



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월10일
(11) 등록번호 10-2177124
(24) 등록일자 2020년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) B41M 5/03 (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) C23C 18/16 (2006.01)
C23C 18/20 (2006.01) C23C 18/44 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12M 23/20 (2013.01)
B41M 5/03 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0029261
(22) 출원일자 2019년03월14일
심사청구일자 2019년03월14일
(65) 공개번호 10-2020-0109734
(43) 공개일자 2020년09월23일

(56) 선행기술조사문헌
KR1020160006841 A*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자
한국교통대학교 산학협력단
충청북도 충주시 대소원면 대학로 50

(72) 발명자
박성준
서울특별시 서초구 서운로 104, 203동 2703호(서초동, 래미안 서초 에스티지S)

이내윤
서울특별시 강남구 역삼로 315-1, 502동 2404호(역삼동, 개나리SK뷰)

(74) 대리인
특허법인충현

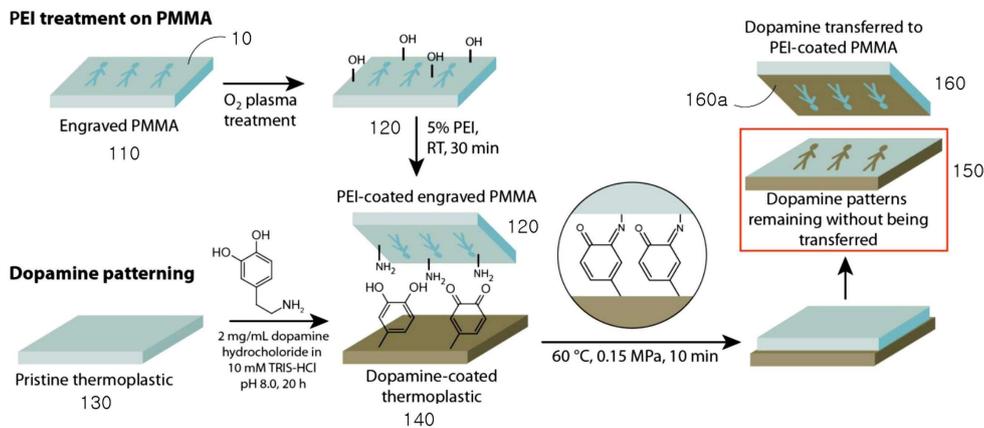
심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 감법전사방식에 의한 도파민 패턴 제조방법

(57) 요약

본 발명은 도파민 패턴 제조방법에 관한 것으로서, 감법전사방식을 통해 도파민 패턴을 제조하는 방법을 특징으로 하며, 패턴의 붕괴없이 깔끔하고 완벽한 도파민 패턴을 간단한 조작을 통해 대량으로 제조할 수 있고, 소수성의 기판 상에 형성되어 있으므로, 다방면으로 활용이 가능하다는 장점을 갖는다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12M 23/12 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
C23C 18/1603 (2013.01)
C23C 18/1641 (2013.01)
C23C 18/2086 (2013.01)
C23C 18/44 (2013.01)
C12N 2533/20 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170029237 A
KR1020140085006 A
US8999452 B2
CN101913278 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 하드 기판 상에 음각으로 일정한 패턴을 새기는 단계;
- 2) 상기 하드 기판 표면을 초친수성으로 개질하기 위해 산소 플라즈마를 처리하는 단계;
- 3) 상기 표면개질된 패턴이 형성된 하드 기판 표면 전체에 아민계 고분자층을 코팅하는 단계;
- 4) 도파민이 코팅된 열가소성 기판 상에 아민계 고분자층이 코팅된 하드 기판을 배치하되, 상기 아민계 고분자층이 상기 도파민층과 마주보도록 위치시키는 단계; 및
- 5) 상기 열가소성 기판으로부터 상기 하드 기판 방향으로 가압, 가열한 후, 두 기판을 분리하면 상기 열가소성 기판 상으로부터 도파민층이 상기 하드 기판의 일정한 패턴을 제외하고 전사되어 제거되고, 상기 열가소성 기판에는 도파민 패턴층이 형성되는 단계를 포함하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 1) 단계 후, 상기 하드 기판을 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하드 기판은 폴리 메틸 메타크릴레이트(poly methyl methacrylate, PMMA)인 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 열가소성 기판은 폴리스타이렌(Polystyrene, PS) 기판, 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC) 기판 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(Polyethyleneterephthalate, PET) 기판으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 아민계 고분자는 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine: PEI), 폴리아민(Polyamines), 폴리아미드아민(Polyamideamine), 폴리비닐아민(Polyvinylamine), 폴리아미도이민(Polyamidoimine), 폴리알릴아민(Polyallylamine), 폴리라이신(Poly-L-lysine) 및 키토산(Chitosan) 군으로부터 선택된 1종 이상의 고분자 또는 이의 공중합체인 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 5) 단계에서 가압 조건은 0.05 내지 5.0 MPa인 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 5) 단계에서 가열 조건은 60 내지 90 °C인 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법..

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 5) 단계에서 가압, 가열은 1 내지 10분동안 수행되는 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감법전사방식에 의한 도파민 패턴 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 감법전사방식을 이용하여 비-탄성 기판에 도파민 패턴을 형성하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바다에서 서식하는 홍합의 우수한 표면 접착능력은 다양한 영역에 활용될 수 있는 주제로서 널리 연구되고 있다. 이러한 표면 접착 능력은 홍합의 접착 물질의 작용기인 카테콜(catechol)이 중요한 역할을 한다. 따라서, 카테콜로 구성되는 도파민 역시 우수한 부착 특성을 나타내며, 금속 도금, 세포배양, 등 다방면에 적용이 가능할 뿐만 아니라, 비용 및 공정에서 강점을 가지고 있다.

[0003] 상기 금속 도금이나 세포 배양에서는, 일정한 패턴을 정확하고 균일하게 형성하는 것이 중요한 요소로 작용한다. 이를 위해 세포 분주 몰드(cell seeing mold)로 탄성막(elastomeric membranes)을 사용한 바 있고, PDMS(polydimethylsiloxane) 스탬프를 사용하여 폴리리신을 스탬핑하거나, 기판 상에 PEG(Polyethylene glycol)를 코팅하기 위해 다양한 소프트 리소그래피 방법, 잉크젯 프린팅, 자기적으로 라벨링된 세포 및 유전영동(dielectrophoresis) 등의 기술들이 개발되어 왔다. 이중에서도 소프트 리소그래피 방법이 도파민을 패터닝하는데 가장 널리 사용되고 있다.

[0004] 상술한 방법들로 도파민 패턴을 제조하고 이를 활용하여 세포 또는 나노물질의 패턴을 형성할 경우, 패턴간에 페어링(peering)되는 문제가 발생할 뿐만 아니라, 패턴이 처지거나(sagging), 경화 과정 동안 PDMS 기판이 수축되어 패턴의 변형/파손이 발생하는 등의 다양한 문제점들이 발생하였다. 즉 종래 패터닝 방법들만으로 도파민 패턴층을 형성하는데 많은 어려움이 있을 뿐만 아니라, 이를 세포의 패턴화 등에 활용하기에는 많은 문제점들이 존재한다. 게다가 소프트 리소그래피 방법의 경우에도 낮은 표면 에너지를 갖는 기판에 대해서는 매우 낮은 전달 효율을 갖고 있다는 가장 큰 한계점이 존재했다.

[0005] 따라서, 낮은 표면 에너지(높은 물 접촉각)를 갖는 기판에 대해서도 도파민 패턴층을 정확하고, 일정하게 형성할 수 있는 새로운 방법의 개발이 절실한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허 제10-1721071호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 낮은 표면 에너지를 갖는 기관에서 도파민 패턴을 효과적으로 제조할 수 있도록 하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 물리적으로 코팅된 도파민 패턴을 사용하여, 세포 또는 나노물질의 패턴을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 하기 단계를 포함하는 도파민 패턴의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 1) 하드 기관 상에 음각으로 일정한 패턴을 새기는 단계;
- [0011] 2) 상기 하드 기관 표면을 초친수성으로 개질하기 위해 산소 플라즈마를 처리하는 단계;
- [0012] 3) 상기 표면개질된 패턴이 형성된 하드 기관 표면에 아민계 고분자층을 코팅하는 단계;
- [0013] 4) 도파민이 코팅된 열가소성 기관 상에 아민계 고분자층이 코팅된 하드 기관을 배치하되, 상기 아민계 고분자층이 상기 도파민층과 마주보도록 위치시키는 단계; 및
- [0014] 5) 상기 열가소성 기관으로부터 상기 하드 기관 방향으로 가압, 가열한 후, 두 기관을 분리하면 상기 열가소성 기관 상으로부터 도파민층이 상기 하드 기관의 일정한 패턴을 제외하고 전사되어 제거되고, 상기 열가소성 기관에는 도파민 패턴층이 형성되는 단계.
- [0015] 상기 1) 단계 후, 하드 기관을 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 감법전사방식에 의한 도파민 패턴의 제조방법.
- [0016] 상기 하드 기관은 폴리 메틸 메타크릴레이트(poly methyl methacrylate, PMMA)일 수 있다.
- [0017] 상기 열가소성 기관은 폴리스타이렌(Polystyrene, PS) 기관, 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC) 기관 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(Polyethyleneterephthalate, PET) 기관으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0018] 상기 아민계 고분자는 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine: PEI), 폴리아민(Polyamines), 폴리아미드아민(Polyamideamine), 폴리비닐아민(Polyvinylamine), 폴리아미도이민(Polyamidoimine), 폴리알릴아민(Polyallylamine), 폴리라이신(Poly-L-lysine) 및 키토산(Chitosan) 군으로부터 선택된 1종 이상의 고분자 또는 이의 공중합체일 수 있다.
- [0019] 상기 5) 단계에서 가압 조건은 0.05 내지 5.0 MPa일 수 있다.
- [0020] 상기 5) 단계에서 가열 조건은 60 내지 90 °C일 수 있다.
- [0021] 상기 5) 단계에서 가압, 가열은 1 내지 10분동안 수행될 수 있다.
- [0022] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 상기 도파민 패턴의 제조방법으로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 기관 상에 마이크로물질 또는 나노물질 또는 세포가 분산되어 있는 분산액으로 코팅하는 단계;를 포함하는 세포 패턴 또는 나노물질 패턴의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 상기 나노물질은 발광 나노입자, 초상자성 나노입자, 금속 나노입자 및 금속산화물 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0024] 상기 금속 나노입자의 경우, 무전해 도금법으로 코팅할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명은 비-탄성이면서 소수성 표면을 갖는 기관 상에 친수성의 도파민 패턴을 제조하는 새로운 전략에 관한 것으로, 감법전사방식을 통해 PEI의 아민 작용기와 도파민의 상호작용을 이용함으로써 패턴의 붕괴없이 깔끔하고 완벽한 도파민 패턴을 간단한 조작을 통해 대량으로 제조할 수 있다.

[0026] 상술한 과정을 통해 제조된 도파민 패턴은, 소수성의 기판 상에 형성되어 있으므로, 다방면으로 활용이 가능하다. 예를 들어 마이크로 물질, 나노물질 또는 세포를 선택적으로 패턴화하는데 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 도파민 패턴을 제조하는 과정을 개략적으로 도시한 공정도이다.

도 2A는 다양한 열가소성 기판(PC, PMMA, PS, PET)과 다양한 전사 온도(실온, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C)로 하여 제조된 도파민 패턴층을 촬영한 것이다.

도 2B는 도파민 코팅된 PC 기판으로부터 음각패턴을 갖는 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 60 °C의 전사 온도 하에서, 도파민을 전사하였을 때, 각 표면을 촬영한 사진이다.

도 3A는 표면 특성을 확인하기 위한 실험과정을 도식화한 것이다.

도 3B는 아무것도 처리되지 않은 PMMA 기판 표면에 대한 형광 현미경 이미지이다.

도 3C는 O₂-플라즈마 처리된 PMMA 기판 표면에 대한 형광 현미경 이미지이다.

도 3D는 PEI 코팅된 PMMA 기판 표면에 대한 형광 현미경 이미지이다.

도 4A는 본 발명에 따른 감법전사방식에 의한 도파민 패턴닝방법을 도시화한 것이다.

도 4B는 실험에 3으로부터 제조된 각각의 아무것도 처리안된 열가소성 기판 도파민 코팅된 기판, 도파민이 제거된 기판에 대한 물 접촉각을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 4C는 아무것도 처리하지 않은 PMMA 기판과 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 도파민 패턴닝 공정을 수행한 후의 표면을 촬영한 것이다.

도 4D는 아무것도 처리하지 않은 PMMA 기판과 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 도파민 패턴닝 공정을 수행하여 제조된 각각의 도파민이 제거된 PS 기판에서의 물 접촉각을 측정한 것이다.

도 5는 실시예 1 중에서 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판, PEI 코팅된 PMMA 기판, 도파민 코팅된 PS 기판에 대하여 XPS 분석을 실시한 결과이다. 도 5A는 광범위한 XPS 스캔 스펙트럼이고, 도 5B는 각각의 기판에 대한 원소의 원자비(%)를 나타낸 표이며, 도 5C는 O1s 및 N1s core level에 대한 고해상도 스펙트럼이다.

도 6A는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 배양하는 과정을 개략적으로 도시한 것이다.

도 6B는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('점 패턴')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 2일 동안 배양한 후, 광학 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 6C는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('점 패턴')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 4일 동안 배양한 후, 광학 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 6D는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 4일 동안 배양하고 광학현미경으로 촬영한 것이다.

도 6E는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 4일 동안 배양한 후, 살아있는 세포를 green-fluorescent calcein-AM(녹색 형광)으로 염색하여 형광 현미경으로 관찰한 것이다.

도 7A는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판의 제조과정을 도시화한 것이다.

도 7B는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판(d = 300 μm)의 광학 현미경(OM) 이미지이다.

도 7C는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판 내에 봉입된 유리비드를 확인하기 위한, 형광 이미지이다.

도 7D는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판의 웰 내에 유리비드(d = 40 μm)가 봉입되어 있음을 보여주기 위하여, 확대한 광학 현미경 이미지이다.

도 8A는 은으로 코팅되기 전과 후 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판의 표면을 광학 현미경으로 촬영한 것으로, 도 8A(a)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판이고, 도 8A(b)는 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판이며, 도 8A(c)는 무전해 도금방법으로 은이 코팅된 후의 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판이고, 도

8A(d)는 은이 코팅된 후의 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판이다.

도 8B은 은으로 코팅되기 전과 후 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판의 표면을 보여주는 SEM 이미지로, 도 8B(a)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판 중에서 도파민 패턴층이 형성된 면과 도파민이 제거된 면의 경계를 촬영한 것이고, 도 8B(b)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판에서 도파민 패턴층의 표면을 확대한 SEM 이미지이며, 도 8B(c)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판에 코팅된 은층에 대한 SEM 이미지이며, 도 8B(d) 상기 은층을 보다 확대한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서, 어떤 층 또는 기판이 다른 층 또는 기판과 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 층 또는 기판이 다른 층 또는 기판에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 층 또는 두 기판 사이에 또 다른 층 또는 또 다른 기재가 존재하는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명의 일 측면은 하기 단계를 포함하는 도파민 패턴의 제조방법에 관한 것이다.
- [0031] 1) 하드 기판 상에 음각으로 일정한 패턴을 새기는 단계;
- [0032] 2) 상기 하드 기판 표면을 초친수성으로 개질하기 위해 산소 플라즈마를 처리하는 단계;
- [0033] 3) 상기 표면개질된 패턴이 형성된 하드 기판 표면에 아민계 고분자층을 코팅하는 단계;
- [0034] 4) 도파민이 코팅된 열가소성 기판 상에 아민계 고분자층이 코팅된 하드 기판을 배치하되, 상기 아민계 고분자층이 상기 도파민층과 마주보도록 위치시키는 단계; 및
- [0035] 5) 상기 열가소성 기판으로부터 상기 하드 기판 방향으로 가압, 가열한 후, 두 기판을 분리하면 상기 열가소성 기판 상으로부터 도파민층이 상기 하드 기판의 일정한 패턴을 제외하고 전사되어 제거되고, 상기 열가소성 기판에는 도파민 패턴층이 형성되는 단계.
- [0036] 우선, 1) 하드 기판(110) 상에 음각으로 일정한 패턴(10)을 새긴다.
- [0037] 상기 패턴(10)을 형성하는 단계는 당해 분야에서 일반적으로 사용되는 방법이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 CNC 밀링(computer numerical control milling)을 이용해 형성될 수 있다. CNC 밀링은 컴퓨터 수치 제어를 이용한 밀링 절삭 방법 중 하나로, CNC 밀링 머신을 통해 가공품의 평면 절삭, 곡면 절삭, 홈 절삭, 절삭 가공 등을 정밀히 수행할 수 있다. CNC 밀링은 절삭 분야에서 통상적으로 알려져 있는 것이므로 구체적인 설명은 생략하도록 한다.
- [0038] 상기 하드 기판(120)은 폴리 메틸 메타크릴레이트(poly methyl methacrylate, PMMA)일 수 있다.
- [0039] 상기 패턴(10)의 형태는 하드 기판 상에 음각으로 새길 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 폭, 길이, 깊이, 형태에 특정되지 않고 다양한 형태로 디자인될 수 있다. 후술하는 실험예에서와 같이 'GU'나 사람을 나타내는 기호 등의 형태로 형성되는 것도 가능하다.
- [0040] 상기 1) 단계 후, 상기 하드 기판(120)을 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 세척 단계는 상기 하드 기판 상에 잔류한 불순물을 제거하기 위한 단계로, 증류수, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 등으로 5 내지 20분 정도 세척한 후 진공 건조기에서 충분히 건조시키는 과정을 통해 수행되는 것일 수 있다.
- [0041] 다음으로 2) 상기 하드 기판(120) 표면을 초친수성으로 개질하기 위해 산소 플라즈마를 처리한다. 상기 산소 플라즈마 장치를 이용하여 표면처리할 수 있다. 플라즈마 공정시 처리시간은 30 내지 300초가 적당하고, 이때 전력은 60 W일 수 있다. 30초 미만으로 플라즈마 처리가 이루어질 경우 부분친수화가 진행되어 패턴의 전사시 효율이 떨어지는 문제가 발생할 수 있고 300초를 초과할 경우에는 기판의 물성이 저하될 수 있고 공정비용이 상승할 우려가 있다. 또한 전력을 높여주면 플라즈마 처리 시간을 단축할 수 있으므로 전력에 따라 처리시간을 적절히 조절할 수 있다.
- [0042] 이후, 3) 상기 표면개질된 패턴이 형성된 하드 기판(120) 표면에 아민계 고분자층을 코팅한다. 이는 도파민 패턴층을 형성하는데 있어서, 상기 하드 기판만으로는 도파민의 전사를 매개할 수 있는 작용기가 거의 구비되지

않음에 따라서, 상기 아민계 고분자를 상기 하드 기판(120) 표면에 구비하여, 도파민층이 코팅된 열가소성 기판(140)과의 전사단계를 수행하였을 때, 상기 하드 기판(120) 상의 패턴(10)영역을 제외한 나머지 도파민과 용이하게 상호작용을 형성함에 따라, 목적하는 패턴(10) 영역만을 열가소성 기판(140) 상에 남기고 제거할 수 있다는 이점이 있다.

- [0043] 상기 아민계 고분자는 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine: PEI), 폴리아민(Polyamines), 폴리아미드아민(Polyamideamine), 폴리비닐아민(Polyvinylamine), 폴리아미도이민(Polyamidoimine), 폴리알릴아민(Polyallylamine), 폴리라이신(Poly-L-lysine) 및 키토산(Chitosan) 군으로부터 선택된 1종 이상의 고분자 또는 이의 공중합체일 수 있고, 바람직하게는 폴리에틸렌이민(PEI)일 수 있다.
- [0044] 다음, 3) 도파민이 코팅된 열가소성 기판(140) 상에 아민계 고분자층이 코팅된 하드 기판(120)을 배치하되, 상기 아민계 고분자층이 상기 도파민층과 마주보도록 위치시킨다.
- [0045] 상기 열가소성 기판은 폴리스타이렌(Polystyrene, PS) 기판, 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC) 기판 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(Polyethyleneterephthalate, PET) 기판으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0046] 상기 열가소성 기판 상에 도파민을 코팅하는 단계는, 구체적으로 도파민이 용해된 코팅제를 제조하고, 상기 코팅제를 상기 열가소성 기판에 도포하거나 침지시켜 도파민층을 형성하는 단계를 통해 제공될 수 있다.
- [0047] 상기 아민계 고분자의 아민작용기와 도파민의 카테콜기 간의 슈프(Schiff) 염기 반응으로 인해, 상기 패턴(10)이 붕괴되지 않고, 상기 패턴(10)을 제외한 나머지 도파민층이 정확하고 완전하고 빠르게 전사되어 제거될 수 있다.
- [0048] 최종적으로 4) 상기 열가소성 기판(140)과 상기 하드 기판(120)을 가압, 가열한 후, 두 기판을 분리하면 상기 열가소성 기판(140) 상으로부터 도파민층이 상기 하드 기판(140)의 일정한 패턴(10)을 제외하고 전사되어 제거되고, 상기 열가소성 기판(150)에는 도파민 패턴층이 형성된다.
- [0049] 보다 상세하게 상기 열가소성 기판(140)으로부터 상기 하드 기판(120)을 제거, 분리하면, 상기 하드 기판(120)의 일정한 패턴(10)을 제외한 상기 열가소성 기판(140)의 도파민층이 상기 하드 기판(160)의 PEI 층과 결합하여 전사되고, 상기 열가소성 기판(140)으로부터 제거되게 된다. 결국 상기 열가소성 기판(150) 상에는 상기 하드 기판(120)의 패턴(10)을 따라 도파민층이 남게되면서, 원하는 패턴(10)으로 패턴화된 도파민층이 상기 열가소성 기판(150) 상에 형성되는 것이다.
- [0050] 상기 5) 단계에서 가압 조건은 0.05 내지 5.0 MPa인 것이 바람직하다.
- [0051] 상기 5) 단계에서 가열 조건은 60 내지 90℃인 것이 바람직하는데, 60℃미만일 경우, 상기 도파민이 코팅된 열가소성 기판(140)으로부터 도파민층이 상기 하드 기판(120)으로 제대로 전사되지 못하고, 잔여물이 그대로 남아있게 되는 문제점이 있음을 확인하였다. 90℃를 초과할 경우에는 기판의 변형이나 패턴의 변형이 야기될 수 있고, 비용이 증가하는 문제가 발생할 수 있다.
- [0052] 상기 5) 단계에서 가압, 가열은 1 내지 10분 동안 수행되는 것이 바람직하는데, 1분 미만으로 수행되면 충분한 접착이 이뤄지지 않아 상기 도파민이 코팅된 열가소성 기판(140)으로부터 도파민층이 상기 하드 기판(120)으로 제대로 전사되지 못하며, 10분을 초과하면 도파민 중합 중간 생성물로 1차 아민과 2차 아민이 형성되므로, 원하는 도파민 패턴층의 물성을 얻을 수 없게되는 문제가 발생할 수 있다.
- [0053] 상기 5) 단계를 통해, 열가소성 기판(140)에 물리적으로 코팅되어 있던 도파민층에서 패턴(10)이 아닌 부분을 선택적이고 효율적으로 제거함으로써, 표면 상에 패턴(10)만 남겨둘 수 있다. 따라서, 본 발명은 감법전사방식을 통해 고-대비 도파민의 패턴화가 가능하다.
- [0054] 즉, 하드 기판(120) 상에 코팅된 아민계 고분자가 도파민과 강한 시프(Schiff)-염기 반응에 의한 공유결합을 형성하여, 패턴(10)이 아닌 영역에서의 도파민을 제거(subtraction)하게 되는 것이다.
- [0055] 이를 통해 도파민 층이 하드 기판(120)에 의해 제거되면, 상기 열가소성 기판(140)은 원래의 소수성과 투명성이 회복되게 된다. 이는 후술하는 실험을 통해 완전히 깨끗하게 도파민이 제거되는 것을 확인하였다. 이에 반해 패턴(10) 부분에는 도파민이 남아있게 되고, 상기 도파민 패턴층(150)은 친수성을 그대로 유지하게 된다.
- [0056] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 도파민 패턴층(150)은 도파민 패턴층(150)을 제외한 나머지 부분은 소수성 영역이고, 도파민 패턴층(150)은 친수성이기 때문에, 실질적으로 패턴과 외부 영역간에 분리막이

형성되어 있지 않더라도, 젖음성 차이로 인해 물리적 장벽이 형성되어 있다. 즉, 세포나 나노물질이 분산되어 있는 수용액을 처리할 경우, 별도의 공정단계 없이도 세포나 나노물질을 도파민 패턴층(150)을 따라 패턴화할 수 있다는 큰 장점을 갖는다.

- [0057] 상술한 제조방법은 종래 엘라스토머 스탬프를 사용하는 소프트 리소그래프와는 달리, 비 탄성 몰드를 사용하여 패턴의 변형없이 높은 정확도와 균질성으로 도파민을 전사시킴으로써, 간단한 조작만으로 도파민을 소수성 기판 상에 정밀하게 패턴화할 수 있음을 알 수 있다. 상기 과정을 통해 제조된 도파민 패턴층의 두께는 열가소성 기판 상에 코팅되는 도파민 층의 두께를 제어함으로써 용이하게 조절될 수 있다.
- [0058] 상술한 방법으로 제조된 도파민 패턴층은 마이크로 웰 어레이를 개발하거나 세포배양 플랫폼을 위한 세포의 패턴화하는데도 사용할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 다른 측면은 상술한 과정을 통해 제조된 도파민 패턴층이 형성된 기판(160) 상을 마이크로물질 또는 나노물질 또는 세포가 분산되어 있는 분산액에 침지 또는 도포하는 단계;를 포함하는 세포 패턴 또는 나노물질 패턴의 제조방법에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명은 앞서 도파민 패턴 제조방법을 통해 낮은 표면 에너지(높은 물 접촉각)를 갖는 기판에서 도파민 패턴을 효과적으로 패턴화함으로써, 친수성과 소수성 표면의 차이로 인해 각각의 패턴이 물리적 장벽으로 작용하므로, 각 패턴이 공간적으로 분리되어 형성되어 있을 수 있다. 따라서 이와 같은 특성으로 간단하게 세포를 패턴화할 수 있으므로, 대량으로 세포 배양 플랫폼을 제공할 수 있다.
- [0061] 상기 분산액은 수용액인 것이 바람직하며, 증류수 또는 완충액일 수 있다.
- [0062] 상기 나노물질은 발광 나노입자, 초상자성 나노입자, 금속 나노입자 및 금속산화물 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0063] 상기 세포가 분산되어 있는 분산액은 세포 배양배지를 더 포함할 수 있다. 배양배지는 세포에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 상기 세포 역시 2차원 배양이 가능한 세포라면 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 상기 마이크로물질은 1 내지 100 μm 의 직경을 갖는 구형의 비드일 수 있다.
- [0065] 상기 금속 나노입자의 경우, 무전해 도금법으로 코팅할 수 있다. 이는 도파민 패턴층(160)을 기반으로 하여 복잡한 전기 장치를 사용하지 않더라도 단순하게 선택적으로 금속을 침착시켜 패턴화할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 금속으로 은을 사용하였다.
- [0066] 후술하는 실험예에서 확인한 바와 같이, 상기 과정을 통해 제조된 마이크로물질, 나노물질 또는 세포로 이루어진 패턴은 도파민 패턴층을 벗어난 부분에서는 전혀 증착되지 않음을 확인할 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명의 따른 도파민 패턴층은 세포의 배양에 있어서 독성을 전혀 나타내지 않으므로, 새로운 세포 패턴의 제조방법 및 세포배양 플랫폼으로써 활용이 가능함을 확인하였다.
- [0068] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.
- [0069] **<실험재료>**
- [0070] 도파민 염산염(dopamine hydrochloride), PEI(분지, Mw ~ 25,000), 질산은(AgNO₃), D-(+)-포도당 및 수산화암모늄 용액(NH₄OH, 28.0-39.0%)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Tris-HCl(1 M, pH 8.0)은 Biosesang(한국)로부터 구입하였다. PMMA, PC, PS 및 PET 기판은 Goodfellow(Huntingdon, 영국, 영국)에서 구입하여 사용하였다.
- [0071] 인간 제대 정맥 내피세포(HUVECs), 내피 세포 배양액(ECM, endothelial cell medium), 페니실린/스트렙토마이신(P/S) 용액, 내피 세포 성장 보충제(ECGS), 트립신/EDTA 용액 0.25%(T/E), 트립신 중화 용액(TNS, trypsin neutralization solution) 트립판 청색 용액 0.4%(TB, trypan blue solution), Dulbecco 인산완충생리식염수(DPBS, Dulbecco 's phosphate buffered saline) 및 소태아혈청(FBS, fetal bovine serum)은 ScienCell Research Laboratories(California, USA)로부터 구입하였다.
- [0072] 세포 생존여부를 분석하기 위한 LIVE/DEAD[®] 생존 능력/세포 독성 키트와 녹색 형광을 띄는 카르복실레이트로 개질된 마이크로스피어(FluoSpheres[™] Carboxylate-Modified Microspheres)('형광비드'라고도 한다)는 Thermo

Fisher Scientific(Massachusetts, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, Polysciences(미국 펜실베이니아)로부터 30-50 μm 유리비드를 구입하였다.

[0073] **<실시예 1> 도파민 패턴층의 제조**

[0074] 도 1을 참고하면, 먼저 컴퓨터 수치 제어(CNC) 밀링 머신(TINYROBO, Korea)을 사용하여 PMMA 기판 표면에 음각으로 일정한 패턴을 새겼다(1 단계). 이후, 상기 음각패턴이 새겨진 PMMA 기판을 철저히 세척하여 플라스틱 먼지를 제거하였다. 상기 음각패턴이 새겨진 PMMA 기판을 1 분 동안 60 W에서 산소 플라즈마로 처리하고(Femto Science, Korea)(2 단계), 풍부한 아민 기능성(amine-rich functionalities)을 부여하기 위해 상온에서 30 분 동안 1 % PEI 수용액에 침지시켰다(3 단계).

[0075] 다음으로, 10 mM Tris-HCl(pH 8) 버퍼 용액을 준비하고 도파민 하이드로 클로라이드와 혼합하여 농도 2 mg mL⁻¹의 도파민 용액을 준비하였다. 상기 도파민 용액에 PS 기판(열가소성 기판)을 담그고, 실온에서 20 시간 동안 방치한 후, 증류수로 씻고, 공기로 건조시켜, 도파민 코팅된 기판을 준비하였다.

[0076] 상기 도파민 코팅된 PS 기판과 3 단계에서 준비된 PEI로 코팅된 PMMA 기판을 서로 밀착 접촉시켜(4 단계), 0.15 MPa의 압력에서 10 분 동안 맞춤형 공압 프레스기를 사용하여 60 °C 이상으로 가열하여 수행한 후, 두 기판을 분리하여, 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판과 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판을 얻었다(5 단계).

[0077] 상기 두 기판의 표면을 육안으로 확인한 결과, 도파민 코팅된 PS 기판으로부터 PEI가 코팅된 PMMA 기판으로 일정한 패턴을 제외한 도파민 층(갈색을 띠)이 전사되었음을 확인하였다. 즉, PEI가 코팅된 PMMA 기판 상에 존재하는 음각패턴을 따라 도파민층이 남게되므로, 하기 PS 기판 상에는 도파민 패턴층이 형성됨을 확인하였다.

[0078] **<실시예 2> 도파민 패턴층을 갖는 PC 기판의 제조**

[0079] 열가소성 기판으로 PC를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 모두 동일하게 도파민 패턴층을 갖는 PC 기판을 제조하였다.

[0080] **<실시예 3> 도파민 패턴층을 갖는 PET 기판의 제조**

[0081] 열가소성 기판으로 PET를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 모두 동일하게 도파민 패턴층을 갖는 PET 기판을 제조하였다.

[0082] **<실시예 4> 마이크로웰 어레이 제조**

[0083] 열가소성 기판으로 마이크로웰 구조를 갖는 PS 기판과 음각 패턴을 새기지 않은 PMMA 기판을 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 모두 동일하게 하여 마이크로웰 구조의 PS 기판을 제조하였다.

[0084] 상기 마이크로웰 구조를 갖는 PS 기판은 CNC 밀링 머신을 사용하여 PS 기판에 직경 300 μm 의 오목부를 새겨 제조되었다.

[0085] 상기 마이크로웰 구조를 갖는 PS 기판의 마이크로 웰 내부까지 도파민이 주입되기 위해서는 추가적인 공정이 필요하다. 우선 공기 방울(air bubble)이 없는 소수성 마이크로 웰 내에 도파민을 코팅하기 위해, 에탄올로 상기 오목부(cavities)를 충전하였다. 이후 물이 채워진 배치에 넣어, 상기 오목부에 에탄올이 제거되고, 빈자리를 물이 메꾸도록 하였다. 다음, 도파민 용액에 20 시간 동안 기판을 침지시켜, 오목부와 기판 표면 모두에 도파민이 코팅되도록 하였다.

[0086] 이후 과정은 실시예 1과 모두 동일하나, 간략하게 설명하면 상기 도파민 코팅된 PS 기판(마이크로웰 구조)을 PEI 코팅된 PMMA 기판 상에 밀착 접촉시키고, 0.15 MPa, 60°C에서 10분간 가압 가열한 다음, 분리하면 오목부외에 도파민층이 PEI 코팅된 PMMA 기판에 의해 제거됨으로써, 도파민층으로 오목부만 코팅되어 있는 마이크로 웰 어레이를 얻을 수 있다.

[0087] 이후, 형광비드가 분산된 수용액 또는 유리비드가 분산된 수용액을 마이크로 피펫으로 마이크로 웰 어레이 상에 반복적으로 도포 및 흡인시키고, 형광 현미경과 광학 현미경으로 확인한 바, 오목부(웰)에만 선택적으로 형광비드나 유리비드가 채워져 있음을 확인하였다. 이는 후술하는 실험예를 통해 보다 구체적으로 설명하기로 한다.

[0088] **<실험예 1> 전사 조건 최적화**

[0089] 도파민 패턴층을 제조하기 위한 조건을 최적화하기 위한 것으로 실험은 다음과 같이 수행하였다.

[0090] PMMA 기판을 철저히 세척하여 플라스틱 먼지를 제거하고, 1 분 동안 60 W에서 산소 플라즈마로 처리한 후

(Femto Science, Korea), 풍부한 아민 기능성(amine-rich functionalities)을 부여하기 위해 상온에서 30 분 동안 1 % PEI 수용액에 침지함으로써, PEI 코팅된 PMMA 기판을 준비하였다.

- [0091] 다음으로, 10 mM Tris-HCl(pH 8) 버퍼 용액을 준비하고 도파민 하이드로 클로라이드와 혼합하여 농도 2 mg mL⁻¹의 도파민 용액을 준비하고, 상기 도파민 용액에 다양한 열가소성 기판(PC, PMMA, PS, PET)을 각각 담그고, 실온에서 20 시간 동안 방치한 후, 증류수로 씻고, 공기로 건조시켜, 도파민 코팅된 기판을 준비하였다.
- [0092] 상기 도파민 코팅된 기판과 PEI로 코팅된 PMMA 기판을 서로 밀착 접촉시켜 0.15 MPa의 압력에서 10 분 동안, 다양한 전사 온도(실온, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C) 조건 하에서, 맞춤형 공압 프레스기를 사용하였다. 상기 두 기판을 분리한 후, 각각의 표면을 촬영하여 도 2에 나타내었다.
- [0093] 도 2A는 다양한 열가소성 기판(PC, PMMA, PS, PET)과 다양한 전사 온도(실온, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C)로 하여 제조된 도파민 패턴층을 촬영한 것이다.
- [0094] 도 2B는 도파민 코팅된 PC 기판으로부터 음각패턴을 갖는 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 60 °C의 전사 온도 하에서, 도파민을 전사하였을 때, 각 표면을 촬영한 사진이다.
- [0095] 상기 도 2A, B에서 'a'는 도파민이 원래 코팅되어 있었던 열가소성 기판으로, 전사 과정을 통해 표면으로부터 도파민 층이 제거되는 기판이다. 'b'는 PEI가 코팅된 PMMA 기판이며, 상기 'a'에서 'b'로 전사가 이루어지며, 이는 화살표를 통해 표기하였다. 스케일 바 = 50 μm.
- [0096] 도 2A에 나타난 바와 같이, 폴리도파민(Polydopamine)은 고유한 진갈색을 띤다. 본 실험에서 각 기판 표면에 존재하는 갈색 색상의 외관(appearance)과 배치(relocation)를 관찰하여 도파민의 코팅과 전사 여부를 확인하였다. PEI 코팅된 PMMA를 사용한 경우, 1급, 2급 아민의 풍부함으로 인해 도파민 전사가 잘 이뤄지고, 열가소성 기판으로부터 PEI 코팅된 PMMA 층으로의 도파민 층 전사가 전체적으로 고르게 이루어짐을 확인하였다. 이는 열가소성 물질에 관계없이 전사 온도가 높을수록 우세한 것을 알 수 있다. 특히, 50 °C 이상의 온도에서, 열가소성 표면의 도파민 층이 PEI 코팅된 PMMA 기판으로 완전히 전사되었음을 확인하였다.
- [0097] 그러나 전사온도가 40 °C 이하로 내려가거나, 상온이 되면, 열가소성 기판으로부터 도파민 층이 PEI 코팅된 PMMA 기판으로 전사되지 못함을 육안으로 확인할 수 있다. 이는 고온에서 아민기와 도파민 층 사이의 반응성이 증가하기 때문일 것으로 예상된다.
- [0098] 도 2B는 앞서 설명한 바와 같이 평평한 폴리카보네이트(PC) 표면 상에 전체적으로 도파민층을 코팅한 다음, 음각 패턴을 갖는 PEI가 코팅된 PMMA 기판으로 전사한 후, 이를 촬영한 것이다. 도 2b를 살펴보면 폴리카보네이트(PC) 기판의 표면에서부터 PEI가 코팅된 PMMA 기판으로 전사되되, 음각으로 새겨진 패턴을 제외한 평평한 영역에만 선택적으로 전사되었음을 알 수 있다. 전사 인쇄 후, PC 기판 상에 남아있는 도파민 패턴의 치수는 PEI 코팅된 PMMA의 새겨진 부분의 치수와 잘 일치하였으며, 전사 공정 중에 패턴의 왜곡이 발생하지 않음을 확인하였다. 또한 본 발명은 하드 기판을 사용함에도 높은 품질, 높은 해상도의 패턴을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 밀착 접촉(conformal contact)으로 인해 야기되는 문제들을 오히려 극복하고 있음을 알 수 있다.
- [0099] **<실험예 2> PEI 코팅된 PMMA 기판의 표면 분석**
- [0100] PMMA 기판을 철저히 세척하여 플라스틱 먼지를 제거하여, 아무것도 처리되지 않은 PMMA 기판(Pristine PMMA)을 준비하였다. 다음 상기 PMMA 기판을 1 분 동안 60 W에서 산소 플라즈마(Femto Science, Korea)로 처리하여 O2-플라즈마 처리된 PMMA 기판을 제조하였다. 마지막으로 풍부한 아민 기능성(amine-rich functionalities)을 부여하기 위해 상기 O2-플라즈마 처리된 PMMA 기판을 상온에서 30 분 동안 1 % PEI 수용액에 침지시켜, PEI 코팅된 PMMA 기판을 제조하였다.
- [0101] 상기 과정을 통해 PMMA 표면에 성공적으로 PEI 층이 형성되었는지 여부를 카르복실레이트로 개질된 마이크로스피어(이하, '형광비드'라고 한다)를 통해 평가하고자 하였다.
- [0102] 도 3A는 표면 특성을 확인하기 위한 실험과정을 도식화한 것으로, 이를 참고로 하여 실험방법을 설명하면 다음과 같다. 상기 과정을 통해 제조된 아무처리도 되지 않은 PMMA 기판(Pristine PMMA), O2-플라즈마 처리된 PMMA 기판, PEI 코팅된 PMMA 기판을 준비하고, 각각의 표면 전체에 카르복실레이트로 개질된 마이크로스피어(이하, '형광비드'라고 한다)를 골고루 처리하였다. 5분이 지난 후, 증류수로 세척하고 청색 형광필터를 통해 형광을 측정하는 다음 ProgRes[®] CapturePro 소프트웨어로 분석하였다.
- [0103] 카르복실레이트로 개질된 형광비드는 카르복실레이트에 의해 음전하를 띄며, PEI의 아민기에 결합한다. 따라서,

상기 형광비드를 PMMA 표면에 처리하였을 때, 형광비드가 고정화되었는지를 형광(녹색 형광)으로 확인함으로써 PMMA 표면 상에 PEI가 균일하거나 성공적으로 형성되었는지를 평가할 수 있다. 이때, 카르복실레이트로 개질된 마이크로스피어(형광비드)는 100 배 희석시켜 사용하였다.

[0104] 도 3B는 아무것도 처리되지 않은 PMMA 기판 표면에 대한 형광 현미경 이미지이고, 도 3C는 O2-플라즈마 처리된 PMMA 기판 표면에 대한 형광 현미경 이미지이며, 도 3D는 PEI 코팅된 PMMA 기판 표면에 대한 형광 현미경 이미지이다. 스케일 바는 500 μm 이다.

[0105] 도 3B, C, D에서와 같이, 아무처리도 되지 않은 PMMA 기판(Pristine PMMA), O2-플라즈마 처리된 PMMA 기판, PEI 코팅된 PMMA 기판에 형광비드를 처리하였을 때, 오로지 PEI로 코팅된 PMMA(도 3D)만이 강한 형광 신호를 나타내었다. 아무처리도 되지 않은 PMMA 기판과 O2-플라즈마 처리된 PMMA 기판은 무시할 수 있을 정도의 약한 신호만이 관찰되었다.

[0106] 상술한 결과의 차이를 통해, 형광비드의 카르복실레이트기는 PEI의 아민기와 정전기적 상호작용에 의해 결합을 형성하므로, 발현된 녹색 형광을 통해 카르복실레이트기를 갖는 형광비드들이 PEI가 코팅된 PMMA 기판 상에 균일하고, 성공적으로 고정되었음을 알 수 있다. 즉, PMMA 기판의 표면 상에는 PEI 층이 균일하게 형성되어 있음을 알 수 있다.

[0107] <실험예 3> 접촉각 분석-1

[0108] 도파민 패터닝을 제조하기 위한 조건을 최적화하기 위한 것으로 실험은 다음과 같이 수행하였다.

[0109] PMMA 기판을 철저히 세척하여 플라스틱 먼지를 제거하고, 1 분 동안 60 W에서 산소 플라즈마로 처리한 후 (Femto Science, Korea), 풍부한 아민 기능성(amine-rich functionalities)을 부여하기 위해 상온에서 30 분 동안 1 % PEI 수용액에 침지함으로써, PEI 코팅된 PMMA 기판을 준비하였다.

[0110] 다음으로, 아무것도 처리안된 열가소성 기판(PC, PMMA, PS, PET)을 준비한다(I 단계, Pristine). 10 mM Tris-HCl(pH 8) 버퍼 용액을 준비하고 도파민 하이드로 클로라이드와 혼합하여 농도 2 mg mL⁻¹의 도파민 용액을 준비하고, 상기 도파민 용액에 다양한 열가소성 기판(PC, PMMA, PS, PET)을 각각 담그고, 실온에서 20 시간 동안 방치한 후, 증류수로 씻고, 공기로 건조시켜, 도파민 코팅된 기판(II 단계, dopamine coated)을 준비하였다.

[0111] 상기 도파민 코팅된 기판과 PEI로 코팅된 PMMA 기판을 서로 등각 접촉시켜 0.15 MPa의 압력에서 10 분 동안, 60 °C 온도 조건 하에서, 맞춤형 공압 프레스기를 사용하였다. 상기 두 기판을 분리하여 도파민이 전사된 PEI-코팅된 PMMA 기판(Dopamine-transferred to PEI-coated PMMA)과 도파민이 제거된 기판(III 단계, Dopamine-subtracted)을 제조하였다. 상기 각각의 기판 상에 sessile drop 기법을 사용하여 물 접촉각(Contact angle)을 측정하였고, 이는 Phoenix 10 시스템 (Surface Electro Optics, Korea)을 사용하였다. 각 기판 당 2군데 이상에서 물 접촉각을 측정하여 그 평균을 계산하여 도 4에 나타내었다.

[0112] 도 4A는 본 발명에 따른 감법전사방식에 의한 도파민 패터닝방법을 도시화한 것이다. 여기서 "I"은 아무런 처리도 가하지 않은 열가소성 기판(Pristine)을 의미한다. "II"는 20 시간 동안 도파민을 코팅한 열가소성 기판을 의미한다. "III"는 도파민 층이 전사공정을 통해 제거된 열가소성 기판(Dopamine-subtracted)을 의미한다.

[0113] 도 4B는 실험예 3으로부터 제조된 각각의 아무것도 처리안된 열가소성 기판 도파민 코팅된 기판, 도파민이 제거된 기판에 대한 물 접촉각을 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0114] 본 발명에 따른 감법전사방식에 의해 도파민이 패터닝 될 때, 도파민 코팅된 기판으로부터 패터를 제거한 도파민이 전부 PEI 코팅된 PMMA 기판으로 전사되는지를 조사하고자 하였다. 이를 위해 실험예 3의 I, II, III 단계로부터 얻은 기판의 표면의 접촉각 변화를 통해 확인하였다.

[0115] 도 4B에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 PC, PMMA, PS 및 PET 기판(I 단계)의 물 접촉각은 각각 79.1 \pm 0.7°, 74.3 \pm 1.1°, 85.1 \pm 1.4° 및 83.6 \pm 1.1° 이었다.

[0116] 도파민이 코팅된 후에는, 도파민의 친수성 때문에 접촉각이 모두 약 40° 로 감소하였다.

[0117] 다음, III 단계를 통해 도파민이 제거된 후에는, PC, PMMA, PS 및 PET 기판의 물 접촉각이 각각 78.6 \pm 0.5°, 69.4 \pm 0.8°, 85.4 \pm 1.4°, 81.2 \pm 0.7° 으로 처음 수준으로 회복되었음을 알 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 감법전사방식에 의해 도파민이 패터닝 될 때, 즉, 도파민 코팅된 기판으로부터 패터를 제외한 부분의 도파민이 전부 PEI 코팅된 PMMA 기판으로 전사된다는 것을 의미한다.

[0118] <실험예 4> PEI 코팅층에 따른 접촉각 분석-2

[0119] 본 발명에 따른 감법전사방식에 의해 도파민이 패터닝될 때, PMMA 기판 표면의 영향을 살펴보고자 하였다. 이를 위해 아무것도 처리하지 않은 PMMA 기판과 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 실험예 3과 같이 도파민 패터닝을 수행하고, 이로부터 제조된 각각의 도파민이 제거된 PS 기판('b', 'd')에 대해 물 접촉각을 분석하였다. 또한 상기 과정을 통해 얻어진 도파민이 전사된 각각의 PMMA 기판('a', 'c')에 대해서도 물 접촉각을 분석하였다.

[0120] 도 4C는 아무것도 처리하지 않은 PMMA 기판과 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 도파민 패터닝 공정을 수행한 후의 표면을 촬영한 것이다. 도 4D는 아무것도 처리하지 않은 PMMA 기판과 PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용하여 도파민 패터닝 공정을 수행하여 제조된 각각의 도파민이 제거된 PS 기판에서의 물 접촉각을 측정된 것이다.

[0121] 도 4C에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 PMMA 기판을 사용한 경우에는, 도파민 전사가 매우 부분적으로 일어났다. 이에 반해, PEI 코팅된 PMMA 기판을 사용한 경우에는 도파민 전사가 전체적으로 균일하게 이루어졌음을 확인하였다.

[0122] 도 4D를 살펴보면, 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판('c')은 $72.84 \pm 0.6^\circ$ 로 수접촉각이 현저히 증가하였음을 확인하였다. 도파민이 코팅된 기판의 물 접촉각이 40° 인 점을 고려한다면, 예상외의 결과이다.

[0123] 실험예 3의 결과에서 살펴본 바와 같이, 도파민 표면이 당연히 친수성일 것이라는 것과는 모순되는 것이라 할 수 있다. 이는 도파민의 구조적 형태에 따라 다른 특성을 보이는 것에서 기인한다고 여겨진다. 즉, PEI 층에 존재하는 아민기와 카테콜 기의 접합된 형태를 따라 전자쌍(lone electron pair)의 탈편재화(delocalizing)가 일어나, 물과의 수소 결합 형성 정도에 영향을 주었기 때문이라 볼 수 있다.

[0124] 따라서, 본 발명에 따른 감법전사방식에 의해 도파민을 패터닝하기 위해서는 반드시 PMMA 기판을 PEI로 코팅하는 과정이 필요하다는 것을 알 수 있다.

[0125] <실험예 5> XPS 분석

[0126] XPS 분석(X-ray photoelectron spectroscopy, Axis-His, Kratos Analytical)이 수행되었다. 40 eV의 통과 에너지(pass energy)를 갖는 알루미늄 X-선 소스(모노 건, 1486.6 eV)가 장착된 AxisHsi (Kratos Analytical, UK)를 사용하여 측정하였다. 데이터 취득 전에 챔버의 압력은 5×10^{-9} Torr 미만이었으며, 애노드의 전압 및 전류는 각각 13 kV 및 18 mA이었다. 이륙각(take-off angle) 45° 였다. C1s의 결합 에너지(284.5eV)를 기준으로 활용되었고, 결합 에너지 측정을 위한 에너지 분해능은 대략 0.1eV이었다.

[0127] 도 5는 실시예 1 중에서 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판, PEI 코팅된 PMMA 기판, 도파민 코팅된 PS 기판에 대하여 XPS 분석을 실시한 결과이다. 도 5A는 광범위한 XPS 스캔 스펙트럼이고, 도 5B는 각각의 기판에 대한 원소의 원자비(%)를 나타낸 표이며, 도 5C는 O1s 및 N1s core level에 대한 고해상도 스펙트럼이다.

[0128] 도 5A에 나타난 바와 같이, PS 기판은 탄소와 수소로만 구성되어 있기 때문에, XPS 스펙트럼에서 관찰된 O1s 및 N1s 피크는 PS 기판 상에 코팅된 도파민을 나타내는 것이라 할 수 있으며, 이를 통해 PS 기판 상에 도파민이 제대로 코팅되어 있음을 알 수 있다.

[0129] PEI 코팅된 PMMA 기판에서는 뚜렷하고 강한 N1 피크를 관찰할 수 있는데, 이를 통해 PEI가 PMMA 기판 표면에 성공적으로 결합되었음을 알 수 있다. 또한 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판에서는 C1s 피크 강도가 다른 것들보다 높은 것을 확인하였다.

[0130] 도 5B에 나타난 바와 같이, 각각에 대한 XPS 스펙트럼으로부터 원자 비율을 계산한 바, 도파민 코팅된 PS 기판은 0.13의 N/C 비를 가지고 있었으나, 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판은 0.084의 N/C 비를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 즉, 두 기판 모두 동일하게 도파민층을 표면에 가지고 있음에도 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판의 N/C 비는 더 낮은 것으로 분석되었다. 이와 같이 도파민이 전사되었을 때 N 피크 또는 O 피크가 아닌 C 피크 강도만 증가했다는 것은 PEI층과 도파민층 전사공정과의 유기적 결합관계에 의해 나타난 예기치 못한 현상으로 여겨진다.

[0131] 도 5C에 나타난 바와 같이, 각 기판에 대한 O1s 및 N1s의 피크를 고해상도 XPS 스캔으로 도시한 결과, PEI로 코팅된 PMMA의 스펙트럼과 도파민 코팅된 PS의 스펙트럼은 피크 시프트, 강도에서 뚜렷한 차이를 나타냄을 확인하였다.

[0132] PEI 코팅된 PMMA 기판은 PEI의 1 차 아민이 O2-플라즈마 처리를 통해 PMMA 표면에 결합되어 있던 산소와 상호작

용하여, 1 차 아민이 감소하였음을 확인하였다. 이에 반해 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판은 도파민 스펙트럼이 PEI 스펙트럼을 완전히 커버하고 있는 것으로 여겨진다. 이러한 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판은 도파민이 코팅된 PS 기판과 O1s, N1s 피크에서는 유사한 스펙트럼 특징을 가지고 있음에도 불구하고, 피크의 비율면에서는 눈에 띄는 차이를 보였다.

[0133] 구체적으로 도파민 코팅된 PS 기판은 1 차 아민 대 3 차 아민의 비율이 더 높았으나, 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판은 1 차 아민보다 3 차 아민의 비율이 더 높았다. 이는 PEI 코팅된 PMMA 기판의 표면에 도파민이 전사될 때, 1 차 아민보다 3 차 아민이 더 많이 형성되는 것이라 여겨진다(이차 아민은 큰 변화가 없었다). 10 분 이상 전사공정을 수행할 경우에는 1차 아민과 2차 아민이 증가되는 결과를 얻을 수 있었다.

[0134] 본 발명의 감법전사방식에 의한 도파민 패터닝방법은 10 분 미만의 도파민 전사과정을 통해, 도파민 중합 중간 생성물(polymerization intermediate)로 토토머(tautomer)와 관련된 3 차 아민의 고농도가 초래된 것으로 여겨진다. 이를 통해 전사과정을 통해 PEI 코팅된 PMMA 기판 상에 코팅된 도파민층에서 물 접촉각이 증가되는 것을 이해할 수 있다. 즉, 수소 결합을 형성할 가능성을 감소시키므로, 높은 물 접촉각을 갖게 되는 것이다.

[0135] <실험예 6> 세포 패턴의 제조

[0136] 본 발명의 감법전사방식에 의한 도파민 패터닝방법을 통해, 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판(실시예 1)을 제조하고, 이를 통해 세포 패턴이 제조가능한지를 살펴본 것이다. 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판의 표면에 HUVECs를 배양한 후, 생존여부를 확인하였다.

[0137] 1) 세포 배양

[0138] 먼저, T/E, TNS 및 DPBS 및 배지(1% P/S, 1% ECGS, 및 5% FBS를 ECM에 희석함)를 상온에서 준비하였다. 이후, DPBS가 첨가된 세포 배양 플라스크에서 HUVECs 세포를 배양하고, DPBS(10 mL)와 T/E(1 mL)가 혼합된 용액을 사용하여 린스하였다. 세포를 분리하기 위해 37 °C에서 2 분 동안 교반 및 배양하여 세포 혼합물을 얻었다. 상기 세포 혼합물을 FBS 5 ml와 TNS 5 ml가 들어있는 50 ml 튜브에 옮기고, 1000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다. 여기에서 용액을 제거하고, 배지에 세포를 재현탁하였다. 우리는 trypan blue로 죽은 세포를 염색하고, hemocytometer를 사용하여 살아있는 세포의 수를 세어 생존 가능한 세포 농도를 결정하였다.

[0139] 상기 과정을 통해 얻은 HUVEC(5000 cells cm⁻²) 세포를 준비한 다음, 각각의 기판이 담겨져 있는 배양접시에 넣고, 가습조건에서 37 °C, 5% CO₂에서 배양하여, 세포를 패턴화한 세포배양 플랫폼을 제조하였다. 3일마다 배양 배지를 교환하였다. 배양 2 일 또는 4 일 후, 상기 세포배양 플랫폼을 꺼내 DPBS로 조심스럽게 씻어 세포 패턴을 확인하였고, 세포 생존력은 LIVE/DEADTM 키트를 통한 calcein AM 염색으로 확인하였다. 구체적으로 DPBS 용액으로 희석한 4 μM calcein AM 용액(ex/em ~495 nm/~515 nm)을 준비하고, 상기 세포배양 플랫폼에 첨가한 후 20분 동안 반응시키고, 형광 현미경으로 관찰한 다음 ProgResTM CapturePro 소프트웨어로 분석하였다.

[0140] 2) 결과

[0141] 도 6A는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 배양하는 과정을 개략적으로 도시한 것이다. 도 6B는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('점 패턴')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 2일 동안 배양한 후, 광학 현미경으로 촬영한 사진이고, 도 6C는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('점 패턴')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 4 일 동안 배양한 후, 광학 현미경으로 촬영한 사진이다.

[0142] 도 6D는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 4일 동안 배양하고 광학현미경으로 촬영한 것이다. 도 6E는 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 HUVECs 세포를 4일 동안 배양한 후, 살아있는 세포를 green-fluorescent calcein-AM(녹색 형광)으로 염색하여 형광 현미경으로 관찰한 것이다. 스케일 바는 도 6B, C = 100 μm, 도 6D, E = 300 μm이다.

[0143] 본 발명을 통해 제조된 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판은 세포배양을 위한 플랫폼으로 사용될 수 있다. 아무것도 처리하지 않은 열가소성 기판(PS 기판) 표면에는 세포-방호 기능을 가지고 있기 때문에, 바로 세포를 부착하기 어려울 뿐만 아니라, 세포가 일정한 패턴 내에서 배양되도록 제어하는데 많은 어려움이 있다.

[0144] 그러나, 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판은 세포가 도파민 표면에 대해 높은 친화도를 가지고 있기 때문에 일정한 패턴 내에서의 선택적 세포 배양이 가능하다는 장점이 있다.

- [0145] 도 6A 내지 도 6C에 나타난 바와 같이, 도파민 패턴층이 형성된 PS 표면 상에는 도파민 패턴층 내에 HUVECs 세포를 선택적으로 부착, 배양 및 성장이 가능함을 확인하였고, 4일째 세포의 수가 증가했음에도 여전히 도파민 패턴층을 벗어나지 않고, 선택적으로 배양되고 있음을 알 수 있다. 설사 도파민 패턴층을 세포가 벗어나더라도 PS 표면에서는 세포가 부착/증식되지 못하므로 각각의 패턴은 서로 분리된 하나의 배양공간으로써 작용함을 확인하였다.
- [0146] 도 6D를 통해, 일정한 배열의 점 패턴 외에, 다양한 패턴층의 형성이 가능하며, 상기 다양한 패턴층에서도 세포의 배양이 가능함을 확인하였다.
- [0147] 또한 도 6E를 통해 상기 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판 상에 배양된 HUVECs 세포 중에서 살아있는 세포를 calcein AM로 확인한 결과, 'GU' 패턴과 살아있는 HUVECs 세포가 정확히 일치하고 있음을 확인하였다. 즉, 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층('GU')이 형성된 PS 기판은 패턴에 따라 세포의 배양이 가능하며, 세포 독성이 거의 없으므로, 세포배양을 위한 새로운 플랫폼으로 충분히 활용가능하다.
- [0148] <실험예 7> 마이크로웰 어레이
- [0149] 본 발명의 감법전사방식에 의한 도파민 패턴링방법을 통해, 마이크로웰 구조의 PS 기판(실시예 4)을 제조하고, 이의 마이크로웰 어레이로써의 응용 가능성을 살펴본 것이다. 본 발명의 제조방법으로부터 제조된 마이크로웰 구조의 PS 기판에 형광비드 또는 유리비드를 봉입(immobilization)한 후, 광학현미경과 형광현미경으로 확인하였다.
- [0150] 도 7A는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판의 제조과정을 도시화한 것이고, 도 7B는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판($d = 300 \mu\text{m}$)의 광학 현미경(OM) 이미지이다.
- [0151] 도 7C는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판 내에 봉입된 유리비드를 확인하기 위한, 형광 이미지이고, 도 7D는 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판의 웰 내에 유리비드($d = 40 \mu\text{m}$)가 봉입되어 있음을 보여주기 위하여, 확대한 광학 현미경 이미지이다. 스케일 바는 $400 \mu\text{m}$ 이다.
- [0152] 도 7A에 나타난 바와 같이, 실시예 4에 따라 마이크로웰 구조의 PS 기판은 각각의 웰은 친수성이지만, 전사를 통해 도파민층이 제거된 표면은 소수성이다. 즉, 본 발명에 따른 패턴링과정을 통해 선택적으로 표면을 친수성 또는 소수성으로 제조할 수 있고, 이러한 특성을 통해 수용액을 사용하여 상기 웰 내에만 형광비드 또는 유리비드가 봉입 또는 고정되도록 할 수 있음을 확인하였다.
- [0153] 실제로 상술한 방법으로 형광비드를 웰에 고정화한 마이크로웰 구조의 PS 기판(실시예 4)을 광학 이미지(도 7B)와 형광 이미지(도 7C)로 분석한 결과, 웰 내부에만 효과적으로 형광비드가 고정되어 있음을 확인하였다.
- [0154] 도 7D에 따르면 $30\text{-}40 \mu\text{m}$ 지경의 유리비드도 같은 방식으로, 마이크로웰 구조를 갖는 PS 기판의 웰에만 고정화할 수 있음을 알 수 있다. 상기 실시예 4로부터 제조된 마이크로웰 구조의 PS 기판은 다중 분자 시험 또는 단일 세포 포착에 사용될 수 있는 세포배양 플랫폼 등으로 활용될 수 있다.
- [0155] <실험예 8> 무전해도금을 통한 은코팅
- [0156] 본 발명의 감법전사방식에 의한 도파민 패턴링방법을 통해, 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판(실시예 1)을 제조하고, 이를 은의 선택적 무전해 도금에 응용할 수 있는지 살펴보고자 하였다. 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판의 표면에 질산은(AgNO_3)를 이용한 무전해 도금방법으로 은(Ag)을 코팅하였다. 이때, 도파민 패턴층의 패턴은 '사람 모양 기호'를 사용하였다.
- [0157] 구체적으로 AgNO_3 수용액(50 mM , 4 mL)의 도금액을 준비하고, 상기 도금액에 $2 \text{ M NH}_4\text{OH}$ 를 적가하여, 갈색깔 응집체가 형성되었다 다 사라질때까지 잘 혼합해주었다. 이후, 포도당(16.7 MM 의 $400 \mu\text{L}$)을 환원제로써 첨가하고, 여기에 상기 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판(실시예 1)을 침지시킨 후, 15분 후 꺼내고 증류수로 세척하였다(반응중결).
- [0158] 상기 무전해도금으로 은이 코팅된 PS 기판을 SEM 및 EDX를 사용하여 분석하기 위해, 우선 Cressington 스퍼터 코터 108auto(Cressington Scientific Instruments, UK)를 사용하여 기판 표면을 백금으로 코팅하고, 이를 JSM-7500F SEM(JEOL Ltd., Japan) 및 X-act EDX 장치(Oxford Instruments, Mumbai)로 분석함으로써, SEM 및 EDX 데이터를 얻었다.
- [0159] 도 8A는 은으로 코팅되기 전과 후 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판의 표면을 광학 현미

경으로 촬영한 것으로, 도 8A(a)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판이고, 도 8A(b)는 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판이며, 도 8A(c)는 무전해 도금방법으로 은이 코팅된 후의 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판이고, 도 8A(d)는 은이 코팅된 후의 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판이다.

[0160] 도 8B은 은으로 코팅되기 전과 후 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판의 표면을 보여주는 SEM 이미지로, 도 8B(a)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판 중에서 도파민 패턴층이 형성된 면과 도파민이 제거된 면의 경계를 촬영한 것이고, 도 8B(b)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판에서 도파민 패턴층의 표면을 확대한 SEM 이미지이며, 도 8B(c)는 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판에 코팅된 은층에 대한 SEM 이미지이며, 도 8B(d) 상기 은층을 보다 확대한 이미지이며, 도 8B(e)는 도 8B(d)에 대한 EDX 데이터이다. 도 8A의 스케일 바는 1 mm이다.

[0161] 도 8A(a), (b)를 살펴보면 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판 상에 무전해도금으로 은이 코팅되기 전과 후를 비교할 수 있다. 은이 코팅되고 난 후, 도파민 패턴층이 투명성을 잃어버렸으며, 시간이 지남에 따라 은 코팅에 의해 불투명해졌음을 확인하였다.

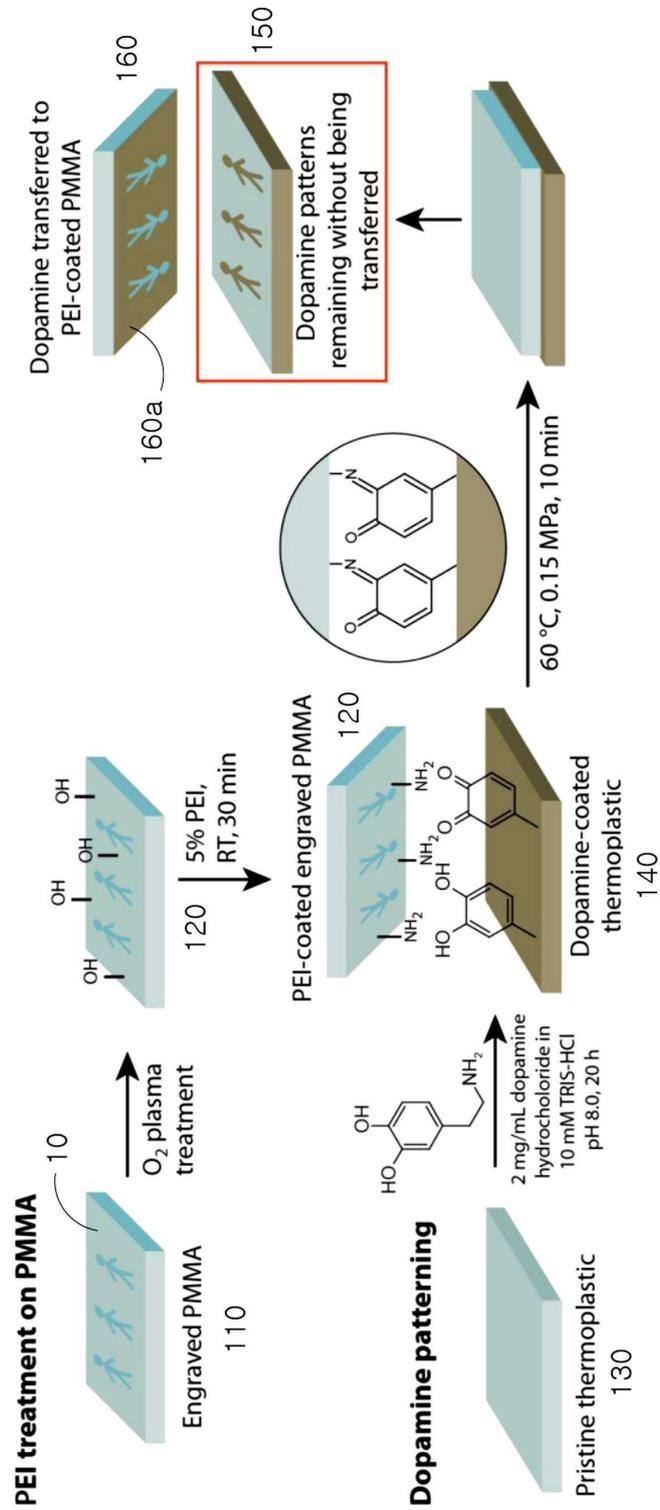
[0162] 이와는 반대로, 도파민이 전사된 PEI 코팅된 PMMA 기판에서는 패턴을 제외한 나머지 표면에 은이 도금되었다(도 8A(c), 도 8A(d)).

[0163] 또한, 도 8B(a)를 살펴보면 도파민 패턴층이 형성된 PS 기판으로부터 도파민이 제거된 표면은 깨끗하고 평평한데, 이는 전사과정을 통해 패턴이 아닌 나머지 도파민층이 기판으로부터 완전하고 깨끗하게 제거되었음을 알 수 있다.

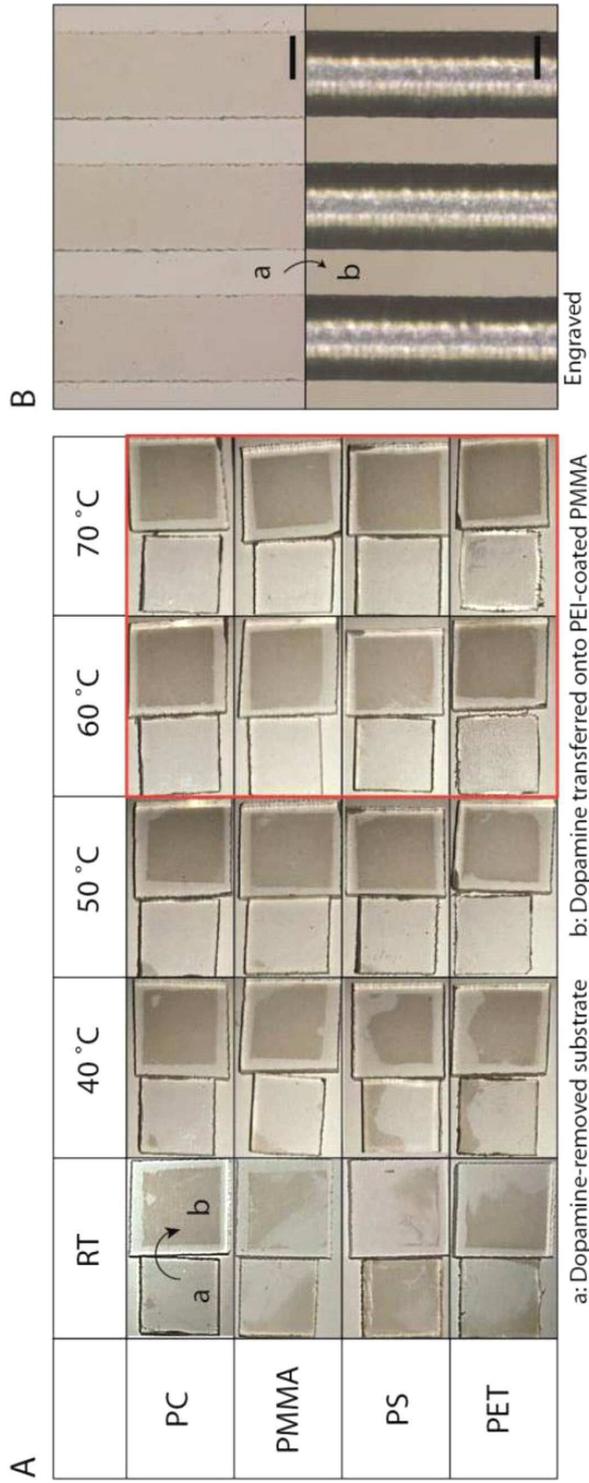
[0164] 실시예 1로부터 제조된 도파민 패턴층에 무전해도금을 통해 은 코팅이 잘 이루어졌음을 도 8B로 보다 분명하게 확인할 수 있다. 특히 도 8B(d)를 통해 무전해도금을 통해 도파민 패턴층을 따라 은 나노입자가 조밀하고 뽁뽁하게 코팅되어 있음을 확인하였다. 이는 표면의 주 성분을 EDX(energy dispersive X-ray spectrometry) 데이터로 확인한 결과(도 8B(e))에서도 확인할 수 있다.

도면

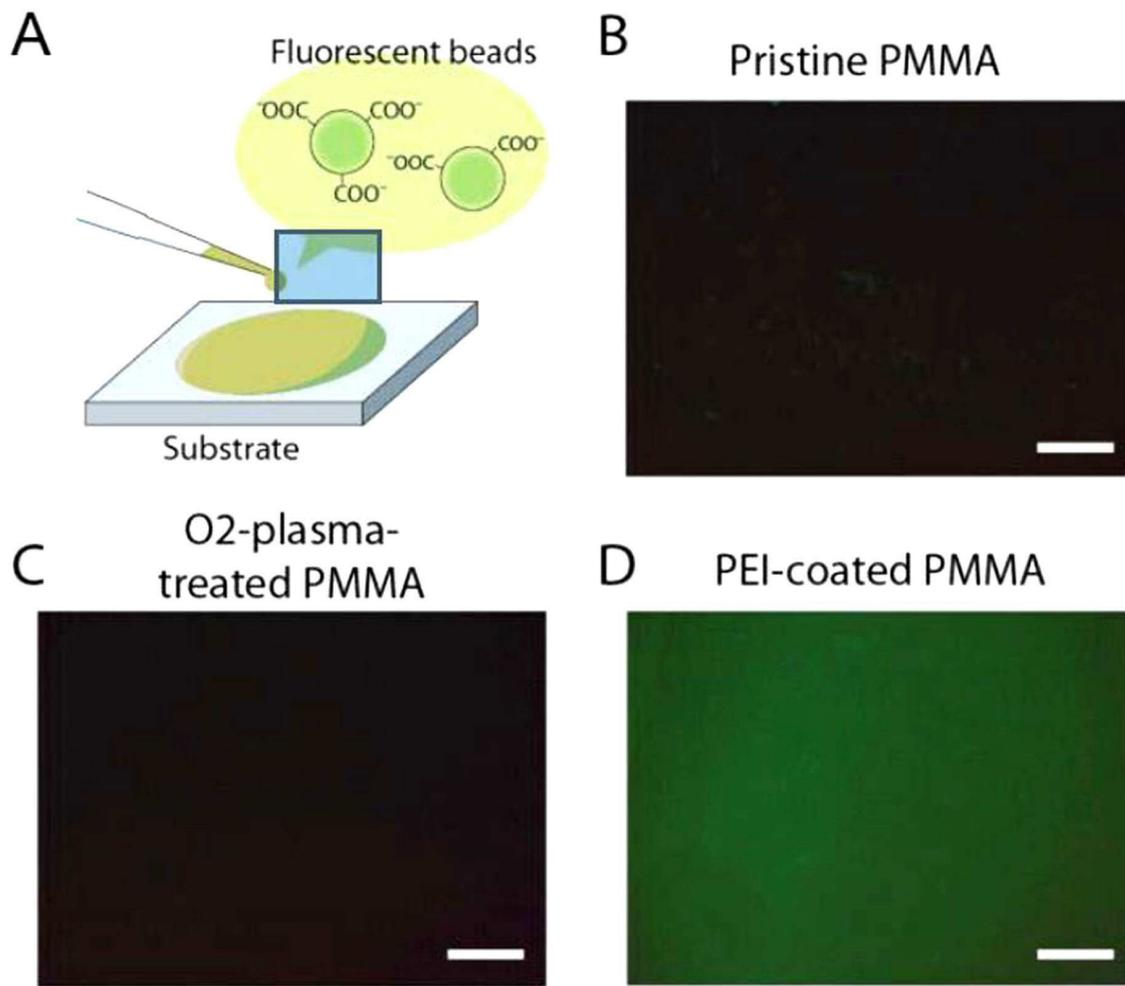
도면1



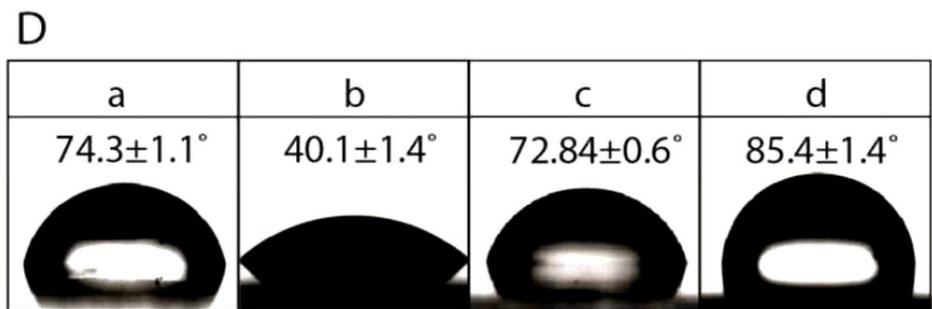
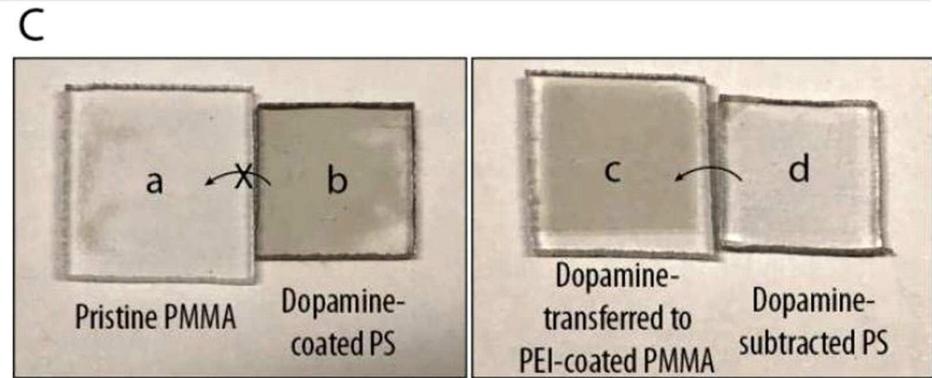
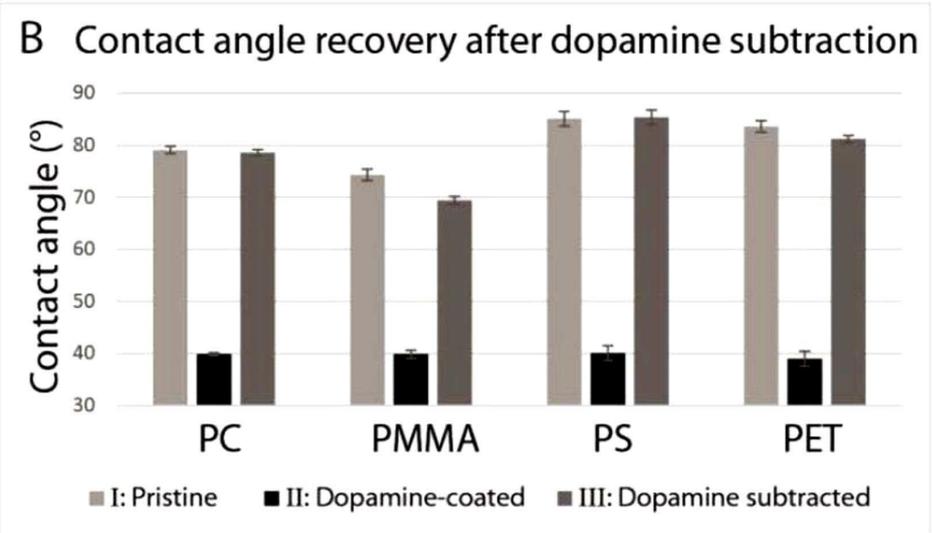
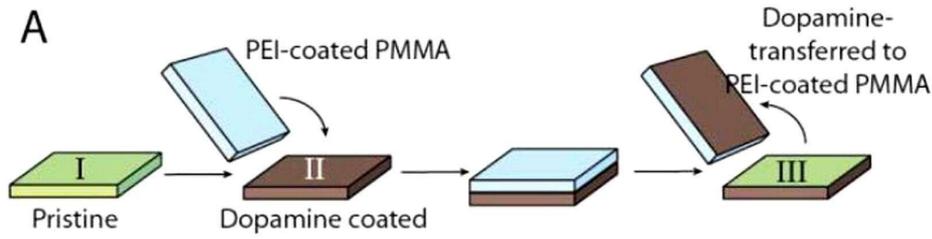
도면2



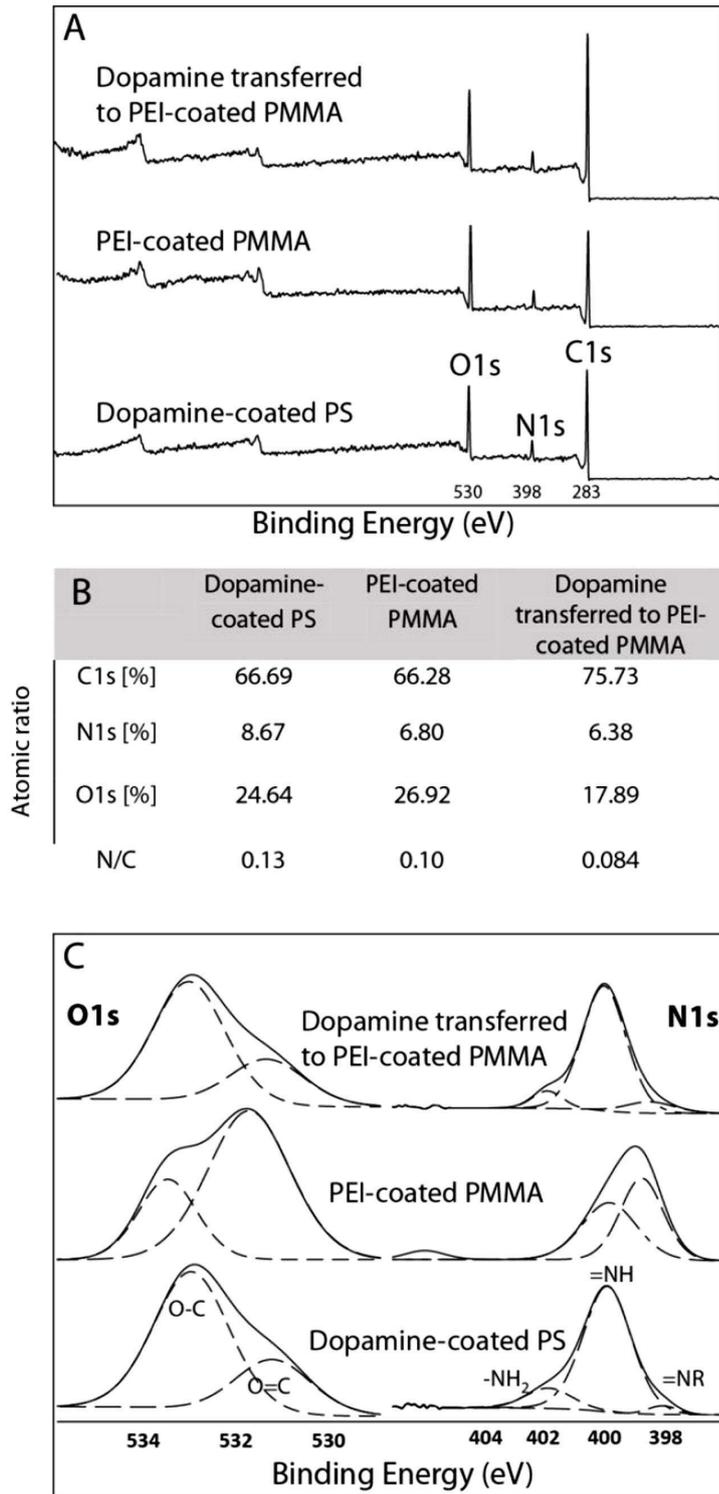
도면3



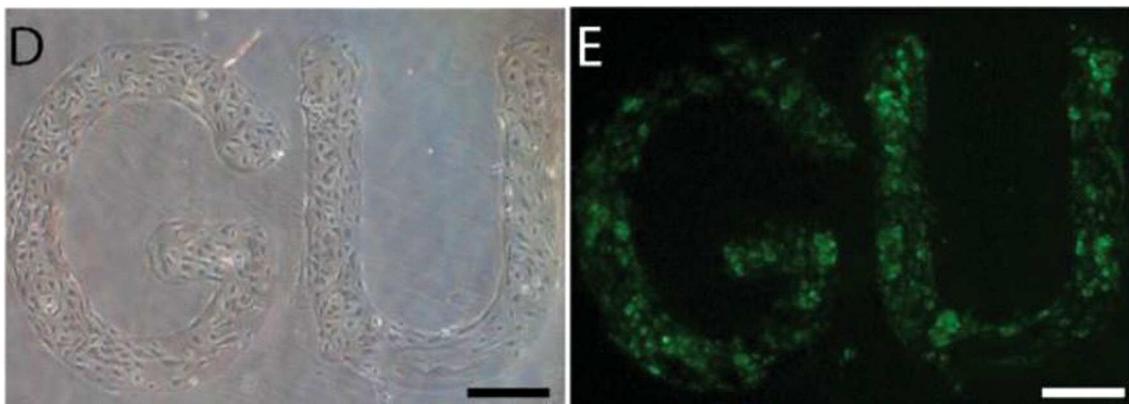
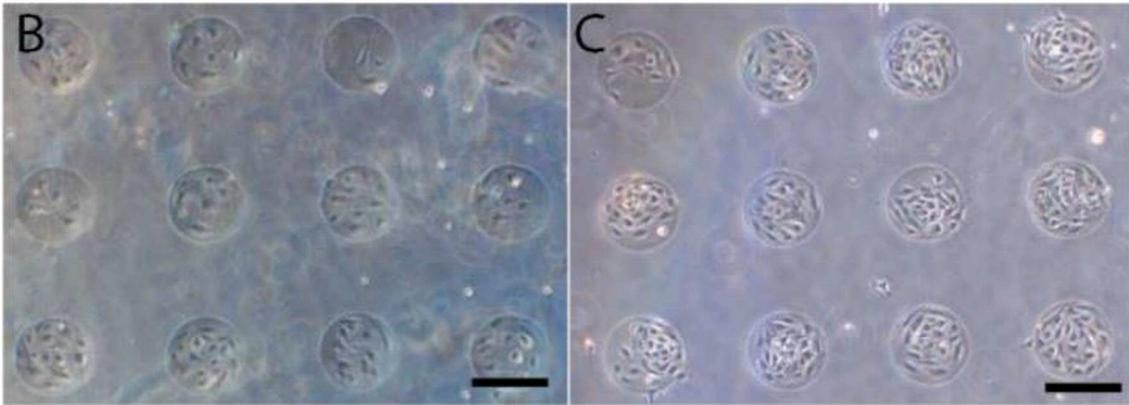
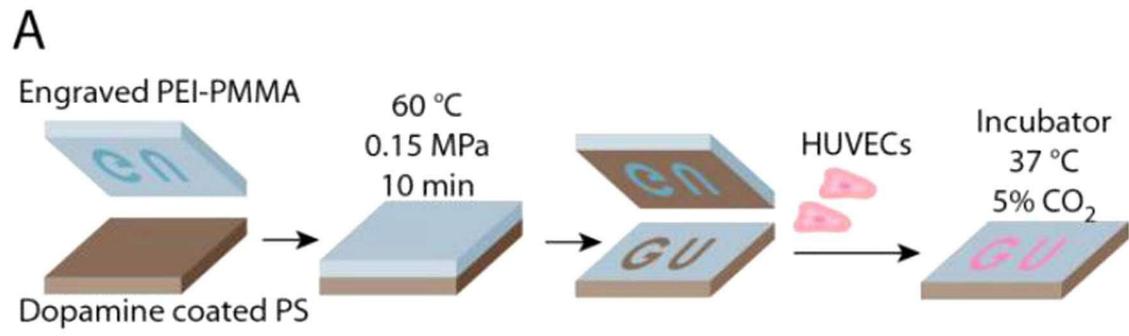
도면4



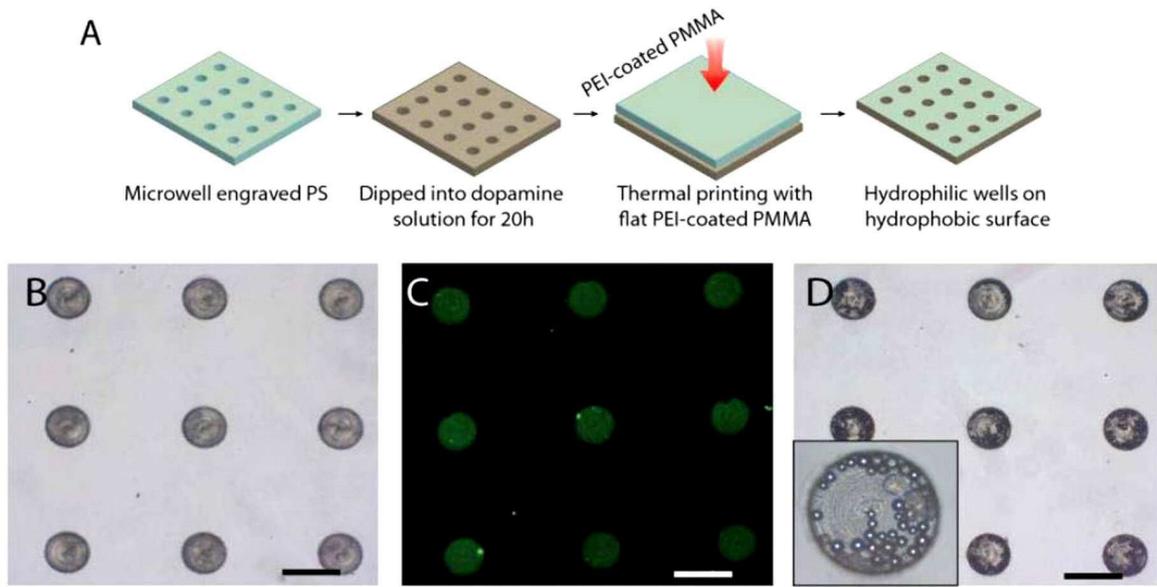
도면5



도면6

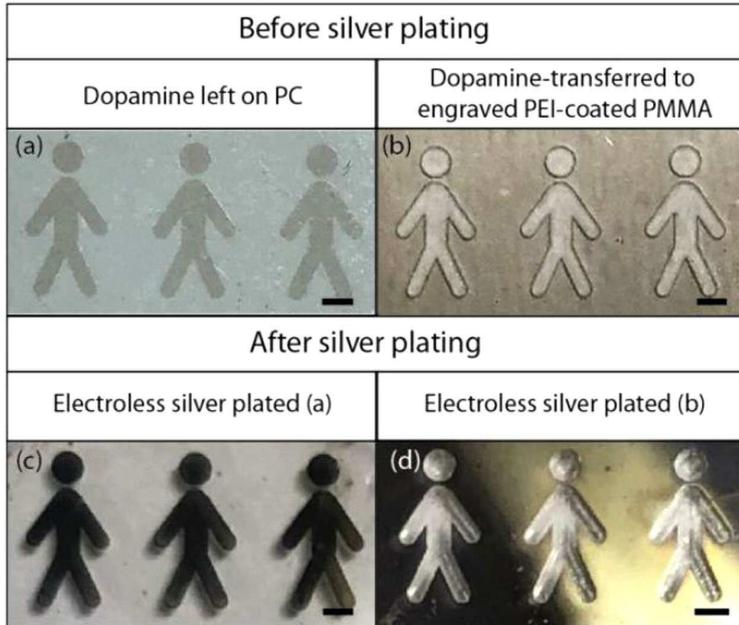


도면7



도면8

A



B

