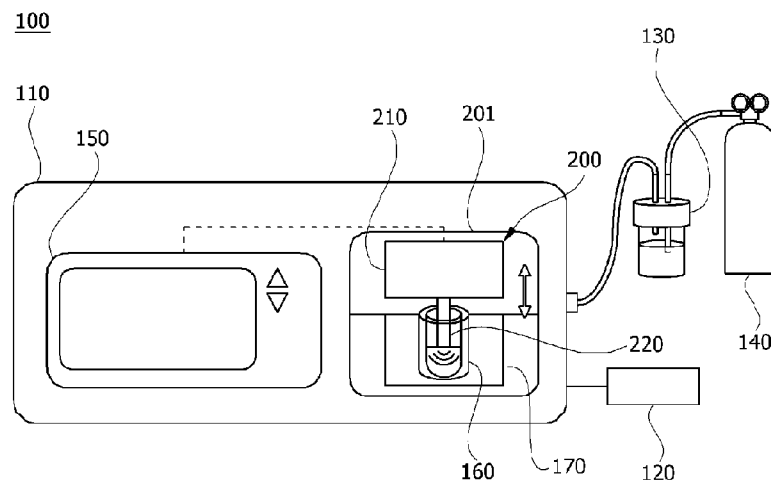
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

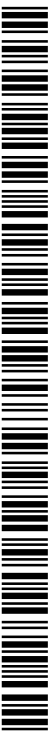
(54) Title: CELL REPROGRAMMING APPARATUS

(54) 발명의 명칭 : 세포 리프로그래밍 장치



(57) Abstract: The present invention relates to a cell reprogramming apparatus using energy which can promote an environmental transition, more specifically to a cell reprogramming apparatus applying energy, such as ultrasonic waves, laser or heat treatment, to differentiated cells to induce reprogramming into pluripotent cells of a new type having pluripotent properties, or into arbitrary differentiated cells having a different expression type from the differentiated cells.

(57) 요약서: 발명은 환경 유입을 촉진할 수 있는 에너지를 이용한 세포 리프로그래밍 장치에 관한 것으로, 보다 상세하게는 분화된 세포에 초음파, 레이저 또는 열 처리 등의 에너지를 가하여 다능성 특성을 가진 새로운 타입의 다능성 세포 또는 상기 분화된 세포와 표현형이 상이한 임의의 분화세포로의 리프로그래밍을 유도하는 효과를 갖는다.



WO 2017/155167 A1

명세서

발명의 명칭: 세포 리프로그래밍 장치

기술분야

- [1] 본 발명은 초음파, 레이저 또는 열 처리 등을 통해 환경 유입을 촉진할 수 있는 세포 리프로그래밍 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명을 지원한 국가연구개발사업은 보건복지부 첨단의료기술개발사업으로서, 과제 고유번호 HI14C3297, 허혈성 뇌손상 모델에서 마이크로 RNA 추적시스템을 이용한 생체 내 줄기세포 분포 및 신경분화 모니터링법 개발 사업이며, 주관기관인 가톨릭관동대학교 산학협력단이 지원하였다. 또한, 본 발명을 지원한 국가연구개발사업은 미래창조과학부 중견연구자지원사업으로서, 과제 고유번호 2013R1A2A2A01068140, 마이크로 RNA 기반 줄기세포분화 추적 방사선 생체분자영상법 개발 사업이며, 주관기관인 가톨릭관동대학교 산학협력단이 지원하였다.

배경기술

- [2] 체세포를 다른 종류의 세포, 전구세포 및 줄기세포 등으로 리프로그래밍하는 방법은 세포 치료, 질환 모델 및 이식에서 임상적으로 중요한 기술이다. 이러한 기술들은 현재 몇몇 다능성 유전자 및 다양한 분화 특이적 발현 유전자 등을 표적으로 하는 분자 및 화학 방법들을 통해 시도되었다. 그러나 기존의 방법은 안정성과 효율성에 있어서 지적을 받고 있으며, 과정이 복잡한 단점을 가지고 있다.
- [3] 세포는 다양한 환경에 노출되어 있으며, 이러한 환경은 세포가 세대를 거쳐 감에 따라 짧거나 혹은 긴 시간 동안에 세포의 유전자 발현에 영향을 미치며, 환경 변화에 의한 스트레스로 인해 세포의 유전자 발현 프로그램이 조절된다. 세포 배양 환경에서 배지 성분은 다양한 물질과 이온을 포함하고 있으며, 이러한 환경의 세포내 유입은 세포 변화를 촉진시킬 수 있는 획기적인 방법이 될 수 있다. 그러나 세포는 인지질로 구성된 세포막에 의해 세포 배지의 다양한 성분들 중에 극성 정도 및 크기의 다양성 때문에 세포 전달 및 유입이 잘 이루어지지 못하고 있다. 최근에 초음파에 의해 발생된 마이크로버블과 공동현상(cavitation) 효과로 인한 외부 환경의 세포내 유입 가능성이 보고되었으며, 초음파 자극이 세포 발달에 긍정적인 효과를 미친다는 보고가 있다. 또한 초음파로 인해 ATP가 유발되며 이러한 ATP가 세포막의 수용체와 반응하여 물질 수송을 유발한다는 보고도 있다.
- [4] 이러한 측면에서, 본 발명자들은 초음파와 같은 물리적 자극을 이용하여 체세포 막에 일시적인 손상을 줌과 동시에 초음파로 인한 배지의 공동현상 효과를 이용하여 다양한 물질들을 세포 내로 전달시키는 방법을 고안하여 물리적 자극에 의한 환경유입을 이용한 세포 리프로그래밍 방법, 일명 “Physical

stimulation-mediated permeation of **Environmental transition guided cellular reprogramming, ENTER 세포**”를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 분화된 세포에 초음파, 레이저 또는 열 처리 등을 통하여 환경 유입을 촉진할 수 있는 세포 리프로그래밍 장치를 제공하는 것을 해결하고자 하는 과제로 한다.

과제 해결 수단

- [6] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면에 따르면, 세포 및 배양배지를 수용하도록 마련된 배양챔버, 및 배양챔버 내의 세포 및 배양배지에 초음파, 레이저 및 열 중 적어도 하나의 물리적 자극을 가함으로써 에너지를 제공할 수 있도록 마련된 하나 이상의 기구를 포함하는 세포 리프로그래밍 장치가 제공된다.
- [7] 또한, 상기 기구는, 초음파를 조사하는 초음파 발생장치, 레이저를 조사하는 레이저 조사장치 및 온도조절장치 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [8] 또한, 세포 리프로그래밍 장치는 배양챔버 내의 습도를 조절하기 위한 습도조절장치 및 배양챔버 내의 이산화탄소량을 조절하기 위한 가스조절장치 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [9] 또한, 세포 리프로그래밍 장치는 배양챔버 내의 온도, 습도, 이산화탄소량 중 하나 이상을 조절하기 위한 입력부를 갖는 디스플레이부를 추가로 포함할 수 있다.
- [10] 또한, 기구가 초음파 발생장치를 포함하고, 디스플레이부는 초음파 주파수, 및 시간을 설정할 수 있도록 마련될 수 있다.
- [11] 또한, 배양 챔버에는 세포를 수용하는 샘플 튜브가 배치되며, 초음파 발생장치는 샘플 튜브를 향하여 승강 가능하게 마련될 수 있다.
- [12] 또한, 배양 챔버에는 샘플 튜브를 지지하기 위한 샘플 튜브 홀더가 마련될 수 있다.
- [13] 또한, 샘플 튜브는 이중 튜브 구조를 가질 수 있다
- [14] 또한, 초음파 발생장치는 초음파 트랜스듀서가 교체 가능하게 마련될 수 있다.
- [15] 또한, 온도 조절 장치는 배양 챔버 주변으로 마련된 열선을 포함할 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 복수 개의 샘플 튜브가 장착될 수 있도록 마련된 오토 샘플러 및 오토 샘플러에 탑재된 어느 한 샘플 튜브로 초음파를 발생시키도록 마련된 초음파 발생장치를 포함하는 세포 리프로그래밍 장치가 제공된다.
- [17] 또한, 오토 샘플러는 회전 가능하게 마련되고, 초음파 발생장치는 승강 가능하게 마련될 수 있다.
- [18] 또한, 오토 샘플러가 회전하는 경우, 초음파 발생장치는 상승된 상태일 수 있다.

- [19] 또한, 세포 리프로그래밍 장치는 초음파 처리된 배양배지가 저장된 배양배지 탱크와, 상기 배양배지 탱크 내의 배양배지가 공급되는 하나 이상의 배양 플라스크, 및 배양 플라스크와 샘플 튜브를 유체 이동 가능하게 연결하는 인젝션 튜브를 추가로 포함할 수 있다.
- [20] 또한, 초음파가 가해진 샘플 튜브 내의 세포는 인젝션 튜브에 의해 배양 플라스크로 이동되도록 마련될 수 있다.
- [21] 또한, 세포 리프로그래밍 장치는 복수 개의 배양 플라스크를 이송시키기 위한 이송 벨트를 추가로 포함할 수 있다.
- [22] 또한, 세포 리프로그래밍 장치는 배양 플라스크가 수용되는 인큐베이터와, 인큐베이터 내의 배양 플라스크의 배양 배지가 회수되는 회수 탱크, 및 인큐베이터 내의 배양 플라스크로 배양 배지를 공급하고, 배양 플라스크 내의 배양 배지를 회수 탱크로 회수하기 위한 서큘레이터를 추가로 포함할 수 있다.
- [23] 또한, 배양 플라스크는 양 측에 유동 통로가 각각 마련될 수 있다.
- [24] 또한, 배양 플라스크의 양 측 유동 통로는 서로 다른 높이에 위치할 수 있다.
- [25] 또한, 각각의 유동 통로에는 마개가 장착될 수 있다.
- [26] 또한, 적어도 하나의 마개는 배양 배지 유동을 위한 인젝터(injector)가 장착되도록 마련될 수 있다.
- [27] 또한, 인큐베이터에는 안착된 배양 플라스크를 흔들기 위한 셰이커(shaker)가 마련될 수 있다.

발명의 효과

- [28] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치는 다음과 같은 효과를 갖는다.
- [29] 분화된 세포에 초음파, 레이저 또는 열 처리 등의 에너지를 가하여 다능성 특성을 가진 새로운 타입의 다능성 세포 또는 상기 분화된 세포와 표현형이 상이한 임의의 분화세포로의 리프로그래밍을 유도하는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1 및 도 2는 본 발명의 제1 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치를 나타내는 개념도들이다.
- [31] 도 3은 도 1에 도시된 세포 리프로그래밍 장치를 구성하는 초음파 트랜스듀서의 다양한 실시예를 나타내는 개념도이다.
- [32] 도 4는 도 1에 도시된 세포 리프로그래밍 장치를 구성하는 샘플 튜브를 나타내는 개념도이다.
- [33] 도 5 내지 도 7은 본 발명의 제2 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치를 나타내는 개념도들이다.
- [34] 도 8은 도 5에 도시된 세포 리프로그래밍 장치를 구성하는 배양 플라스크를 나타내는 도면이다.
- [35] 도 9는 배양 플라스크에 장착되는 인젝터를 나타내는 도면이다.

[36] 도 10은 배양 플라스크에 인젝터가 장착된 상태를 나타내는 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

[37] 이하, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 리프로그래밍 장치를 첨부된 도면을 참고하여 상세히 설명한다.

[38] 또한, 도면 부호에 관계없이 동일하거나 대응되는 구성요소는 동일 또는 유사한 참조번호를 부여하고 이에 대한 중복 설명은 생략하기로 하며, 설명의 편의를 위하여 도시된 각 구성 부재의 크기 및 형상은 과장되거나 축소될 수 있다.

[39] 본 발명은 분화된 세포 및 배양 배지의 혼합물에 환경유입(environmental influx)을 촉진할 수 있는 물리적 자극을 제공하고, 상기 물리적 자극을 제공받은 혼합물을 일정 시간 배양하여 리프로그래밍된 세포를 수득하는 것을 포함하는, 세포의 리프로그래밍 방법에 관한 것이다.

[40] 본 발명은 분화된 세포에 초음파, 레이저 또는 열처리 등 환경 유입을 촉진할 수 있는 물리적 자극을 제공하면서 목적하는 리프로그래밍된 세포를 유도할 수 있는 임의의 배지에서 분화된 세포를 배양하여 다능성(pluripotency) 세포; 또는 상기 분화된 세포와 표현형이 상이한 임의의 분화세포, 예컨대, 간세포, 조골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포, 성상세포, 각질세포, 모근세포, 췌장 베타세포 또는 심근세포 등으로 세포의 리프로그래밍을 유도할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[41] 일 예로, 리프로그래밍된 세포로 다능성 세포를 목적으로 하는 경우 분화된 세포와 줄기세포 배양 배지를 혼합하고, 물리적 자극을 제공하여 일정 시간 배양함으로써 분화된 세포는 다능성 세포로 리프로그래밍될 수 있다.

[42] 다른 예로, 리프로그래밍된 세포로 분화된 세포와 표현형이 상이한 임의의 분화세포를 목적으로 하는 경우, 분화된 세포와 목적하는 분화세포의 분화유도배지를 혼합하고, 물리적 자극을 제공하여 일정 시간 동안 배양함으로써 분화된 세포는 표현형이 상이한 임의의 분화세포로 리프로그래밍될 수 있다.

[43] 본 발명의 세포의 리프로그래밍 방법은 분화된 세포에의 물리적 자극을 통해 세포 외의 환경유입에 따라 분화된 세포의 리프로그래밍이 유도되는 것으로 보인다. 이러한 환경유입은 물리적 자극을 제공받은 분화된 세포에서 배출되는 유전물질, 화학물질, 소분자 또는 엑소좀; 또는 배양 배지 성분 등의 이웃하는 분화된 세포로의 유입을 의미한다.

[44] 본 발명의 세포의 리프로그래밍 방법에 따르면, 분화된 세포로의 환경유입은 다능성 마커와 3배엽 마커를 안정적으로 발현하는 다능성 세포와 상기 분화된 세포와 표현형이 상이한 분화세포로의 리프로그래밍 방향성을 결정할 수 있는 것으로 보인다.

[45] 덧붙여, 리프로그래밍 방향성은 배양 배지의 종류에 의해 결정될 수 있는

것으로 보인다.

- [46] 즉, 상술한 바와 같이 분화된 세포에서 다능성 세포로의 리프로그래밍은 분화된 세포와 줄기세포 배양 배지의 혼합물에 물리적 자극을 제공한 경우 유도될 수 있고, 분화된 세포에서 표현형이 상이한 임의의 분화세포로의 리프로그래밍은 분화된 세포와 임의의 분화세포의 분화유도배지의 혼합물에 물리적 자극을 제공한 경우 유도될 수 있다.
- [47] 분화된 세포로의 환경유입과 관련하여, 본 발명자들은 특히 물리적 자극에 의한 세포막 손상과 세포 분비 물질(엑소솜)을 고려하였다. 즉, 초음파, 레이저, 또는 열 처리는 에너지에 의한 온도 상승, 초음파에 의해 생성되는 마이크로버블의 진동, 액체의 흐름 생성 유도 즉, 세포막을 따라 마이크로스트림 생성을 유도하여 이러한 효과로 인해 세포막에 미세한 손상을 가하고, 구멍 생성을 유도함으로써 외부 물질의 흡수가 증가하도록 하는데, 이는 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화 즉, 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화 분석은 세포막에 손상이나 막의 유동성이 증가될 경우 순간적으로 세포 내(cytosol) Ca^{2+} 농도가 증가함을 반영하여 세포막 유동성의 증가를 확인하는 것으로, 본 발명의 일 구체 예에 따르면, 초음파 처리 직후 Ca^{2+} 농도가 빠르게 증가하다가 점차 감소하여 초음파를 처리하지 않는 대조군의 수준으로 감소함을 통해 세포막의 손상이 유도된 후 회복됨을 알 수 있었다. 또한, 초음파로 인한 ATP 발생 및 증가가 다양한 세포성 스트레스에 대한 반응 및 세포막내 ATP 수용체와 반응하여 엔도사이토시스를 유도하는 것으로 알려져 있다. 즉 ATP 농도와 세포 손상 및 세포내 물질 유입과의 연관성이 있고, 이를 확인하기 위해, 초음파 처리 후 세포에서의 ATP 농도를 분석한 결과, 미처리 대조군에 비해 높은 수준으로 ATP를 농도가 높게 나타났다. 아울러, ATP 의해 영향을 받는 세포막내 이온성 P2X 수용체와 대사성 P2Y 수용체 발현 역시 초음파 처리된 세포에서 대조군 대비 활성화되었다. 이와 같은 결과는 초음파로 세포내 손상뿐만 아니라 세포 외부환경의 유입 가능성을 나타낸다.
- [48] 한편, 엑소솜은 내부에 유전정보 물질(DNA, mRNA, microRNA, protein)을 포함하고 있는 것으로 알려져 있는데, 세포막 손상을 통해 세포막 밖으로 빠져 나온 엑소솜이 주변 다른 세포에 다시 들어가는 과정을 통해 엑소솜 내부에 존재하는 유전정보 물질이 전달될 수 있다. 따라서, 초음파 처리에 의한 자극으로 인해 세포 내 저발현되거나 발현이 억제된 상태로 유지되었던 다능성 마커들의 발현이 유도 내지 촉진됨과 동시에 세포막에 손상이 생김에 따라, 상기 발현이 유도 내지 촉진된 다능성 마커들을 포함하는 세포 내부에 존재하는 엑소솜이 외부로 배출되어 주변 세포에 전달되는데 주변 세포 역시 세포막이 부분적으로 손상된 상태이기 때문에 세포막 유동성이 증가되어 세포 내부로 엑소솜이 들어가는 효율이 정상 상태에 비해 더 높을 것으로 추정되며, 이러한 엑소솜 내부에 존재하는 상기 발현 유도 내지 촉진된 다능성 관련 유전정보가 전달되어 다능성 세포가 만들어지는 것으로 생각되었다. 본 발명의

일구체예에서 다능성 세포 유도 과정 중 배양 배지를 회수하고, 배지 내 엑소좀을 추출하여 엑소좀 내부에 다능성 세포 관련 다능성 마커가 존재하는 지 확인한 결과, 알려진 다능성 마커들이 높은 발현 정도를 보이면서 확인되어 본 발명자들의 이러한 가설을 뒷받침하는 것으로 사료된다. 또한, 이러한 초음파, 레이저, 또는 열 처리에도 핵형 기형이 없이 정상인 것으로 나타났다.

- [49] 이러한 가설은 세포막 손상에 의한 엑소좀 방출 유도를 통해 다능성 세포를 제조할 수 있음을 가능케 한다.
- [50] 상기 분화된 세포로, 포유류 유래의 진피섬유아세포, 피부섬유아세포 등을 포함하는 체세포; 자궁암세포(HeLa), 간암세포(Hep3B) 등을 포함하는 암세포; 또는 폐 상피세포(L132 cell)를 포함하는 기관 내 조직세포 등을 사용할 수 있다.
- [51] 본 명세서에서, 용어 "체세포"란 성체를 구성하는 세포로서 분화능 및 자가생산능이 제한된 세포를 의미한다. 일 구현예에 따르면, 상기 체세포는 포유류의 피부, 모발, 지방을 구성하는 체세포일 수 있고, 바람직하게는 포유류 유래의 섬유아세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [52] 본 명세서에서, 용어 "다능성 세포"는 물리적 자극, 엄격한 의미에서 초음파, 레이저, 또는 열 처리 후 다능성을 획득한 세포를 말한다. 본 명세서에서 상기 다능성은 포괄적으로 줄기세포에서 발현되는 다능성 마커를 안정적으로 발현하는 상태를 의미한다. 아울러, 세 종류의 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 3배엽 마커를 발현하는 상태를 의미한다. 상기 다능성 세포는 "**Embryonic stem cell media-based Environmental transition-guided cellular reprogramming(es/ENTER)**" 세포 사용될 수 있다.
- [53] 본 발명에 따른 다능성 세포는 외부 환경에 따라 분화 유도가 잘되며, 줄기세포의 속성 대비 분화속성이 강한 전구세포(progenitor cell)의 속성이 더 강하다는 점에서 공지의 유도 만능 줄기세포와 차별화된 특징을 갖는다. 즉, 유도 만능 줄기세포와 같은 배아줄기세포를 세포 치료제로 사용하는 경우, 어느 정도 분화 과정을 거치는 준비 단계가 요구되며, 암으로 변할 수 있는 위험 요소를 내포하고, 역분화 유도인자 도입을 위해 바이러스 벡터를 사용함에 따른 안전성 문제가 대두되나, 본 발명의 다능성 세포는 유전자 변이를 위한 역분화 유도인자 또는 화학물질 등의 역분화 유도 물질을 별도로 도입하지 않고 유도되므로 다른 종류의 세포와 공동 배양을 통한 배양이 필요 없어 세포 오염(다른 세포가 섞이는 문제점) 문제점이 없고 인 비보 실험에서 암세포와 유사한 테라토마를 형성하지 않아 암 발생의 문제점이 없어 안전성이 확보되어 있다. 다시 말해, 본 발명의 다능성 세포는 유도 과정이 단순하고 짧아 자가세포를 처리하여 이식 때까지 시간을 획기적으로 단축할 수 있는 장점을 가진다.
- [54] 상기 다능성 세포는 OCT3/4, SOX2, NANOG, c-MYC, KLF4, TDGF1, SSEA4, TRA-1-60, PAX6, Nestin, Brachyury, SMA, GATA4, 또는 AFP 중 어느 하나의 다능성 마커 또는 중배엽 및 내배엽으로 이루어진 3배엽 마커 유전자를

안정적으로 발현하는 것을 특징으로 한다.

- [55] 본 명세서에서, 용어 "리프로그래밍(reprogramming)"은 분화능이 없는 세포 또는 일정 부분 분화능이 있는 세포 등 서로 다른 양태로 존재하는 분화된 세포로부터 최종적으로 새로운 유형의 세포 또는 새로운 유형의 분화잠재력을 갖는 상태로 복원 또는 전환될 수 있는 프로세스를 의미한다. 본 발명에 따르면, 분화된 세포는 환경유입을 촉진할 수 있는 물리적 자극을 받을 시 다능성 세포 또는 분화된 세포와 표현형이 상이한 목적하는 임의의 분화세포로 리프로그래밍될 수 있다.
- [56] 상기 분화세포는 예시로, PAX6, Nestin, MAP2, TuJ1, GFAP 또는 O4 중 어느 하나를 발현하는 신경세포("neuronal stem cell media-based ENTER, n/ENTER"라고 함); Desmin, Actinin, SMA, GATA4 또는 NKX2-5 중 어느 하나를 발현하는 근육세포("muscle differentiation media-based ENTER, m/ENTER"라고 함); AFP, HNF4a, CK18 또는 ALB 중 어느 하나를 발현하는 간세포("hepatocyte differentiation media-based ENTER, h/ENTER"라고 함); 또는 Pparc2, C/ebpa, aP2 또는 Fabp4 중 어느 하나를 발현하는 지방세포("adipocyte differentiation media-based ENTER, a/ENTER"라고 함)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [57] 본 명세서에서, "배양 배지"는 포괄적 의미에서 인 비트로 세포 배양에 사용되는 배지로, 본 발명에서는 줄기세포 배양 배지 또는 분화유도배지를 의미하며, 상기 줄기세포 배양 배지는 더 구체적으로 배아줄기세포 배양 배지를 의미한다. 또한, "분화유도배지"는 통상의 줄기세포의 분화세포로의 유도에 사용하는 배지로, 예를 들어, 간세포 분화유도배지, 골형성 분화유도배지, 지방세포 분화유도배지, 근육세포 분화유도배지, 성상세포 분화유도배지, 신경세포 분화유도배지, 각질세포 분화유도배지, 췌장 베타세포 분화유도배지 또는 심근세포 분화유도배지 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [58] 본 발명의 세포의 리프로그래밍 방법은 도 1을 참고하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [59] 우선, 배양 배지와 분화된 세포를 혼합하고, 상기의 혼합물에 물리적 자극을 제공한다.
- [60] 분화된 세포의 혼합물에 물리적 자극을 제공하기 전에 배양 배지에 물리적 자극을 제공하여 세포의 리프로그래밍 효율을 높일 수 있다.
- [61] 상기 물리적 자극은 초음파, 레이저 또는 열처리 중 어느 하나일 수 있다.
- [62] 상기 배양 배지에 대한 초음파 처리는 출력강도 1W/cm² 내지 20W/cm²의 초음파를 1 내지 20 분, 구체적으로, 출력강도 2W/cm² 내지 10W/cm²의 초음파를 5 내지 15 분, 더 구체적으로, 출력강도 3W/cm² 내지 7W/cm²의 초음파를 7 내지 13 분 동안 동안 동안 수행하는 것일 수 있다.
- [63] 배양 배지에 대한 레이저 처리는 300 내지 900 nm 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을 1분 내지 20분, 더 구체적으로, 상기 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을 3분

- 내지 15분, 보다 구체적으로, 상기 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을 5분 내지 10분 동안 조사하는 것일 수 있다. 상기 파장 대역은 예를 들어 400 nm, 808 nm, 880 nm의 파장을 사용할 수 있다.
- [64] 배양 배지에 대한 열 처리는 40 내지 50 °C의 온도 조건에서 5분 내지 20분 동안 수행할 수 있다.
- [65] 분화된 세포에 물리적 자극을 제공할 경우, 일정 세기로 노출시키는 것이 좋고, 이 범위를 벗어날 경우 세포 생존율이 감소할 수 있다.
- [66] 따라서, 배양 배지와 분화된 세포의 혼합물에 대한 초음파 처리는 출력강도 0.5W/cm² 내지 3W/cm²로 1 내지 5초 동안, 더 구체적으로, 출력강도 0.7W/cm² 내지 2W/cm²로 1 내지 5초 동안, 보다 구체적으로, 출력강도 0.8W/cm² 내지 1.5W/cm²로 1 내지 5초 동안 수행하는 것일 수 있다.
- [67] 배양 배지와 분화된 세포의 혼합물에 대한 레이저 처리는 300 내지 900 nm 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을 1초 내지 20초, 더 구체적으로, 상기 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을 3초 내지 10초, 보다 구체적으로, 상기 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을 4초 내지 6초 동안 조사하는 것일 수 있다. 상기 파장 대역은 예를 들어 400 nm, 808 nm, 880 nm의 파장을 사용할 수 있다.
- [68] 배양 배지와 분화된 세포의 혼합물에 대한 열 처리는 40 내지 50 °C의 온도 조건에서 1분 내지 10분 동안 노출한 후 0°C 내지 4°C의 온도 조건에서 5 내지 10초간 노출하여 수행하는 것일 수 있다.
- [69] 다음으로, 물리적 자극이 제공된 혼합물을 일정 시간 동안 배양하여 리프로그래밍된 세포를 수득한다.
- [70] 물리적 자극이 제공된 혼합물의 배양은 부유 배양(suspended culture) 또는 부착 배양(monolayer culture) 방식을 통해 다능성 마커 또는 분화 마커를 안정적으로 발현하는 스페로이드가 형성되는 기간, 즉, 2일 내지 10일 동안 수행하는 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [71] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 부유 배양은 부착 배양에 비해 더 높은 스페로이드 형성 효율을 나타낸다. 또한, 부유 배양은 부착 배양에 비해 스페로이드의 수와 크기가 더 크며, 일정한 크기 분포를 나타낸다.
- [72] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 초음파 또는 레이저 처리된 사람 피부 섬유아세포의 부유 배양 시 대략 3일째부터 다능성 마커 또는 분화 마커의 발현이 증가하거나 안정화되어 이 시기부터 리프로그래밍이 시작되는 것으로 보인다. 또한, 열 처리된 사람 피부 섬유아세포의 부유 배양 시 대략 8일째부터 다능성 마커의 발현이 증가하거나 안정화되어 이 시기부터 리프로그래밍이 시작되는 것으로 보인다.
- [73] 상기 다능성 마커, 예컨대, OCT3/4, SOX2, NANOG, c-MYC, KLF4, TDGF1, SSEA4, TRA-1-60 등이 발현됨을 통해 스페로이드가 다능성을 가짐을 확인할 수 있다. 다능성 마커의 확인은 RT-PCR 또는 면역세포화학법을 통해 분석할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [74] 또한, 본 발명의 다능성 세포는 3배엽 마커, 즉 외배엽(PAX6, Nestin), 중배엽(Brachyury, SMA), 내배엽(GATA4, AFP) 마커들을 높은 수준으로 발현하는 특징을 나타낸다.
- [75] 다른 구체예에서, 분화유도배지에서 피부 섬유아세포에 대해 물리적 자극을 제공하는 경우, 배양 후 약 2일 내지 6일 사이에 스페로이드가 형성될 수 있다.
- [76] 분화 마커는, 신경세포로 리프로그래밍되는 경우, PAX6, Nestin, MAP2, TuJ1, GFAP 또는 O4 중 하나 이상일 수 있다.
- [77] 근육세포로 리프로그래밍되는 경우, Desmin, Actinin, SMA, GATA4 또는 NKX2-5 중 하나 이상일 수 있다.
- [78] 간세포로 리프로그래밍되는 경우, AFP, HNF4a, CK18 또는 ALB 중 하나 이상일 수 있다.
- [79] 지방세포 리프로그래밍되는 경우, oil red O 염색이 되며, Pparc2, C/ebpa, aP2 또는 Fabp4 중 어느 하나일 수 있다.
- [80] 또한, 본 발명의 다능성 세포는 증식 마커 단백질인 Ki-67를 발현하여 증식능을 가지는 특징이 있다.
- [81] 또한, 상기의 리프로그래밍된 다능성 세포를 영양세포와 공배양할 경우 다능성 세포의 증식이 증가될 수 있다.
- [82] 또한, 본 발명의 세포의 리프로그래밍 방법은 상기 다능성 세포를 분화유도배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 분화유도배지의 종류에 따라 다능성 세포는 목적하는 분화세포로 분화될 수 있다.
- [83] 상기 분화유도배지로, 간세포 분화유도배지, 골형성 분화유도배지, 지방세포 분화유도배지, 근육세포 분화유도배지, 성상세포 분화유도배지, 신경세포 분화유도배지, 각질세포 분화유도배지, 췌장 베타세포 분화유도배지 또는 심근세포 분화유도배지 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [84] 이하, 전술한 세포 리프로그래밍 방법을 수행할 수 있는 세포 리프로그래밍 장치를 첨부된 도면을 참조하여 구체적으로 설명한다.
- [85] 전술한 바와 같이, 세포에 가해지는 물리적 자극은 초음파, 레이저 또는 열처리 중 어느 하나일 수 있다.
- [86] 도 1 및 도 2는 본 발명의 제1 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치(100)를 나타내는 개념도들이고, 도 3은 도 1에 도시된 세포 리프로그래밍 장치를 구성하는 초음파 트랜스듀서(220-1, 220-2, 220-3)의 다양한 실시예를 나타내는 개념도이며, 도 4는 도 1에 도시된 세포 리프로그래밍 장치를 구성하는 샘플 튜브(160)를 나타내는 개념도이다.
- [87] 도 1 및 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치(100)는 세포 및 배양배지를 수용하도록 마련된 배양챔버(110), 및 배양챔버(110) 내의 세포 및 배양배지에 초음파, 레이저 및 열 중 적어도 하나의 물리적 자극을 가함으로써 에너지를 제공할 수 있도록 마련된 하나 이상의

기구를 포함한다.

- [88] 또한, 상기 기구는, 초음파를 조사하는 초음파 발생장치(200), 레이저를 조사하는 레이저 조사장치 및 온도조절장치(120) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [89] 또한, 세포 리프로그래밍 장치(100)는 배양챔버(110) 내의 습도를 조절하기 위한 습도조절장치(130) 및 배양챔버(110) 내의 이산화탄소량을 조절하기 위한 가스조절장치(140) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [90] 또한, 세포 리프로그래밍 장치(100)는 배양챔버(110) 내의 온도, 습도, 이산화탄소량 중 하나 이상을 조절하기 위한 입력부를 갖는 디스플레이부(150)를 추가로 포함할 수 있다.
- [91] 또한, 기구가 초음파 발생장치(200)인 경우, 디스플레이부(150)는 초음파 주파수, 및 시간을 설정할 수 있도록 마련될 수 있다.
- [92] 구체적으로, 본 발명은 세포 및 배양 배지를 수용할 수 있는 배양챔버(110) 및 상기 배양챔버(110)의 일측에 배치되고, 상기 세포 및 배양 배지에 환경 유입(environmental influx)을 촉진할 수 있는 에너지를 제공할 수 있는 기구를 포함한다. 또한, 리프로그래밍된 세포는 분화된 세포 및 배양 배지의 혼합물에 환경 유입을 촉진할 수 있는 에너지를 제공하고, 상기 에너지를 제공받은 혼합물을 일정 시간 배양하여 분화된 세포에서 유도된 것인, 분화된 세포에서 리프로그래밍된 세포의 유도 장치를 제공한다.
- [93] 상기 배양챔버(110)는 통상 세포 배양에 사용 가능한 챔버를 의미할 수 있다. 또한, 배양챔버(110)는 세포 배양이 가능하도록 온도, 습도, 및/또는 가스 등이 조절 가능한 챔버일 수 있다. 예를 들어, 배양챔버(110)는 온도 제어부와 이산화탄소 제어부를 구비하고, 배양챔버(110) 내 세포 배양 조건은 목적과 세포의 종류에 따라 당업자 수준에서 적절히 조절될 수 있다.
- [94] 또한, 상기 배양챔버(110)는 세포의 부유 배양 또는 단층 배양 방식을 사용할 수 있어, 이러한 배양이 가능한 구조로 되어 있는 것이 좋다. 예컨대 부유 배양을 위한 교반기가 구비된 배양챔버일 수 있다.
- [95] 상기 환경 유입 촉진할 수 있는 에너지를 제공할 수 있는 장치는 초음파를 조사할 수 있는 초음파 발생장치(200), 레이저를 조사할 수 있는 레이저 발생장치(미도시), 또는 온도조절장치(120)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 온도조절장치(120)는 후술할 샘플 튜브 홀더(170)를 통해 그 기능이 구현될 수도 있다.
- [96] 상기 초음파 발생장치(200)는 주파수가 10kHz 내지 100MHz인 초음파를 발생하는 공지의 초음파 장치라면 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 초음파 발생장치는 초음파 발생부(Ultrasonic generator)(210) 및 초음파 트랜스듀서(Ultrasonic transducer)(220: 220-1, 220-2, 220-3)를 포함할 수 있다. 또한, 초음파 발생장치(200)는 초음파 트랜스듀서(220)가 교체 가능하게 마련될 수 있다. 또한, 초음파 발생장치(200)는 초음파 챔버(201) 내에 마련될 수 있다.
- [97] 상기 레이저 발생장치는 300 내지 900 nm 파장 대역의 펄스형 레이저 빔을

발생하고, 1 내지 15W 출력으로, 펄스 지속 시간이 1ms 내지 900ms이고, 주파수가 1 내지 100Hz인 레이저 장치를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [98] 온도조절장치(120)는 -40°C 내지 99.9°C 범위의 온도 조절이 가능한 공지의 온도조절장치를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 온도조절장치(120)는 배양 챔버 주변으로 마련된 열선일 수도 있다.
- [99] 본 발명의 분화된 세포에서 리프로그래밍된 세포의 유도 장치는 배양 배지와 분화된 세포의 혼합물에 상기 초음파 발생장치, 레이저 발생장치, 또는 온도조절장치를 이용하여 초음파, 레이저, 또는 열 처리하고 일정 시간 배양하여 다능성 세포 또는 분화세포로의 리프로그래밍을 유도할 수 있다. 이때, 리프로그래밍 효율을 높이기 위해 배양 배지를 분화된 세포와 혼합하기 전에 배양 배지에 초음파, 레이저, 또는 열 처리를 미리 수행할 수 있다.
- [100] 또한, 세포 리프로그래밍 장치(100)는, 배양 챔버의 습도를 조절하기 위한 습도조절장치(130)를 포함할 수 있다. 전술한, 온도조절장치(120)와 습도조절장치(130) 및 가스조절장치(이산화탄소 제어부)(140)를 통해, 배양 챔버(110) 내의 온도, 습도, 및 이산화탄소량을 적절히 조절할 수 있다.
- [101] 또한, 상기 세포 리프로그래밍 장치(100)는, 전술한 온도, 습도, 및 이산화탄소량을 조절하기 위한 디스플레이부(150)를 포함할 수 있다. 사용자는 디스플레이부를 조작함으로써, 배양챔버(110) 내의 온도, 습도, 및 이산화탄소량을 조절할 수 있다. 상기 디스플레이부(150)는 터치 입력 방식 또는 버튼 입력 방식의 입력부를 포함할 수 있다.
- [102] 또한, 초음파 챔버(201)에는 세포를 수용하는 샘플 튜브(160)가 배치되며, 초음파 발생장치(200)는 샘플 튜브(160)를 향하여 승강 가능하게 마련될 수 있다. 또한, 초음파 챔버(201)에는 샘플 튜브(160)를 지지하기 위한 샘플 튜브 홀더(170)가 마련될 수 있다. 또한, 샘플 튜브(160)는 이중 튜브 구조를 가질 수 있다. 또한, 샘플 튜브 홀더(170)는 온도 조절 기능을 가질 수 있고, 예를 들어, 히트(haet) 블록으로 마련될 수 있다.
- [103] 구체적으로, 배양 챔버(110)는, 초음파가 가해지는 세포를 수용하는 샘플 튜브(sample tube)(160)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 초음파 발생장치(200)는 상기 샘플 튜브(160) 내로 초음파를 발생하도록 배치되며, 이에 따라 초음파 챔버(201)에는 샘플 튜브(160)를 지지하기 위한 샘플 튜브 홀더(sample tube holder)(170)가 마련된다. 한편, 샘플 튜브(160)의 입/출입 및 다양한 크기의 샘플 튜브(160)에 대응할 수 있도록, 상기 초음파 발생장치(200), 구체적으로 초음파 트랜스듀서(220)는 승강 가능하게 마련될 수 있다. 또한, 상기 디스플레이부(150)를 조작함으로써, 초음파 발생장치(200), 특히, 초음파 트랜스듀서(220)를 상승 또는 하강시킬 수 있다.
- [104] 또한, 상기 초음파 트랜스듀서(220)가 승하강 가능하게 장착되는 이송부(230)는, 하강시 샘플 튜브(160)의 입구를 막도록 마련될 수 있다. 또한,

초음파 챔버(201) 내의 온도, 습도, 및 가스 수준을 유지시키기 위하여, 상기 초음파 발생장치(200) 및 샘플 튜브(160)를 둘러싸는 뚜껑(111)이 마련될 수 있다. 상기 뚜껑(111)은 개폐 가능하게 장착될 수 있으며, 유리 또는 투명 수지와 같은 투명한 재질로 형성될 수 있다.

- [105] 도 3을 참조하면, 초음파 발생장치(200)는 샘플 튜브의 크기 및 초음파의 방사 특성에 따라 다양한 종류의 초음파 트랜스듀서(220-1, 220-2, 220-3)가 교체 가능하게 장착될 수 있다.
- [106] 도 4를 참조하면, 샘플 튜브(160)는 이중 튜브(161, 162) 구조를 가질 수 있다. 또한, 샘플 튜브 홀더(170) 내부에 샘플 튜브(160)가 삽입될 수 있다. 이때, 샘플 튜브(160)는 내화성 및 내열성이 우수한 재질(예를 들어, 수지 재질)로 형성될 수 있고, 샘플 튜브 홀더(170)가 샘플 홀더를 둘러싸에 따라 방음 효과를 구현할 수 있다. 구체적으로, 상기 샘플 튜브 홀더(170)는 세포 오염 발지를 위해 밀폐된 공간으로 마련되는 것이 바람직하며, 초음파로 인한 소음이 차단될 수 있는 방음 기능이 포함되는 것이 바람직하다. 한편, 샘플 튜브 홀더(170)는 온도 조절 장치(예를 들어, 열선)의 기능을 수행하도록 마련될 수도 있다.
- [107] 도 5 내지 도 7은 본 발명의 제2 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치(300)를 나타내는 개념도들이고, 도 8 및 도 10은 세포 리프로그래밍 장치(300)를 구성하는 배양 플라스크(180)를 나타내는 도면이다.
- [108] 도 5를 참조하면, 도 1 내지 도 4를 설명한 세포 리프로그래밍 장치(100)는 대형 자동화 설비에 적용이 가능하다.
- [109] 도 5 및 도 6을 참조하면, 본 발명의 제2 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치(300)는 복수 개의 샘플 튜브(160)가 장착될 수 있도록 마련된 오토 샘플러(500) 및 오토 샘플러(500)에 탑재된 어느 한 샘플 튜브로 초음파를 발생시키도록 마련된 초음파 발생장치(400)를 포함한다.
- [110] 또한, 오토 샘플러(500)는 회전 가능하게 마련된다. 또한, 상기 초음파 발생장치(400)는 제1 실시예에서와 마찬가지로, 초음파 발생부(410)와 초음파 트랜스듀서(420) 및 이송부(430)를 포함한다. 이때, 초음파 트랜스듀서(420)는 승강 가능하게 마련될 수 있다.
- [111] 또한, 오토 샘플러(500)가 회전하는 경우, 초음파 발생장치(400)는 상승된 상태일 수 있다.
- [112] 또한, 세포 리프로그래밍 장치(300)는 초음파 처리된 배양배지가 저장된 배양배지 탱크(330)와, 상기 배양배지 탱크(330) 내의 배양배지가 공급되는 하나 이상의 배양 플라스크(180), 및 배양 플라스크(180)와 샘플 튜브(160)를 유체 이동 가능하게 연결하는 인젝션 튜브(312)를 추가로 포함할 수 있다.
- [113] 또한, 초음파가 가해진 샘플 튜브(160) 내의 세포는 인젝션 튜브(312)에 의해 배양 플라스크(180)로 이동되도록 마련될 수 있다.
- [114] 또한, 세포 리프로그래밍 장치(300)는 복수 개의 배양 플라스크(180)를 이송시키기 위한 이송 벨트(320)를 추가로 포함할 수 있다.

- [115] 또한, 세포 리프로그래밍 장치(300)는 배양 플라스크(180)가 수용되는 인큐베이터(600)와, 인큐베이터(600) 내의 배양 플라스크(180)의 배양 배지가 회수되는 회수 탱크(610), 및 인큐베이터(600) 내의 배양 플라스크(180)로 배양 배지를 공급하고, 배양 플라스크(180) 내의 배양 배지를 회수 탱크(610)로 회수하기 위한 서큘레이터(620)를 추가로 포함할 수 있다.
- [116] 또한, 배양 플라스크(180)는 양 측에 유동 통로가 각각 마련될 수 있고, 또한, 배양 플라스크의 양 측 유동 통로는 서로 다른 높이에 위치할 수 있다. 또한, 각각의 유동 통로에는 마개(181, 182)가 장착될 수 있다. 또한, 적어도 하나의 마개(182)는 배양 배지 유동을 위한 인젝터(injector)(191)가 장착되도록 마련될 수 있다.
- [117] 구체적으로, 제2 실시예와 관련된 자동 세포 리프로그래밍 장치(300)는, 복수 개의 샘플 튜브가 장착될 수 있는 오토 샘플러(auto sampler)를 포함한다. 상기 오토 샘플러는 회전 가능하게 마련된다.
- [118] 또한, 전술한 초음파 발생장치(400)가 마련된다. 여기서 상기 초음파 발생장치(400)는 오토 샘플러(500)에 탑재된 어느 한 샘플 튜브 내부에 초음파를 발생시킬 수 있도록 배치된다. 예를 들어, 초음파 발생장치(400)의 위치는 고정적일 수 있다. 물론, 전술한 바와 같이, 초음파 발생장치(400)는 이송부(430) 등을 통해, 높이 방향을 따라 상승 및 하강 가능하도록 마련될 수 있다.
- [119] 예를 들어, 상기 오토 샘플러(500)가 회전하는 과정에서, 상기 초음파 발생장치(400)(구체적으로, 초음파 트랜스듀서)는 상승된 상태일 수 있고, 위치된 샘플 튜브(160)로 초음파를 발생하는 과정에서, 상기 초음파 발생장치(400)(구체적으로, 초음파 트랜스듀서)는 하강된 상태일 수 있다.
- [120] 이때, 오토 샘플러(500)가 회전함에 따라, 복수 개의 샘플 튜브(160)가 초음파 트랜스듀서(420) 측으로 이동되고, 초음파 트랜스듀서(420)는 위치된 샘플 튜브(160)로 초음파를 발생시킨다. 즉, 사용자가 오토 샘플러(500)에 복수 개의 샘플 튜브를 탑재시키면, 각각의 샘플 튜브(160)는 오토 샘플러(500)에 의해, 차례로 초음파 트랜스듀서(420)로 이동되고, 샘플 튜브(160)의 내의 세포에 초음파가 가해질 수 있다.
- [121] 또한, 초음파가 가해진 세포는 인젝션 튜브(injection tube)(312)('제2 인젝션 튜브'라고도 함)를 통해 배양 플라스크(180)(Culture flask) 측으로 이송될 수 있다. 즉, 오토 샘플러(500)의 회전 과정에서, 어느 한 샘플 튜브(160)에는 초음파가 가해질 수 있고, 초음파가 가해진 샘플 튜브(160) 내의 세포는 인젝션 튜브(312)에 의해 배양 플라스크(180) 측으로 이동될 수 있다.
- [122] 제1 실시예에서 설명한 바와 같이, 제2 실시예와 관련된 자동 세포 리프로그래밍 장치(300)에서도, 내부 온도, 가스, 습도 등이 조절될 수 있으며, 외부와 밀폐된 장치(무균 시설)로 구현될 수 있다. 또한, 초음파 트랜스듀서(420) 역시, 레이저 또는 열 충격(heat shock)을 가할 수 있는 히트 스틱(heat stick)으로 용도 변경이 가능하다.

- [123] 또한, 상기 자동 세포 리프로그래밍 장치(300)에는 초음파 처리된 배양배지가 저장된 배양배지 탱크(330)(media tank)가 마련된다. 상기 배양배지 탱크(330) 내의 배양 배지는 제1 인젝션 튜브(311)를 통해 배양 플라스크(180)로 공급된다. 한편, 복수 개의 배양 플라스크(180)는 이송 벨트(moving belt)(320)와 같은 이송부에 의해 오토 샘플러(500) 측에서 인큐베이터(600) 측으로 이송된다. 또한, 배양배지 탱크(330) 내에는 하나 이상의 초음파 트랜스듀서(420)가 마련된다.
- [124] 또한, 상기 자동 세포 리프로그래밍 장치(300)에는 배양 플라스크(180) 내의 배양 배지가 회수되는 회수 탱크(610)(waste tank)가 추가로 마련될 수 있다. 배양 배지의 초음파 처리와 관련하여, 초음파 처리 장치(400)가 배양배지 탱크(330)에 마련되고, 하나 이상의 초음파 트랜스듀서(420)를 통해 배양배지 탱크(330) 내의 배양 배지로 초음파를 발생시킨다. 이때, 초음파의 강도 및 시간을 설정 및 조절하기 위한 디스플레이부(150, 도 1 참조)가 마련될 수 있다. 또한, 초음파가 인가되는 시간을 카운트하기 위한 타이머가 마련될 수 있다.
- [125] 이때, 인큐베이터(600) 내의 배양 플라스크(180)로 배양 배지를 공급하고, 배지 교환시간이 되면, 배양 플라스크(180) 내의 배양 배지를 회수 탱크(610)로 회수하기 위한 서큘레이터(620)(Circulator)가 마련될 수 있다. 상기 서큘레이터(620)는, 타이머(621)에 설정된 배지 교환시간이 경과하면, 배양 플라스크(180) 내의 배양배지를 회수 탱크(610)로 회수시키도록 마련되고, 초음파 트랜스듀서(420)에 의해 초음파가 처리된 배양배지를 배양배지 탱크(330)에서부터 각각의 배양 플라스크(180)로 서큘레이터(620)(Circulator)로 공급하도록 마련되었다.
- [126] 또한, 인큐베이터(600)에는 안착된 배양 플라스크를 흔들기 위한 셰이커(shaker)(601)가 마련될 수 있다. 예를 들어, 셰이커(601)는 배양 플라스크를 시소와 같이 흔들도록 마련될 수 있다.
- [127] 한편, 상기 인큐베이터(600)는 제1 실시예에서 설명한 배양 챔버(110)와 마찬가지로, 내부 온도, 가스, 습도들이 설정 및 조절될 수 있으며, 외부와 밀폐된 장치(무균 시설)로 구현될 수 있다.
- [128] 도 8 내지 도 11을 참조하면, 배양 플라스크(180)는 인젝션 튜브 측 및 인큐베이터(600) 측에서 자동적으로 배지 주입 및 회수가 가능하도록 양 측에서 각각 도킹 가능한 구조를 가질 수 있다. 도 8 및 도 10을 참조하면, 배양 플라스크(180)의 양 측(예를 들어, 앞/뒤)에는 각각 유동 통로가 마련될 수 있다. 각각의 유동 통로에는 고무 또는 수지 재질의 마개(181, 182)가 마련될 수 있다. 특히, 도킹되는 부분은 고무 재질로 형성됨에 따라 배양 배지가 밖으로 나오지 않게 마련될 수 있다. 특히, 배지 회수 시 적정량만을 회수할 수 있도록 도킹되는 부분의 높이가 조절되어 있다. 예를 들어, 배지 폐수 시에는 뒤쪽 유동 통로의 높이까지의 배지가 회수될 수 있다. 또한, 도 9 및 도 10을 참조하면, 적어도 하나의 마개는 배양 배지 유동을 위해, 인젝터(191)와 결합하도록 마련될 수 있다.

- [129] 위에서 설명된 본 발명의 바람직한 실시예는 예시의 목적을 위해 개시된 것이고, 본 발명에 대한 통상의 지식을 가지는 당업자라면 본 발명의 사상과 범위 안에서 다양한 수정, 변경, 부가가 가능할 것이며, 이러한 수정, 변경 및 부가는 하기의 특허청구범위에 속하는 것으로 보아야 할 것이다.

산업상 이용가능성

- [130] 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 리프로그래밍 장치는, 분화된 세포에 초음파, 레이저 또는 열 처리 등의 에너지를 가하여 다능성 특성을 가진 새로운 타입의 다능성 세포 또는 상기 분화된 세포와 표현형이 상이한 임의의 분화세포로의 리프로그래밍을 유도하는 효과를 갖는다.

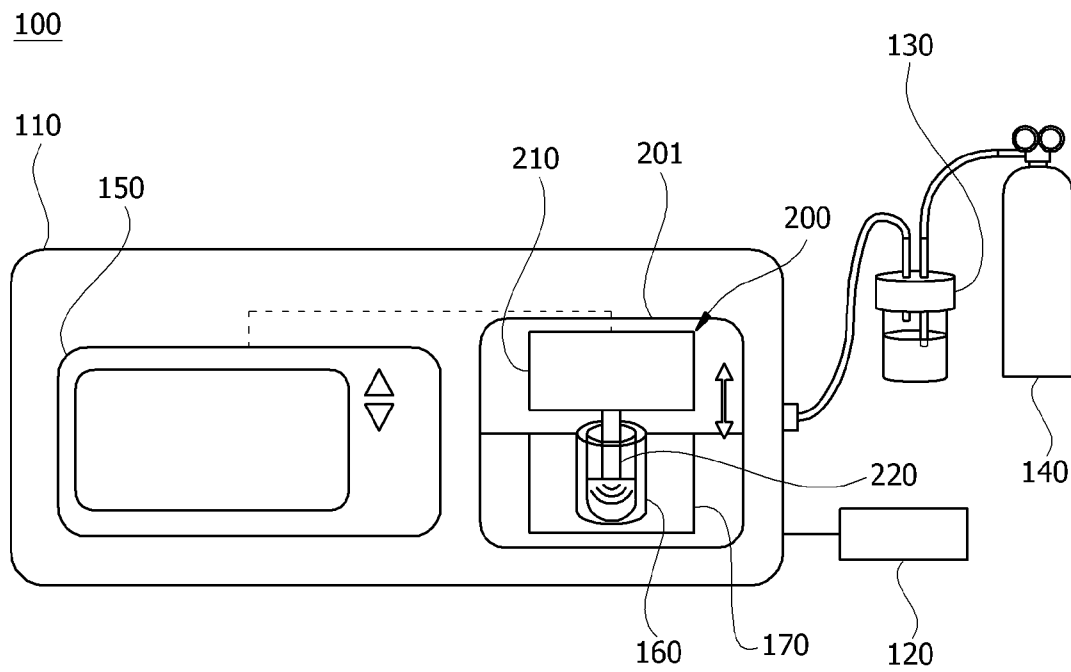
- [131]

청구범위

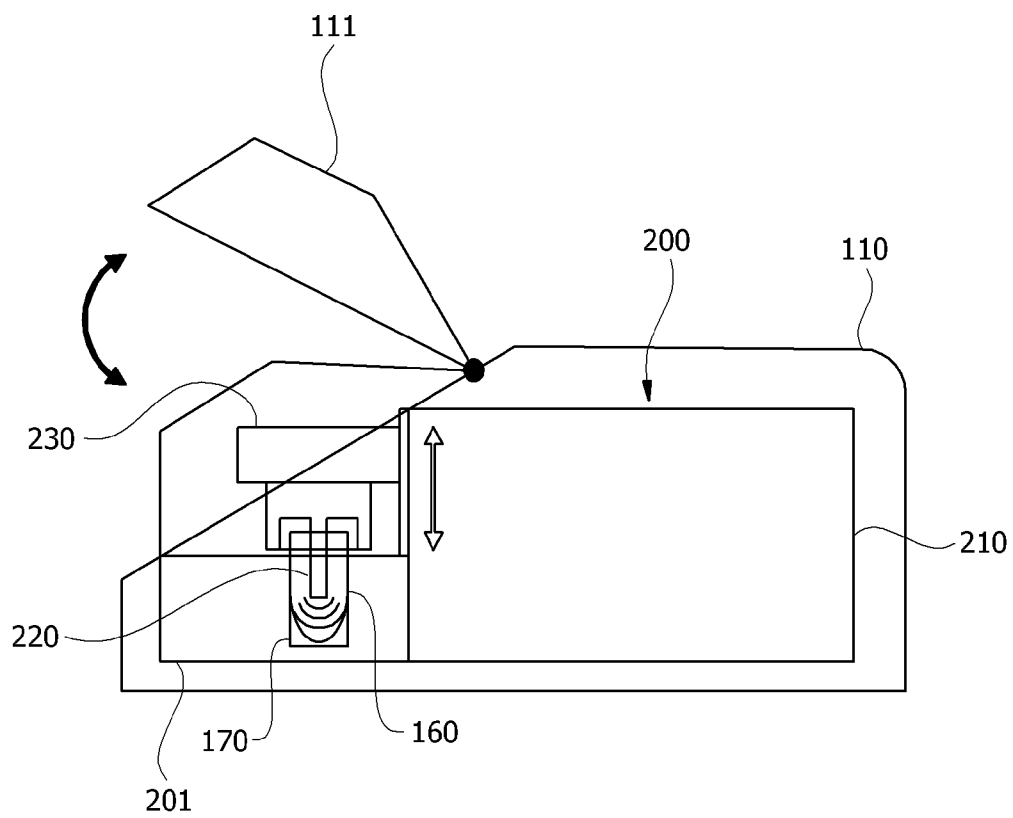
- [청구항 1] 세포 및 배양배지를 수용하도록 마련된 배양챔버; 및
배양챔버 내의 세포 및 배양배지에 초음파, 레이저 및 열 중 적어도 하나의 물리적 자극을 가함으로써 에너지를 제공할 수 있도록 마련된 하나 이상의 기구를 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 기구는, 초음파를 조사하는 초음파 발생장치, 레이저를 조사하는 레이저 조사장치 및 온도조절장치 중 하나 이상을 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
배양챔버 내의 습도를 조절하기 위한 습도조절장치 및 배양챔버 내의 이산화탄소량을 조절하기 위한 가스조절장치 중 하나 이상을 추가로 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
배양챔버 내의 온도, 습도, 이산화탄소량 중 하나 이상을 조절하기 위한 입력부를 갖는 디스플레이부를 추가로 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
기구가 초음파 발생장치를 포함하고,
디스플레이부는 초음파 주파수, 및 시간을 설정할 수 있도록 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 6] 제 2 항에 있어서,
배양 챔버에는 세포를 수용하는 샘플 튜브가 배치되며,
초음파 발생장치는 샘플 튜브를 향하여 승강 가능하게 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
배양 챔버에는 샘플 튜브를 지지하기 위한 샘플 튜브 홀더가 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서,
샘플 튜브는 이중 튜브 구조를 갖는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 9] 제 2 항에 있어서,
초음파 발생장치는 초음파 트랜스듀서가 교체 가능하게 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 10] 제 2 항에 있어서,
온도 조절 장치는 배양 챔버 주변으로 마련된 열선을 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 11] 복수 개의 샘플 튜브가 장착될 수 있도록 마련된 오토 샘플러; 및

- 오토 샘플러에 탑재된 어느 한 샘플 튜브로 초음파를 발생시키도록 마련된 초음파 발생장치를 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
오토 샘플러는 회전 가능하게 마련되고,
초음파 발생장치는 승강 가능하게 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
오토 샘플러가 회전하는 경우, 초음파 발생장치는 상승된 상태인 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 14] 제 11 항에 있어서,
초음파 처리된 배양배지가 저장된 배양배지 탱크;
상기 배양배지 탱크 내의 배양배지가 공급되는 하나 이상의 배양 플라스크; 및
배양 플라스크와 샘플 튜브를 유체 이동 가능하게 연결하는 인젝션 튜브를 추가로 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
초음파가 가해진 샘플 튜브 내의 세포는 인젝션 튜브에 의해 배양 플라스크로 이동되도록 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 16] 제 14 항에 있어서,
복수 개의 배양 플라스크를 이송시키기 위한 이송 벨트를 추가로 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 17] 제 15 항에 있어서,
배양 플라스크가 수용되는 인큐베이터;
인큐베이터 내의 배양 플라스크의 배양 배지가 회수되는 회수 탱크; 및
인큐베이터 내의 배양 플라스크로 배양 배지를 공급하고, 배양 플라스크 내의 배양 배지를 회수 탱크로 회수하기 위한 서큘레이터를 추가로 포함하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 18] 제 14 항에 있어서,
배양 플라스크는 양 측에 유동 통로가 각각 마련된 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 19] 제 18 항에 있어서,
배양 플라스크의 양 측 유동 통로는 서로 다른 높이에 위치하는 세포 리프로그래밍 장치.
- [청구항 20] 제 17 항에 있어서,
인큐베이터에는 안착된 배양 플라스크를 흔들기 위한 셰이커(shaker)가 마련된 세포 리프로그래밍 장치.

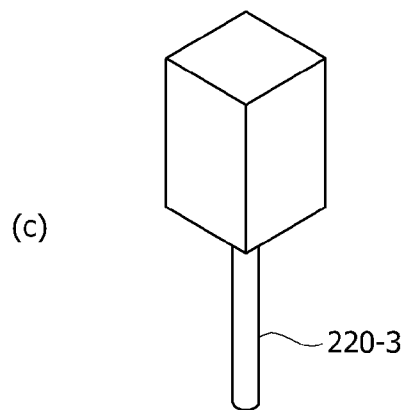
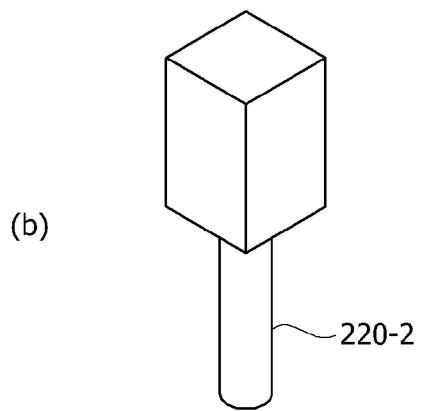
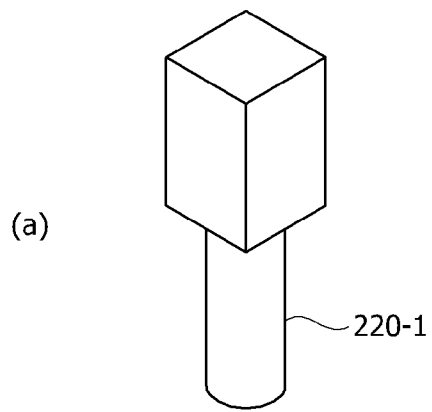
[Fig. 1]



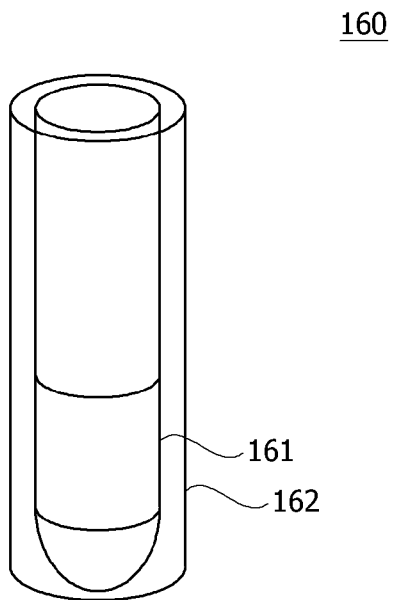
[Fig. 2]



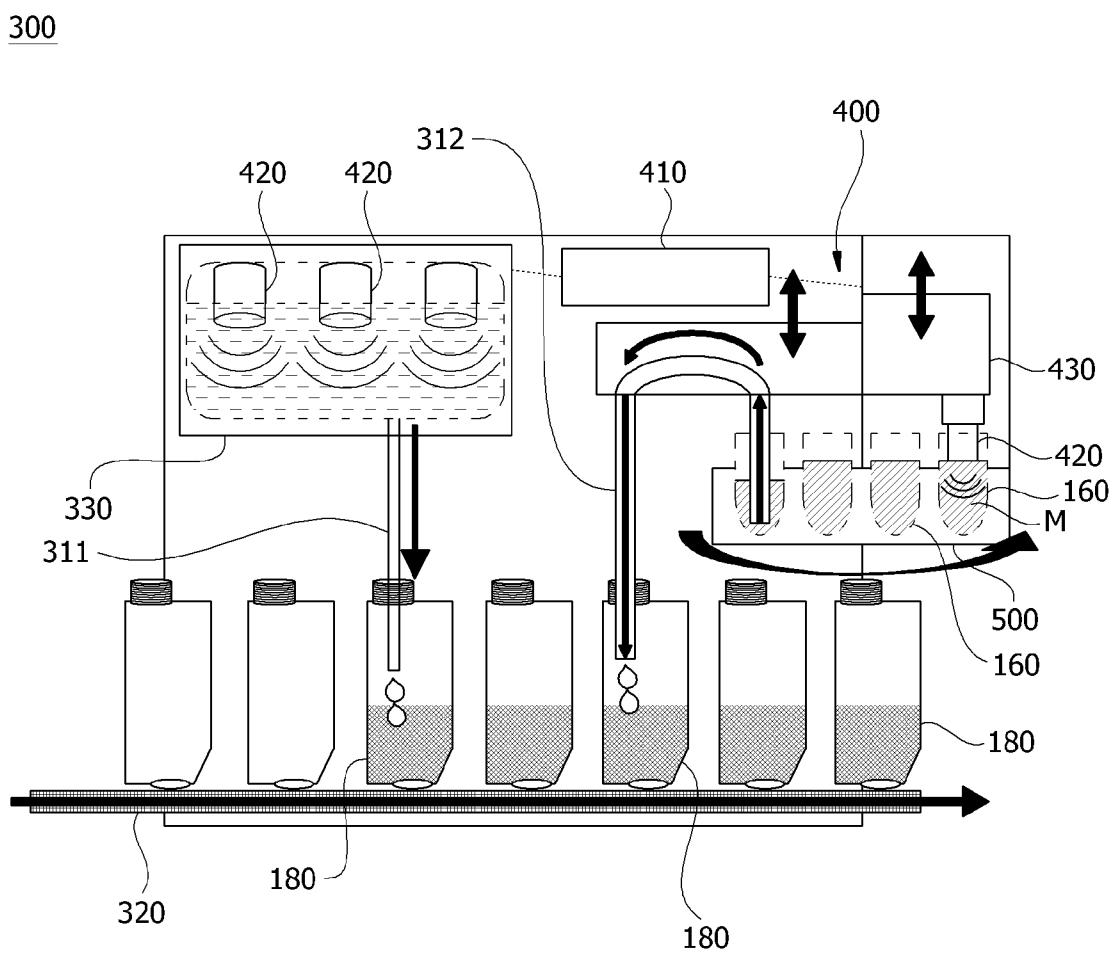
[Fig. 3]



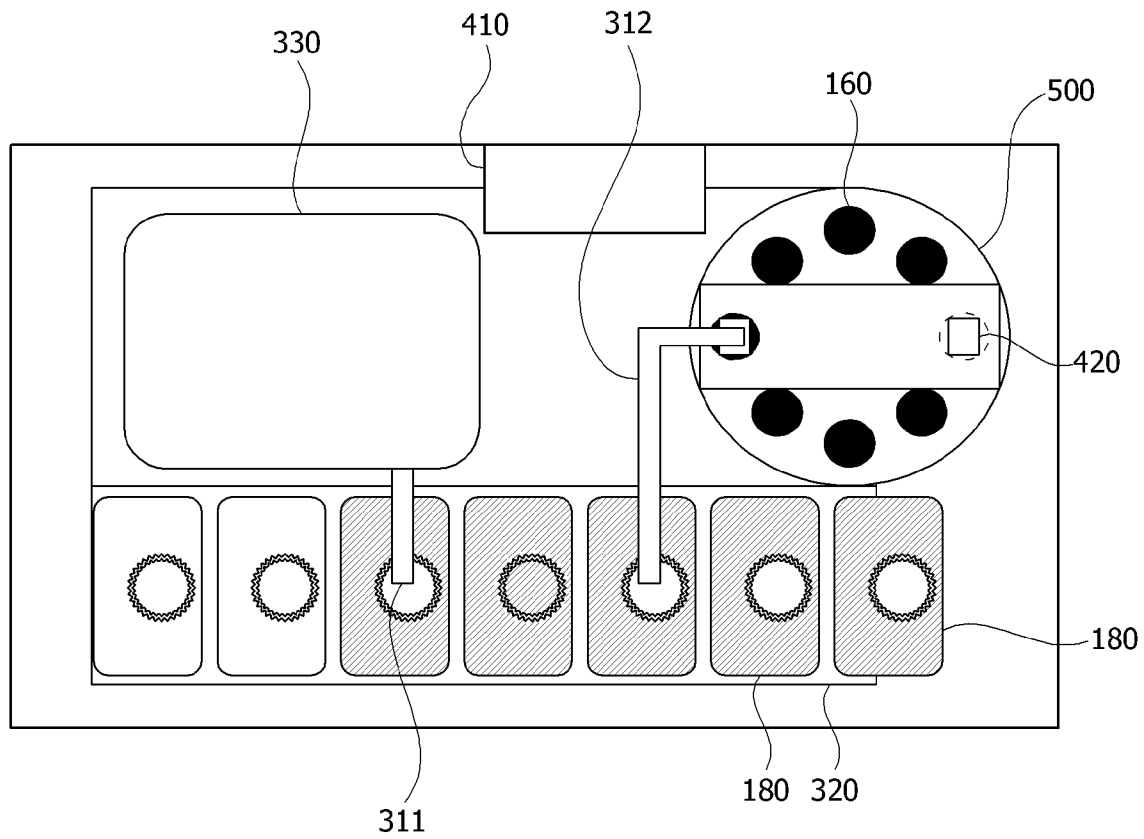
[Fig. 4]



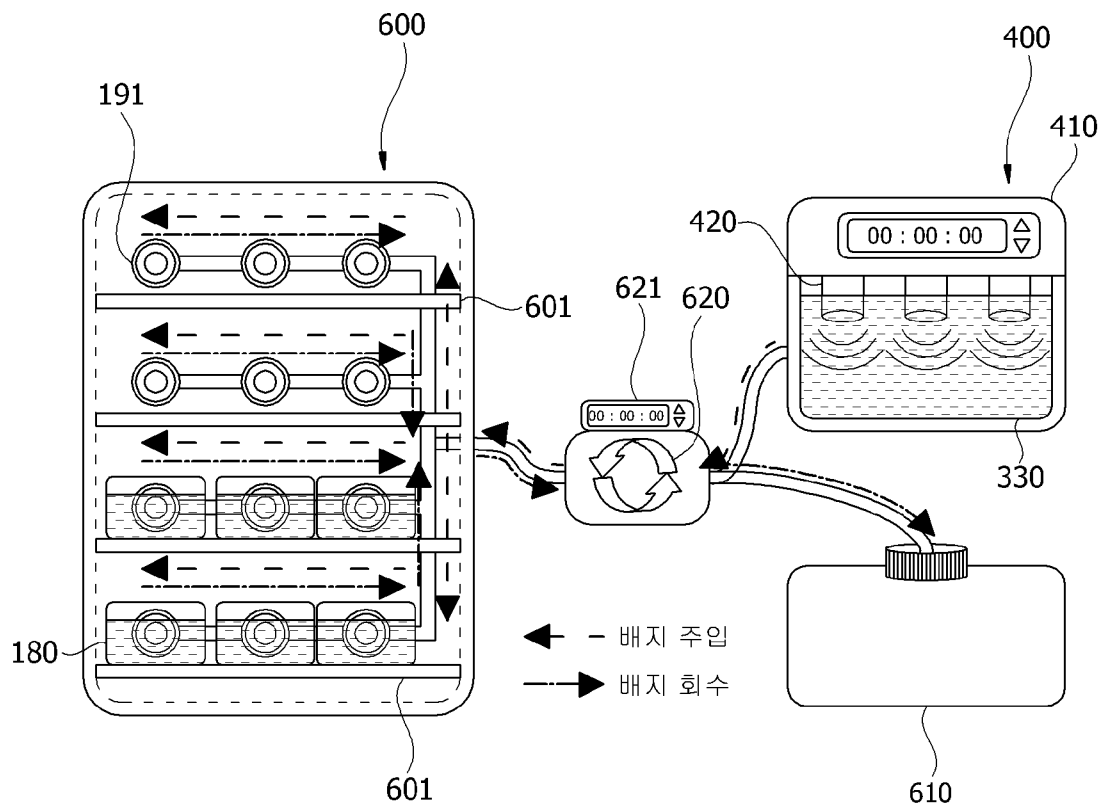
[Fig. 5]



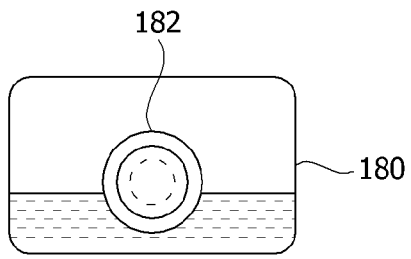
[Fig. 6]

300

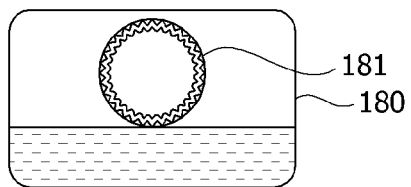
[Fig. 7]



[Fig. 8]

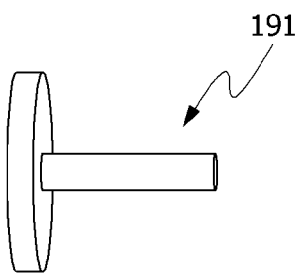


(a)

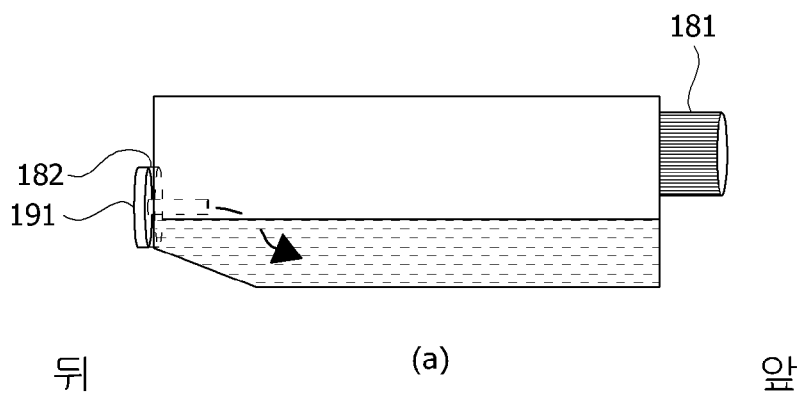


(b)

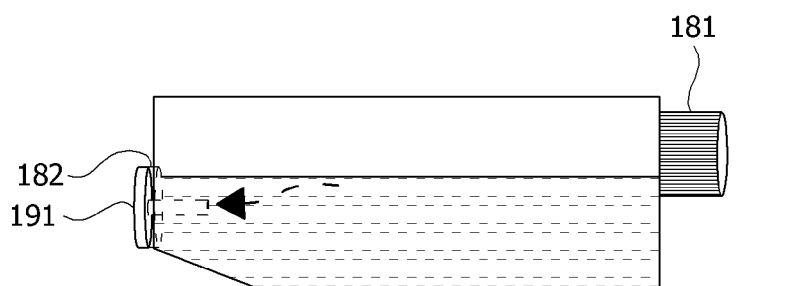
[Fig. 9]



[Fig. 10]



(a)



(b)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/008755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 13/00(2006.01)i, C12M 1/42(2006.01)i, C12M 1/36(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)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 13/00; A61K 35/12; A61K 35/16; C12M 3/00; C12M 1/42; C12M 1/36; C12N 5/077; C12N 5/071; C12N 5/074

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: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: culture chamber, ultrasound, laser, heat, cell reprogramming, autosampler

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0045935 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al.) 29 April 2015 See abstract; claims 1 and 13; paragraphs [0135]-[0136].	1,2,6-10
Y		3-5,11-20
Y	KR 10-2009-0080390 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 24 July 2009 See abstract; claims 1 and 5-6.	3-5
Y	US 2014-0038257 A1 (SUBRAMANIAN, Anuradha et al.) 06 February 2014 See abstract; claims 1, 10 and 12; figure 1.	11-20
A	US 7052720 B1 (JONES, Derek Leigh) 30 May 2006 See abstract; claim 1.	1-20
A	LV, Yonggang et al., "Effects of Low-intensity Pulsed Ultrasound on Cell Viability, Proliferation and Neural Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells-derived Neural Crest Stem Cells", Biotechnology Letters, (E-pub.) 28 September 2013, vol. 35, no. 12, pages 2201-2212 See the entire document.	1-20



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

28 DECEMBER 2016 (28.12.2016)

Date of mailing of the international search report

28 DECEMBER 2016 (28.12.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/008755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0045935 A	29/04/2015	AU 2013-251649 A1 CA 2885576 A1 EP 2844738 A1 JP 2015-516812 A US 2015-0110749 A1 WO 2013-163296 A1	31/10/2013 31/10/2013 11/03/2015 18/06/2015 23/04/2015 31/10/2013
KR 10-2009-0080390 A	24/07/2009	KR 10-0960106 B1	27/05/2010
US 2014-0038257 A1	06/02/2014	NONE	
US 7052720 B1	30/05/2006	AT 478940 T AU 5542800 A AU 772667 B2 CA 2373391 A1 EP 1185620 A2 EP 1185620 B1 EP 1624055 A1 JP 2003-503021 A WO 00-78927 A2 WO 00-78927 A3	15/09/2010 09/01/2001 06/05/2004 28/12/2000 13/03/2002 25/08/2010 08/02/2006 28/01/2003 28/12/2000 28/06/2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 13/00(2006.01)i, C12M 1/42(2006.01)i, C12M 1/36(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 13/00; A61K 35/12; A61K 35/16; C12M 3/00; C12M 1/42; C12M 1/36; C12N 5/077; C12N 5/071; C12N 5/074

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 배양챔버, 초음파, 레이저, 열, 세포 리프로그래밍, 오토 샘플러

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0045935 A (더 브리검 앤드 우먼즈 হাসপিটল, ইনক. 등) 2015.04.29 요약; 청구항 1 및 13; 단락 [0135]-[0136] 참조.	1,2,6-10
Y		3-5,11-20
Y	KR 10-2009-0080390 A (전남대학교산학협력단) 2009.07.24 요약; 청구항 1 및 5-6 참조.	3-5
Y	US 2014-0038257 A1 (SUBRAMANIAN, ANURADHA 등) 2014.02.06 요약; 청구항 1, 10 및 12; 도면 1 참조.	11-20
A	US 7052720 B1 (JONES, DEREK LEIGH) 2006.05.30 요약; 청구항 1 참조.	1-20
A	LV, YONGGANG 등, 'Effects of low-intensity pulsed ultrasound on cell viability, proliferation and neural differentiation of induced pluripotent stem cells-derived neural crest stem cells', Biotechnology Letters, (전자공개)2013.09.28, 제35권, 제12호, 2201-2212 페이지 전체 문헌 참조.	1-20

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 28일 (28.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 12월 28일 (28.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

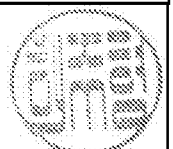
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0045935 A	2015/04/29	AU 2013-251649 A1 CA 2885576 A1 EP 2844738 A1 JP 2015-516812 A US 2015-0110749 A1 WO 2013-163296 A1	2013/10/31 2013/10/31 2015/03/11 2015/06/18 2015/04/23 2013/10/31
KR 10-2009-0080390 A	2009/07/24	KR 10-0960106 B1	2010/05/27
US 2014-0038257 A1	2014/02/06	없음	
US 7052720 B1	2006/05/30	AT 478940 T AU 5542800 A AU 772667 B2 CA 2373391 A1 EP 1185620 A2 EP 1185620 B1 EP 1624055 A1 JP 2003-503021 A WO 00-78927 A2 WO 00-78927 A3	2010/09/15 2001/01/09 2004/05/06 2000/12/28 2002/03/13 2010/08/25 2006/02/08 2003/01/28 2000/12/28 2001/06/28