

|                                                                                   |                                    |                                     |                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호<br>(43) 공개일자              | 10-2010-0112662<br>2010년10월20일 |
| (51) Int. Cl.                                                                     | (71) 출원인                           |                                     |                                |
|                                                                                   | 충남대학교산학협력단                         |                                     |                                |
|                                                                                   | 대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교           |                                     |                                |
|                                                                                   | (21) 출원번호 10-2009-0031042          | (72) 발명자                            |                                |
|                                                                                   | (22) 출원일자 2009년04월10일              | 양성윤                                 |                                |
|                                                                                   | 심사청구일자 없음                          | 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 203동 804호      |                                |
|                                                                                   |                                    | 진혜승                                 |                                |
|                                                                                   |                                    | 충청남도 천안시 서북구 두정동 대우2차아파트 205동 1302호 |                                |
|                                                                                   |                                    | (74) 대리인                            |                                |
|                                                                                   |                                    | 특허법인 천지                             |                                |

전체 청구항 수 : 총 9 항

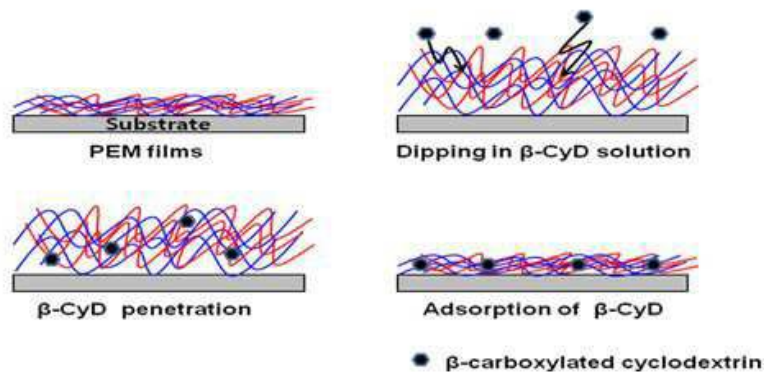
#### (54) 고분자 전해질 다층막 및 생체감응장치

##### (57) 요약

본 발명은 음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층의 교대 적층구조에 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체를 포함하는 고분자 전해질 다층막, 이의 제조방법 및 이를 이용한 생체감응장치에 관한 것이다.

본 발명의 다층막은 접촉각을 통하여 확인한 결과 젖음성이 뛰어나고, 세포의 흡착력이 우수할 뿐만 아니라, 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체를 패터닝하는 경우 세포의 비선택적인 흡착을 통제할 수 있으며, 다층막에 포함되거나 다층막의 최외각층을 형성하는 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체의 특성을 이용하여 특정 물질을 포집하거나 특정 물질의 광학활성을 유도함으로써, 특정 물질에 대한 존재여부 및 특정 물질의 함량을 측정할 수 있는 생체감응장치에 유용하게 응용될 수 있으므로, 산업적으로도 그 효과가 매우 크다는 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2007-000-11930-0

부처명 교과부, 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 특정기초연구 핵심

연구과제명 바이오시스템의 모사를 통한 생체적활성 나노구조 연구

기여율

주관기관 충남대학교

연구기간 2007년 05월 01일~2010년 04월 30일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층의 교대 적층구조에 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체를 포함하는 고분자 전해질 다층막.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 음이온성 고분자 전해질층은 폴리메타아크릴 산, 폴리아크릴 산 및 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것이고, 상기 양이온성 고분자 전해질층은 폴리 알릴아민하이드로클로라이드 및 폴리아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것인 다층막.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층이 각각 2층 이상인 다층막.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

음이온성 고분자 전해질층은 같거나 다른 고분자로 이루어지고, 양이온성 고분자 전해질층은 같거나 다른 고분자로 이루어지는 다층막.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 사이클로텍스트린은 알파-사이클로텍스트린 또는 베타-사이클로텍스트린인 다층막.

### 청구항 6

음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층의 교대 적층구조를 포함하고,

상기 교대 적층구조의 최외각층의 어느 한 층 또는 양 층은 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체로 이루어진 것인 다층막.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 음이온성 고분자 전해질층은 폴리메타아크릴 산, 폴리아크릴 산 및 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것이고, 상기 양이온성 고분자 전해질층은 폴리 알릴아민하이드로클로라이드 및 폴리아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것인 다층막.

### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 사이클로텍스트린은 알파-사이클로텍스트린 또는 베타-사이클로텍스트린인 다층막.

### 청구항 9

제1항 또는 제6항의 다층막을 포함하는 생체감응장치.

## 명 세 서

### 발명의 상세한 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 고분자 전해질 다층막 및 생체감응장치에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 최근 바이오엔지니어링(bioengineering) 분야가 대두되고 있다. 바이오엔지니어링이라 함은 세포의 기능을 연구하거나 유도함에 있어서, 세포 배양액에 포함되는 호르몬이나 성장 인자, 혈청을 조절하는 전통적인 방법과 달리 세포가 부착되어 자라는 지지체와 세포와의 상호 작용을 통하여 세포의 특성인 부착(attachment), 증식(proliferation), 분화(differentiation)와 세포의 기질(extracellular matrix) 분비 등을 조절하는 것을 의미한다. 이를 위해서는 생체적합성(biocompatibility)을 가지는 물질의 개발과 표면의 특성을 변화시키는 기술(chemical surface modification)의 개발이 필요하다.

[0003] 따라서 생체적합성을 가질 뿐만 아니라 세포의 부착능을 향상시킬 수 있는 다층막 및 특정 물질에 대한 포집능과 세포 부착능을 함께 가지는 다층막을 포함한 다양한 다층막 및 이를 포함하는 생체감응장치(biosensor)에 대한 기술의 개발이 요구되고 있다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

[0004] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 생체친화력이 뛰어나고, 물질에 대한 선택적인 포집능력을 갖는 고분자 전해질 다층막 및 상기 다층막을 포함하는 생체감응장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층의 교대 적층구조에 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체를 포함하는 다층막을 제공한다.

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층의 교대 적층구조를 포함하고, 상기 교대 적층구조의 최외각층의 어느 한 층 또는 양 층은 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체로 이루어진 다층막을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 상기 다층막을 포함하는 생체감응장치를 제공한다.

[0008] 본 발명자들은 면역성 및 독성의 면에서도 가장 안전하고, 항균성 및 항박테리아성을 확보할 수 있는 고분자 전해질을 이용하여 layer-by-layer(LBL) 증착기술로 다층막을 제조하고, 상기 다층막에 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체를 포함 또는 흡착시키거나, 상기 다층막의 최외각층에 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체로 이루어진 중합체로 형성된 막을 더욱 적층시키는 경우, 세포 생장에 적합하고 흡습성이 우수하며, 응용 조건에 따라 특정 물질을 포집하거나 특정 물질의 광학적 활성을 유도할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0010] 본 발명에 있어서, 고분자 전해질은 용매에 녹아 해리할 수 있는 고분자를 의미하며, 상기 고분자 전해질에는 양이온성 고분자 전해질과 음이온성 고분자 전해질이 포함될 수 있다.

[0011] 상기 양이온성 고분자 전해질은 수용액상태에서 고분자사슬의 화학적 작용기가 음이온을 잃거나 수소이온을 얻어서 양전하를 띌 수 있는 고분자 전해질을 의미할 수 있고, 주위환경의 산도 또는 염기도의 영향을 받아 이온화의 정도가 다양하게 나타나는 약전해질 양이온성 고분자 뿐만 아니라, 중성 수용성 고분자 중 일반적인 물의 pH 범위에서는 이온화가 잘 되지 않고, 주변의 산도가 매우 높아진 경우에 양전하를 띠는 폴리아크릴 아미드와 같은 중성 수용성고분자도 포함된다.

[0012] 상기 음이온성 고분자 전해질은 고분자사슬의 화학적 작용기가 양이온을 잃거나 수소이온을 잃어서 음전하를 띌 수 있는 고분자 전해질을 의미할 수 있고, 주위환경의 산도 또는 염기도의 영향을 받아 이온화의 정도가 다양하게 나타나는 약전해질 음이온성 고분자가 포함된다.

[0013] 본 발명에 있어서, 1bilayer는 종류가 상이한 두 고분자 전해질층 각 1층이 적층된 다층막을 의미한다.

[0014] 본 발명의 한 측면에 있어서, 본 발명은 다층막에 관한 것이다.

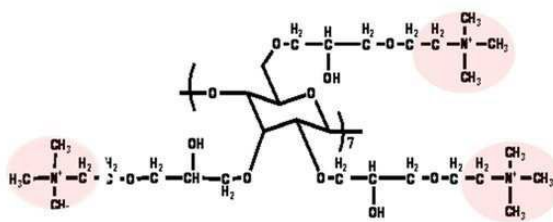
- [0015] 상기 다층막은 고분자 전해질 다층막일 수 있고, 보다 상세하게는 음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층의 교대 적층구조를 포함하는 다층막 또는 상기 교대 적층구조를 포함하고, 상기 교대 적층구조의 최외각층의 어느 한 층 또는 양 층은 사이클로텍스트린 또는 이의 유도체의 중합체로 이루어진 다층막인 것일 수 있다.
- [0016] 상기 음이온성 고분자 전해질층은 바람직하게는 폴리메타아크릴 산(poly methacrylic acid, PMA), 폴리아크릴산(poly acrylacid, PAA), 폴리스티렌 설프네이트(poly styrene sulfonate, PSS) 및 히알루론산(hyaluronic acid, HA)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것일 수 있고, 상기 양이온성 고분자 전해질층은 바람직하게는 폴리 알릴아민하이드로클로라이드(poly(allylamine hydrochloride), PAH), 폴리 아크릴아미드(poly acrylamide, PAAm) 및 폴리 4-비닐벤질트리메틸암모늄 클로라이드(poly(4-vinylbenzyltri-methyl ammonium chloride, PVTAC)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다.
- [0017] 상기 다층막은 양이온성 고분자 전해질층과 음이온성 고분자 전해질층이 각 1층 이상인 다층막일 수 있다. 일 예로, 상기 다층막은 1bilayer이거나 그 이상일 수 있으며, 각각 2층 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, Layer-by-Layer(LBL)이란 상대전하를 띠는 고분자 전해질이 기질표면에 흡착되도록 하는 방법으로 원하는 만큼 반복을 함으로써 고분자 전해질 다층막 또는 필름의 두께를 조절할 수 있는 방법을 의미한다.
- [0019] 또한, 상기 양이온성 고분자 전해질층 또는 음이온성 고분자 전해질층이 2이상인 경우에는, 상기 전해질층은 각각 동일한 고분자 전해질층 또는 상이한 고분자 전해질층이 적층될 수 있다. 구체적으로 음이온성 고분자 전해질층이 2층 이상인 경우, 특정 음이온성 고분자 전해질 층이 양이온성 고분자 전해질 층과 교대로 적층되거나, 종류가 상이한 음이온성 고분자 전해질 층이 양이온성 고분자 전해질 층과 교대로 적층될 수 있다. 양이온성 고분자 전해질층의 경우에도 상기와 같을 수 있다.
- [0020] 상기 최외각층이란 다층막의 최외각 즉, 제일 바깥에 위치한 층 즉, 최외각에 위치한 고분자 전해질층을 의미한다.
- [0021] 상기 폴리메타아크릴산은 폴리메타아크릴산 그 자체뿐만 아니라 그것의 염을 모두 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리메타아크릴산 및 폴리메타아크릴산 염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 폴리메타아크릴산의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 10,000 내지 200,000 또는 50,000 내지 150,000일 수 있다.
- [0022] 상기 폴리 아크릴산은 폴리 아크릴산 그 자체뿐만 아니라 그것의 염을 모두 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리 아크릴산 및 폴리 아크릴산 염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 폴리 아크릴산의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 10,000 내지 100,000 또는 30,000 내지 90,000일 수 있다.
- [0023] 상기 히알루론산은 D-글루쿠론산과 N-아세틸글로코사민이  $\beta(1\rightarrow3)$  글리코시드 결합에 의해 연결된 이당 유닛으로 이루어지는 글루코사미드글리칸의 일종으로, 상기 히알루론산은 그 화학적, 물리적 구조에 종 차이가 없고, 인간도 대사체를 가지고 있으며, 면역성 및 독성의 면에서도 가장 안전한 생체 재료이다.
- [0024] 상기 히알루론산은 히알루론산 그 자체뿐만 아니라 그것의 염을 모두 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 히알루론산은 히알루론산 및 히알루론산 염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 히알루론산 염은 히알루론산 나트륨, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트 등과 같은 무기염과 히알루론산 테트라부틸암모늄 등과 같은 유기염을 모두 포함한다. 상기 히알루론산의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 100,000 내지 10,000,000일 수 있다.
- [0025] 상기 폴리 알릴아민하이드로클로라이드는 히알루론산이나 폴리아크릴 산과 화학적으로 결합할 수 있으며, 상기 폴리 알릴아민하이드로클로라이드의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 10,000 내지 100,000 또는 30,000 내지 80,000일 수 있다.
- [0026] 상기 폴리 아크릴아미드는 히알루론산이나 폴리아크릴 산과 화학적으로 결합할 수 있으며, 상기 폴리 아크릴아미드의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 100,000 내지 10,000,000일 수 있다.
- [0027] 상기 다층막은 양이온성 고분자 전해질이 폴리 아크릴아미드인 경우에는, 생체적 환경에 대한 안정성을 부여하기 위하여, 고분자 전해질 간에 가교반응을 수행하여 가교결합(cross-linking)이 형성된 것일 수 있다. 상기

가교반응은 일 예로 EDAC을 통한 화학반응 또는 열처리에 의해 수행될 수 있다.

[0028] 본 발명의 다층막은 상기 고분자 전해질층의 교대 적층구조를 포함하는 다층막에 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체를 가지고 있거나 상기 교대 적층구조를 포함하고, 상기 교대 적층구조의 최외각층의 어느 한 층 또는 양층이 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체의 중합체로 이루어진 다층막인 것일 수 있다.

[0029] 상기 사이클로덱스트린(cyclodextrin)은 글루코피라노우즈(glucopyranose) 단위들이  $\alpha$ -(1,4) 결합을 하고 있는 고리형 올리고사카라이드(oligosaccharide)로, 대표적으로 6개 단위의 알파-사이클로덱스트린( $\alpha$ -사이클로덱스트린), 7개 단위의 베타-사이클로덱스트린( $\beta$ -사이클로덱스트린), 8개 단위의 감마-사이클로덱스트린( $\gamma$ -사이클로덱스트린) 등일 수 있다. 또한, 상기 사이클로덱스트린 유도체는 각 탄소에 결합해 있는 하이드록실기(hydroxyl)가 다른 기능기로 치환된 것일 수 있고, 일 예로 하기 화학식 1과 같이 글루코피라노우즈 단위의 2번, 3번 및 6번 탄소에 결합된 하이드록실기로 이루어진 군 중에서 선택된 1이상의 하이드록실기가 아민기를 포함하는 기능기 또는 다른 기능기로 치환된 것일 수 있다.

[0030] [화학식 1]



[0031] 상기 다층막은 생체감응장치를 포함하는 다양한 고분자 다층막이 요구되는 장치 또는 기구에 응용될 수 있다.

[0032] 일 예로, 본 발명은 상기 다층막을 포함하는 생체감응장치를 제공한다.

[0033] 또한, 상기 다층막의 경우는 세포의 선택적 흡착 등과 같은 목적 또는 생체감응장치의 응용을 위하여 상기 고분자 전해질 또는 상기 사이클로덱스트린 중합체를 패터닝할 수 있다.

[0034] 상기 패터닝을 통하여 형성되는 상기 다층막 패턴층에는 생체물질 고정용 물질이 결합될 수 있다. 상기 생체물질은 일예로 세포, 단당류, 이당류, 올리고사카라이드, 지방산, 폴리펩타이드 또는 단백질 및 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 세포일 수 있다. 상기 세포는 원핵세포 및 진핵세포를 포함한 모든 세포일 수 있고, 일 예로 섬유세포, 간세포(hepatocyte), 신경세포(neurons), 암세포(cancer cell, 예를 들면 HeLa cell), B cell, 백혈구세포(white blood cell, 예를 들면 Raw264.7) 등을 포함한 면역세포 및 배아세포 등일 수 있다.

[0035] 상기 생체물질 고정용 물질은 바람직하게는 생체물질 고정용 생체물질일 수 있다. 상기 생체물질 고정용 생체물질은 아미노산 서열이 RGD인 올리고펩타이드 서열을 포함한 모든 올리고펩타이드 및 상기 올리고펩타이드를 포함하는 단백질과 기타 수용체 펩타이드를 가진 단백질일 수 있으며, 상기 올리고펩타이드를 포함하는 단백질은 피브로넥틴(fibronectin) 또는 피브린(fibrin) 등일 수 있고, 상기 수용체 펩타이드를 가진 단백질은 라미닌(lamin) 또는 콜라겐(collagen) 등일 수 있다.

[0036] 또한, 상기 다층막은 상기 패턴층 위에 박막을 추가로 포함하는 것일 수 있고, 상기 박막은 상기 생체물질, 바람직하게는 세포를 포함하는 것일 수 있고, 상기 생체물질은 상기 생체물질 고정용 생체물질, 바람직하게는 아미노산 서열이 RGD인 올리고펩타이드 서열을 포함한 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 박막은 고분자 전해질 또는 사이클로덱스트린이나 이의 유도체의 중합체를 포함하는 패턴층에 부착된 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 박막에 포함된 세포가 세포정용 생체물질이 결합된 고분자 전해질 또는 사이클로덱스트린이나 이의 유도체의 중합체를 포함하는 패턴층에 부착된 것일 수 있다.

[0037] 상기 다층막이 DNA 칩(DNA chip), 단백질 칩(Protein chip) 또는 세포계 바이오센서(cell-based biosensor) 등에 사용되는 경우, 상기 패턴층을 포함하지 아니한 최외각층은 기판에 접합하는 기판 접촉층일 수 있고, 상기 다층막이 유도 조직 재생술에 사용되거나, 피부 또는 점막 조직의 드레싱 소재 등으로 사용되는 등 조직 재생 유도 기능을 위해 손상 조직과 마주하는 면으로 사용되는 경우, 상기 패턴층을 포함하지 아니한 최외각층은 생체 조직에 접합하는 조직 접촉층일 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 생체반응장치에 관한 것이다.

- [0040] 상기 생체반응장치는 상기 다층막을 포함하는 생체감응장치일 수 있다.
- [0041] 구체적으로, 상기 생체반응장치는
- [0042] 기관; 최외각층에 고분자 전해질층 또는 상기 사이클로덱스트린이나 이의 유도체의 중합체로 이루어진 층이 최상층으로 되게 상기 기관 위에 형성된 상기 다층막을 포함하는 생체감응장치일 수 있다.
- [0043] 상기 생체감응장치는 세포고정용 생체물질이 아미드기를 포함하는 양전하성 고분자 전해질과 결합되어 있어서, 화학적 안정성이 우수하고, 세포 배양에 적합한 조건을 제공할 수 있으므로, 세포계 생체감응장치에 응용될 수 있다. 상기 생체감응장치는 일 예로 biosensor일 수 있다.
- [0044] 상기 기관은 생체감응장치에 응용될 수 있는 기관으로, 그 재질이 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 유리로 제조된 것(glass slide) 또는 실리콘(silicon)이나 금(gold) 등의 금속기관으로 제조된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 기관은 mica와 같이 양전하 경향을 띄는 기관일 수 있고, 유리(glass), 실리콘(silicon), 금(gold), 철(steel) 등의 금속기관과 같이 음전하 경향을 띄는 기관일 수 있으며, 플라스틱류(폴리스티렌, 아크릴, 테프론 등)와 같은 전하를 띄지 않는 유기질 기관일 수 있다.
- [0045] 상기 전하를 띄는 기관의 경우, 반대전하의 고분자 전해질을 이용하여 다층막을 코팅할 수 있고, 상기 전하를 띄지 않는 유기질 기관의 경우, 고분자 물질간의 소수성(hydrophobic) 흡착성을 이용하여 다층막을 코팅할 수 있다.
- [0046] 상기 다층막은 음이온성 고분자 전해질층과 양이온성 고분자 전해질층이 layer-by-layer(LBL) 증착기술을 이용하여 제조된 것일 수 있고, 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체가 포함되거나 사이클로덱스트린 또는 이의 유도체의 중합체가 최외각층인 것일 수 있다.

## 효 과

- [0047] 본 발명의 생체감응장치 및 이의 제조방법은 고분자를 이용하므로 세포의 흡착성을 향상시키고, 다층막 내부의 특정 물질을 흡착할 수 있으며, 특정 물질의 광학활성을 향상시킬 수 있으므로, 생체감응장치(Biosensor)를 포함한 다양한 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 생체조직과 결합하여 실험 또는 진단용, 의료용이나 질병 치료용으로도 사용될 수 있어, 그 산업적 효과가 매우 크다 할 것이다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 실시예일 뿐이므로, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### [0049] 실시예:

#### [0050] 실시예 1-1. 시약

- [0051] Poly(methacrylic acid)(PMA, Mw=100,000) 및 Poly(allyamine hydrochloride)(PAH, Mw=60,000)은 Polysciences사의 시약을 사용하였고, Carboxylated beta-cyclodextrin은 SUPELCO사의 시약을 사용하였다. Methylene blue Hydrate는 Fluka사의 제품을 이용하였다. 모든 고분자 전해질과 시약은 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 세포실험에 이용한 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS), 0.25% Trypsin-EDTA, Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)은 gibco 제품을 사용하였다. 또한 DMEM을 만들기 위해서 Gibco 제품의 fetal bovine serum(FBS)와 Antibiotic-Antimycotic을 사용하였다.

- [0052] 알파-Cyclodextrin 시약은 TCI사 제품을 사용하였고, 베타-Cyclodextrin 시약은 Aldrich사 제품을 사용하였다. Epichlorohydrin(EP), choline chloride (CC)는 Aldrich사 제품을 이용하였다. Dialysis는 Spectrum사의 분자량 cut-off 1000 membrane을 이용하였다. dialysis 및 실험의 전 과정은 탈이온수(Deionized water; >18MΩ cm Millipore Milli-Q)를 이용하여 수용액을 만들었다.

#### [0053] 실시예 1-2: 고분자 다층막의 제조

- [0054] 고분자 전해질 수용액을 만드는 과정과 세척과정은 Millipore 사의 Milli-Q 정수기를 이용하여 생산한 탈이온수

(Deionized water; > 18 MΩ)를 이용하여 수행하였다.

[0055] 상기 고분자 전해질 중, PAH 와 PMA수용액은 0.01M의 농도로 만들어 0.45μm의 기공을 가진 필터로 여과해서 먼지나 미생물을 제거하여 사용하였고 0.1M의 HCl이나 NaOH 수용액으로 pH를 조정하였다. 본 발명에서는 고분자 전해질 다층막은 고분자 전해질의 양전하와 음전하를 이용한 이온결합을 이용하여 고분자 전해질 다층막을 형성하였고, PAH와 PMA를 교대로 흡착시켜 얻었다. 본 실험에서 다층막의 물성측정을 위하여 사용한 기판(기질)은 실리콘 기판(silicon glass 또는 silicon wafer)을 세척병에 희석한 세제와 함께 넣고, 초음파처리(ultrasonication)을 15분 이용한 다음 다시 탈이온수로 행구어준다. 2-3번의 행구어주는 과정이 거친 후 질소 가스로 건조를 시켜준다. PAH 양이온성 수용액에 20분간 담근 다음 2번의 행굼과정을 거친 다음 15분간 음이온성 고분자 전해질 수용액 PAA에 기질을 담근 후 탈이온수에 2분동안 2번 행굼 과정을 거친다. 이 과정을 1 bilayer라 하고 원하는 두께 만큼 bilayer수를 늘린다. 필름 제조가 끝난 후에는 다시 질소 가스를 이용해 신속히 건조 시켜 준다.

[0056] 실시예 1-3: 다층박막에 사이클로덱스트린을 포함(흡착)시키는 실험

[0057] 상기 사이클로덱스트린을 포함(흡착)시키는 실험은 도 1에 나타난 방법으로 수행하였다.

[0058] 보다 구체적으로, 상기 실시예 1-2의 다층 박막을 형성한 필름을 Carboxylate beta cyclodextrin에 15분간 담그는 방법으로 수행하였다.

[0059] **실시예 2: 고분자 다층막의 특성 확인**

[0060] 실시예 2-1: 접촉각의 측정을 통한 젖음성의 측정

[0061] 상기 실시예 1-3에서 제조된 다층막의 젖음성(습윤성, wettability)을 측정하기 위하여, Face사의 CA-A Contact angle analyzer를 이용하여 물의 접촉각을 측정하였다. 상기 접촉각 측정에 의해 확인된 접촉각인 advancing contact angle과 receding contact angle은 필름의 수분에 대한 변화 경향을 측정하는데 도움이 되는 지수이다. 일반적으로, 젖음성이 좋은 필름은 static contact angle만 낮은 것이 아니라 상기 advancing contact angle과 receding contact angle도 낮은 것으로 보고되어있다.

[0062] 상기 접촉각 측정에 사용한 물은 정제수를 필터를 한 후에 사용하였으며, 주사기를 이용하여 10 ul의 방울을 형성한 후 필름이 올려진 측정판을 서서히 올려 물방울에 접촉하도록 하여 접촉각 측정에 중력의 영향이 없도록 하였다. 보다 상세하게는, 상기 도 2에 기재된 바와 같이, static contact angle를 측정하고, advancing contact angle의 측정은 상기 static contact angle를 측정한 상태에서 10 ul의 물을 더 첨가하여, 다시 접촉각을 측정하여 수행하였고, 상기 receding contact angle의 측정은 상기 advancing contact angle을 측정한 20 ul의 물방울에서 10 ul의 물을 빨아들여서 다시 접촉각을 측정하여 수행하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0063] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 제조된 고분자 전해질 다층막의 경우, 베타-사이클로덱스트린이 포함된 경우에 접촉각이 약 반으로 감소되어 막의 두께가 다른 경우 모두 젖음성이 현저하게 향상되는 것으로 확인되었다.

[0064] 실시예 2-2: UV 측정방법

[0065] UV-vis 분광광도계는 자외선광원이 시료를 통과하게 되면 시료 내부의 전자 전이가 발생하게 되는데 이때 분자 내의 전자구조, 즉, 분자의 화학 결합상태 및 기하학적 구조 등의 특징에 따라 흡수되는 빛 에너지의 크기(frequency) 및 세기(Intensity)가 다르게 나타나게 된다. 여기서 빛의 파장(nm) 또는 진동수(Hz)에 따라 물질의 흡광도(absorbance)를 측정하여 데이터를 나타내게 된다. 용액상에서 측정할 수도 있으며, Film이 얼마나 잘 형성되었는지 결과를 보기위해서 사용하기도 한다. 실험실에서 사용하는 Scinco S-3100 모델을 대상으로 사용법에 대해 설명하면, 먼저 프로그램 사용 20분 전에 UV-vis spectrophotometer의 전원을 켜둔 뒤, 20분 뒤에 프로그램을 실행한다. 프로그램을 실행해서 기본사항(y축, 반복측정횟수 등)을 Setting 해준 뒤 Sample을 찍기 전 Base line을 잡아주어야 한다. Base line은 sample의 기질분비와 마찬가지로 Ultrasonication을 이용하여 세척되어진 Slide glass로 사용한다. Base line은 Measure 메뉴의 run blank (또는 도구상자의 회색 비커

모형)를 클릭하게 되면 10번의 스캔을 거쳐 Base line을 측정하게 된다. 그 다음 sample을 측정하게 되는데 Sample을 홀더에 장착한 뒤, measure 메뉴의 run sample 을 클릭하여 측정할 수 있다. 데이터는 화면에 즉각적으로 그래프로 표시가 된다. 측정한 데이터의 저장은 File-Save-sample spectrum, CSV format file을 선택한 뒤 ok를 누르면 된다. 데이터는 표의 형태로 얻어지는데 저장한 파일을 excel에서 열어서 차트화 시키면 그래프 형태로 데이터를 얻을 수 있다.

[0066] 2-3원자 힘 현미경(AFM)을 이용한 표면형태학적 특성의 측정

[0067] 상기 실시예 1-2 및 1-3에서 제조된 다층막의 특성을 알아보기 위하여 표면형태학적 성질을 AFM을 이용하여 확인하였다. 일반적으로 상기 표면형태학적 성질에 의하여 확인한 결과, 세포의 비선택적 흡착을 방지하는 효과를 보인 표면들은 전체적으로 측정된 표면에 미세한 입자가 분포되어 있는 것 같은 형상을 나타내는 것으로 보고되어있다.

[0068] 구체적으로, 본 실험에서 이용한 현미경은 Digital Instrument사의 Dimension 3100 AFM을 이용하였고, 상기 표면형태학적 성질의 확인은 상기 AFM을 이용하여 tapping mode에서 AFM의 높이(height) 이미지를 촬영하여 각각의 고분자 전해질 다층막 표면의 위상차를 확인하는 방법으로 수행하였다.

[0069] 실시예2-4: 고분자 전해질 다층막 필름의 세포 흡착성 실험

[0070] 다층막을 이용하여 고분자 전해질 다층막 필름의 세포 흡착성 실험을 수행하였다.

[0071] 상기 다층막과 세포와의 상호작용을 알아보기 위하여 신장세포(HEK 293 kidney cell)를 포함한 여러 세포를 이용하여 실험하였으며, 현미경으로 관찰하였다.

[0072] 실시예 3: 다층막의 효과 확인

[0073] PAH(8.5)/PMA(4.0)의 필름은 약 40° 정도를 유지하였으나, carboxylated beta cyclodextrin에 한 번 담근 후에는 약 20° 정도를 친수성 표면을 갖게 되었다.

[0074] 필름에 흡착되어진 carboxylated beta cyclodextrin은 Methylene blue (MeB) 0.001M와 complexation을 형성할 수 있다.

[0075] PAH/PMA 필름은 MeB와 거의 반응이 없지만, Carboxylated beta cyclodextrin이 흡착된 필름은 MeB와 반응을 하여 UV흡수도가 증가하였다. 이는 아래 그림과 같이 Beta cyclodextrin의 기공에 MeB가 들어가 Host-Guest interaction이 일어나 흡수도가 증가하였음을 알 수 있었다.

[0076] 다양한 pH condition에서 형성된 다층박막이 Carboxylated  $\beta$ -CyD와 Methyleneblue (MeB)의 Host-Guest 상호작용에 영향을 주는 정도를 알아보았다. PAH, PMA는 약고분자 전해질이기에 때문에 pH에 따라 전하밀도가 달라지고 이는 사슬구조의 변화를 가져오게 된다. 사슬 구조의 변화는 필름의 모폴로지, 젖음성 등 다양한 성질을 갖게 한다.

[0077] 우리는 PAH(4.0)/PMA(4.0), PAH(8.5)/PMA(4.0), PAH(8.5)/PMA(8.5)의 조건으로 다양한 필름을 형성하였다. 또한 필름 형성 후 낮은 pH(2.0)의 di-water에 2min간 처리해줌으로써 필름 내부의 공간을 확보해주는 실험도 하였다.

[0078] MeB이 외에도 Salicylic acid(SCA)를 guest 분자로 이용하여 Carboxylated  $\beta$ -CyD와 Host-Guest 상호작용을 실험해 보았다.

[0079] Carboxylated  $\beta$ -CyD이 존재하지 않아도 Salicylic acid의 영향으로 필름이 친수성으로 변하였으나, Carboxylated  $\beta$ -CyD와 Salicylic acid의 Host-Guest 상호작용으로 접촉각은 조금 감소하였다..

[0080] 세포 흡착 실험

- [0081] 신장 세포 (HEK 293 cell)은 증식이 빠르고 배양이 용이하기 때문에 의학 분야와 생체재료 분야에서 유용한 세포의 종이다. 세포 흡착 실험을 위한 기질은 지름 60mm의 세포배양용 폴리스타이렌 디쉬(TCPSTissue Culture Grade Polystyrene Dish)의 2/3만큼을 다층박막 필름으로 코팅하여 코팅된 부분과 그렇지 않은 부분(Bare)을 비교 관찰 할 수 있도록 하였다. 실험을 위해서 세포배양용 media를 세포에 가장 적당한 온도로 맞추어 주기 위하여 항온조에 넣어 37℃로 만들어 주고 CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양되어 온 세포들을 시편에 나누어 넣기 위해서 세포가 자라고 있는 TCPS의 media를 제거해 주고 DPBS ( Dulbecco Phosphate Buffered Saline)로 TCPS의 세포를 2번 세척하여 주고 Tripsinf-EDTA 700 ¼l을 TCPS에 넣어 최익각 쪽부터 수평으로 2~3회 정도 기울여 적신 후 Micro-Pipet을 이용하여 Trypsin-EDTA를 완전히 제거하여 주었다. 세포의 안정화를 위하여 5 분간 Incubator에서 배양시켜 주고 다시 꺼내어 새 media 4ml을 세포에 분산시켜 준다. 세포가 분산되 4 ml의 media 중 1/10을 70% 에탄올로 소독된 sample 위에 4 ml의 media와 함께 넣어 주었다. 그리고 다시 CO<sub>2</sub> Incubator에 넣고 배양하고 실험 후 1, 3, 5일 후에 세포들의 흡착과정을 관찰하였다. Carboxylated β-CyD 존재 유무에 따른 세포실험을 하였다.
- [0082] 2-2 Cationic β-CyD polymer 합성
- [0083] 1) 실험
- [0084] 1-1) 시약
- [0085] β-CyD, Epichlorohydrin(EP), choline chloride (CC)는 Aldrich사 제품을 이용하였다. Dialysis는 Spectrum사의 분자량 cut-off 1000 membrane을 이용하였다.dialysis 및 실험의 전 과정은 탈이온수(Deionized water; >18MΩcm Millipore Milli-Q)를 이용하여 수용액을 만들었다.
- [0086] 1-2) Cationic β-CyD polymer [P(βCyD)]합성
- [0087] β-CyD/EP/CC=1/15/1의 몰비로 합성은 진행되었다. NaOH 1g을 20ml 탈이온수에 녹인다. NaOH 수용액에 1.135g의 β-CyD를 넣어준다. β-CyD가 들어간 NaOH 수용액은 25℃에서 24시간 교반시켜준다. 수용액에 CC 0.140g 넣어주고 EP 1.388g을 약 0.1ml/min 속도로 첨가하여준다. EP을 다 넣어준 후, 60℃로 열을 가해준다. 중합이 진행되는 동안 60℃와 600rpm을 유지시켜준다. 두 시간후 중합은 3N의 염산 수용액을 첨가해줌으로써 중성 수용액에 의해 종료되어진다. Solution은 분자량 cut-off 1000 membrane을 이용하여 24시간동안 dialysis한다. Dialysis를 통해 얻어진 solution은 동결건조를 통해 순수한 파우더를 얻을 수 있다.
- [0088] 2) 결과
- [0089] 2-1) GPC
- [0090] 합성 된 Cationic β-CyD polymer의 분자량을 측정하기 위해 GPC를 이용하였다. GPC sample은 3mg/1ml의 농도로 준비하였고 GPC standard는 PEG를 이용한 결과이다. Mn은 2211.5g/mol, Mw는 2306.4 g/mol D:1.0429의 결과를 얻었다.
- [0091] 2-2) NMR
- [0092] 합성 된 cationic β-CyD polymer 구조를 분석하기 위해서 NMR을 측정하였다. JNM-AL400의 NMR에서 시행되어졌고, 400MHz 공명주파수를 가진다. NMR solvent는 Aldrich사의 D<sub>2</sub>O를 사용하였다.
- [0093] 2-3) P(βCyD)를 이용한 다층박막 형성
- [0094] 1. 실험
- [0095] 1-1) 시약
- [0096] Poly (Acrylic acid)(Mw=90.000)은 Polyscience사의 시약을 사용하였다. 고분자 전해질은 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 세포실험에 이용한 Dulbecco Phosphate Buffered Saline(DPBS), 0.25% Tripsinf-EDTA, Dulbecco modified eagle medium(DMEM)은 gibco 제품을 사용하였다. 또한 DMEM을 만들기 위해서 Gibco 제품의 fetal bovine serum(FBS)와 Antibioic-Antimycotic을 사용하였다

[0097] 2. 결과

[0098] P( $\beta$ CyD)의 pH를 7.0으로 고정 시킨 후, PAA pH를 각각 3.0, 5.0, 7.0으로 조정 한 뒤 LBL 형식으로

[0099] 필름을 형성한 뒤 MeB로 염색한 후 UV를 측정하였다.

[0100] 접촉각이란 액체가 고체 표면 위에서 열역학 적으로 평형을 이룰 때 고체 표면과 액체 표면이 이루는 각을 말한다. 이 때 고체 표면의 상태와 액체의 종류에 따라 그 각이 달라지기 때문에, 접촉각으로 표면 에너지와 표면의 균일성, 친수성 정도를 알 수 있다. 필름이 적층됨에 따라 젖음성(Wettability)의 변화를 평가하기 위해 접촉각을 측정했다. 젖음성 실험은 Face회사의 CA-A Contact angle analyzer를 이용하여 물의 접촉각을 측정하였다. 접촉각 측정에 사용한 물은 탈이온수를 사용하였으며 주사기를 이용하여 15 $\mu$ l의 방울을 형성한 후 필름이 올려진 측정판을 서서히 올려 물방울에 접촉하도록 하여 접촉각 측정에 중력의 영향이 없도록 하였다. 먼저 정적 접촉각(Static contact angle)을 측정하였고, 그 상태에서 15 $\mu$ l를 더 첨가하여 Advancing contact angle를 측정하였다. 마지막으로 30 $\mu$ l의 방울에서 15 $\mu$ l를 다시 빨아들여서 Receding contact angle을 측정하였다. 결과 값은 필름의 표면에 물방울을 떨어뜨려 5회 측정한 값의 평균값을 구했다.

[0101] Charge density를 충분히 하기 위해서 낮은 pH로 P( $\beta$ CyD)의 pH를 조절하였다. pH3.0으로 조정 된 P( $\beta$ CyD)는 앞에 실험과 같이 PAA pH3.0, 5.0 7.0 과 LBL 방법으로 필름을 형성하였다. 이 필름은 MeB에 담겨 P( $\beta$ CyD)와 complexation을 형성한다. UV를 이용하여 관찰하였다. 또한 PAH/PAA, PAH/PAA/P( $\beta$ CyD)/PAA의 필름과 비교하였다.

[0102] 광학적으로 비활성을 가진 guest 분자가 Cyclodextrin과 complexation 형성하면, 활성을 가지는 특징을 가지게 된다. Cyclodextrin과 Guest 분자의 상호작용으로 광학 활성은 유도 되어진다 Circular dichroism spectra에 의해 complexation을 확인할 수 있고 구조 정보에 대해서도 알 수 있다. MeB와 complexation 형성 시 CD값을 가짐을 확인할 수 있었다

### 도면의 간단한 설명

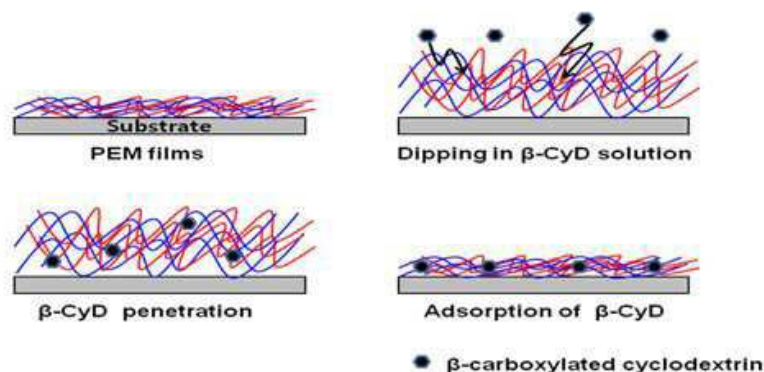
[0103] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 고분자 전해질 다층막에 사이클로덱스트린이 포함된 고분자 전해질 다층 필름을 제조하는 방법을 나타낸 개략도이다.

[0104] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 고분자 전해질 다층막의 젖음성을 나타내는 접촉각 실험결과를 나타낸 그래프이다.

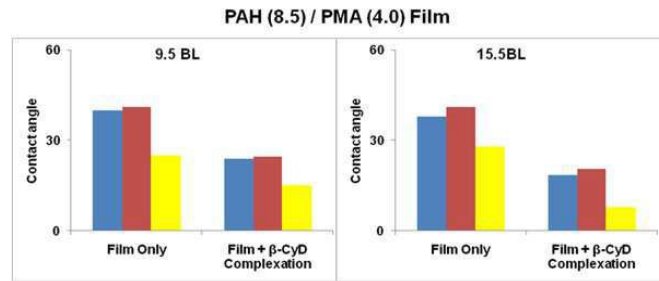
[0105] 도 3 내지 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 다층막의 접촉각, UV를 통하여 측정한 값 및 세포 접착력을 나타낸 그래프 또는 사진이다.

### 도면

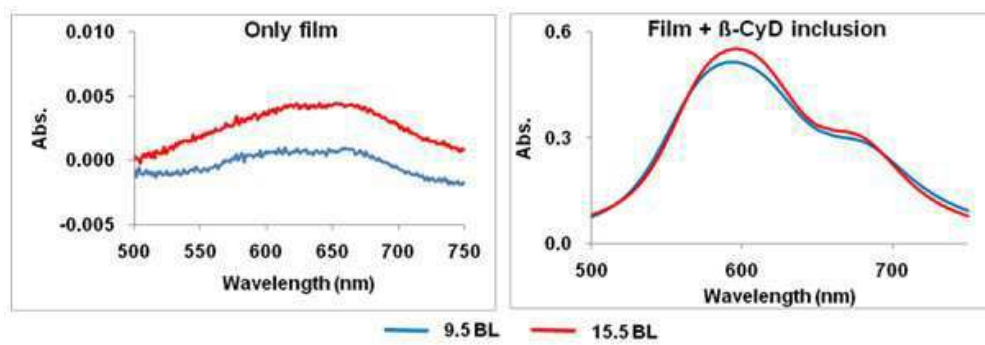
#### 도면1



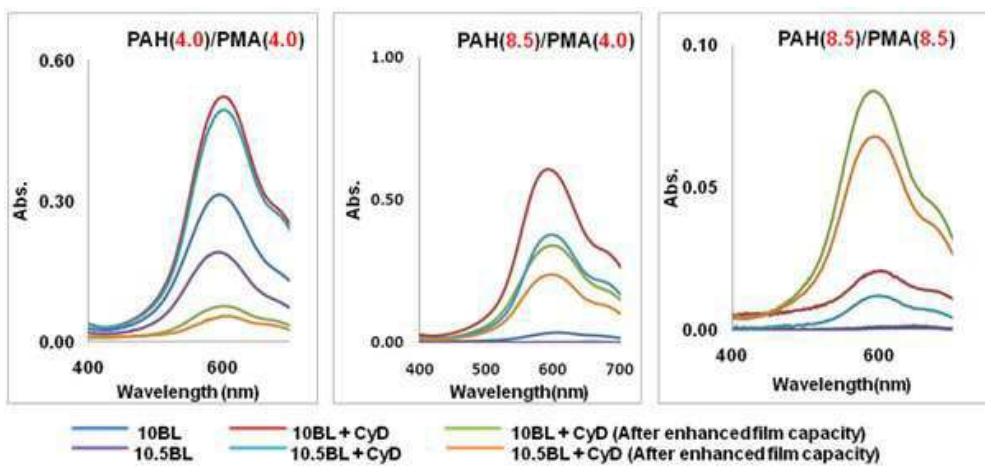
도면2



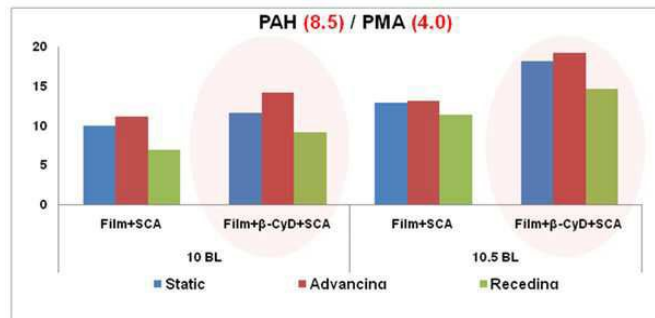
도면3



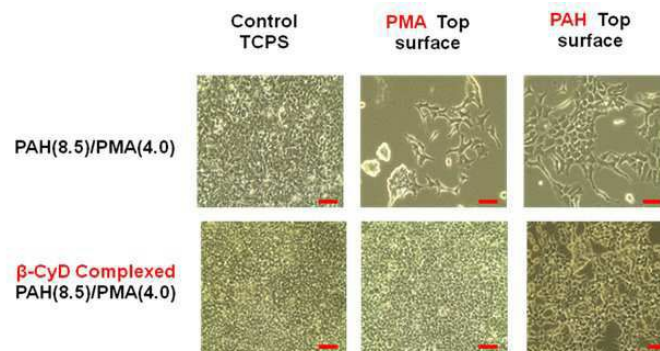
도면4



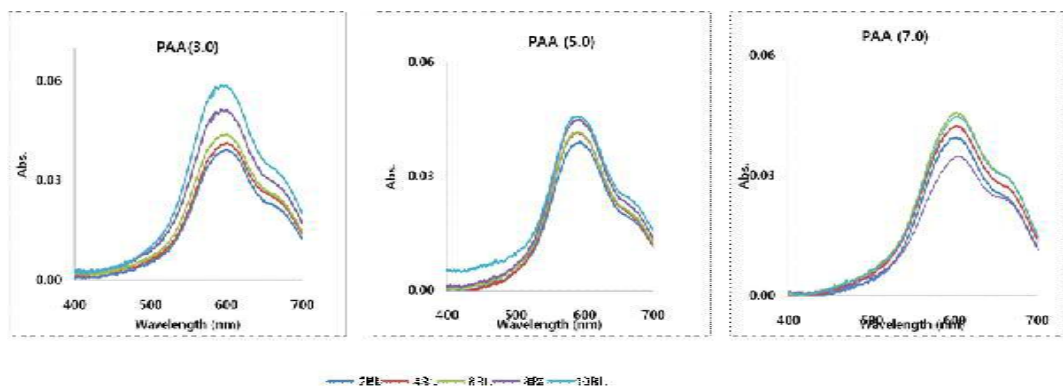
도면5



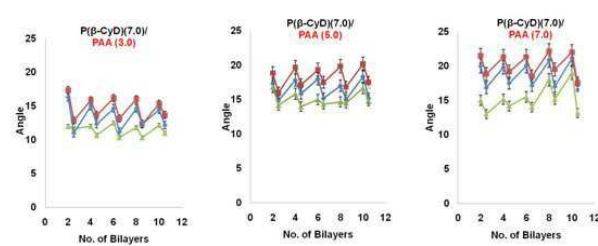
도면6



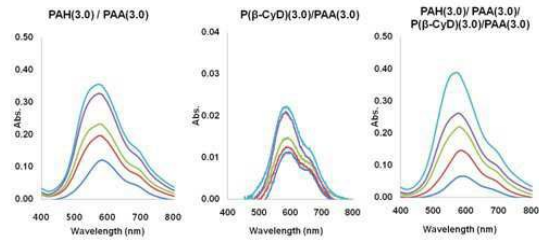
도면7



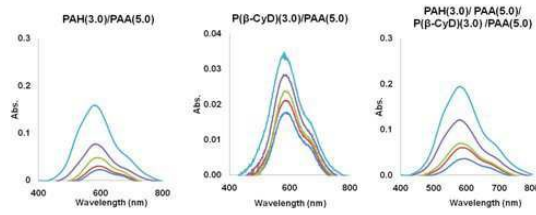
도면8



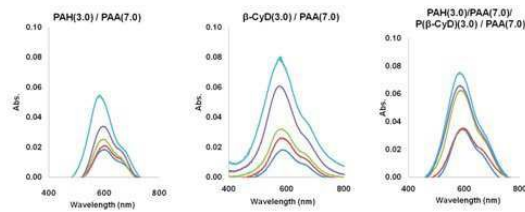
도면9



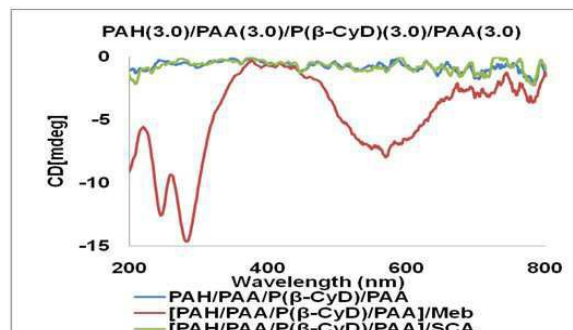
도면10



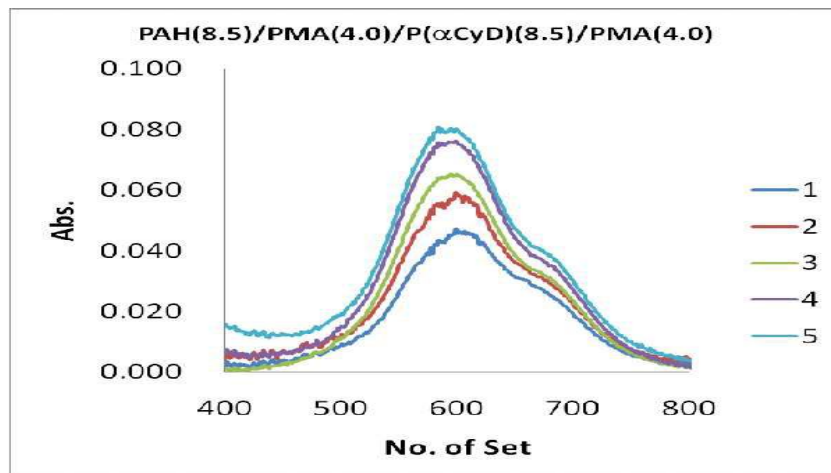
도면11



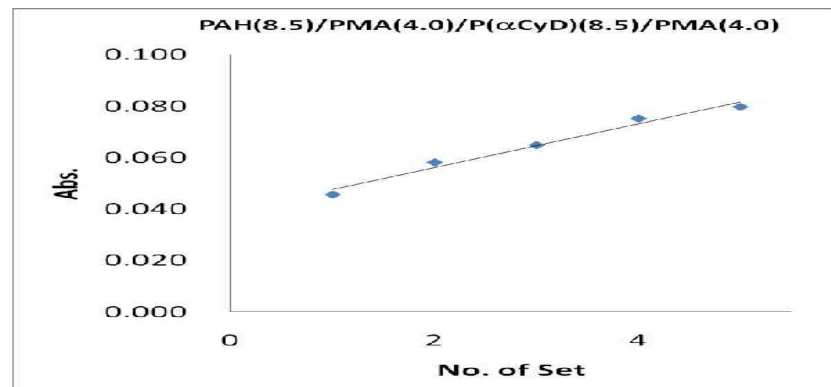
도면12



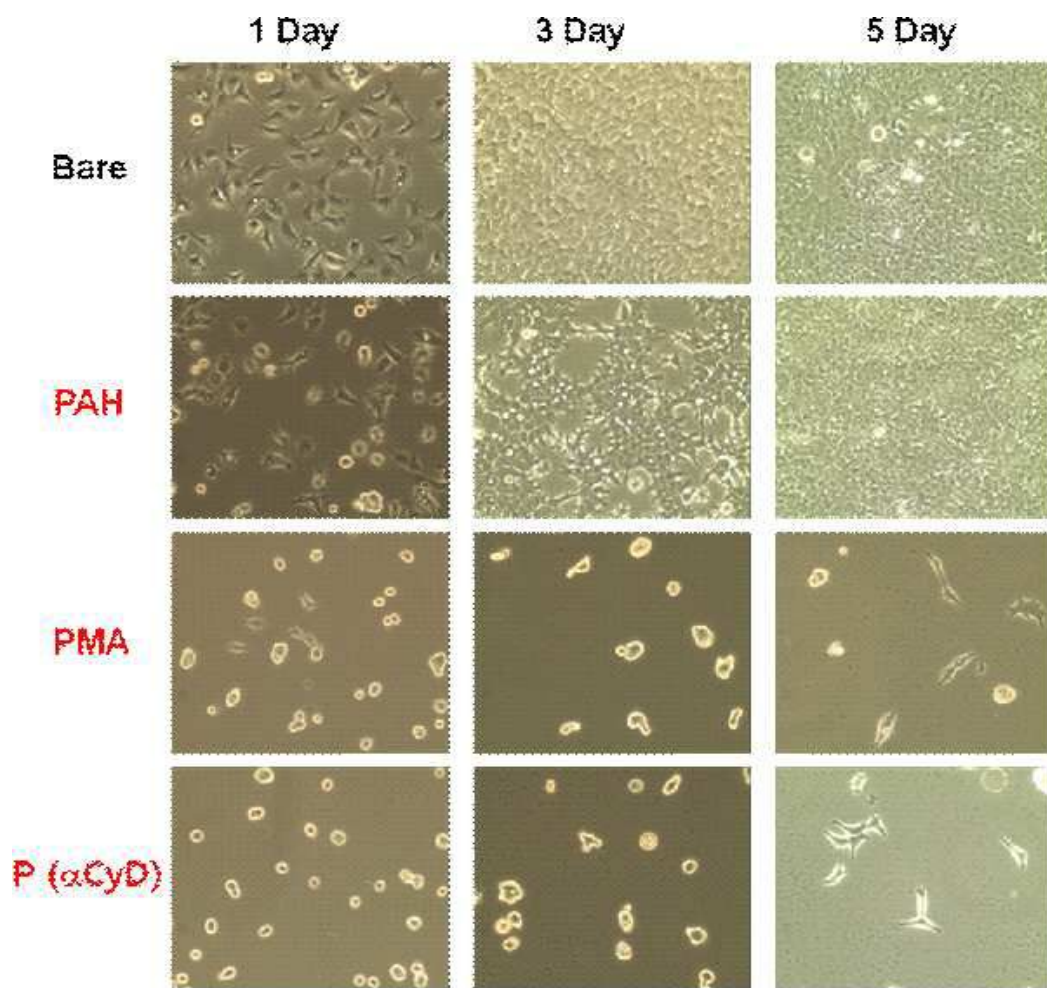
도면13



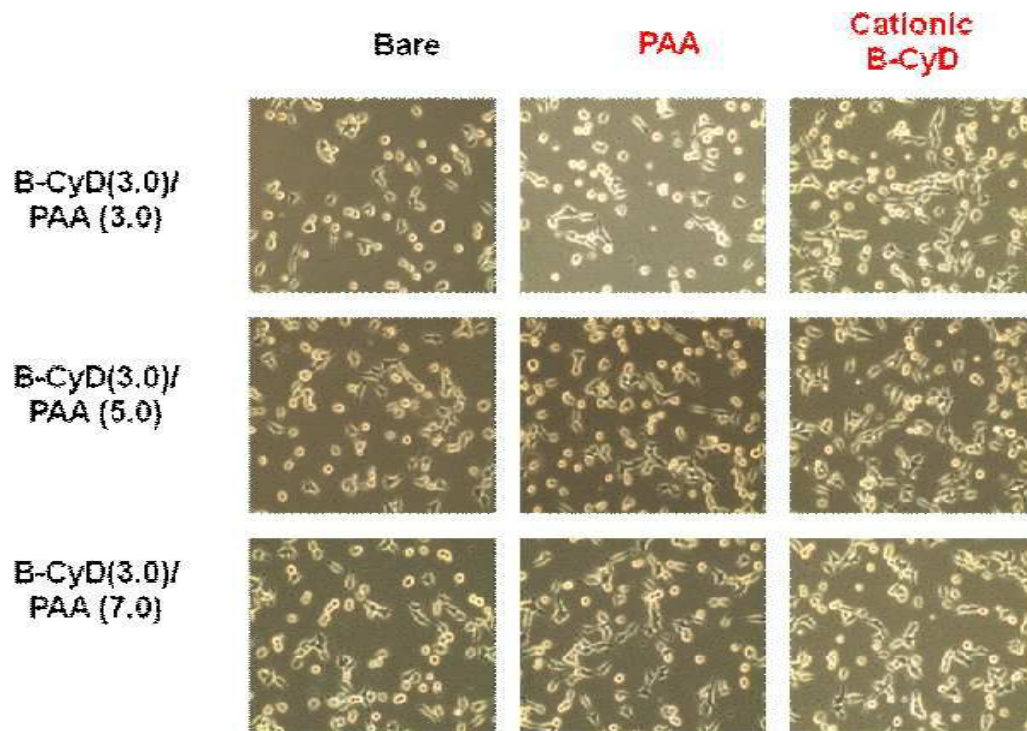
도면14



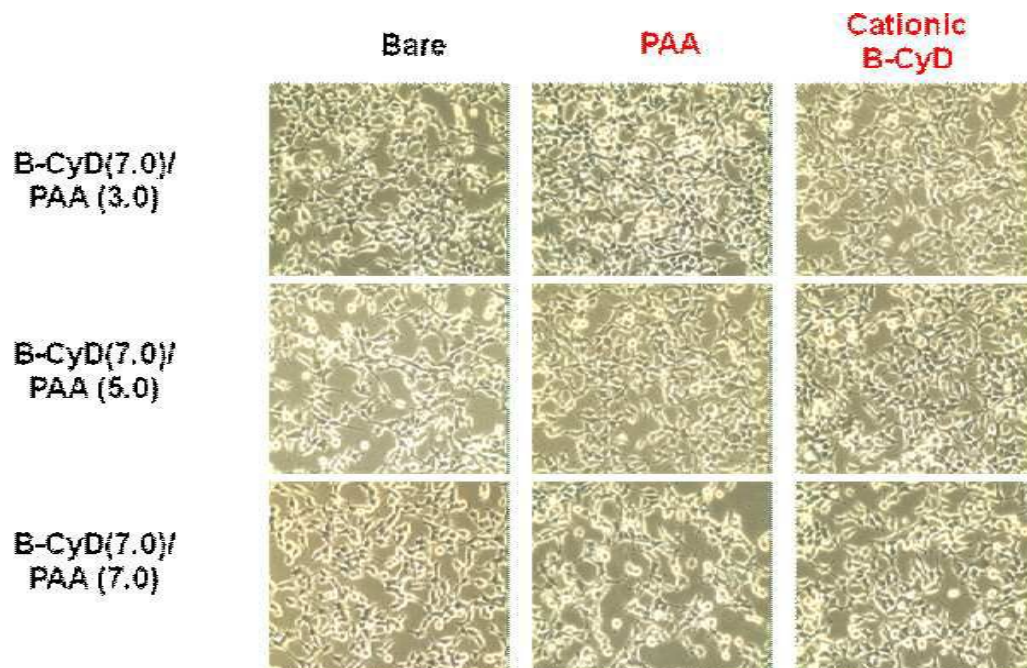
도면15



도면16



도면17



도면18

