



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0124395
(43) 공개일자 2019년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0793 (2010.01) C04B 35/52 (2006.01)
C04B 35/622 (2006.01) C04B 41/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)
C04B 35/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0048305

(22) 출원일자 2018년04월26일

심사청구일자 2018년04월26일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

강경태

경기도 용인시 기흥구 서그내로 31, 103동 901호 (서천동, 용인서천 효성해링턴플레이스)

이민형

경기도 화성시 동탄청계로 303-33, 1103동 201호 (청계동, 모아미래도아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인도담

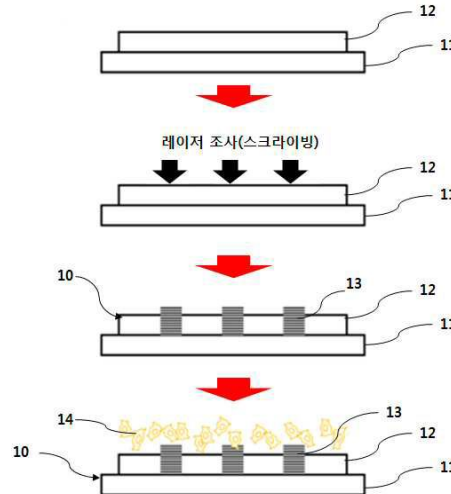
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 레이저 조사에 의하여 환원된 그래핀 옥사이드를 이용하여 신경 세포의 성장을 유도하는 방법

(57) 요약

본 개시 내용에서는 레이저 조사에 의한 광열(photothermal) 반응에 따라 그래핀 산화물(graphene oxide) 층의 원하는 영역 또는 패턴화된 영역을 환원시킴으로써 환원된 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide; rGO) 영역이 갖는 표면 형태학적 특징(구체적으로 표면 나노형태학적 특징)을 이용하여 신경 세포의 성장을 유도하는 방법이 기재된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C04B 35/62222 (2013.01)

C04B 41/0036 (2013.01)

C12N 5/0068 (2013.01)

C04B 2235/963 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

(72) 발명자

이한별

대전광역시 서구 둔산남로 15, 109동 105호 (은하수아파트)

이상화

경기도 용인시 기흥구 예현로 15, 107동 702호(서천동, 서그네마을에스케이아파트)

김윤영

충청남도 부여군 은산면 충의로 703, 1동 401호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GRRC-kyunghee2017(A01)

부처명 경기도

연구관리전문기관 경기도 지역협력연구센터(GRRC)

연구사업명 글로벌 의약품소재개발 연구센터

연구과제명 글로벌 개량 합성 신약의 후보물질 플랫폼 제조를 위한 원천기술 연구

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2017.08.01 ~ 2018.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3D1A1039379

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리사업

연구과제명 d-오비탈의 소자적, 기하학적 제어

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2017.08.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 그래핀 산화물(GO) 층을 제공하는 단계
- b) 상기 그래핀 산화물 층에 대하여 원하는 패턴으로 레이저를 선택적 조사하는 단계, 여기서 상기 레이저는 조사된 패턴 영역 내 그래핀 산화물의 적어도 일부를 환원시키는 에너지를 제공하고 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 표면 거칠기가 형성됨; 및
- c) 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 신경 세포를 부착시켜 성장시키는 단계;
- 를 포함하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 a)에서 그래핀 산화물 층은 기재(substrate) 상에 형성되는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 기재는 무기계 기재 또는 유기계 기재인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 그래핀 산화물 층의 두께는 0.5 내지 10 μm 범위인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 그래핀 산화물 층은 그래핀 산화물을 액상 매질에 투입하여 제조된 분산액을 기재 상에 도포하여 형성되는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 분산액 내 그래핀 산화물의 농도는 0.5 내지 5 mg/ml 범위인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 분산액은 드롭-캐스팅법, 또는 스핀코팅법에 의하여 기재 상에 도포되는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역의 깊이는 그래핀 산화물 층의 전체 두께 기준으로, 이의 표면으로부터 적어도 30% 범위인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 레이저는 적외선 레이저인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 적외선 레이저의 파장 범위는 700 내지 850 nm이고, 상기 적외선 레이저의 출력은 30 내

지 100 mW 범위인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 11

제11항에 있어서, 상기 레이저의 조사 폭은 1 내지 30 μm 범위인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 레이저 조사는 1 또는 2회 이상 반복 수행되는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 레이저의 조사 소스로서 DVD 레코딩 드라이브를 사용하는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역의 표면 거칠기는 표면 높이 변화 폭 기준으로 100 내지 2000 nm의 스케일 범위인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 신경 세포는 해마 뉴런(hippocampus neurons), 척수 운동 뉴런, 후근 신경절(dorsal root ganglion), 망막 신경절 뉴런(retinal ganglion neurons), 골지 I 뉴런(Golgi I neurons), 골지 II 뉴런(Golgi II neurons), 농세포(basket cells), 베헤 세포(betz cells), 루가르 세포(lugaro cells), 중간 가시 뉴런(medium spiny neurons), 푸르킨예 세포(purkinje cells), 렌쇼세포(renshaw cells), 단극 브러쉬 세포(unipolar brush cells), 과립 세포(granule cells), 전각 세포(anterior horn cells), 운동 뉴런(motoneurons), 방추 세포(spindle cells), 가단극성 뉴런(pseudounipolar neurons), 다극성 뉴런(multipolar neurons), 중간 뉴런(interneurons), 운동 뉴런(motor neurons), 감각 뉴런(sensory neurons), 성세포(stellate cells) 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 적어도 하나가 선택되는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단계 c)에 앞서 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 대하여 산소 플라스마 처리를 수행하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 세포의 부착을 촉진하기 위하여, 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 대하여 PDL(poly-D-lysine hydrobromide) 용액, PLL(Poly-L-lysine) 용액 및 PEI(Polyethyleneimine) 용액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 이용하여 처리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 18

제2항에 있어서, 기재 상에 상기 그래핀 산화물 층을 형성하기에 앞서 기재 표면의 친수성을 증가시키기 위하여 친수화 처리를 수행하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 친수화 처리는 산소 플라스마 처리, 또는 피라나 용액 처리인 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 형성된 표면 거칠기는 비등방성을 나타

내는 것을 특징으로 하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시 내용은 레이저 조사에 의하여 환원된 그래핀 옥사이드를 이용하여 신경 세포의 성장을 유도하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 레이저 조사에 의한 광열(photothermal) 반응을 이용하여 원하는 패턴에 따라 그래핀 산화물(graphene oxide) 층을 환원시키고, 환원된 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide; rGO) 영역이 갖는 표면 형태학적 특징(구체적으로 표면 나노형태학적 특징)을 이용하여 신경 세포의 성장을 유도하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 그래핀은 탄소원자들이 2차원 판상 구조에 육각형의 기본 형태로 배열되어 있는 원자 한 층의 나노 재료로서, 우수한 역학적 강도와 화학적, 열적 안정성 및 뛰어난 전기 전자적 성질로 인하여 다양한 분야에서 주목을 받고 있다. 또한, 그래핀은 물리적 강도 및 열 전도성이 우수한 것으로 보고된 바 있다.

[0003] 또한, 그래핀-유도 재료(그래핀, 그래핀 산화물(GO) 및 이의 화학적/물리적 유도체)가 생물학적 시스템과의 계면 적합성을 갖는 다양한 물성을 갖고 있기 때문에 의료 분야에 적용하고자 하는 연구도 활발히 진행되고 있다. 예를 들면, 그래핀(즉, sp²-결합 탄소의 분자 층)은 특히 양호한 전도성을 나타내며 생체발전용 바이오 시스템에 대한 시그널을 측정하거나 제공하는 새로운 개념의 방식을 제공한다. 이처럼, 그래핀은 높은 전자 이동도, 유연성 및 강도와 같은 기계적 물성의 우수성, 높은 열전도도 등의 특성을 갖고, 특히 바이오메디컬 분야에서 적용하는데 적합한 생적합성(biocompatibility) 및 화학적 안정성을 나타낸다.

[0004] 한편, 그래핀의 산화물 형태인 그래핀 옥사이드(GO)는 의학 분야에서 상이하지만 보다 현저한 특성, 예를 들면 개선된 수용해성, 화학적 기능화의 용이성, 대량 합성의 용이성 및 흥미로운 생물학적 특성(예를 들면, 생적합성, 항박테리아 특성, 및 줄기세포 분화에 대한 영향)을 제공한다. 그래핀의 발견 이후, 약물 전달, 바이오센서용 플랫폼, 티슈 엔지니어링, 및 줄기세포 엔지니어링용 담체로서 이용되어 왔다. 이러한 적용 예의 다수는 간단한 도전성 재료(그래핀으로 사용될 경우) 또는 바이오기능화 가능한 기재(GO로 사용될 경우)로서 그래핀-유래 재료를 사용한 것으로, GO와 그래핀의 장점을 동시에 이용할 수 없었다.

[0005] 전술한 장점을 고려할 때, 그래핀 재료는 신경세포(또는 뉴런)에 대하여도 유용하게 적용 가능할 것으로 고려되는데, 이를 이용하여 그래핀계 기재 상에 신경 세포를 성장시키는 기술도 개발된 바 있다(Biochemical and Biophysical Research Communications 460 (2015) 267-273). 또한, 그래핀 층을 포함하는 세포 시트 제조용 장치 위에서 세포를 배양하는 기술 역시 알려져 있다(국내특허번호 제1752715호).

[0006] 살아있는 신경 세포를 위하여 설계된 바이오 전자 디바이스는 미세한 마이크로/나노패턴으로 배치된 다양한 생활성(bioactive) 표면을 포함하는 복잡한 전기회로를 종종 필요로 하는데, 특히 신경망을 다루는 경우 신경망의 마이크로 스케일의 기하학적 특징이 이의 기능을 반영하기 때문이다. 따라서, 신경망을 연구하기 위하여는 신경망의 선택적 부위에서 생성되는 전기 시그널을 측정하거나, 해당 부위로 전기 시그널을 전달해야만 한다.

[0007] 그러나, 그래핀 재료를 신경망 연구 용도에 사용하기 위하여는 해결해야 할 중대한 이슈가 존재한다. 먼저, 초기 그래핀을 직접 기능화하는 동안 이의 전도성을 적정 범위 내에서 유지하는 것은 전반적으로 제한된다. 초기 그래핀의 화학적 기능화는 생물학적 응용에 있어서는 불가피한데, 이는 고유 특성 상 세포 또는 조직에 대하여는 활성을 나타내지 않고 수용액 내에서 응집 경향을 나타내어 많은 생물학적 조건 하에서 취급이 곤란하기 때문이다.

[0008] 또한, 그래핀 산화물(GO)의 경우, 간단한 C=C 결합에 비하여 화학적 유도화 반응에 보다 민감한 기능기를 갖고 있으나, 이와 동시에 전도성은 결여되어 있다. 이러한 그래핀 및 그래핀 산화물 각각의 고유의 특성으로 인한 한계는 그래핀계 물질을 뉴런-기반의 칩 또는 인공 뉴런에 폭넓게 응용하는 것을 곤란하게 한다. 또한, 상술한 그래핀계 재료의 사용으로 인하여 다른 통상의 재료와 복합체 내 지지체로서의 역할은 제한된다. 이러한 한계를 극복하고, 전기발생 바이오 시스템을 위한 그래핀 재료의 적용 가능성을 넓히기 위하여, 단일의 세심하게 설계된 디바이스 내에 그래핀 산화물과 그래핀 모두의 장점을 발현시키는 것이 바람직하다.

[0009] 이외에도, 신경 세포(또는 뉴런)의 경우, 이의 부착 및 성장은 표면의 물리화학적 성질에 의하여 크게 영향을 받는 한편, 앞서 언급된 그래핀계 재료는 신경 세포에 적합한 표면 특성을 제공하는데 불충분하다. 기존 기술

의 다수의 경우, 그래핀의 생적합성에 기초한 성장 테크닉 위주로 연구가 진행되어 효과적인 세포 성장 효과를 제공하는데 한계가 있으며, 바이오전자 디바이스와 같이 특정 패턴으로 신경 세포를 성장시키는 것이 요구되는 분야에는 더욱 적용하기 곤란하다.

[0010] 이처럼, 그래핀 기반의 기재 또는 표면에 신경 세포 등을 효과적으로 부착 및 성장시킬 수 있는 기술은 바이오 메디컬 분야에 있어서 중대한 장점을 제공할 수 있는 만큼, 종래 기술의 한계를 극복할 수 있는 방안을 도출하는 것이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 개시 내용에 따른 일 구체예에서는 그래핀계 기재를 뉴런 등의 신경 세포의 성장에 적합하도록 개질함과 동시에 신경 세포를 효과적으로 성장시킬 수 있는 방안을 제공하고자 한다.

[0012] 또한, 본 개시 내용에 따른 구체예에서는 바이오전자 시스템 등의 분야에서 원하는 패턴(또는 미세패턴) 영역에서 신경 세포를 성장시키고자 할 경우, 간편하면서도 저비용으로 구현할 수 있는 방안을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 개시 내용의 일 구체예에 따르면,

[0014] a) 그래핀 산화물(GO) 층을 제공하는 단계

[0015] b) 상기 그래핀 산화물 층에 대하여 원하는 패턴으로 레이저를 선택적 조사하는 단계, 여기서 상기 레이저는 조사된 패턴 영역 내 그래핀 산화물의 적어도 일부를 환원시키는 에너지를 제공하고 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 표면 거칠기가 형성됨; 및

[0016] c) 상기 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역에 신경 세포를 부착시켜 성장시키는 단계;

[0017] 를 포함하는 신경 세포의 성장을 유도하는 방법이 제공된다.

[0018] 예시적 구체예에 따르면, 상기 단계 a)에서 그래핀 산화물 층은 기재(substrate) 상에 형성될 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 개시 내용에 따른 방법에 따르면, 단일의 에너지 또는 광 조사 프로세스에 의하여 그래핀 산화물 층(또는 필름)에 환원된 그래핀 옥사이드(rGO)의 패턴(마이크로패턴 또는 매크로패턴) 영역을 간편하게 형성할 수 있고, 환원된 그래핀 옥사이드(rGO)의 패턴 영역이 갖는 특유의 표면 거칠기 또는 질감(texture)를 이용하여 신경 세포를 효과적으로 부착(고정) 및 성장시킬 수 있다. 특히, 레이저 스크라이빙(scribing) 방식을 도입할 경우, 1회 또는 그 이상 조사하는 간단한 조작만으로 원하는 디자인에 따라 전도성 또는 반도체 패턴 등을 신속하고 용이하게 제작할 수 있어 제작 공정 단계 및 비용을 저감할 수 있다.

[0020] 따라서, 본 개시 내용에 따른 방법은 탄소-기반의 신경 칩과 같은 바이오 전자 소자 또는 디바이스 분야, 신경 보철 등을 포함하는 다양한 분야에 적용할 수 있는 만큼, 향후 광범위한 상용화가 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a는 일 구체예에 따라 레이저 조사에 의하여 패턴화된 환원 그래핀 산화물(rGO)을 형성하고, 그 위에 신경 세포를 부착하여 성장시키는 일련의 과정을 개략적으로 도시하는 도면이고;

도 1b는 패턴화된 환원 그래핀 산화물(rGO) 상에 신경 세포가 성장한 상태를 보여주는 도면이고;

도 2a는 실시예에 따른 LGO(laser-scribed rGO) 마이크로패턴의 형성 과정으로 개략적으로 도시하는 도면이고,

도 2b는 실시예에서 PET 필름 상에 부착된 LGO의 저배율 사진(좌측), 그리고 고배율 사진 및 SEM 사진(우측)이고;

도 2c는 GO 필름(좌측) 및 LGO 필름(우측)의 X-선 광전자 스펙트럼(C 1S)이고;

도 3a 및 도 3b 각각은 GO 및 LGO 상에 8 DIV에서 배양된 해마 뉴런(hippocampal neurons; FDA로 염색됨)의 형

광 현미경 사진(양 방향 화살표는 레이저 스크라이빙의 방향을 지시함)이고;

도 3c는 대조군(PDL-코팅된 커버슬립), GO 및 LGO 상에서 배양된 해마 뉴런의 상대적 생존력(relative viability)을 나타내는 그래프이고(그래프 내 값은 대조군의 값으로 표준화되었고, 95%의 유의 수준(significant level)에서 일 방향 ANOVA에 의하여 대조군과 비교한 후에 투키의 다중 비교 테스트(Tukey's Multiple Comparison test)(n.s.)를 수행함(* $p < 0.0001$));

도 3d는 LGO 상에 8 DIV에서 배양된 뉴런의 예시적인 SEM 사진(scale bar: 100 μm)이고;

도 4a 내지 도 4c는 각각 1회, 5회 및 10회 레이저-스크라이빙된 LGO의 SEM 사진이고,

도 4d 내지 도 4f는 개별 기재 상에 7 DIV에서 배양된 해마 뉴런을 보여주는 형광 현미경 사진(양 방향 화살표는 레이저-스크라이빙의 방향을 지시함)이고

도 4g는 스크라이빙 방향 및 세포체(soma)의 위치에 대하여 정렬된, 기관 상의 신경 돌기 추적(neurite tracings)을 보여주는 도면이고;

도 4h는 기재 상에 배양된 해마 뉴런의 생존력을 보여주는 도면(측정된 값은 10회 레이저 스크라이빙된 기재 상에 배양된 값에 대하여 표준화된 값임)이고;

도 5a는 LGO의 산소 플라즈마 처리 방법의 개략적인 도면이고;

도 5b는 산소 플라즈마-처리된 LGO 상에 7 DIV에서 배양된 해마 뉴런을 보여주는 형광 현미경 사진이고(양 방향 화살표는 레이저-스크라이빙 방향을 지시함); 그리고

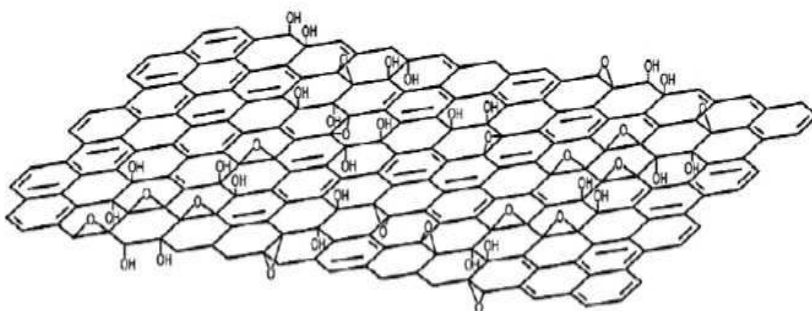
도 5c는 대조군(PDL-코팅된 커버슬립) 및 산소 플라즈마-처리된 LGO 상에서 배양된 해마 뉴런의 상대적 생존력을 나타내는 그래프(그래프 내 값은 대조군의 값으로 표준화되었고, 95%의 유의 수준(significant level)에서 일 방향 ANOVA에 의하여 대조군과 비교한 후에 투키의 다중 비교 테스트(Tukey's Multiple Comparison test)(n.s.)를 수행함)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 명세서에서, "그래핀 산화물(GO)"은 하기 구조식 1과 같이 산소-함유 기능기(예를 들면, 에폭시 또는 히드록시기)으로 기능화된 그래핀, 구체적으로 단일층 그래파이트 산화물(C-O 공유 결합을 도입함으로써 그래핀으로부터 유도된 2차원 물질)을 의미할 수 있고, 그래핀의 엣지(edge) 부위에는 카르보닐기 및 카르복시기가 존재하여 극성 표면 특성을 나타낼 수 있다.

[0024] [구조식 1]



[0025]

[0026] 예를 들면, 카르복시기의 존재로 인하여 친수성을 나타내어 물에 용이하게 분산되어 콜로이드 용액을 형성할 수 있다. 그래핀 산화물은 그래핀계 격자 및 다양한 산소-함유 기능기의 존재로 인하여 그래핀 산화물 표면의 작용기는 다양한 활성종을 고정하기 위한 앵커 사이트로 작용할 수 있고, 조절 가능한 전자적 특성을 갖게 된다.

[0027] "환원된 그래핀 산화물(rGO)"는 그래핀과 유사한 구조를 갖는 물질로서 높은 비표면적, 박막 및 도전성을 나타낼 수 있다. 전형적으로, 그래핀 산화물은 절연 특성을 갖게 되는 바, 시트 저항은 $10^{12} \Omega/\text{sq}$ 이상을 나타낸다. 그러나, 그래핀 산화물이 환원될 경우, rGO의 시트 저항은 현저히 감소하여 도전체 또는 반도체로

전환될 수 있다.

- [0028] "뉴런"은 적어도 하나의 뉴런 세포 타입의 마커 특성을 발현하거나, 또는 적어도 하나의 뉴런의 기능적 특성을 갖거나, 또는 뉴런 형태(morphology)를 갖는 임의의 세포를 의미할 수 있다.
- [0029] 도 1a는 일 구체예에 따라 레이저 조사에 의하여 패턴화된 환원 그래핀 산화물(rGO)을 형성하고, 그 위에 신경 세포를 부착하여 성장시키는 일련의 과정을 개략적으로 도시하고, 또한 도 1b는 패턴화된 환원 그래핀 산화물(rGO) 상에 신경 세포가 부착하여 성장한 상태를 예시적으로 보여준다.
- [0030] 이와 관련하여, 본 구체예에서는 광열 반응(photothermal reaction)을 이용한 그래핀 산화물의 환원 과정을 수반한다. 구체적으로, 그래핀 산화물이 선택적으로 조사되는 에너지 소스(구체적으로 레이저, 보다 구체적으로 적외선 레이저)를 흡수할 경우, 온도가 급격히 증가하게 되고, 이에 따라 환원 반응이 유도됨으로써 환원된 그래핀 산화물(rGO)이 형성된다.
- [0031] 상기 도면을 참조하면, 먼저 기재(11)를 제공하고, 그 위에 그래핀 산화물(12) 층이 형성된다.
- [0032] 이와 관련하여, "기재"는 1 또는 2 이상의 부재 또는 부품(예를 들면, 센서, 세포 등)을 지지할 수 있는 고체 표면을 의미할 수 있으며, 전형적으로는 평평한 표면을 제공할 수 있다.
- [0033] 도시된 구체예에 따르면, 기재(11)로서, 화학적으로 안정한 특성을 갖는 한, 특별한 제한없이 사용할 수 있다. 예시적 구체예에 따르면, 기재(11)는 무기재(금속 또는 글라스) 기재, 유기재(고분자) 기재 등의 재질일 수 있다. 일 예로서, 무기재 기재의 경우, 글라스(예를 들면, 소다 라임, 보로실리케이트 등), 실리콘, 실리콘카바이드, 비소갈륨, 인화인듐, 인화갈륨, 인화알루미늄, 질화갈륨, 질화인듐, 질화알루미늄, 산화마그네슘, 산화알루미늄, 티타니아, 사파이어, 석영, 파이렉스 등으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 또한, 유기재 기재로서 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET), 폴리카보네이트(PC), 폴리이미드(PI), 폴리아미드(PA), 폴리에틸렌나프탈레이트 또는 이의 조합(예를 들면, 공중합체 또는 혼합물 포함)일 수 있다. 예시적 구체예에 따르면, 기재는 후술하는 바와 같이 세포(구체적으로 신경세포)의 관찰이 용이하도록 투명성을 나타내고, 더 나아가 연성(flexibility)을 갖는 것이 유리할 수 있다. 이러한 관점에서, 특정 구체예에서는 PET 재질의 기재를 사용할 수 있다.
- [0034] 또한, 기재(11)의 두께는, 예를 들면 약 0.1 mm 내지 5 cm 구체적으로 약 1 mm 내지 3 cm, 보다 구체적으로 약 10 mm 내지 2 cm 범위일 수 있는 바, 이는 예시적 목적으로 제공되는 것으로 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 일 구체예에 따르면, 상술한 바와 같이 제공된 기재(11) 상에 그래핀 산화물 층(12)을 형성한다. 그래핀 산화물은 당업계에서 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 이러한 방법의 예로서 Brodie 방법, Staudenmaier 방법, Hummer 방법 등이 알려져 있는 바, 보다 전형적으로는 개량된 Hummer 방법을 적용할 수 있다. Hummer 방법의 경우, 예를 들면 산화제인 포타슘 퍼망가네이트(KMnO₄) 3중량 당량 및 소듐 니트레이트 0.5 중량 당량을 사용하여, 강산(질산 또는 질산/황산)의 존재 하에서 그라파이트(구체적으로 플레이트 형태) 1 중량 당량을 그래핀 산화물로 전환시킬 수 있다.
- [0036] 예시적 구체예에 따르면, 당업계에서 공지된 방법에 따라 제조된 그래핀 산화물을 액상 매질에 투입하여 분산액(농도: 예를 들면 약 1 내지 5 mg/ml, 구체적으로 약 1.5 내지 3 mg/ml)을 제조한 후, 기재(11) 상에 도포하여 그래핀 산화물 층(12)이 코팅된 기재(11)를 제조할 수 있다. 예시적으로, 그래핀 산화물의 분산액 제조용 액상 매질로서, 예를 들면 물, 디메틸 포름아마이드(*N,N*-dimethylformamide), 메틸피롤리돈(*N*-Methyl-2-Pyrrolidone), 테트라하이드로 퓨란(tetrahydrofuran), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 등을 사용할 수 있으며, 분산액 내 그래핀 산화물의 농도는, 예를 들면 약 0.5 내지 5 mg/ml, 구체적으로 약 1 내지 4 mg/ml, 보다 구체적으로 약 1.5 내지 3 mg/ml 범위일 수 있다. 택일적으로, 상업적으로 입수 가능한 그래핀 산화물의 분산액을 구입하여 사용할 수도 있다.
- [0037] 또한, 그래핀 산화물의 도포 방법으로, 드롭-캐스팅법, 스핀코팅법 등과 같이 당업계에서 공지된 방식을 예시할 수 있는 바, 도포 후에는 분산액 내 액상 매질을 제거하기 위하여 건조시킬 수 있다. 이때, 건조 온도는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 전형적으로는 약 15 내지 40℃, 보다 전형적으로는 약 20 내지 30℃, 특히 상온에서도 가능하다.
- [0038] 또한, 그래핀 산화물 층(12)의 두께는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 세포배양의 편의성을 고려할 때, 예를 들면 약 0.5 내지 10 μm , 구체적으로 약 0.8 내지 5 μm , 보다 구체적으로 약 0.9 내지 3 μm 범위일 수 있다.

- [0039] 예시적 구체예에 따르면, 접착성의 개선을 위하여, 그래핀 산화물 층(12)의 형성에 앞서 기재(11)의 표면의 친수화 처리 단계가 선택적으로 수행될 수 있다. 이러한 친수화 처리로서, 산소 플라즈마 처리, 피라나 용액 처리 등을 예시할 수 있다. 구체적으로, 산소 플라즈마 처리를 적용할 수 있는 바, 산소 플라즈마를 접촉시켜 기재(11)의 표면을 산화시키는 방식으로 기재 표면의 친수성을 증가시키는 방식이다.
- [0040] 한편, 전술한 바와 같이 기재(11) 상에 그래핀 산화물 층(12)이 부착된 후에는 에너지를 그래핀 산화물 층(12)의 원하는 영역에 선택적으로 조사하여 광열 반응을 통하여 조사된 영역만을 환원된 그래핀 산화물로 전환시킴으로써 그래핀 산화물 층(12)에 패턴화된 환원된 그래핀 산화물(rGO) 영역(13)을 형성한다. 이때, 패턴화된 rGO 영역은, 도시된 바와 같이 그래핀 산화물 층(12)의 두께 전체를 가로지르는 깊이까지 형성될 수도 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적으로, 레이저 조사 시 그래핀 산화물 층(12)의 전체 두께 기준으로, 이의 표면으로부터 적어도 약 30%, 구체적으로 약 50 내지 90%, 보다 구체적으로 약 70 내지 80% 범위의 깊이까지 환원된 그래핀 산화물로 전환될 수 있다. 특히, 조사 회수에 따라 그래핀 산화물 층(12) 깊이의 100%까지 rGO로 전환시킬 수 있다.
- [0041] 도시된 구체예에 있어서, 그래핀 산화물 층에 미리 정해진 패턴을 따라 레이저를 조사하거나 스캐닝함에 따라 해당 조사 또는 스캐닝 영역에서 높은 면적-대-체적 비를 갖는 그래핀 산화물(GO)은 광열 반응에 의하여 탈산소화되어 환원 그래핀 산화물(rGO)으로 전환된다. 이와 관련하여, 그래핀 산화물의 환원을 위한 광열 반응의 에너지 소스로서 국소적 또는 패턴화 방식으로 적용 가능한 수단을 적용할 수 있는 바, 예를 들면 레이저, 전자빔, 집속 이온 빔, 마이크로파 빔 등을 예시할 수 있다. 다만, 원하는 패턴화의 용이성 및 소프트웨어를 이용한 고정밀도의 패턴 구현 가능성을 고려하면 레이저를 적용하는 것이 유리할 수 있는 바, 이와 같이 특정 영역에 대하여 선택적으로 레이저를 스캐닝하는 방식을 "레이저 스크라이빙"으로 지칭할 수 있다.
- [0042] 예시적 구체예에 따르면, 에너지 소스로서 레이저, 구체적으로 적외선 레이저, 보다 구체적으로 약 700 내지 850 nm(구체적으로 약 750 내지 800 nm, 보다 구체적으로 약 770 내지 790 nm)의 파장 범위를 갖는 적외선 레이저를 사용할 수 있다. 이와 같이 적외선 대역, 구체적으로 특정 파장 대역의 레이저를 적용하는 것이 유리한 이유는 그래핀 산화물에 대한 국소 적용 시 조사 부위가 효과적으로 환원될 수 있는 에너지를 제공할 뿐만 아니라, 이에 따라 형성된 환원 영역이 신경 세포의 성장에 적합한 표면 특성을 제공하기 때문이다.
- [0043] 예시적 구체예에 따르면, 레이저의 출력의 경우, 전형적으로 레이저 출력이 강할수록 이에 따른 광열 반응에 의한 환원 역시 증가하는 점을 고려하여, 예를 들면 약 30 내지 100 mW, 구체적으로 약 50 내지 90 mW, 보다 구체적으로 약 60 내지 80 mW 범위 내에서 선정할 수 있다. 레이저 출력이 지나치게 크거나 작은 경우에는 기관이 손상되거나 환원 정도가 불충분한 문제점이 유발될 수 있는 만큼, 전술한 범위 내에서 조절하는 것이 유리할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 조사되는 레이저의 폭은, 예를 들면 약 1 내지 30 μm , 구체적으로 약 10 내지 25 μm , 보다 구체적으로 약 15 내지 20 μm 범위일 수 있으나, 이의 예시적인 것으로 이해될 수 있으며, 조작 여하에 따라서는 그래핀 산화물 층(12)에 마이크로 수준에서 매크로 수준까지의 환원된 그래핀 산화물 패턴(13)을 형성할 수 있다.
- [0045] 도시된 구체예에 있어서, 레이저 스크라이빙 또는 스캐닝을 적용할 경우, 조사 대상인 그래핀 산화물 층(12) 및/또는 기재(11)가 광에 의하여 손상되는 현상을 방지할 수 있다. 따라서, 열 등에 취약한 재질, 예를 들면 연성 특성을 갖는 고분자 기재를 비롯하여 글라스, 반도체 웨이퍼 등의 다양한 기재에 대하여도 적용할 수 있는 장점을 갖는다. 더욱이, 레이저 출력의 조절 여하에 따라서는 1회의 레이저 조사에 의하여도 패턴화에 필요한 에너지를 제공할 수도 있다.
- [0046] 예시적 구체예에 따르면, 패턴화 구현을 위하여 이미징 소프트웨어가 사용될 수 있는 바, 선택적 레이저 조사는, 예를 들면 레이저 소스로서 시판 중인 DVD 레코딩 드라이브 등을 이용할 수 있기 때문에 처리 작업이 용이하고 패턴 설계의 유연성도 높고, 또한 고가의 장비에 대한 의존성도 낮다.
- [0047] 그래핀 산화물은 에너지를 흡수할 경우 이를 분산시키기 어려운 물성을 갖고 있기 때문에 조사된 그래핀 산화물의 국지적 또는 선택적 영역에서의 온도가 급격히 상승하게 되는 바, 적외선 레이저 스크라이빙 또는 스캐닝의 경우, 예를 들면 약 400 내지 1000 $^{\circ}\text{C}$, 구체적으로 약 500 내지 900 $^{\circ}\text{C}$ 까지 급격하게 가열될 수 있기 때문에 산소-함유 기능기를 함유하는 그래핀 산화물이 신속하고 효과적으로 환원될 수 있다. 이와 관련하여, 그래핀 산화물(GO)은 다량의 산소-함유 기능기로 산화된 그래핀계 재료로서, 제로 밴드 갭 및 높은 전자 전도성을 갖는 그래핀과 달리 밴드 갭이 3.5 eV 이상이고 전도성이 매우 낮은 광 밴드 갭 반도체 특성을 갖는다. 이때, 레이저 조사를 통한 환원 작용에 의하여 그래핀 산화물로부터 산소-함유 기능기를 제거하면, 광 밴드 갭이 1 eV 이

하로 감소하여 광 흡수는 증가하고, 전도성이 회복된다. 또한, 그래핀은 소수성인 반면, 그래핀 산화물(GO)은 산소-함유 기능기를 갖기 때문에 친수성이나, rGO의 친수성은 중간 정도로서 이는 rGO 내에 잔류하는 산소-함유 기능기의 수가 그래핀 산화물(GO)보다 적기 때문이다.

[0048] 한편, 예시적 구체예에 따르면, 레이저 조사 또는 스크라이빙은 1회에 걸쳐 수행될 수 있으나, 환원된 그래핀 산화물의 패턴 영역의 원하는 표면 특성에 따라서는 복수 회에 걸쳐 수행할 수 있다. 즉, 레이저 조사의 회수를 변화시킴으로써 레이저 조사 또는 스크라이빙된 rGO(LGO)의 전기적 및/또는 형태학적 특성을 조절할 수 있다. 예시적으로, 복수 회에 걸쳐 레이저 조사하는 경우, 조사 회수는, 전형적으로 15회 이하, 구체적으로 10회 이하일 수 있다.

[0049] 또한, 레이저 조사 회수 증가에 따라 표면 거칠기가 증가할 뿐만 아니라, 해당 패턴에서 거칠기가 형성된 표면의 폭이 증가하는 경향을 나타낼 수 있는 만큼, 정밀하고 미세한 패턴에서 후속적으로 신경 세포를 성장시키고자 하는 경우에는 레이저 조사 회수를 적정 범위 내에서 조절하는 것이 유리할 수 있다.

[0050] 전술한 바와 같이, 선택적 레이저 조사에 의하여 형성된 rGO 패턴은 증가된 전도성을 나타낼 뿐만 아니라, 마이크로 스케일의 거칠기를 형성하는 점은 주목할 만하다. 구체적으로, 거칠기가 형성된 rGO 표면은 뉴런 등의 신경 세포가 용이하게 부착함과 동시에, 어떠한 화학적 기능화 과정 없이도 후속 단계에서 신경 돌기(neurite)의 연장(elongation)을 유도하게 된다. 즉, 레이저 스크라이빙 등에 의하여 형성된 rGO 패턴은 신경 세포가 보다 신속하게 부착되어 발달하도록 물리적으로 가이드하는 역할을 하는 것이다. 이처럼, 신경 세포(신경 돌기)의 성장을 물리적으로 가이드하는 주된 요인은 rGO 패턴의 전도성 증가보다는 표면 형태학적 특징(surface topography)으로부터 기인한 것으로 볼 수 있다.

[0051] 예시적 구체예에 따르면, 패턴화된 rGO 표면 거칠기는, 서브-마이크론 스케일, 구체적으로 나노-스케일의 거칠기 또는 조도일 수 있는 바, 이러한 거칠기 부여를 통하여 신경 세포가 효과적으로 부착 및 성장할 수 있다. 이와 관련하여, 패턴화된 rGO의 표면 거칠기는, 예를 들면 표면 높이 변화 폭 기준으로 약 100 내지 2000 nm, 구체적으로 약 200 내지 1000 nm, 보다 구체적으로 약 300 내지 800 nm의 스케일 범위일 수 있는 바, 패턴화된 rGO 표면 거칠기가 일정 수준 미만인 경우에는 신경세포가 인식하지 못하는 문제점이 있는 반면, 지나치게 높은 수준에서는 기관의 안정성에 문제점이 유발될 수 있다. 따라서, 전술한 표면 거칠기 범위가 되도록 레이저 조사 또는 스크라이빙을 수행할 수 있다.

[0052] 따라서, 1회의 레이저 조사(또는 레이저 스크라이빙)에 의하여 형성된 표면 거칠기가 원하는 수준에 미치지 못할 경우에는 전술한 바와 같이 추가적인 레이저 조사를 통하여 원하는 수준까지 rGO 패턴의 표면 거칠기를 증가시킬 수 있다.

[0053] 도 1a를 다시 참조하면, rGO 패턴(13)이 형성된 구조물(10) 상에 신경 세포를 부착 및 성장시키는 단계가 수행된다.

[0054] 이때, 구조물(10)의 표면에 부착 및 성장 가능한 세포로서, 배아줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 세포를 생성할 수 있는 기타 세포 타입일 수 있다. 이러한 세포는 복수의 종으로부터 유래할 수 있는 바, 예를 들면 마우스, 래트, 토끼, 양, 염소, 돼지, 인체 등일 수 있다.

[0055] 구체적으로, 신경 세포는 해마 뉴런(hippocampus neurons), 척수 운동 뉴런, 후근 신경절(dorsal root ganglion), 망막 신경절 뉴런(retinal ganglion neurons), 골지 I 뉴런(Golgi I neurons), 골지 II 뉴런(Golgi II neurons), 농세포(basket cells), 베헤 세포(betz cells), 루가로 세포(lugaro cells), 중간 가시 뉴런(medium spiny neurons), 푸르킨예 세포(purkinje cells), 렌쇼세포(renshaw cells), 단극 브러쉬 세포(unipolar brush cells), 과립 세포(granule cells), 전각 세포(anterior horn cells), 운동 뉴런(motoneurons), 방추 세포(spindle cells), 가단극성 뉴런(pseudounipolar neurons), 다극성 뉴런(multipolar neurons), 중간 뉴런(interneurons), 운동 뉴런(motor neurons), 감각 뉴런(sensory neurons), 성세포(stellate cells) 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 적어도 하나가 선택될 수 있다.

[0056] 다만, 예시된 신경 세포들은 그래핀 산화물에 존재하는 음의 표면 전하로 인하여 이의 표면에 부착 및 성장이 곤란한 특성을 가질 수 있는 바, 해마 신경 세포가 대표적이다. 또한, 구조물(10)에 적용되는 신경 세포는 이의 1차 배양물(primary culture)일 수 있다.

[0057] 예시적 구체예에 따르면, 신경 세포의 부착에 앞서 선택적으로 rGO 패턴(13)이 형성된 구조물(10)의 표면에 대하여 산소 플라즈마 처리를 수행할 수 있다. 산소 플라즈마 처리를 통하여 구조물(10)의 전체 표면은 산화되고, rGO 패턴 영역 역시 그래핀 산화물(GO)로 전환된다. 그 과정에서 표면의 형태학적 특징, 즉 rGO 패

턴 영역에 대응되는 영역의 표면 거칠기 또는 조도는 유지될 수 있다. 따라서, 산소 플라즈마 처리에도 불구하고 신경 세포의 부착 및 성장에 적합한 거칠기를 갖는 표면 특성을 갖고 있다. 이는 신경 세포가 부착 및 성장 표면의 전도성보다는 기저 표면의 형태학적 특징에 의하여 영향을 받기 때문으로 설명할 수 있다. 이때, 산소 플라즈마 처리는, 예를 들면 약 0.5 내지 10 분(구체적으로 약 0.5 내지 3 분, 보다 구체적으로 약 1 내지 2 분) 동안 수행될 수 있으나, 이는 예시적인 의미로 이해될 수 있다.

[0058] 또한, 신경 세포(또는 뉴런)의 부착을 촉진할 목적으로, 양전하를 띠는 고분자 용액, 예를 들면 PDL(poly-D-lysine hydrobromide) 용액, PLL(Poly-L-lysine) 용액, PEI(Polyethyleneimine) 용액 등으로부터 선택되는 적어도 하나를 이용하여 표면을 추가적으로 처리할 수 있다.

[0059] 한편, 신경 세포 부착 및 성장은 당업계에서 알려진 배양 방법, 예를 들면 표면에 rGO 패턴이 형성된 구조물(10)과 소정 시간 동안 배양하는 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 예시적으로, 배양 시 신경 세포의 배양 밀도는 예를 들면 약 50 내지 300 세포/ cm^2 , 구체적으로 약 80 내지 250 세포/ cm^2 , 보다 구체적으로 약 100 내지 200 세포/ cm^2 범위일 수 있다. 이러한 배양 방법에 대한 구체적인 설명은 생략한다. 특정 구체예에 따르면, 먼저 구조물(10) 표면 상에 세포를 시드화한 후에 인큐베이션시키는 방식으로 수행할 수 있으나, 이는 예시적으로 이해될 수 있다.

[0060] 예시적 구체예에 따르면, 구조물(10) 상에서의 신경 세포 배양에 사용되는 배양용 조성물은 신경 세포의 부착 및 성장이 용이하도록 하는 성분, 예를 들면 물, 식염수, 인산염 버퍼 식염수, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상의 폴리에틸렌 글리콜 등) 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0061] 상술한 과정을 통하여, 도 1b에 도시된 바와 같이 구조물(10) 상의 표면 거칠기가 형성된 패턴 영역(13)에서 신경 세포(14)의 부착 및 성장이 두드러진다. 이에 대한 원인으로서는, 나노구조 형성 기술과 결합하여 뉴런과 같은 신경 세포가 부착 및 성장하는 표면의 나노형태학적 특징을 변화시킴으로써 신경 세포의 거동을 조절할 수 있다는 점을 들 수 있다. 그 결과, 그래핀 산화물 표면에 대하여는 성장이 곤란한 것으로 알려진 세포도 유효하게 부착(고정) 및 성장할 수 있게 된다. 따라서, 본 구체예에 따른 방법은 바이오메디컬 분야에서 광범위하게 적용 가능한 잠재력을 갖고 있다.

[0062] 한편, 도시된 구체예에서, 신경 세포는 일단 패턴화된 rGO에 부착된 후에는 해당 패턴에 정렬된 형태로 성장하는 것이 유리할 수 있는 바, 이를 위하여 레이저 조사 회수 등을 조절할 수 있다. 예시적으로, 신경 세포는 가급적 단방향으로 성장하는 것이 유리할 수 있으며, 이때 성장 배향 각도는, 예를 들면 약 15° 이하, 구체적으로 약 5 내지 14° , 보다 구체적으로 약 7 내지 13° 범위일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 일반적으로, 신경-전자 디바이스 내에서 세포의 거동을 조절하기 위하여 나노 스케일 또는 마이크로 스케일의 거칠기를 갖는 표면을 직접적으로 적용하는 것은 용이하지 않다. 이는 표면 형태학적 특징과 신경 세포(뉴런) 거동 및 기능 간의 관계가 충분히 규명되지 않았고, 나노구조화 표면을 형성하는 방법이 현재 적용 중인 바이오 전자 디바이스에 사용된 재료와 상용성이 낮기 때문으로 볼 수 있다. 그러나, 본 구체예에 따르면, 레이저 조사를 통한 광열 반응에 의하여 형성된 rGO 패턴이 갖는 표면 형태학적 특징을 신경 세포의 부착 및 성장과 결합함으로써 신경 세포 칩 또는 인공 보철을 효과적으로 설계할 수 있다. 특히, 그래핀-기반의 전자 분야에서 간단하면서 다목적 수단으로 활용되기 시작한 레이저-기반의 그래핀 산화물 층(또는 필름)의 환원 기술을 이용하여 생물학적 디바이스까지 적용 범위를 확장할 수 있다는 점에서 기술적 의의가 있다.

[0064] 본 구체예에 따른 방법은 그래핀-기반의 바이오메디컬 디바이스에 적용함에 있어서 다양한 장점을 제공할 수 있다.

[0065] 첫째, 기체가 전도성의 rGO 영역, 그리고 생적합성 및 기능화 가능한 그래핀 산화물 영역을 모두 포함하고 있어 복수의 재료 특성을 모두 이용할 수 있다.

[0066] 둘째, 표면 나노형태학적 특징이 종래의 화학적 기능화 방법과 조합할 것을 요하지 않는다.

[0067] 셋째, 제작 과정에서 리소그래피 테크닉을 요하지 않고 간단한 컴퓨터 소프트웨어를 적용하기 때문에 마이크로 스케일로 디바이스를 설계하는데 높은 수준의 자유도를 확보할 수 있다.

[0068] 이차림, 본 구체예에 의하여 달성되는 설계 용이성은 생체 내 신경망에 적용하는데 요구되는 공간적 복잡성으로 인한 종래의 세포-패터닝 방법과 달리, 신경-전자 디바이스에 적용 시 특히 유용한 장점을 갖는다.

[0069] 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 명확히 이해될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적에 불

과하며 발명의 영역을 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0070] **실시예**

[0071] 실시예에서 사용된 재료 및 장치는 하기와 같다.

[0072] 재료

[0073] - 그래핀 산화물 용액(0.5%)는 Asngstron Materials로부터 구입하였다.

[0074] - Trypan Blue Stain (0.4%), 포스페이트 버퍼 식염수(Phosphate Buffered Saline; PBS) pH 7.4 10X, Hanks' 밸런스 염 용액(Balanced Salt Solution; HBSS) 10X, L-글루타민 100X 200 mM, Neurobasal[®] Medium, 페니실린 스트렙토마이신(Penicillin Streptomycin), GlutaMAX[™] 100X, 및 하이버네이트 용액(hybernate solution)은 Gibco로부터 구입하였다.

[0075] - 파라포름알데히드(Paraformaldehyde), 플루오레신 디아세테이트(fluorescein diacetate; 10 g), 및 폴리-D-리신 하이드로브로마이드(poly-D-lysine hydrobromide(PDL); 5 mg)은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[0076] - 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide)은 Thermo Fisher Scientific로부터 구입하였다.

[0077] - 글라스 커버슬립은 Paul Marienfeld GmbH & Co사로부터 구입하였다.

[0078] - 에탄올(95% 및 99%) 및 탈이온수는 삼천화학사로부터 구입하였다.

[0079] 장치 및 특성화

[0080] - SEM 분석은 10 kV의 전압에서 FE-SEM (Hitachi S-4800)를 이용하여 수행되었다. FE-SEM 사진에 앞서 기재를 10 nm 백금으로 코팅하였다.

[0081] - 플루오레신으로 염색된 뉴런은 인버트 형광 현미경(Olympus I 71)으로 시각화하였고, 신경 돌기(neurite)의 길이를 측정하고 live/dead 세포 집계를 위하여 Image J 소프트웨어(National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하였다.

[0082] 대조군 기체의 제조

[0083] 먼저 글라스 기체를 95% 에탄올 및 탈이온수로 세척하였다. 건조 후, 기체를 1 분 동안 산소 플라즈마 처리하였고, 후속적으로 뉴런의 부착을 촉진하기 위하여 PDL 용액(0.1 mg/ml) 내에서 1 시간 동안 빨아들였다. 탈이온수로 세척한 후에 기체를 질소 가스 흐름 조건 하에서 건조시켰다. 살균을 위하여, 기체를 70% 에탄올 용액에 30분 동안 침적시킨 다음, 탈이온수로 세척하고 건조하였으며, 그리고 저장용 파라필름으로 밀봉(sealing)하였다.

[0084] 그래핀 산화물(GO)에 대한 레이저 스크라이빙

[0085] 그래핀 산화물 용액을 2 mg/ml 농도까지 희석시켰다. 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET) 필름을 절단하여 LightScribe DVD 디스크에 피팅시켰고, 복수 회에 걸쳐 에탄올로 세정하였다. 그 다음, 희석된 그래핀 산화물 용액을 드롭 캐스팅 방법에 의하여 코팅하기 전에 필름을 산소 플라즈마로 처리하여 친수성 표면을 형성하였다. 코팅된 필름을 상온에서 건조시켰다. 최종적으로, 스프레이 글루를 사용하여 그래핀 산화물로 코팅된 필름을 LightScribe DVD 디스크 상에 부착시켰고, LightScribe DVD 드라이브 내로 삽입하였으며, 그리고 소프트웨어로 설계된 패턴에 따라 스캐닝하였다(Nero Cover Designer (Softonics)).

[0086] 뉴런 배양

[0087] 1차 해마 뉴런(primary hippocampal neurons)을 TP18(Timed pregnant 18 days)의 Sprague-Dawley 래트(rat)로부터 추출하였다. 해마는 1X HBSS 용액 내에서 줄기 뇌 조직으로부터 선택적으로 추출하였다. 그 다음, 조직을 15 ml-튜브로 제거하고 반복적으로 피펫팅함으로써 균질화하였다. 균질화된 용액을 1000 rpm에서 2분 동안 스피ن 다운시켰고 상층액을 폐기하였다.

[0088] 그 다음, 세포 펠렛을 GlutaMAX를 함유하는 Neurobasal 배지 내에 재분산시켰고, 집계(counting)를 위하여, Trypan Blue로 뉴런을 염색하였다. 세포는 100-200 세포/mm²의 밀도로 시딩하였다. 시딩 후에 세포를 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건에서 인큐베이션하였다. 상기 배지를 2일 마다 GlutaMAX를 함유하지 않은 신규 Neurobasal 배지로 대체하였다.

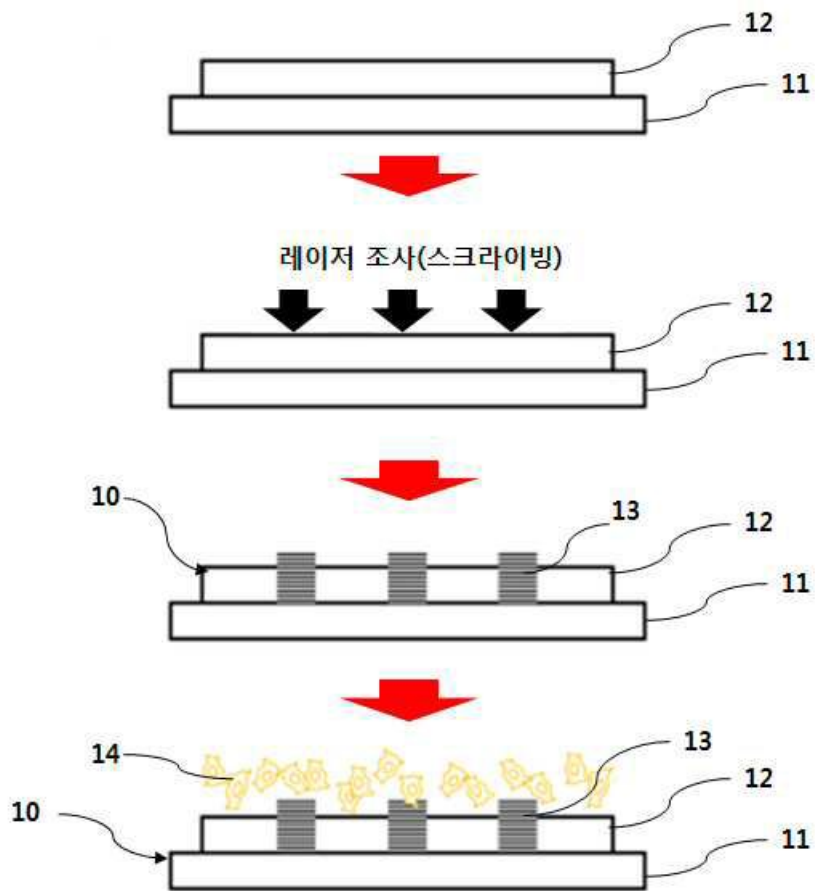
- [0089] live/dead 세포 염색
- [0090] 기재 상에서 뉴런의 생존력을 정량화하기 위하여, 살아있는 세포에 대하여는 플루오레신 디아세테이트(FDA, Sigma-Aldrich), 그리고 죽은 세포에 대하여는 프로피디움 요오드화물(PI, Thermo Fisher Scientific)에 의하여 염색하였다. FDA 스톡 용액은 아세톤 5 ml 내에 FDA 25 mg을 용해시켜 제조하였고, PI 스톡 용액은 PBS 용액 5 ml 내에 PI 10 mg을 용해시켜 제조하였다. 모든 단계는 암 조건 하에서 수행되었다.
- [0091] 원하는 배양 회수에서, 배지를 FDA-함유 배지(스톡으로부터 $1.6 \mu\text{l/ml}$ 까지 희석함) 및 PI-함유 배지(스톡으로부터 $10 \mu\text{l/ml}$ 까지 희석함)로 대체하였다. 37°C 에서 4-5 시간 동안 인큐베이션시킨 후, 형광 현미경으로 관찰하기에 앞서 배지를 제거하고 3회에 걸쳐 1X PBS로 세척하였다.
- [0092] SEM 사진용 세포 제조
- [0093] 기재를 4% 파라포름알데히드 용액 내에 15분 동안 침적시켰고, 1X PBS로 반복 세척하였다. 고정 세포를 갖는 기재를 냉동기 내에서 저장하였다. 고정된 뉴런을 각각 5분 동안 25%, 50%, 70%, 95%, 및 100% 에탄올 내로 침적시킴으로써 점차적으로 탈수시켰다. 그 다음, 100% 에탄올로 3회에 걸쳐 기재를 세척한 후, HMDS 내에 5분 동안 침적시켰다. 최종적으로, 기재를 건조하고 SEM 사진 촬영 준비를 하였다.
- [0094] 결과 분석
- [0095] 도 2a는 실시예에 따른 LGO(laser-scribed rGO) 마이크로패턴의 형성 과정으로 개략적으로 도시한다. 앞서 설명한 바와 유사하게, PET 기재 상에 형성된 GO 필름의 경우, 산소-함유 기능기를 다량 함유하고 있다. 이후, 적외선 레이저 스크라이빙한 후, 조사된 영역(패턴화된 영역)은 rGO 영역을 형성하되, 산소-함유 기능기가 현저히 감소하였다. 이후, 1차 뉴런(primary neuron)을 배양시켜 레이저 스크라이빙에 의하여 패턴화된 영역을 따라 뉴런을 부착 및 성장시킴을 알 수 있다.
- [0096] 한편, 단일 레이저 스크라이빙 프로세스가 GO를 완전히 환원시키는데 불충분한 경우에는 레이저 스크라이빙을 반복하였는 바, 도 2b에 나타난 바와 같이 가시 색상 변화에 이어 마이크로 스케일의 거칠기가 형성되었음을 알 수 있고, 이는 전체 레이저 스크라이빙된 영역 전체에 걸쳐 균일하면서도 재현 가능한 수준이었다.
- [0097] GO 및 LGO 각각에 대한 C1 X-선 광전자 스펙트럼을 분석한 결과를 도 2c에 나타내었다. 상기 도면에서 피크는 탄소-함유 기능기의 특성 피크에 대하여 디컨벌루션되었는 바, C-C/C=C와 O-C=O/C=O/C-O 성분 사이의 비에 있어서 차이가 명확히 관찰되었다. 이는 레이저-스크라이빙에 의하여 GO로부터 rGO로 효과적으로 환원되었음을 뒷받침한다.
- [0098] 복수 회의 레이저 스크라이빙이 LGO의 전기 전도성에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 5 mm 길이를 갖는 2개의 정사각형(square)이 얇은 라인(2 mm 길이 및 $100 \mu\text{m}$ 두께)과 연결되어 있는 간단한 디바이스를 설계하였다. 반복되는 레이저 스크라이빙(10회까지)이 라인 상에 수행되었고, 정사각형은 전기 측정용 패드로 사용되었다.
- [0099] 반복적인 레이저 스크라이빙 결과, LGO의 전기 전도성이 증가하였고 10회에 걸친 레이저 스크라이빙 단계는 $100 \mu\text{m}$ -라인의 선형 전도도를 $350 \mu\text{S/cm}$ 까지 증가시킬 수 있었다. LGO의 측정된 전도도는 반도체 범위 내임에도 불구하고 바이오전자 신호를 측정하는데 여전히 적용 가능하였다. 이러한 차이에 대한 원인으로 초기 GO 필름의 화학적 특성 및 DVD 드라이브 내 IR-레이저 다이오드의 성능을 고려할 수 있다.
- [0100] LGO를 형성하고 특성화하면서 먼저 GO 기재 및 LGO 기재 각각에 대한 뉴런의 부착 및 생존 정도를 조사하였다. 이와 관련하여, 종래 연구에서 GO-코팅된 필름이 포유류 세포에 대하여 생적합성을 갖는 것으로 보고하고 있으나, 도 3a에 나타난 바와 같이 1차 해마 뉴런은 GO 기재 상에 부착되어 생존하지 못한다. 이는 1차 뉴런이 표면 화학 특성(특히, 전하 밀도)에 보다 민감하고 GO의 음 표면 전하가 뉴런의 부착 및 발달에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 예측된 결과로 볼 수 있다.
- [0101] 반면, 레이저-스크라이빙 프로세스를 적용한 결과, 기재의 신경 세포와의 적합성이 현저히 증가하였는 바, 도 3b에 따르면 선형으로 레이저 스크라이빙(10회 초과)된 LGO 기재(약 $15 \mu\text{m}$ 폭 및 $8 \mu\text{m}$ 간격의 라인 패턴) 상에 뉴런이 성장하였다. LGO 상에서 뉴런은 통상적으로 부착(고정)되어 발달하였고, 복수의 신경 돌기(잠정적인 축삭 및 수상 돌기(putative axons and dendrites)로 시각적 카테고리화할 수 있음)를 갖고 있다. LGO 상에 배양된 뉴런의 생존력을 도 3에 나타내었는 바, 대조군에 비하여 $60.02 \pm 10.27 \%$ 인 반면, GO 상에서는 이중 $10.58 \pm 12.01\%$ 만이 생존해 있었다. LGO 상에서의 상대적 생존력은 다른 신경세포 적합성의 기재와 비교하여 낮은 것으로 보이나, LGO 기재의 중대한 부분이 레이저 스크라이빙되지 않아 GO로 남아있음을 고려할 필요가 있

다.

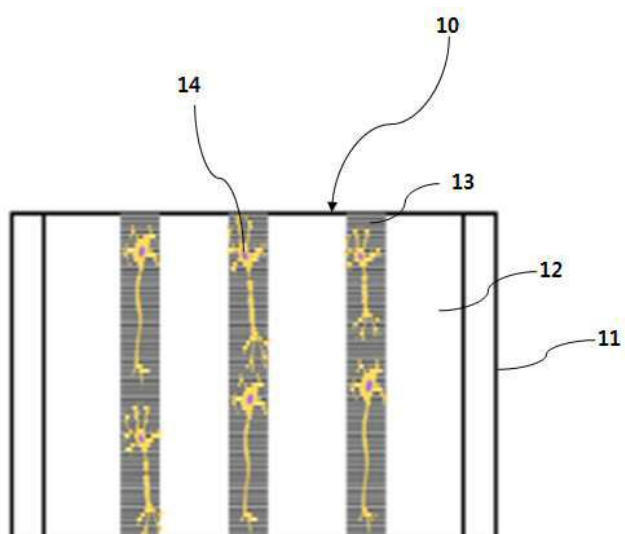
- [0102] 보다 주목할 점은 도 3b 및 도 3d에 나타난 바와 같이 비등방성 레이저-스크라이빙에 의하여 생성된 형태학적 패턴이 신경 돌기 연장을 효과적으로 유도할 수 있다는 것이다. 신경 돌기 유도능은 재현 가능성이 높았고 LGO의 넓은 영역(예를 들면, DVD 영역)으로부터 절단된 모든 기재에 대하여도 확인되었다. 이러한 결과는 레이저 스크라이빙에 의하여 생성된 나노-스케일의 거칠기가 1차 뉴런의 부착 및 발단을 촉진하는 것으로 나타난 활성 형태학적 특징 범위에 해당됨을 강하게 시사한다. 이는 다른 분자로 패턴화된 기재(일반적으로 리소그래피 테크닉을 요구함)의 적용을 회피하도록 한다.
- [0103] 또한, 광 플래쉬에 GO 필름을 노출시킬 경우, 레이저에 의하여 생성된 거칠기와 유사한 거칠기의 마이크로 스케일 표면 형태를 형성함을 확인하였으나, 이는 등방성을 나타내었다. 따라서, 레이저 스크라이빙에 의하여 형성된 비등방성의 표면 형태학적 특징이 신경 세포의 부착 및 신경 돌기의 유도에 중대한 영향을 주는 요인임을 확인할 수 있다.
- [0104] 복수 회의 레이저 조사(또는 스크라이빙)이 LGO의 전기 전도성을 증가시킬 수 있음에도 불구하고, 표면의 형태학적 특징에 있어서 마이크로-스케일의 변화를 유도하며, 따라서 상단에서 뉴런의 거동에 영향을 미칠 수 있다. 이와 관련하여, LGO 기재의 신경 돌기-유도능에 대한 복수회의 레이저 스크라이빙의 영향을 규명하기 위한 분석을 수행하였다.
- [0105] GO 기재 상에서 스크라이빙 영역은 변화시키지 않으면서 1회, 5회 또는 10회의 반복적인 스크라이빙 단계를 수행하였는 바, 이는 표면 형태에 있어서 점차적인 변화를 유발하였다. 이와 관련하여, 반복적인 스크라이빙이 축삭 유도 및 뉴런 생존력에 미치는 영향을 도 4a 내지 도 4h에 나타내었다.
- [0106] 도 4a 내지 도 4c는 추가적인 스크라이빙 단계에 따라 거친 면적의 확장 및 거칠기의 증가를 보여준다. 또한, 도 4d 내지 도 4f는 모든 샘플이 뉴런을 수용할 수 있음을 보여준다. 표면 거칠기 및 거친 영역의 사이즈에 있어서 형태학적 변화는 기재의 전기 전도성과 상관관계를 보여준다. 신경-적합성 면에서, 추가적인 스크라이빙 단계는 세포의 부착 및 생존을 현저히 변화시키지 않으나(도 4g), 신경 돌기의 유도능에 대하여는 음의 영향을 보인다. 도 4h에 따른 신경 돌기의 수동 정렬된 추적에 의하여 나타난 바와 같이, 5회 또는 10회 스크라이빙된 LGO와 비교하면, 신경 돌기는 1회 스크라이빙된 LGO 기재 상에서 스크라이빙 방향에 보다 양호하게 정렬되어 있다. 이러한 결과에 비추어, 본 발명자들은 선형 패턴보다 복잡한 기하학적 형태가 신경 돌기를 유도하는데 이용될 수 있는지 여부를 분석하였는 바, 이때 상호 수직인 2개의 단일 스크라이빙 단계(즉, 그리드 패턴의 LGO 상에서 신경 돌기의 유도)를 수행하였다.
- [0107] 보다 정밀한 뉴런 인터페이스를 설계하는데 LGO를 이용하기 위하여, 신경 돌기 유도능의 화학적 기원을 이해할 필요가 있다. 표면 형태학적 특징이 LGO 기재의 신경 적합성 및 신경돌기 유도능에 있어서 다른 인자들(예를 들면, 전도성 및 화학적 구조)에 비하여 가장 결정적인 인자에 해당되는지 여부를 확인하기 위하여, 라인-패턴화된 LGO 기재를 산소 플라즈마로 처리하였다. 상기 프로세스는 도 5에 도시된 바와 같이 전체 표면을 산화시킴으로써 GO의 전체 영역을 전환시키는 한편, 표면 형태학적 특징은 유지하는 것이다. 그 결과, 도 5b에 나타난 바와 같이 산소 플라즈마는 신경 돌기의 유도를 방해하지 않았고 뉴런의 부착 및 생존 역시 방해하지 않았는 바, 이는 표면의 나노형태학적 특징이 뉴런 부착 및 신경 돌기 유도에 영향을 미치는 주된 인자임을 지시한다(도 5c). 이러한 결과는 신경 돌기의 유도가 표면의 화학적 특성보다는 표면 형태에 의하여 주로 결정됨을 의미하며, 유도 이외의 다른 기능이 추가적으로 요구될 경우, 화학적 기능화에 대한 유연성을 제공한다.
- [0108] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

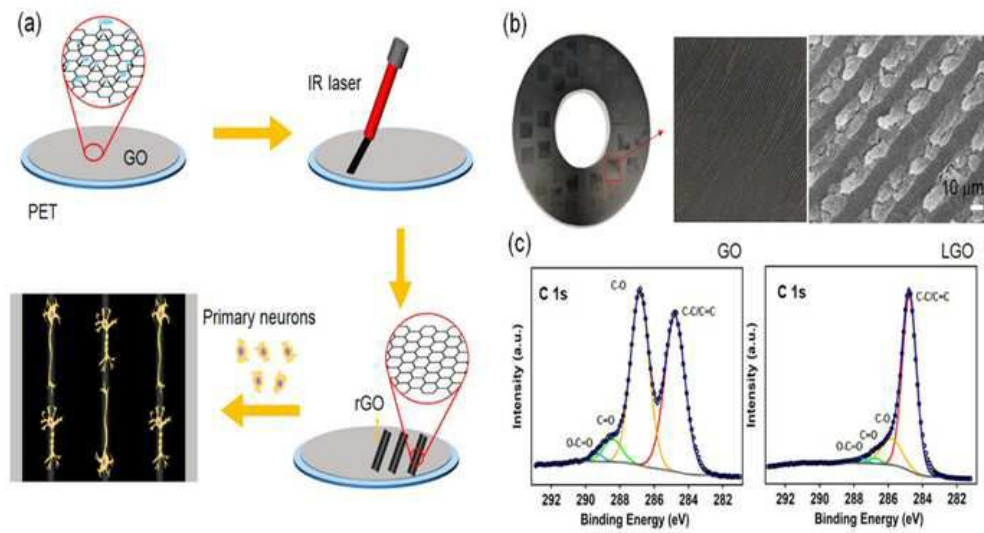
도면1a



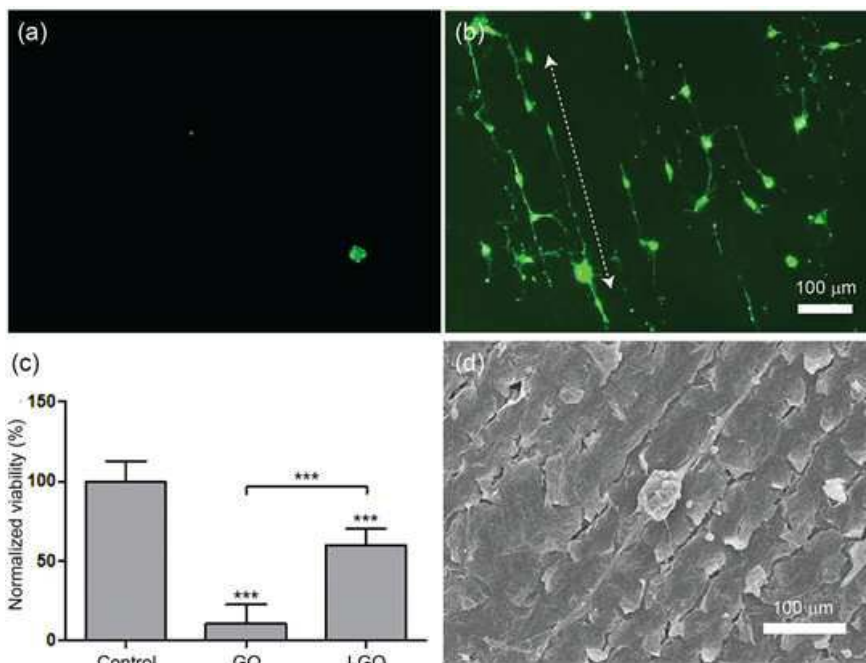
도면1b



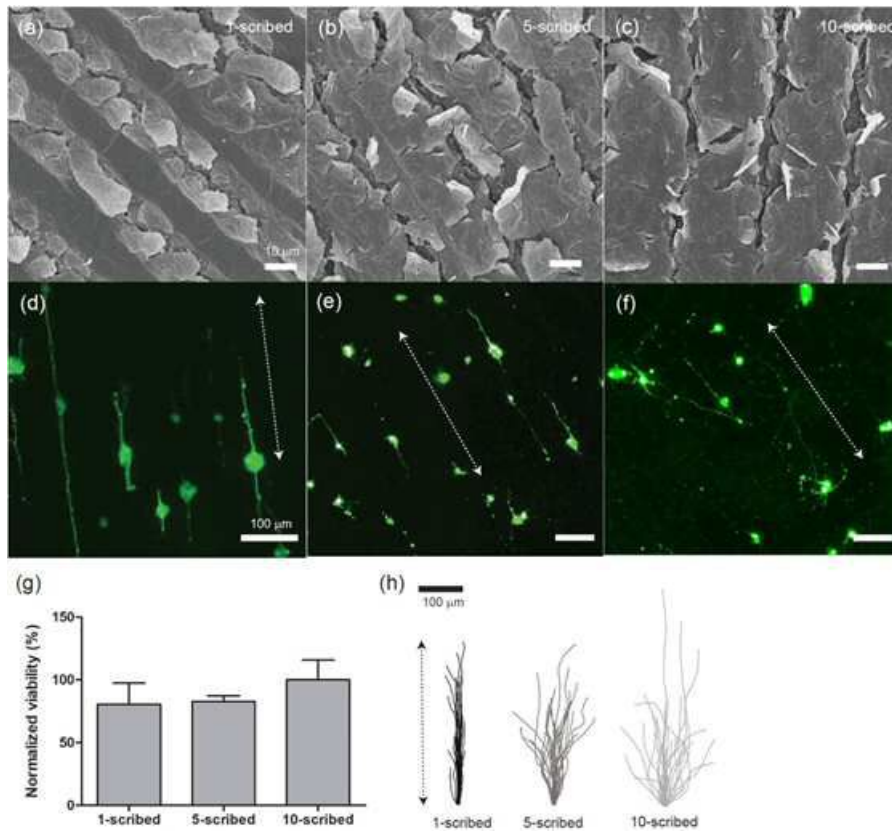
도면2



도면3



도면4



도면5

