(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 11 월 24 일 (24.11.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/186398 A1

(51) 국제특허분류:
B01L 3/00 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005108

(22) 국제출원일: 2016 년 5 월 13 일 (13.05.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0068217 2015 년 5 월 15 일 (15.05.2015) KR

(71) 출원인: **성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR). **이화여자대학교 산학협력단 (EWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).

(72) 발명자: **박성수 (PARK, Sungsu)**; 07324 서울시 영등포구 여의동로 3 길 10, Seoul (KR). **이상혁 (LEE, Sanghyuk)**; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동), Seoul (KR).

(74) 대리인: **이명진 (LEE, Myoung-Jin)**; 06180 서울시 강남구 영동대로 85 길 28, 6 층 (대치동), Seoul (KR).

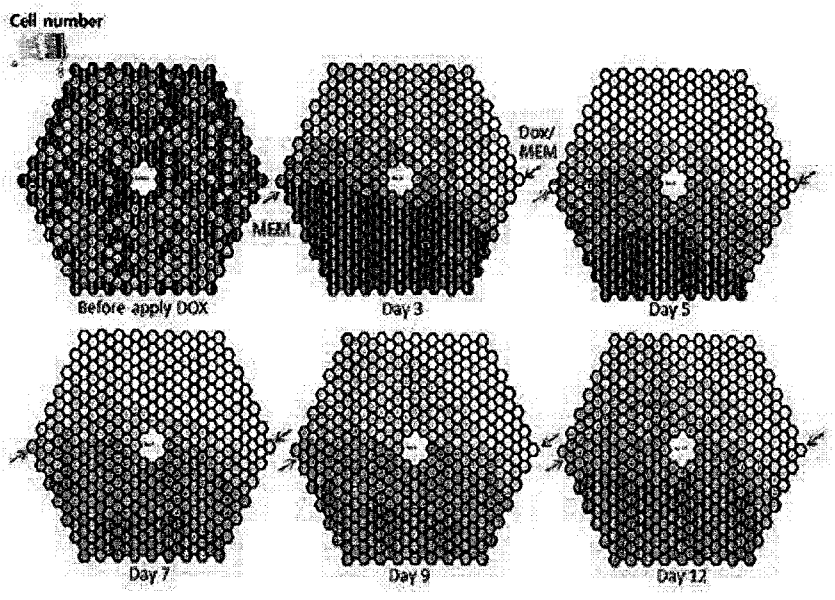
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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),

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: MICROFLUIDIC CHIP FOR SCREENING ANTICANCER DRUG RESISTANT CELLS AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention relates to a microfluidic chip for screening anticancer drug resistant cells and a method for inducing or screening anticancer drug resistance using the same. The microfluidic chip of the present invention can induce a continuous concentration gradient between cell culture chambers and can implement the prompt induction and read-out within a week, unlike in existing read-out techniques, and thus, is expected to be able to take a target treatment through more fundament approach, in the treatment of cancer.

(57) **요약서**: 본 발명은 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 및 이를 이용한 항암제 내성 유도 또는 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 미세유체 칩은 세포 배양 챔버간 연속적인 농도구배 유도 및 기존 판독 기술과 달리, 일주일 내 빠르게 유도 및 판독할 수 있는바, 암의 치료에 있어서, 보다 근본적으로 접근하여 타겟 치료를 할 수 있을 것으로 기대된다.

WO 2016/186398 A1

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))

명세서

발명의 명칭: 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 항암제의 연속적인 농도 구배가 형성된 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 및 항암제 내성세포 유도 또는 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 암은 우리나라 성인의 사망 원인 중 1위 또는 2위를 다투는 중요한 질병으로서, 많은 연구에도 불구하고 암 환자의 약 과반수 가량이 결국에는 사망하는 실정이다. 현재까지 유효한 것으로 알려져 있는 암 치료 방법으로는 수술, 방사선 항암제 치료법이 있으며, 이 중에서 수술과 방사선 치료법은 절제 부위 또는 방사선 조사부위에만 효과가 있는 국소 요법이고, 항암제 치료 요법은 전신에 효과를 나타내는 전신 요법이라는 점에서 차이가 있다.

[3] 일반적으로, 암은 국소에서 발병하여 전신으로 전이되는 질환으로서, 초기에 발견되는 경우를 제외하고는 어느 정도의 전신 전이가 존재한다. 따라서, 아무리 효과적인 국소 치료법을 사용한다 할지라도 다시 재발할 확률이 높다는 사실은, 대부분의 암환자의 치료에 수술 및 방사선 치료와 같은 국소 치료법 뿐만 아니라, 전신 치료법인 항암제 치료법이 필요함을 말해준다. 따라서, 현재로서는 암에 대한 치료 효과를 향상시키기 위해서는 조기 진단에 의한 근치적 수술의 확대가 필요할 뿐만 아니라, 수술이 불가능한 환자 또는 수술 후 재발의 위험이 높은 환자에 대해 항암제 치료는 필수적이다.

[4] 그러나 현재까지 많은 항암제의 개발에도 불구하고, 항암제만으로 완치가 가능한 암은 백혈병, 악성 림프종, 고환암 등 소수의 암에 불과하며, 이는 항암제를 이용한 암 치료시 항암제에 암세포가 반응을 하지 않거나 초기에는 효과적으로 종양이 줄어들지만 치료 도중 또는 치료 후에 항암제 치료에 대한 내성이 생기기 때문이다. 항암제 내성이란, 항암제를 이용하여 암 환자를 치료할 때, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암 치료 효과가 있었으나, 계속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미한다. 이 경우, 치료에 사용된 항암제 뿐 아니라, 다른 종류의 항암제에 대해서도 내성을 나타내는 이른바, 다중 약제 내성 (MDR; multi-drug resistance)을 나타내기 때문에 일단 암세포가 항암제에 대한 내성을 획득하면, 이 후, 암 치료에 있어서 큰 어려움을 겪고 있는 실정이다.

[5] 따라서, 효과적인 항암제 치료를 위해서는 상기와 같은 항암제에 대한 암세포 내성을 극복해야 하며, 이를 위해서는 항암제에 대한 암세포의 내성에 관련된

유전자를 규명할 필요가 있다. 지금까지 밝혀진 몇몇 항암제 내성 유전자 중에서 잘 알려져 있는 것으로 P-당단백질 (P-glycoprotein : PgP)", 다약제 내성 관련 단백질 (Multidrug Resistance-associated Protein, MRP) 등이 있다. 이러한 암세포의 내성에 관련된 유전자 규명은 항암제 병용을 통한 새로운 치료법에 이용될 수 있을 뿐 아니라, 항암제 내성 발달을 예측하는 마커와 같은 역할을 할 수 있다.

[6] 이러한 내성 관련 유전자 분석에 있어서, 암세포의 배양 및 선별은 선결적인 부분으로서, 이에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으나 (한국공개특허 10-2013-0156493), 아직은 미비한 실정이다. 이에, 본 발명자들은 종래 6개월 이상 소요되는 항암제 내성세포 배양의 기간을 단축하고자, 세포 배양 챔버간 연속적인 농도구배가 형성된 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 및 이를 이용한 항암제 내성세포 유도 또는 스크리닝 방법을 고안하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 본 발명의 미세유체 칩에서 배양된 세포의 항암제 내성 증진효과를 확인하고 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[8] 이에, 본 발명의 목적은 복수 개의 세포 배양 챔버 (110)가 방사상으로 구비된 플레이트부 (100); 상기 플레이트부 (100) 중앙 부근에 형성되어 세포를 로딩하기 위한 세포 도입부 (200); 상기 플레이트부 (100)의 둘레를 따라 형성되어 유체의 이동을 위한 공간을 제공하는 유체 확산부 (300); 상기 유체 확산부(300)와 연결되어 배양액 및 항암제를 포함하는 유체가 주입되는 제 1 주입부 (400); 상기 유체 확산부(300)와 연결되어 배양액을 포함하는 유체가 주입되는 제 2 주입부 (500); 및 상기 유체 확산부(300), 세포 배양 챔버 (110), 및 세포 도입부(200)간 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공하는 마이크로 채널 (600); 및 상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 유체를 외부로 배출하기 위한 배출부 (700)를 포함하는, 항암제 내성세포 스크리닝 또는 유도용 미세유체 칩 (Microfluidic chip)을 제공하는 것이다.

[9] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계; 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도구배를 형성하는 단계를 포함하는, 상기 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 유도방법을 제공하는 것이다.

[10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계; 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도

구배를 형성하는 단계; 및 실시간으로 세포 배양 챔버 (110)를 촬영 및 분석하는 단계를 포함하는, 상기 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[11]

[12] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[13] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 복수 개의 세포 배양 챔버 (110)가 방사상으로 구비된 플레이트부 (100); 상기 플레이트부 (100) 중앙 부근에 형성되어 세포를 로딩하기 위한 세포 도입부 (200); 상기 플레이트부 (100)의 둘레를 따라 형성되어 유체의 이동을 위한 공간을 제공하는 유체 확산부 (300); 상기 유체 확산부(300)와 연결되어 배양액 및 항암제를 포함하는 유체가 주입되는 제 1 주입부 (400); 상기 유체 확산부(300)와 연결되어 배양액을 포함하는 유체가 주입되는 제 2 주입부 (500); 상기 유체 확산부(300), 세포 배양 챔버 (110), 및 세포 도입부(200)간 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공하는 마이크로 채널 (600); 및 상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 유체를 외부로 배출하기 위한 배출부 (700)를 포함하는, 항암제 내성세포 유도 또는 스크리닝용 미세유체 칩 (Michrofluidic chip)을 제공한다.

[14] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 유체 확산부 (300)는 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310)와 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)로 구성되며, 상기 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310) 및 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)는 격리될 수 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 미세유체 칩은, 상기 제 1 주입부 (400)와 제 2 주입부 (500)가 상호간에 대향하게 위치할 수 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 미세유체 칩은, 제 2 주입부 방향으로 세포 배양 챔버 (110)간 유체의 연속적인 농도 구배를 형성할 수 있다.

[17] 본 발명은 상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계; 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도 구배를 형성하는 단계를 포함하는, 상기 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 유도방법을 제공한다.

[18] 본 발명은 상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계; 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도 구배를 형성하는 단계;

및 실시간으로 세포 배양 챔버 (110)를 촬영 및 분석하는 단계를 포함하는, 상기 미세유체 칩 (Michrofluidic chip)을 이용한 항암제 내성세포 스크리닝 방법을 제공한다.

[19] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 암세포는 인간 교아 세포종 (glioblastoma) 세포일 수 있다.

[20] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 항암제는 독소루비신 (doxorubicin)일 수 있다.

발명의 효과

[21] 본 발명에 따른 미세유체 칩은 세포 배양 챔버간 연속적인 농도구배를 형성함으로써, 효과적인 항암제 내성세포의 유도 또는 스크리닝이 가능하다. 본 발명은 종래 6개월 이상 소요되는 일반적인 항암제 내성세포 유도 및 판독 기술과 달리, 항암제 내성을 일주일 내 빠르게 배양 및 판독할 수 있는바, 환자 맞춤형 내성 극복을 위한 첨단 치료기술 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩의 기본적인 구조를 나타낸 도이다.

[23] 도 2는 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩의 가장자리 부분을 확대한 것으로서, 유체 확산부와 세포 배양 챔버, 및 챔버간 이동 통로를 제공하는 마이크로 채널을 나타낸 도이다.

[24] 도 3은 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 내 염색제(fluorescein, 1μM)의 농도에 따른 분포를 (a) 시각적으로 확인한 결과, 및 (b) 형광 세기 차이로 확인한 결과이다.

[25] 도 4는 시간의 경과 (1일, 3일, 5일, 7일, 9일, 12일)에 따른 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩 내 생존한 U87 세포의 분포를 시각적으로 확인한 결과이다.

[26] 도 5는 일반 배지에서 배양된 U87 세포 (WT cell)와 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩을 이용하여 배양된 U87-DG 세포(chip cell)간 doxorubicin 처리에 따른 세포 생존률을 비교한 결과이다.

[27] 도 6은 일반 배지에서 배양된 U87 세포 (WT cell)와 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩을 이용하여 배양된 U87-DG 세포(chip cell)간 산화-환원 활성(redox activity)을 비교한 결과이다.

[28] 도 7은 일반 배지에서 배양된 U87 세포 (WT cell)와 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩을 이용하여 배양된 U87-DG 세포(chip cell)간 Rh-123 배출능을 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 본 발명자들은, 세포 배양 챔버간 연속적인 농도 구배를 형성하는 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩을 이용하여 암세포를 배양시킨 결과, 상기

암세포는 일반 배양 배지에서 배양시킨 암세포와 비교하여, 항암제 내성으로 인한 높은 세포 생존률 등을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[30]

[31] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[32]

[33] 본 발명은 복수 개의 세포 배양 챔버 (110)가 방사상으로 구비된 플레이트부 (100); 상기 플레이트부 (100) 중앙 부근에 형성되어 세포를 로딩하기 위한 세포 도입부 (200); 상기 플레이트부 (100)의 둘레를 따라 형성되어 유체의 이동을 위한 공간을 제공하는 유체 확산부 (300); 상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 배양액 및 항암제를 포함하는 유체가 주입되는 제 1 주입부 (400); 상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 배양액을 포함하는 유체가 주입되는 제 2 주입부 (500); 및 상기 유체 확산부 (300), 세포 배양 챔버 (110), 및 세포 도입부 (200)간 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공하는 마이크로 채널 (600); 및 상기 유체 확산부 (300)와 각각 연결되어 유체를 외부로 배출하기 위한 배출부 (700)를 포함하는, 항암제 내성세포 유도 또는 스크리닝용 미세유체 칩 (Microfluidic chip)을 제공한다.

[34] 본 발명에서 사용되는 용어, "항암제 내성"이란, 항암제를 이용한 암 치료에서, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암치료 효과가 있었으나, 계속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미하며, 본 발명자들은 상기와 같은 항암제 내성을 갖는 암세포를 배양하여, 유전자 분석 등의 기초연구 및 항암제 내성 스크리닝 등의 임상분야에서 폭 넓게 활용하고자 하였다.

[35] 플레이트부 (100)는 도 1에 나타낸 바와 같이, 세포 배양 챔버 (110), 세포 도입부 (200), 유체 확산부 (300) 등으로 구성되며, 세포 도입부 (200)는 플레이트부 (100) 의 중앙에 위치하며, 유체 확산부 (300)는 플레이트부의 둘레를 따라 형성되어 있다.

[36] 세포 배양 챔버 (110)는 도 2에 나타낸 바와 같이, 플레이트부 (200)의 중앙에 형성된 세포 도입부 (200)로 로딩된 암세포가 배양되는 공간으로서, 100개 내지 300개의 복수 개로 구성된다. 또한, 세포 배양 챔버 (110)는 세포 도입부(200), 유체 확산부 (300)와 마이크로 채널 (600)로 연결되어 있어 유체가 상호간 연결할 수 있는 통로를 제공한다.

[37] 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체는 유체 확산부 (300)와 연결되어 있는 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)로 각각 주입되며, 상기 유체는 유체 확산부 (300)로 이동 한 후, 마이크로 채널 (600)을 통하여 세포 배양 챔버 (110)로 이동하게 된다. 제 1 주입부 (400)와 제 2 주입부 (500)는 상호간 대향하게 위치하고 있으며, 바람직하게는 주입부 말단에는 보관부(reservoir)를 포함할 수 있다.

[38] 유체 확산부 (300)는, 유체의 이동을 위한 공간을 제공하는 구성으로서, 도 2에 나타낸 바와 같이, 상기 플레이트부 (100) 둘레를 따라 복수 개로 형성될 수 있다.

이 때, 복수 개로 형성된 유체 확산부 (300)는 각각 격리되어 있는 것이 바람직하다. 예컨대, 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310) 및 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)로 구성될 수 있으며, 상기 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)로 주입된 유체가 혼합되지 않도록 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310)와 제 2주입부와 연결된 유체 확산부 (320)는 격리된 구조를 갖는다.

[39] 배출부 (700)는 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 있으며, 주입된 유체가 배출되는 통로를 제공한다. 또한, 상기 설명한 바와 같이, 상기 유체 확산부 (300)는 복수 개로 형성될 수 있는바, 상기 배출부 (700)는 각각 격리된 유체 확산부 (300)와 대응하여 복수개로 형성되는 것이 바람직하다. 예컨대, 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310)와 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)는 각각 격리되어 있으며, 이 때, 상기 배출부 (700)는 각각 상기 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310) 및 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)와 연결되어, 각각의 배출부 (700)로는 혼합되지 않은 유체가 배출된다.

[40] 이러한 유체 이동 과정에서 항암제의 연속구배가 농도 구배가 형성되며, 상기 농도 구배는 항암제를 포함하지 않은 유체가 주입된 제 2 주입부 (400) 방향으로 형성하며, 이러한 항암제의 농도 구배는 항암제 내성 세포의 배양 및 유도를 촉진한다.

[41] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 미세유체 칩 (Death galaxy chip)을 준비한 후, 염색제인 fluorescein을 이용하여 세포 배양 챔버간 연속적인 농도구배를 시각적으로 확인하였다 (실시예 1 내지 2 참고). 또한, 상기 Death galaxy chip을 이용하여 인간 1차 교아 세포종 (human primary glioblastoma)으로부터 유래한 U87 세포 (U87-DG 세포, chip cell)를 배양한 후 (실시예 3 내지 4 참고), 일반 배지에서 배양된 U87 세포 (U87 세포, WT cell)와 비교한 결과, U87-DG 세포는 항암제에 대한 우수한 세포 생존률, 낮은 산화-환원 활성 (redox activity), 및 Rh-123에 대한 우수한 배출능을 가지고 있음을 입증하였는바, 본 발명의 미세유체 칩을 이용하여 항암제 내성세포 유도 또는 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다 (실시예 5 내지 7 참고).

[42] 이에, 본 발명은 상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계; 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도 구배를 형성하는 단계를 포함하는, 상기 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 유도방법을 제공한다.

[43] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계; 제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도 구배를 형성하는 단계; 및 실시간으로 세포 배양 챔버 (110)를 촬영 및 분석하는 단계를

포함하는, 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 스크리닝 방법을 제공한다.

[44] 본 발명의 유도 또는 스크리닝 방법에서 사용되는 용어, "항암제"란 종양의 치료를 위하여 사용되는 화학 요법제를 총칭하는 것으로서, 바람직하게는 doxorubicin일 수 있으나, 이로써 제한되는 것은 아니다.

[45] 또한, 본 발명에서 유도 또는 스크리닝의 대상이 되는 항암제 내성세포는 항암제에 대한 내성을 획득할 수 있는 암세포를 총칭하는 것으로서, 바람직하게는 인간 교아 세포종 (glioblastoma) 세포일 수 있으나, 이로써 제한되는 것은 아니다.

[46] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[47]

[48] 실시예 1. 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩의 준비

[49] PDMS로 이루어진 육각형의 마이크로챔버 어레이 (microchamber array)를 종래의 세포 배양접시 위에 놓았다. 이 후, 표면간 강한 정합성 접촉 (conformal contact)을 위하여, 클린 벤치 (clean bench) 안에 수 시간 동안 보관하였다. Needle-free 실린지를 이용하여 육각형의 어레이의 중앙의 홀 (hole)로 구성된 세포 도입부를 통해 70% 에탄올을 미세유체 칩 안으로 기포의 형성이 없도록 주의를 기울이며 주입하였다. 70% 에탄올은 순차적으로 PBS과 MEM 배지로 교체되었다. 이하의 실시예에서는 항암제 내성세포 스크리닝용 미세유체 칩을 Death galaxy chip으로 명명하였다.

[50]

[51] 실시예 2. Death galaxy chip 내에서의 화학적 농도구배 시각화

[52] Death galaxy chip을 준비한 후, 중앙의 세포 도입부를 커버 글래스(10mm Φ)(The Paul Marienfeld GmbH & Co KG., Lauda-Konigshofen, Germany)로 덮었다. 상호간 대향하게 위치한 한 쌍의 주입부에 염색제 (fluorescein, 1μM)가 포함된 MEM 배지 (300μl), 또는 염색제가 포함되지 않은 MEM 배지 (300μl)를 각각 채웠다. 6시간 후, 입체현미경 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)을 통해 형광 이미지를 얻었으며, 전체 배양칩의 형광강도는 Image J 소프트웨어를 통해 분석하였다.

[53] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 염색제가 포함된 MEM 배지 (300μl)를 주입한 주입부 부근의 세포 배양 챔버에서는 높은 형광강도를, 반대편 주입부 부근에서는 낮은 형광강도를 나타냈으며, 마이크로 채널에 의해 염색제가 이동하면서 염색제가 포함되지 않은 MEM 배지 (300μl)를 주입한 주입부 방향으로 농도구배가 형성되는 것을 확인하였다.

[54]

[55] 실시예 3. Death galaxy chip 에서의 세포 배양

[56] MEM 배지 내 약 5000개의 세포들을 피펫을 이용하여, 육각형의 어레이의 중앙의 세포 도입부를 통하여 Death galaxy chip에 로딩하였으며, 이 후, 커버 글래스로 덮었다.

[57] 상호간 대향하게 위치한 한 쌍의 주입부에 MEM 배지를 채웠으며, 이 후, 세포 배양 인큐베이터 안에서 배양시켰다. 배양 24시간 후, 주입부로부터 배지를 제거하였고, 주입부 중 하나에는 MEM 배지 (300μl)만을 채운 반면, 다른 하나에는 doxorubicin (5μM)이 포함된 MEM 배지 (300μl)를 채웠다. 이 후, 상기 세포들은 7일 이상 배양하였고, 주입부에 12시간 마다 신선한 배지와 약물을 주입하였으며, 두 주입부 내에 축적된 잔여물(wastes)들을 제거하였다.

[58] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, doxorubicin의 농도 구배에 따라 doxorubicin (5μM)이 포함된 MEM 배지의 주입부 부근에서는 세포수가 감소함을 확인하였으며, MEM 배지 (300μl)의 주입부 부근으로 이동할수록 생존한 세포수가 증가함을 확인하였다. 이에, 상기 결과는 본 발명의 Death galaxy chip을 이용하여 항암제 내성세포를 선별, 배양할 수 있음을 의미한다.

[59]

[60] 실시예 4. 항암제 내성세포 (U87-DG 세포)의 수득

[61] 7일 동안 Death galaxy chip을 통해, 인간 1차 교아 세포종 (human primary glioblastoma)으로부터 유래한 U87 세포에 항암제인 doxorubicin을 농도 구배에 따라 노출시킨 후, 이들 중 생존한 세포 (U87-DG 세포)가 부착된 세포배양 접시의 표면으로부터 육각형의 마이크로챔버 어레이를 제거하였다. 본 발명자들은 U87-DG 세포 표현형의 특징을 분석하고자 트립신화시키고, 세포들을 수득한 후, 새로운 배양 접시로 옮겨 정상적인 성장 배지(MEM)에서 일주일간 배양시켰다.

[62]

[63] 실시예 5. 항암제 내성의 평가

[64] 3,000개의 세포 (U87 및 U87-DG 세포)를 다양한 농도 (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, and 1 μM)의 doxorubicin이 포함된 200μl의 MEM 배지에 96 well 플레이트 씨딩을 하였다. 72 시간 동안 배양한 후, 각 well에서 생존한 세포수를 계산하였다. 세포 생존률은 doxorubicin이 포함된 well에서 생존한 세포수를 doxorubicin의 공급 없는 well에서 생존한 세포수로 나누어 계산하였다. 세포 생존률에 대한 doxorubicin의 농도를 플롯팅 (plotting)한 후, Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용한 비선형 회귀분석(non-linear regression analysis)을 통해 IC_{50}을 산출하였다.

[65] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, U87 세포 (WT cell)와 비교하여, Death galaxy chip을 통해 배양된 U87-DG 세포(chip cell)의 세포 생존률(Cell viability)이 현저히 높았으며, U87 세포의 IC_{50}은 0.05μM, U87-DG 세포는 1.47μM임을 확인하였다. 상기 결과는 doxorubicin의 농도 구배가 형성된 배양 조건을 제공함으로써, doxorubicin 내성을 갖는 U87세포를 효율적으로 수득할 수 있음을 의미한다.

[66]

[67] 실시예 6. 미토콘드리아의 산화-환원 활성(redox activity)의 확인

[68] U87 세포 및 U87-DG 세포의 미토콘드리아 산화-환원력 (redox capacities)은 EZ-Cytox assay kit (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)을 이용하여 비교하였다. 세포들을 180 μl 배양 배지에 96 well 플레이트 씨딩을 한 후, 6시간 동안 배양하였다. WST 시약 (20 μl)이 각 well에 추가되었으며, 1시간 동안 배양하였다. 미토콘드리아 탈수소효소 (mitochondrial dehydrogenase)에 의해 생산된 WST-formazan의 흡광도는 450nm에서 miroplate reader (Molecular Devices Inc. Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다.

[69] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, U87 세포 (WT cell)와 비교하여, U87-DG 세포 (chip cell)는 낮은 흡광도 (absorbance)를 나타냈다. 상기 결과는 Death galaxy chip을 통해 배양함으로써, U87 세포 내 미토콘드리아의 유기호흡 (aerobic respiration)을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

[70]

[71] 실시예 7. MDR efflux assay

[72] 다중약물 내성은 MDR1 및 MRP1 단백질의 기질로, 형광염색제인 Rh-123 (rhodamine 123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 배출하는 능력을 평가하여 측정하였다. 세포는 아이스 위에서 30분 동안 Rh-123로 프리로딩 (preloading) 되었으며, 이후 37℃ 워터 배스 (water bath)에서 배양하여 염색제의 MDR 단백질 매개 배출을 유도하였다. 상기 세포들을 PI (propudium iodide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 염색하였으며, 분석을 실시할 때까지 아이스 위에서 보관하였다. 배출된 염색제는 flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였으며, PI (positive)양성 dead cell은 분석에 제외하였다. 한편, Rh-123의 배출은 fluorometric plate reader (Molecular Devices Inc. Sunnyvale, CA)을 통해 분석하였다. 세포 정지액은 염색제 배출 전 및 후에 96 well 플레이트 well안에 나누어 분배하였다. 형광 강도는 485 nm의 여기파장 (excitation wavelength) 및 530 nm의 방사파장 (emission wavelength)에서 측정하였다.

[73] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, U87 세포 (WT cell)와 비교하여, U87-DG 세포 (chip cell)는 MDR1 및 MRP1 단백질의 우수한 배출능을 확인하였다. 상기 결과는 Death galaxy chip을 통해 배양함으로써, 배출 펌프 (efflux pumps)를 보다 활성화시켜 U87 세포 내 약제축적률을 감소시키고, 이에 따라 doxorubicin에 대한 내성을 획득하게 됨을 의미한다.

[74]

[75] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[76] 본 발명에 따른 미세유체 칩은 세포 배양 챔버간 연속적인 농도구배를 형성함으로써, 효과적인 항암제 내성세포의 유도 또는 스크리닝이 가능하다. 본 발명은 종래 6개월 이상 소요되는 일반적인 항암제 내성세포 유도 및 판독 기술과 달리, 항암제 내성을 일주일 내 빠르게 배양 및 판독할 수 있는바, 환자 맞춤형 내성 극복을 위한 첨단 치료기술 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 복수 개의 세포 배양 챔버 (110)가 방사상으로 구비된 플레이트부 (100);
상기 플레이트부 (100) 중앙 부근에 형성되어 세포를 로딩하기 위한 세포 도입부 (200);
상기 플레이트부 (100)의 둘레를 따라 형성되어 유체의 이동을 위한 공간을 제공하는 유체 확산부 (300);
상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 배양액 및 항암제를 포함하는 유체가 주입되는 제 1 주입부 (400);
상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 배양액을 포함하는 유체가 주입되는 제 2 주입부 (500);
상기 유체 확산부 (300), 세포 배양 챔버 (110), 및 세포 도입부 (200)간 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공하는 마이크로 채널 (600); 및
상기 유체 확산부 (300)와 연결되어 유체를 외부로 배출하기 위한 배출부 (700)를 포함하는, 항암제 내성세포 유도 또는 스크리닝용 미세유체 칩 (Microfluidic chip).

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 유체 확산부 (300)는 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부(310) 및 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)로 구성되며, 상기 제 1 주입부와 연결된 유체 확산부 (310) 및 제 2 주입부와 연결된 유체 확산부 (320)는 격리되어 있는 것을 특징으로 하는, 미세유체 칩.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 미세유체 칩은, 상기 제 1 주입부 (400)와 제 2 주입부 (500)가 상호간에 대향하게 위치하는 것을 특징으로 하는, 미세유체 칩.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 미세유체 칩은, 제 2 주입부 방향으로 세포 배양 챔버 (110)간 유체의 연속적인 농도 구배를 형성하는 것을 특징으로 하는, 미세유체 칩.

[청구항 5] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 유도방법으로서,
상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계;
제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계; 및
상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도 구배를 형성하는 단계를 포함하는, 유도 방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 암세포는 인간 교아 세포종 (glioblastoma) 세포인 것을 특징으로 하는, 유도방법.

[청구항 7] 제 5항에 있어서,

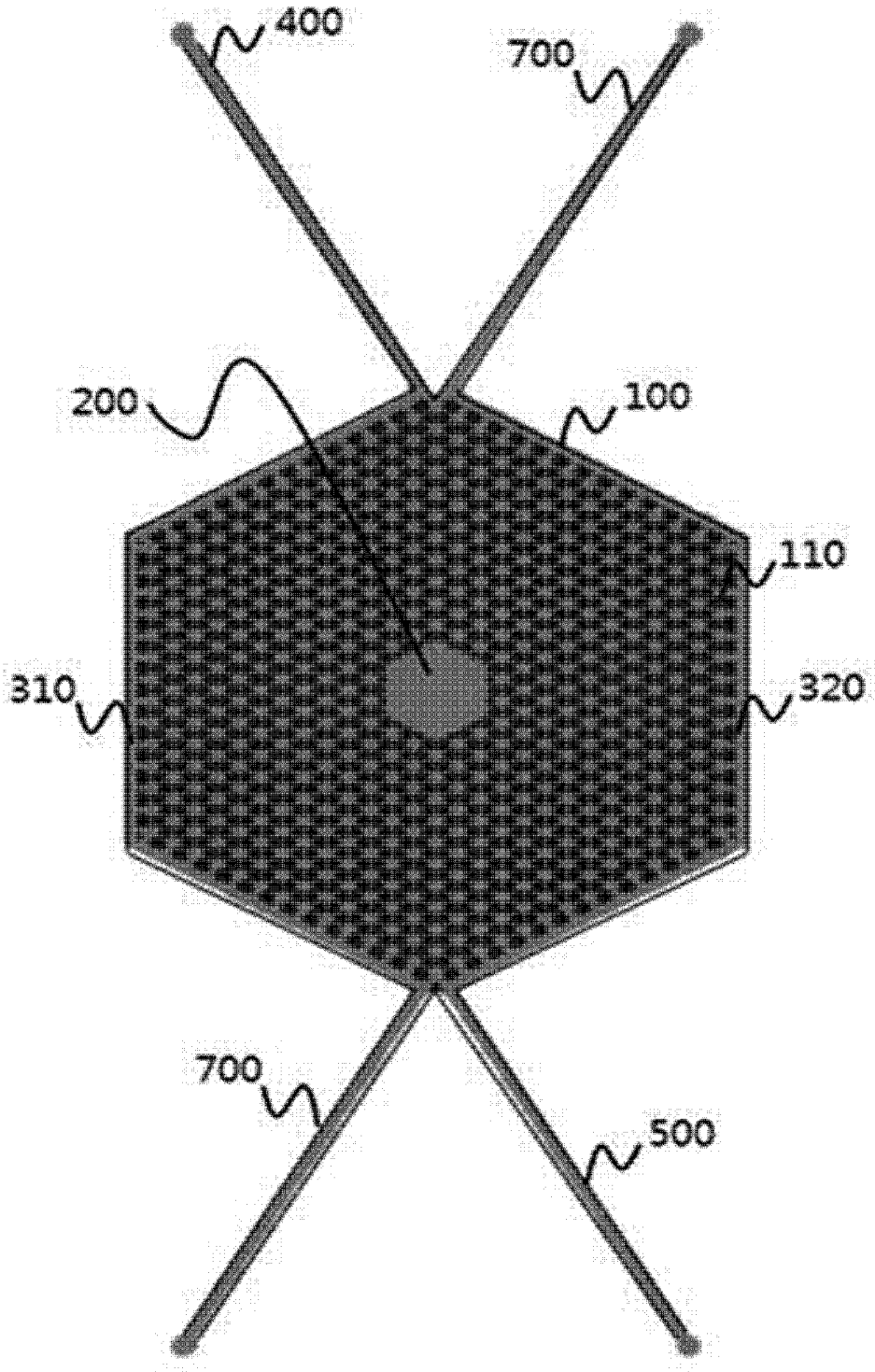
상기 항암제는 독소루비신 (doxorubicin)인 것을 특징으로 하는, 유도방법.

[청구항 8] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 미세유체 칩을 이용한 항암제 내성세포 스크리닝 방법으로서,
상기 세포 도입부 (200)에 환자로부터 분리한 암세포를 로딩하는 단계;
제 1 주입부 (400) 및 제 2 주입부 (500)에 배양액 및 항암제를 포함하는 유체, 및 배양액을 포함하는 유체를 각각 주입하는 단계;
상기 유체가 마이크로 채널 (600)을 통과함에 따라 세포 배양 챔버 (110)간 농도 구배를 형성하는 단계; 및
실시간으로 세포 배양 챔버 (110)를 촬영 및 분석하는 단계를 포함하는, 스크리닝 방법.

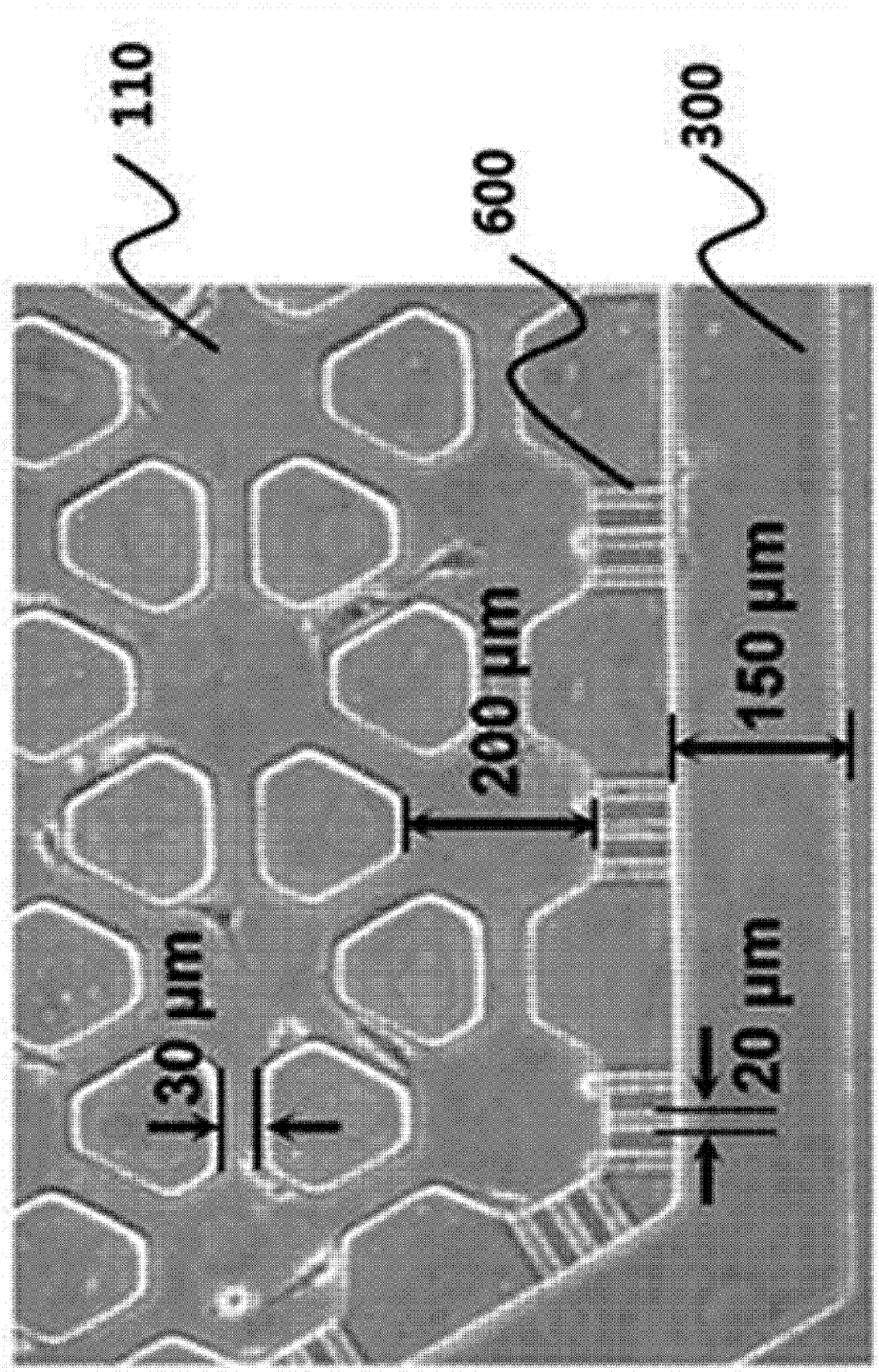
[청구항 9] 제 8항에 있어서,
상기 암세포는 인간 교아 세포종 (glioblastoma) 세포인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

[청구항 10] 제 8항에 있어서,
상기 항암제는 독소루비신 (doxorubicin)인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

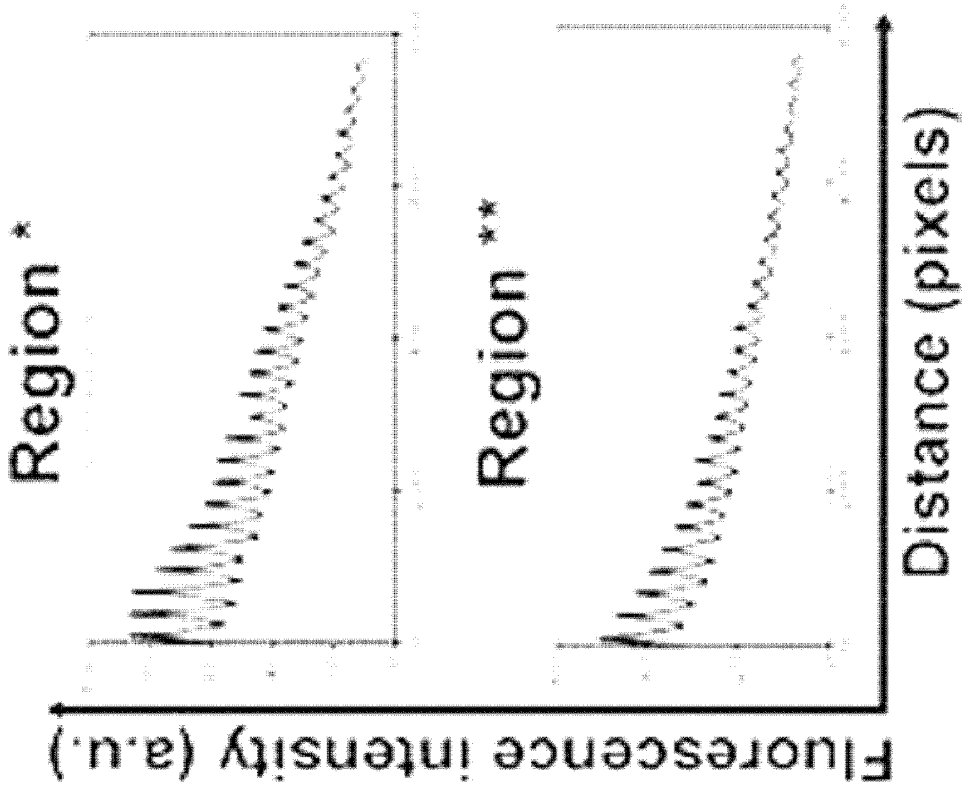
[도1]

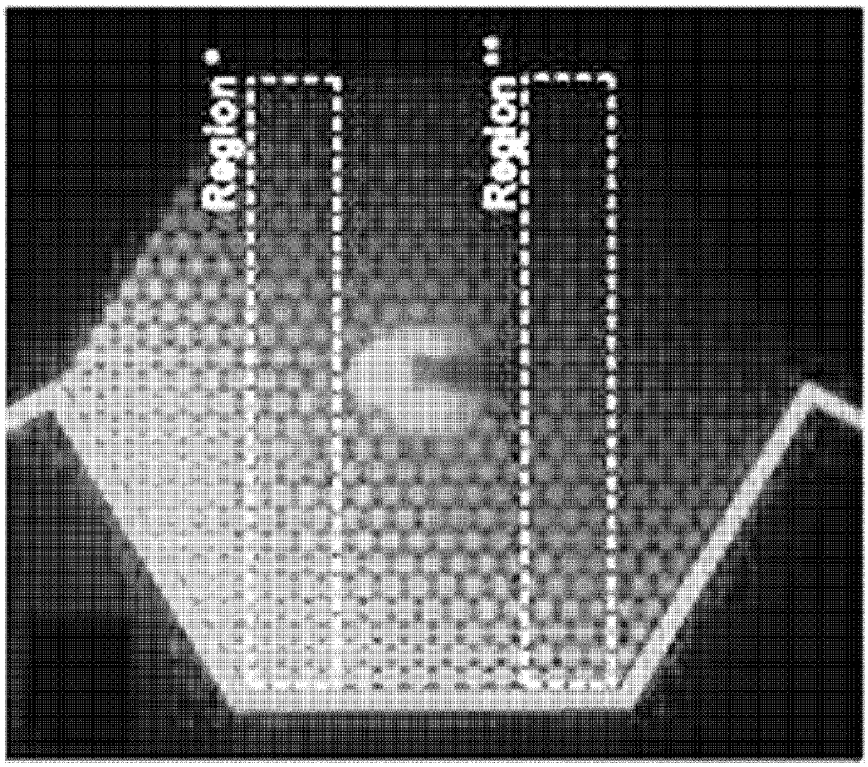


[도2]

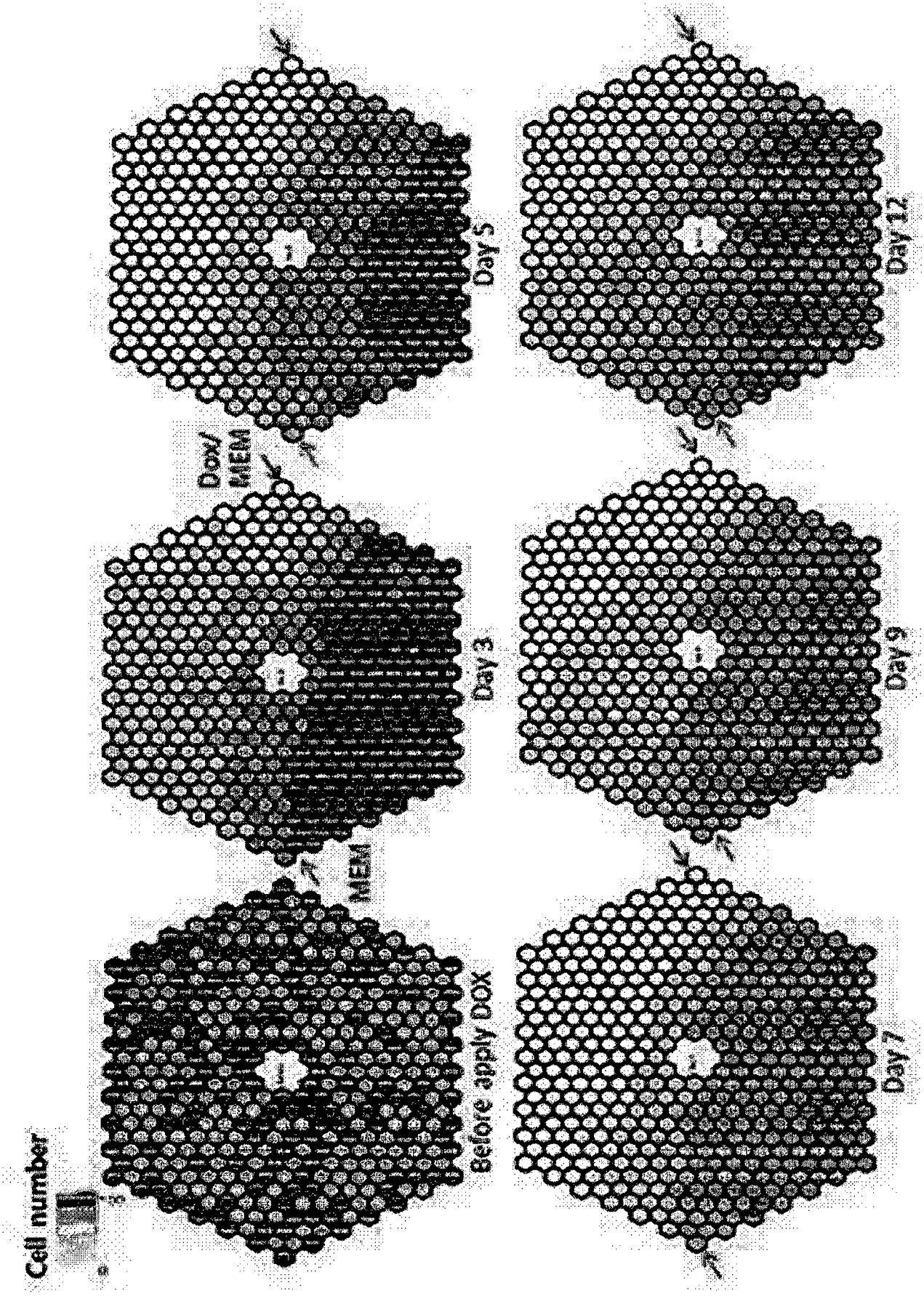


[도3]

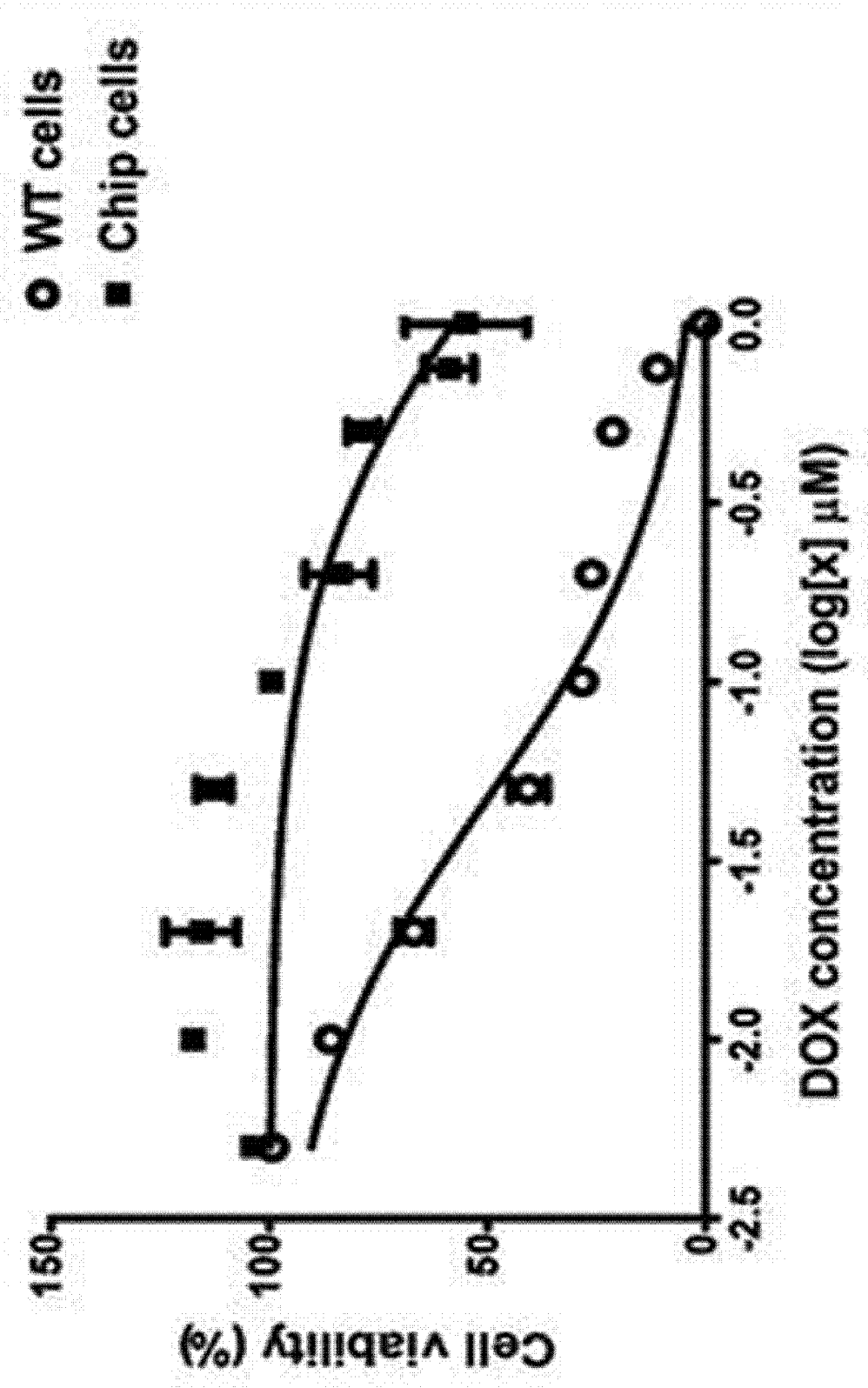

Region *
Region **
Distance (pixels)
Fluorescence intensity (a.u.)
(b)


Region *
Region **
(a)

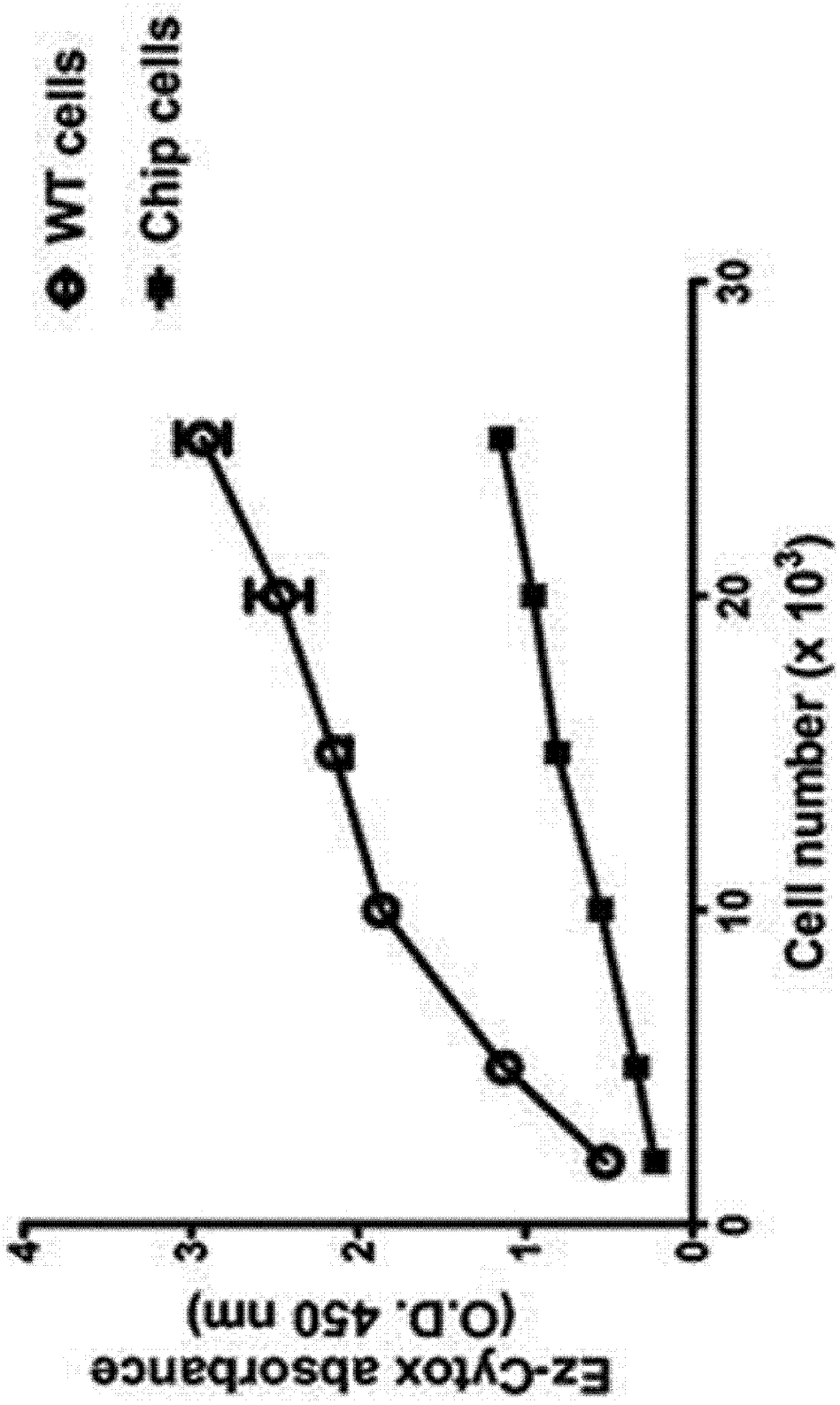
[도4]


Cell number
Before apply DOX
MEM
Dox/ MEM
Day 3
Day 5
Day 7
Day 9
Day 12

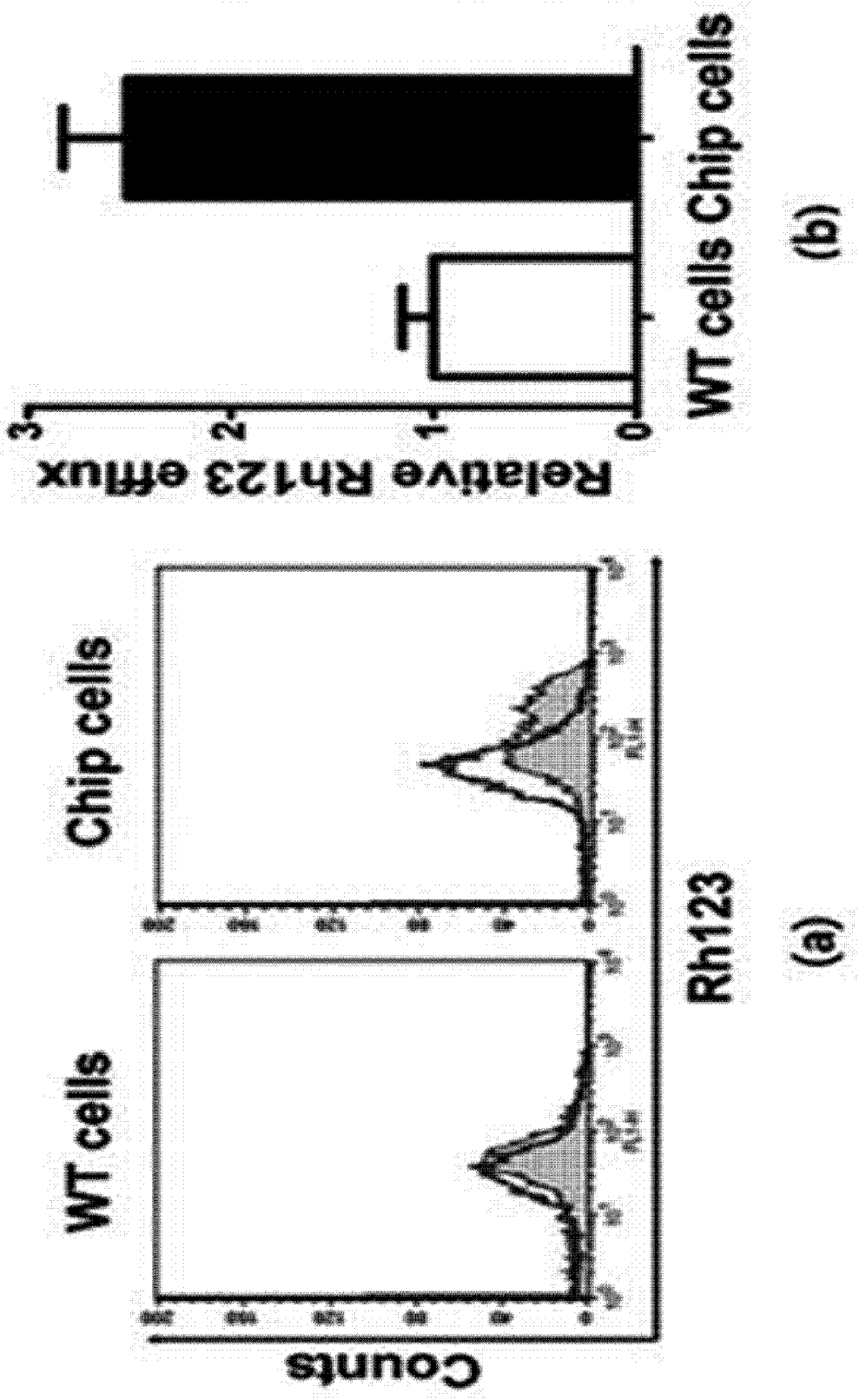
[도5]


WT cells
Chip cells
Cell viability (%)
150
100
50
0
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
DOX concentration (log[x] μM)

[도6]


WT cells
Chip cells
Ez-Cytox absorbance
(O.D. 450 nm)
0
1
2
3
4
0
10
20
30
Cell number (x 10³)

[도7]


Relative Rh123 efflux
3
2
1
0
WT cells Chip cells
(b)
Counts
WT cells
Chip cells
Rh123
(a)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/005108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01L 3/00(2006.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, A61K 31/704(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)

B01L 3/00; C12Q 1/02; G01N 35/08; G01N 33/50; C12M 3/00; C12M 1/34; C12N 5/09; A61K 31/704

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: chamber, cultivation, micro fluid, fluid diffusion part, antitumor agent resistance, cell, screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2014-0128547 A (NANOBIOSYS INC.) 06 November 2014 See paragraphs [0023]-[0027], [0035]; claim 1; and figures 2a-2c.	1-10
Y	KR 10-2005-0115540 A (LG CHEM. LTD.) 08 December 2005 See claim 1; and figures 1-2.	1-10
A	KR 10-1038484 B1 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 02 June 2011 See claims 1, 6, 15; and figures 2-5.	1-10
A	KR 10-1446526 B1 (QUANTA MATRIX CO., LTD. et al.) 08 October 2014 See claims 1, 3; and figures 1, 2.	1-10

☐ 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
08 AUGUST 2016 (08.08.2016)	**08 AUGUST 2016 (08.08.2016)**
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. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/005108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0128547 A	06/11/2014	WO 2014-175710 A1	30/10/2014
KR 10-2005-0115540 A	08/12/2005	KR 10-0724316 B1	04/06/2007
KR 10-1038484 B1	02/06/2011	KR 10-2011-0018798 A	24/02/2011
KR 10-1446526 B1	08/10/2014	CN 105209595 A	30/12/2015
		EP 2987851 A1	24/02/2016
		US 2016-0075985 A1	17/03/2016
		WO 2014-178692 A1	06/11/2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/005108

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

B01L 3/00(2006.01)I, C12N 5/09(2010.01)I, A61K 31/704(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

B01L 3/00; C12Q 1/02; G01N 35/08; G01N 33/50; C12M 3/00; C12M 1/34; C12N 5/09; A61K 31/704

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: 챔버, 배양, 미세유체, 유체확산부, 항암제 내성, 세포, 스크리닝

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2014-0128547 A (나노바이오시스 주식회사) 2014.11.06 단락 [0023]-[0027], [0035]; 청구항 1; 및 도면 2a-2c 참조.	1-10
Y	KR 10-2005-0115540 A (주식회사 엘지화학) 2005.12.08 청구항 1; 및 도면 1-2 참조.	1-10
A	KR 10-1038484 B1 (한양대학교 산학협력단) 2011.06.02 청구항 1, 6, 15; 및 도면 2-5 참조.	1-10
A	KR 10-1446526 B1 (주식회사 퀀타매트릭스 등) 2014.10.08 청구항 1, 3; 및 도면 1, 2 참조.	1-10

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 08월 08일 (08.08.2016)	2016년 08월 08일 (08.08.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
조기윤
전화번호 +82-42-481-5655

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/005108

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0128547 A	2014/11/06	WO 2014-175710 A1	2014/10/30
KR 10-2005-0115540 A	2005/12/08	KR 10-0724316 B1	2007/06/04
KR 10-1038484 B1	2011/06/02	KR 10-2011-0018798 A	2011/02/24
KR 10-1446526 B1	2014/10/08	CN 105209595 A	2015/12/30
		EP 2987851 A1	2016/02/24
		US 2016-0075985 A1	2016/03/17
		WO 2014-178692 A1	2014/11/06