

## 소프트 리소그래피를 이용한 히알루산 고분자 패터닝

### 1. 서론

이번 시간에는 마지막으로 최근 활발히 연구되고 있는 당류(polysaccharides) 고분자에 대한 패터닝을 살펴보고자 한다. 대표적인 당으로 알려진 히알루산(Hyaluronic acid (HA) or hyaluronan)은 음이온을 띤 사슬형 당으로써 glucuronic acid와 N-acetylglucoamine 두 개의 당의 기본 조합으로 이루어져 있다. HA는 우리 몸 속에 존재하여 세포에 물을 공급하는 중요한 역할을 하고 있으며 따라서 생체적합성과 생분해성이 뛰어나다. 최근에는 약물전달, 조직공학, 연골치료 등에 있어 폭넓게 이용되고 있다 [1, 2].

흥미로운 것은 HA가 대부분의 단백질과 세포의 비특이적 결합을 억제하는 성질을 갖고 있을 뿐만 아니라 우리 몸 속에 있는 특정한 단백질, 예를 들면 CD44나 p32와는 특이적으로 결합한다는 사실이다. 따라서 HA를 표면에 고착함과 동시에 패터를 형성할 수 있다면 이를 이용하여 여러 가지 생물학적 연구를 할 수 있음을 기대할 수 있다.

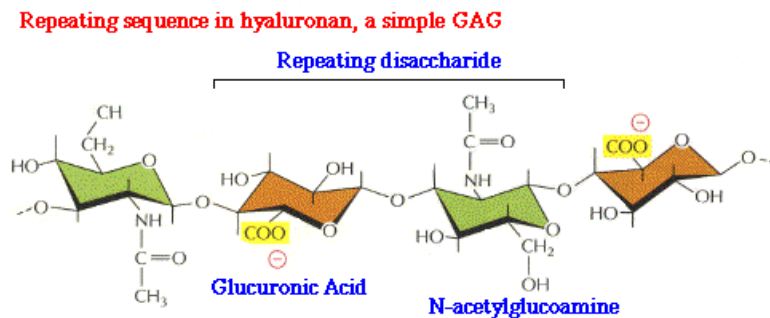


그림 1. HA의 구조

이번 강의에서는 HA를 여러 종류의 기판에 고정화시키고 패터닝하는 방법에 대해 살펴볼 것이다. 여러 패터닝 방법 중에서 간단한 소프트 리소그래피 방법이 주로 대상이 될 것이며 그 중에서 미세 접촉 프린팅(microcontact printing,  $\mu$ CP)과 모세관 리소그래피(capillary lithography or molding)방법이 소개될 것이다 [3]. 사용한 기판으로는 유리, 산화 실리콘, poly(hydroxyethyl methacrylate) (poly(HEMA)), polystyrene (PS) 세포 배양 용기, 및 생분해성 polylactic glycolic acid (PLGA) 등이 사용되었다. 특히 중요한 점은 HA가 음이온을 띤 고분자이기 때문에 기판도 친수성을 가질 필요가 있다. 따라서 사용한 기판 중에서 친수성을 띄지 않을 경우에는 산소 플라즈마 처리를 한다든가 NaOH 용액에 담가 표면을

친수성으로 변화시켰다.

## 2. 본론

그림 2 에서 보듯이 두 가지 소프트 리소그래피 방법이 사용되었다. 간단하게 설명하면 미세접촉 프린팅은 PDMS 몰드에 잉크 물질로 HA 용액을 묻히고 이를 기판에 전송하는 방법이다. 보통 self-assembled monolayers (SAM)을 사용하여 미세접촉 프린팅을 하면 두께가 수 나노미터에 불과하지만 여기서 사용한 HA 용액은 점도가 매우 큰 용액이므로 두께가 보통 90 나노미터 정도 된다. 다른 한가지 방법은 이전에 소개한 모세관 리소그래피 방법으로 PDMS 몰드를 용액 위에 균일하게 접촉시켜 몰딩이 일어나게 만드는 방법이다. 여기서 패턴이 형성되는 메커니즘은 이전 강의에서 소개했듯이 모세관 현상만 일어나는 것은 아니며 매우 친수성이 높은 HA 고분자와 소수성인 PDMS 몰드 사이의 박리 현상도 같이 일어나게 된다. 이러한 박리 현상은 기판이 쉽게 노출될 수 있도록 도와주어 궁극적으로 단백질이나 세포의 흡착을 방지하는 막으로 사용될 수 있게 해준다.

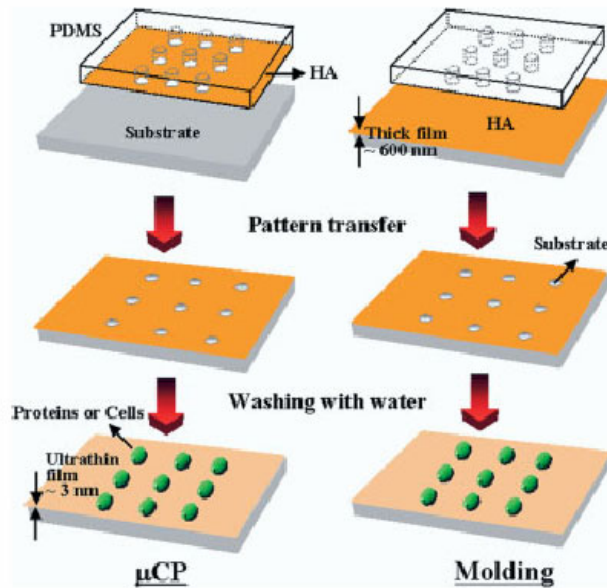


그림 2. HA 를 패터닝하는 두 가지 소프트 리소그래피 방법 개략도

아래 그림 3 에 대표적인 AFM 사진을 나타내었다. 사용한 패턴은 10 마이크로 박스 모양이며 두 가지 방법에서 모두 만족스러운 패턴 전송을 보여준다. 미세접촉 프린팅의 경우 90 나노 정도의 두께이며 (a) 몰딩의 경우에는 몰드의 높이와 비슷한 약 500 나노의 높이를 보여주었다 (d). 두 경우 모두 (b, d)의 위상 이미지를 볼 때 기판이 깨끗하게 노출되었음을 보여준다. 한가지 재미있는 현상은

HA 가 매우 물에 잘 녹는데 반해 PBS 로 씻어내었을 때 모든 고분자가 녹지 않고 약 3 나노 정도의 두께가 남는다는 사실이다 (c, f). 이는 바이오 적용에 있어 매우 흥미로운 사실로 만약 고분자가 모두 녹아 남지 않는다면 아무런 템플레이트로서의 역할을 할 수 없기 때문이다. 이렇게 얇은 3 나노 정도의 두께가 후속 공정에서 단백질과 세포의 접착을 방지하는 역할을 하게 된다.

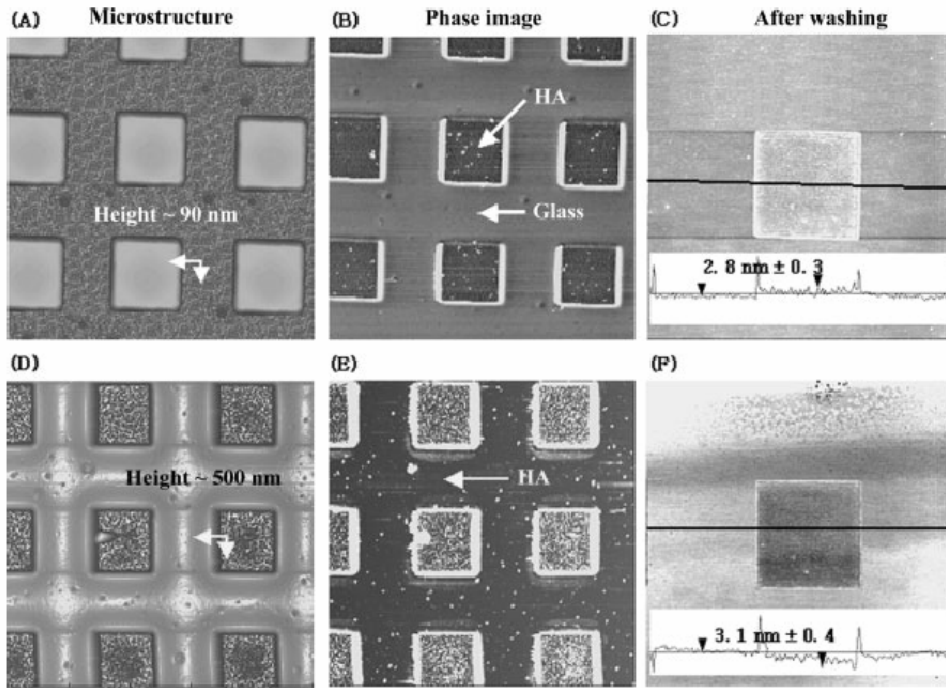


그림 3. 미세접촉 프린팅 및 모세관 리소그래피를 이용한 HA 패턴의 AFM 사진

그림 4 에서는 HA 를 접착방지막으로 하여 형성된 여러 단백질의 어레이를 보여준다. 크게 BSA, IgG, FN 세가지 단백질이 사용되었으며 여러 기관에 대해 테스트 하였다. 그림에서 알 수 있듯이 유리나 산화 실리콘, poly(HEMA) 등은 표면이 친수성이기 때문에 추가적인 표면처리가 필요하지 않으나 PS dish 의 경우는 산소 플라즈마 처리를 하였을 때 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 또한 PLGA 의 경우 NaOH 에 담가서 표면을 -OH 로 바꾸었으나 스웰링이 너무 심하여 만족스러운 결과는 얻을 수 없었다. 또한 그림 5 에는 FN 을 처리한 표면에 Fibroblast 세포를 접착시킨 어레이 결과를 보여준다. 예상했듯이 기관이 노출된 표면에 선택적으로 세포가 붙는 것을 확인할 수 있었으며 특히 패턴의 크기에 따라 세포들이 엉킨 aggregate 뿐만 아니라 단일 세포 어레이도 얻을 수 있었다. 이러한 결과를 통해 HA 가 표면에 고착되어 패턴을 형성하면 여러 가지 단백질 및 세포에 대한 접착 방지막 및 선택적인 접착을 유도하는 데 훌륭하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

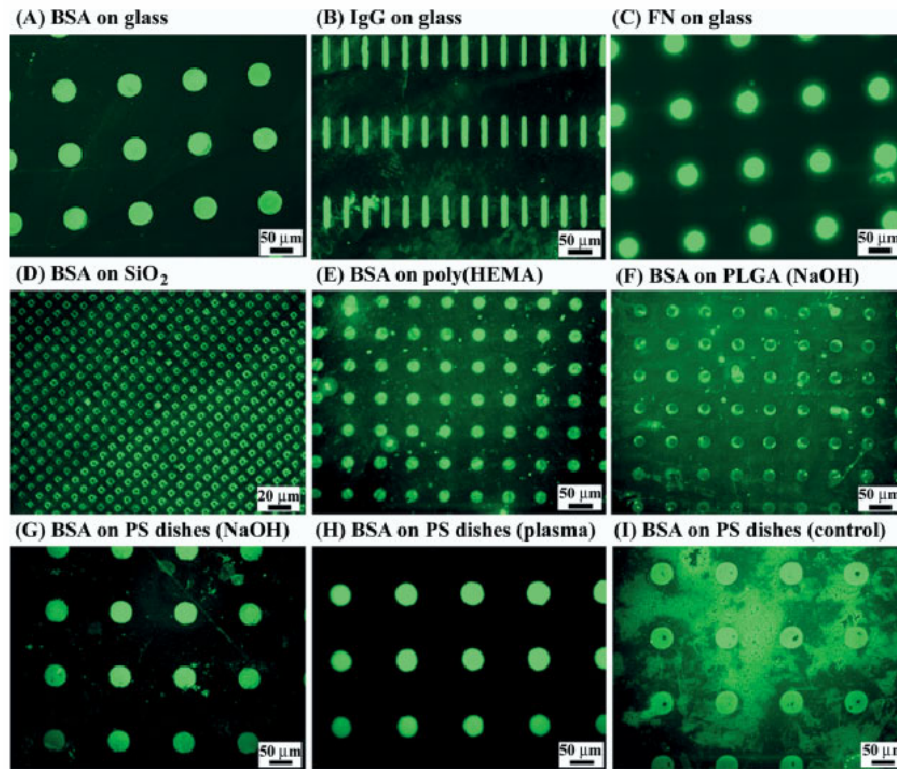


그림 4. 여러 종류의 단백질의 어레이를 보여주는 형광 이미지 사진

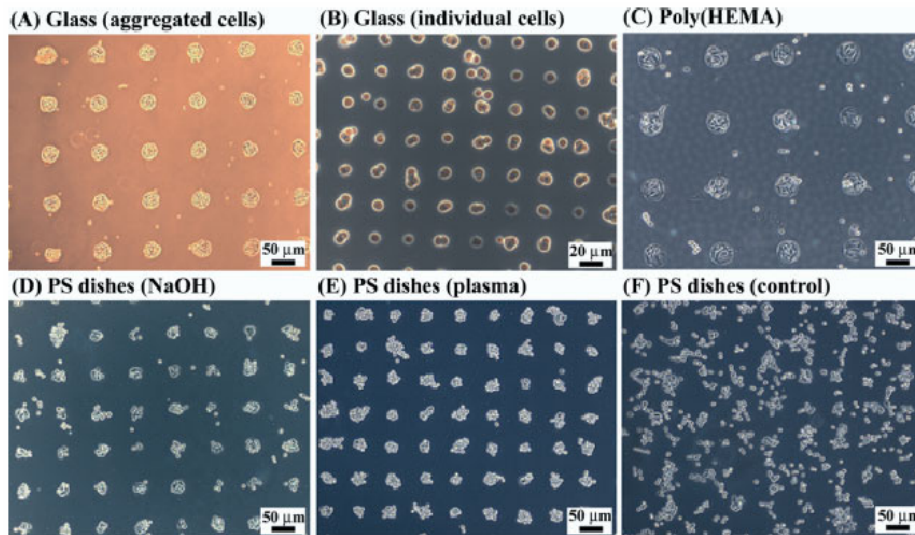


그림 5. Fibroblast 세포의 어레이를 보여주는 현미경 사진

### 3. 결론

간편한 소프트 리소그래피 방법을 이용하여 HA 고분자의 패터닝 방법을 살펴보았다. 두 가지 소프트 리소그래피 방법 모두 넓은 면적에 재현성 있는

공정으로 사용될 수 있음을 알았고 모두 기관이 쉽게 노출되어 이후 공정에서 단백질 및 세포의 접착 방지막 역할을 할 수 있었다. HA의 친수성으로 인해 사용되는 기관은 친수성 또는 친수성 처리를 해 주어야 하며 세척 후 HA의 얇은 층이 남는 것은 확실하지는 않으나 HA가 가지고 있는 수소결합에 기인함을 추측할 수 있다 [4]. 여기서 소개된 간단한 방법으로 HA를 패터닝할 경우 앞으로 다양한 분야에서 적용될 수 있으리라 전망한다.

#### 4. 참고문헌

- [1] G. Abantangelo, P. Weigel, *New Frontiers in Medical Science: Redefining Hyaluronan*, Elsevier, Amsterdam 2000.
- [2] E. A. Balazs, J. L. Denlinger, in *Clinical Uses of Hyaluronan: the Biology of Hyaluronan* (Eds: D. Evered, J. Welan), Wiley, New York 1989, p. 265.
- [3] K. Y. Suh, A. Khademhosseini, J. M. Yang, G. Eng, and R. Langer, "Soft lithographic patterning of hyaluronic acid on hydrophilic substrates using molding and printing," *Advanced Materials*, 16, 584 (2004).
- [4] K. Y. Suh, J. M. Yang, A. Khademhosseini, D. Berry, T. T. Tran, H. Park, and R. Langer, "Characterization of chemisorbed hyaluronic acid directly immobilized on solid substrates," *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 72B, 292 (2005).