

## 광반응성 poly(acrylic acid)를 이용한 Lumbrokinase의 polyurethane표면 고정화 방법에 관한 연구

김현정<sup>1,2</sup> · 류은숙<sup>1,2</sup> · 김종원<sup>1</sup> · 민병구<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(주) 바이오메드랩 연구소, <sup>2</sup>서울대학교 의학연구원 의용생체공학연구소  
(1999년 8월 16일 접수, 1999년 11월 19일 채택)

## Immobilization of Lumbrokinase on the Surface of Polyurethane by using the Photoreactive Poly(acrylic acid)

H.J. Kim<sup>1,2</sup>, E.S. Ryu<sup>1,2</sup>, J.W. Kim<sup>1</sup>, B.G. Min<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biomedlab Institute, Biomedlab Co.,

<sup>2</sup>Institute of Medical and Biological Engineering, Medical Research Center, Seoul National University

(Received August 16, 1999. Accepted November 19, 1999)

**요약:** 생체재료로 사용되는 polyurethane(PU)표면에 항혈전성 lumbrokinase(LK)를 고정함으로써 생체적합성을 향상시키고자 하였다. 먼저 LK를 PU 표면에 고정하기 위한 가교제로서 4-azidoaniline hydrochloride와 poly(acrylic acid)를 이용하여 4-azidophenyl 작용기가 amido 결합으로 치환된 수용성, 광반응성 poly(acrylic acid)(PPA-II)를 합성하였다. <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectrum(500MHz <sup>1</sup>H-NMR)의 6.7 peak와 infrared spectrum(FT-IR)의 2125.48 cm<sup>-1</sup> peak으로부터 PPA-II의 합성을 확인하였다. 또한 4-azidophenyl 작용기가 poly(acrylic acid) 잔기에 치환된 정도는 UV/VIS spectrophotometric spectrum을 확인한 결과 11~14%임을 알 수 있었다. 0.5, 1 및 5% PPA-II를 각각 광반응하여 얻은 PU는 39.5, 161.8 및 181.5 nmole/cm<sup>2</sup>의 농도로 표면에 carboxyl 작용기가 유도되었음을 알 수 있었다. 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5) 용액에서 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide(EDC)를 촉매로 사용하여 LK를 PU표면에 amido 공유결합으로 고정하였으며 이것은 지속적인 fibrinolytic 활성도를 보였다. PPA-II를 이용한 표면 개질 방법은 수용성 반응조건에서 이루어진다는 점과 광반응을 이용함으로써 특정 부위에서의 표면 개질이 가능하다는 점에서 그 응용 가치가 크며 아울러 PU의 생체적합성을 향상시킬 수 있는 방법으로서 판단된다.

**Abstract:** To improve the biocompatibility of polyurethane(PU), we have developed the method for immobilization of lumbrokinase(LK), which is an antithrombogenic enzyme purified from *Lumbricus rubellus*, on PU surface using the photochemical reaction. As a cross-linker for LK, we synthesized the photoreactive poly(acrylic acid) (PPA-II). PPA-II has the 4-azidophenyl group for photochemical reaction and carboxyl group for amide bond formation. The degree of substitution of 4-azidophenyl group in PPA-II was 11-14%. We could know that the carboxyl group was induced to 39.5, 161.8 and 181.5 nmol/cm<sup>2</sup>, respectively, when 0.5, 1 and 5% PPA-II was treated on the PU surface by air-spray method and photoreacted at 254 nm UV light (3.2 mW/cm<sup>2</sup>) for 5 min. To immobilize LK covalently on the surface of PU treated with PPA-II, we used 0.03 M of 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide(EDC) as a catalyst in 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5). The LK immobilized on PU surface has shown the fibrinolytic activity for a few days. This method suggested that the immobilization of LK using the photochemical reaction with PPA-II was able to modify the surface of PU selectively and improve its biocompatibility.

**Key words:** Polyurethane, Lumbrokinase, Photoreactive poly(acrylic acid), Photochemical reaction

## 서론

용과 관련된 연구중에는 photoreactive poly(ethylene glycol)을 합성 처리하여 polymer표면에 유도되는 platelet activation을 방지하거나[1], poly(m-azidostyrene)과 cinnamate moiety를 갖는 N,N-dimethylacrylamide를 합성 처리하여 heparin이 고정된 hydrogel로써 항혈전성을 증가시키거나[2] polymer표면에 다양한 phenylazido-derivatized compound를 처리하여 궁극적으로는 원하는 작용기를 유도하고자 한 연구도 보고되었다[3]. 최근에는 blood platelet의 activation이나 aggregation을 막는 nontoxic drug을 photoreactive derivative로 만들어 그것을 PU 표면에 처리함으로써 low thrombogenicity를 유도한 연구가 보고되었다[4]. 그 외에도 sulfated hyaluronic acid를 광반응으로 poly(ethylene terephthalate) film에 고정함으로써 항혈전성을 향상시키고자 한 연구가 보고되었다[5]. 이러한 광반응을 이용한 polymer표면 개질은 기존의 다른 표면 개질 방법과 달리 폴리머의 불성을 변화시키지 않으며 또한 특정 부위만을 개질할 수 있다는 점에서 응용가치가 다른 방법에 비하여 크다고 평가되었다. Photoreactive polymer의 azido group은 광반응에 의해 nitrogen을 잃고 uncharged monovalent nitrogen intermediate (nitrene)를 생성한다. 이러한 nitrene은 상온이나 고온에서 반응조건에 따라 diradicals(triplet) 또는 electrophilic(singlet)으로 작용한다. 또한 이러한 nitrene은 short lifetime을 갖고 있기 때문에 다음과 같은 반응을 함으로써 안정된다고 보고되었다. 즉, imine으로 isomerization, azo compound로 dimerization, hydrogen abstraction에 의한 heterocyclic compound형성, second arylamine CH 결합에 bimolecular insertion 등, 수 많은 반응에 의해 nitrene은 안정화된다고 보고되었다[6]. 이러한 반응에 대한 nitrene의 상대적 반응도는 phenylnitrene>carboethoxynitrene>sulfonylnitrene>carbene으로 보고되었다[6]. Azido 작용기를 nitrene으로 만들기 위하여 사용되는 방법은 고온 반응을 하거나 일정 파장의 UV light를 일정 intensity로 조사하는 것이다. 본 연구에서는 광반응으로써 azidophenyl 작용기를 갖는 photoreactive poly(acrylic acid)를 사용하여 PU 표면을 개질하고자 하였다. Azidophenyl 작용기를 갖는 poly(acrylic acid)를 합성하고 이것을 적정 광반응 조건하에서 PU 표면에 고정된 후 항혈전성 LK를 최종적으로 고정하고자 하였다. 본 연구에 앞서 연구된 azidophenyl작용기를 갖는 poly(allylamine)은 platelet activation반응을 유도할 가능성으로 인하여 항혈전성 교체로서의 사용에 적합하지 않음이 판단되었다. 그러므로 항혈전성 LK를 azidophenyl 작용기가 유도된 poly(allylamine)이 아닌, poly(acrylic acid)로써 PU 표면에 고정한다면 생체적합성 측면에서 향상된 효과를 기대할 수 있다고 생각된다. 이 방법은 1983년 Mihara[7]에 의해 earthworm, *Lumbricus rubellus*, 에서 분리된 강력한 fibrinolytic enzyme인 LK를 PU 표면에 물성 변화 없이 특정 부위에만 수용액상에서 고정할 수 가장 효율적인 방법으로 판단된다.

## 실험재료 및 방법

### 실험 재료

Poly(acrylic acid) ( $M_n \sim 450,000$  g/mole)와 4-azidoaniline hydrochloride(97%)는 Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다. 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide(EDC)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 투석막(mol. wt., cut off 12,000 g/mole)은 Wako Chemicals(Osaka, Japan)에서 구입하였다. Lumbricinase(LK)는 Y. Park[8]의 방법으로 분리 사용하였다. 그 외 모든 시약은 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

### 광반응성을 갖는 수용성 poly(acrylic acid) (PPA-II)합성

PPA-II는 수용성 poly(acrylic acid)와 4-azidoaniline hydrochloride를 사용하여 합성하였다. EDC는 두 반응물으로부터 amido 공유결합을 형성하는 촉매로서 사용하였다. Poly(acrylic acid) 0.5 g이 녹아있는 50 ml의 0.1 M acetic acid 용액 (pH 4.5)에 0.5 g의 EDC를 첨가하였다. 반응은 0°C에서 30분간 교반 상태에서 실시하였다. 30분 동안 반응한 후 이 용액을 0.05 M 4-azidoaniline hydrochloride의 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.2) 30 ml 용액에 첨가하였다. 반응은 25°C에서 16시간동안 지속하였다. 1 ml의 1 N HCl을 반응 용액에 첨가함으로써 반응을 중단한 후 투석막 (mol. wt., cut off 12,000 g/mole)을 이용하여 72 시간동안 투석하였다. PPA II는 최종적으로 동결건조를 함으로써 얻을 수 있었다.

### FT-IR을 이용한 합성된 PPA-II의 구조 분석

합성된 PPA II는 FT-IR을 이용하여 amido 공유결합으로 결합된 4-azidophenyl 작용기의 존재 여부를 확인 하였다. FT-IR spectrometer(FTS-60BIO-RAD, CA, USA)를 사용하였으며 KBr plate로써 IR spectrum을 얻을 수 있었다.

### $^1\text{H-NMR}$ (500MHz)을 이용한 합성된 PPA-II의 구조 분석

합성된 PPA II는  $^1\text{H-NMR}$ (500MHz)을 이용하여 4-azidophenyl 작용기에 존재하는 hydrogen과 alkyl chain에 존재하는 hydrogen을 확인하였다. PPA II를 녹이는데 쓰인 solvent는  $\text{D}_2\text{O}$ 를 사용하였다.

### PPA-II의 4-azidophenyl 작용기의 치환도

Poly(acrylic acid)내에 4-azidophenyl의 치환도를 알기 위하여, UV/VIS spectrophotometer (UV/VIS spectrophotometer-1601; Shimadzu, Japan)를 이용하여 최대흡광 파장에서 측정된 흡광도와 4-azidoaniline hydrochloride의 molecular absorption coefficient( $\epsilon = 15801 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{max}}$  262.5nm)를 이용하여 그 치환도를 계산하였다.

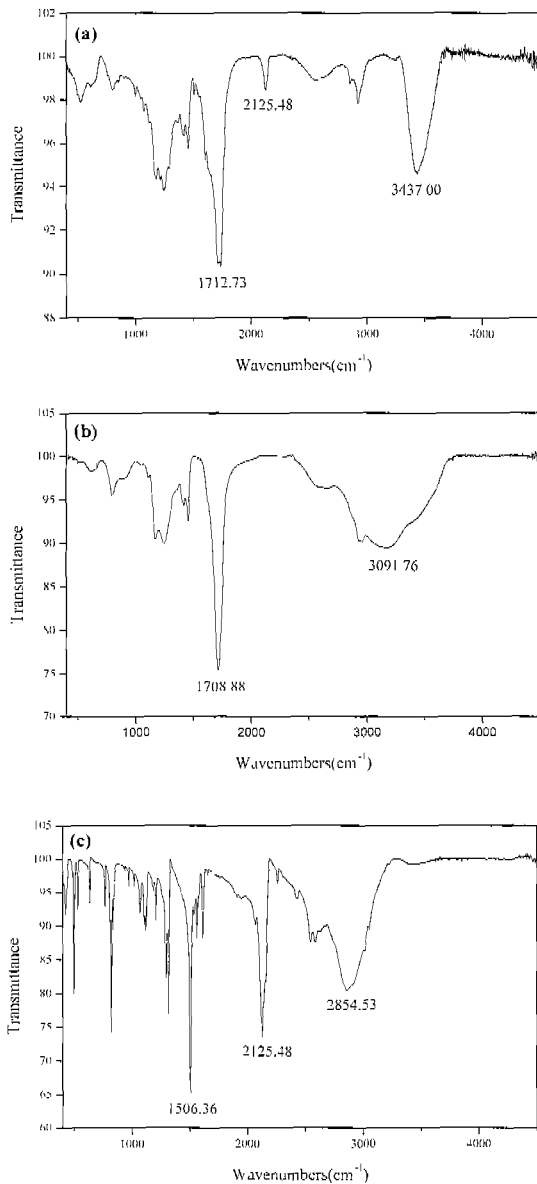


그림 1. PPA-II, poly(acrylic acid), 4-azidoaniline hydrochloride의 FT-IR spectra. (a) PPA-II, (b) poly(acrylic acid), (c) 4-azidoaniline hydrochloride

Fig. 1. FT-IR Spectra of PPA-II, poly(acrylic acid), and 4-azidoaniline hydrochloride. (a) PPA-II, (b) poly(acrylic acid), (c) 4- azidoaniline hydrochloride

PPA-II의 광반응성

PPA II의 광반응성을 조사하기 위하여 0.004%의 PPA-II 용액은 0.5 ml 취하여 1 cm cell (Quartz; Sigma, USA)에 취하여 일정 시간 간격으로 254 nm(3.2 mW/cm<sup>2</sup>) 자외선을 조사하였다. 각각의 시간별로 얻은 PPA II를 각 피장에 따라(200-500 nm) 흡광도를 측정하였다.

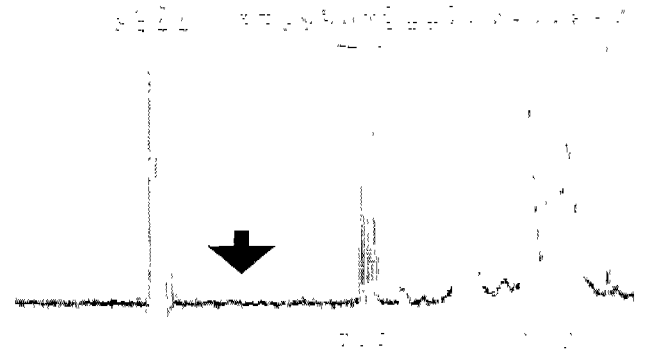


그림 2. PPA-II의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum  
Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PPA-II

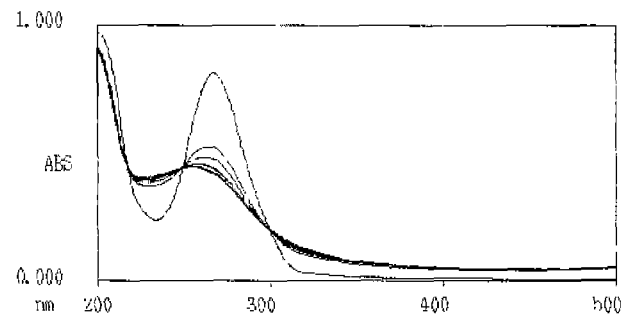


그림 3. PPA-II의 UV/VIS spectrophotometric spectra  
Fig. 3. UV/VIS spectrophotometric spectra of PPA-II

PU 표면에 PPA-II 고정화

PU 표면에 PPA-II를 고정하기 위하여 광반응을 이용하였다. 먼저, PPA-II를 PU 표면에 도포하기 위하여 0.5, 1 및 5% 농도의 PPA-II용액을 준비하였다. 각각의 용액을 분사방법으로 30μl/cm<sup>2</sup>의 표면농도로 PU 표면에 도포하였다. 완전히 건조하기 위하여 vacuum하에서 12시간 건조하였다. 광반응은 254 nm (3.2 mW/cm<sup>2</sup>) 자외선을 5 분 동안 조사하였다. 반응되지 않은 PPA-II를 제거하기 위하여 증류수로 48시간 동안 세척하였다.

PU 표면에 고정된 PPA-II의 carboxyl 작용기의 농도

PPA-II를 고정함으로써 PU 표면에 유도된 carboxyl 작용기의 농도를 측정하기 위하여 toluidine blue dye를 사용하였다. 5 × 10<sup>-4</sup> M toluidine blue 용액은 10<sup>-1</sup> M NaOH 용액 (pH 10.0)을 이용하여 만들었으며 이 용액을 3 ml 취하여 여기에 PPA-II를 고정된 PU sheet (1 cm diameter) 1조각을 넣어 25°C에서 3시간 동안 반응한 후 10<sup>-4</sup> M NaOH 용액 (pH 10.0)을 이용하여 반응되지 않은 toluidine blue dye를 제거하였다. 50% (v/v) acetic acid용액 3 ml를 취하여 PPA-II를 처리한 PU 표

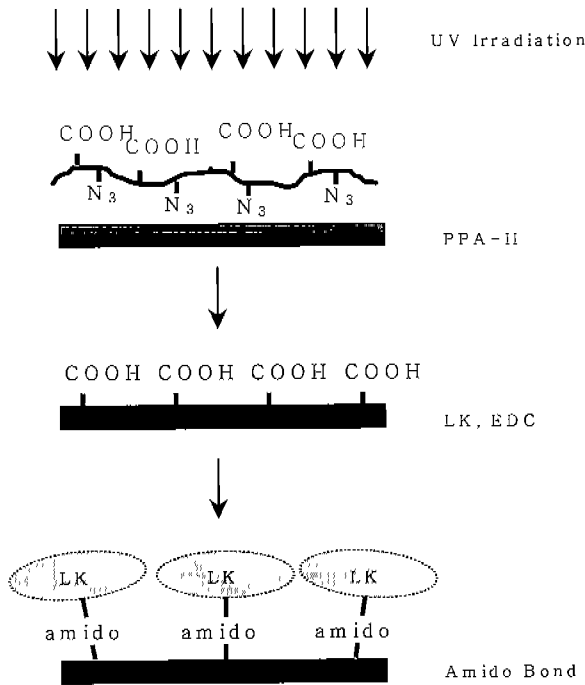


그림 4. polyurethane 표면에 PPA-II와 LK를 연속적으로 고정하기 위한 전체 반응모식도  
 Fig. 4. Reaction scheme for the immobilization of PPA-II and LK on the polyurethane surface

면에 결합되어 있는 toluidine blue dye를 용해시켜 631 nm에서 흡광도를 측정하였다. Toluidine blue의 molecular absorption coefficient ( $\epsilon$ )는  $39576.7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  631nm)이다.

**PPA-II가 고정된 PU 표면에 LK 고정화**

LK를 고정하기 위한 polymer로서 0.5, 1 및 5% PPA II를 각각 광반응으로 고정된 PU를 사용하였다. 먼저 PPA-II가 고정된 PU sheet를 1 cm의 disk로 만든 후 증류수에서 24시간 저리한 후, 100  $\mu\text{g}$ 의 LK가 들어있는 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  용액 (pH 4.40)에서 0.03 M의 EDC로 반응하였다. 반응조건은 25°C에서 16시간 동안 반응하였다. 반응되지 않은 LK를 제거하기 위하여 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  용액 (pH 4.40)과 phosphate buffer saline(PBS) (pH 7.4)으로 연속하여 세척하였다. 최종적으로 salt를 제거하기 위하여 증류수로 세척하였다.

**PPA-II를 이용하여 PU 표면에 고정된 LK의 fibrinolytic 활성도**

0.05 M NaCl을 포함하고 있는 0.2 M Borate buffer에 fibrinogen을 0.8% 되도록 첨가한 후 37°C에서 30 분 동안 처리하였다. 이 용액을 여과한 후 10 ml를 petri-dish에 취하여 5U thrombin을 첨가한 후 상온에서 2시간 이상 굳혀 사용하였다.

**E. O. 가스 소독 후 고정된 LK의 fibrinolytic 활성도**

PPA-II를 이용하여 LK를 고정된 PU를 E. O. gas로 소독한

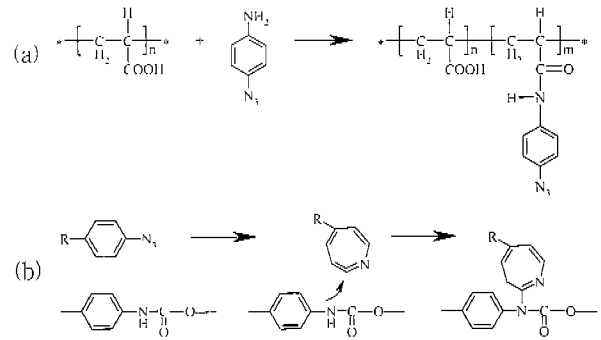


그림 5. PPA-II 화학구조(a)와 UV light 조사시 polyurethane과 반응하는 mechanism 가상도(b)  
 Fig. 5. Scheme of the synthesis of PPA-II(a) and tentative mechanism for the covalent photoreaction of PPA-II to the polyurethane surface(b)

후 fibrinolytic 활성도를 조사하였다. 소독으로 인한 LK의 fibrinolytic 활성도 감소가 있는지 알아보기 위하여 fibrin plate를 이용하여 clear zone의 유무를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**광반응성을 갖는 수용성 poly(acrylic acid) (PPA-II)합성**

Poly(acrylic acid)와 4-azidoaniline hydrochloride를 사용하여 광반응성 poly(acrylic acid)를 합성하였다. 사용된 촉매는 EDC로서 두 반응물질을 amido 공유결합 하였다. EDC를 이용한 반응에는 proton과 해리된 carboxyl 작용기가 필요하기 때문에 0.1 M acetic acid (pH 4.5)를 본 반응에서는 반응용매로 사용하였다[9]. EDC가 carboxyl 작용기와 만드는 중간체는 pH 3.5~4.5 사이에서 가장 빠르게 만들어지며 특히 cyclizable carboxyl 작용기를 갖는 poly(acrylic acid)를 사용하였으므로 EDC의 농도를 carboxyl 작용기 농도의 1/2이 되도록 첨가하였다 [9]. 또한 EDC와 carboxyl 작용기 사이에 만들어진 중간체는 pH 3.5~7에서 안정하므로[9] 반응 pH를 연속적으로 이 범위 안에서 지속시킬 수 있는 0.1 M acetic acid를 사용하였다. Amido 결합은 one step 반응보다는 two-step반응에서 그 수율이 높기 때문에 0°C에서 30분간 반응한 후에 4-azidoaniline hydrochloride를 첨가하여 24°C에서 16시간 동안 반응하였다. 4-azidophenyl 작용기의 269 nm에서의 molecular absorption coefficient가 4-azidoaniline hydrochloride의 molecular absorption coefficient( $\epsilon = 15801 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{max}}$  262.5 nm)와 같다고 가정했을 때[10] PPA II는 11~14%의 4-azidophenyl 작용기가 치환되어 있음을 알 수 있었다.

**합성된 PPA-II의 구조분석과 광화학적 성질 분석**

합성된 PPA II는 FT-IR과  $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz)를 통하여 구조분석을 하였다. 그림 1은 PPA-II의 FT-IR spectrum이며

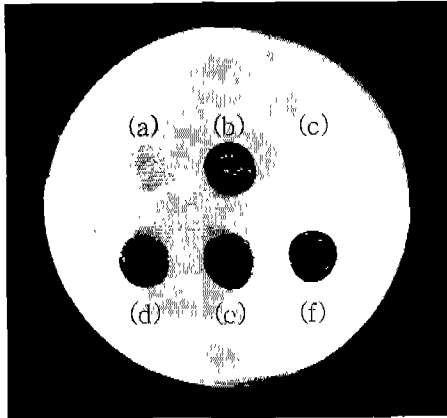


그림 6. PPA-II로 처리된 polyurethane의 fibrinolytic 활성도를 알아보기 위한 fibrin plate test  
 Fig. 6. Fibrin plate test of polyurethane treated with PPA-II and LK to measure its fibrinolytic activity

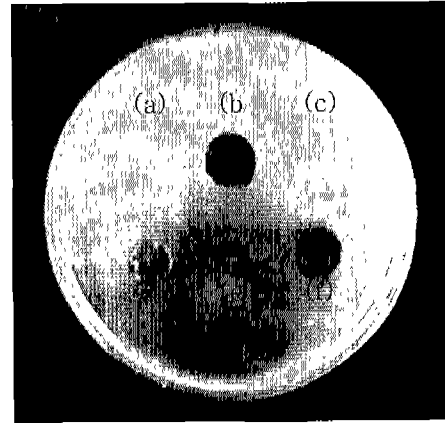


그림 8. E. O. gas로 소독한 후 PPA-II로 처리된 polyurethane의 fibrinolytic 활성도를 알아보기 위한 fibrin plate test  
 Fig. 8. Fibrin plate test of polyurethane treated with PPA-II and LK after sterilization

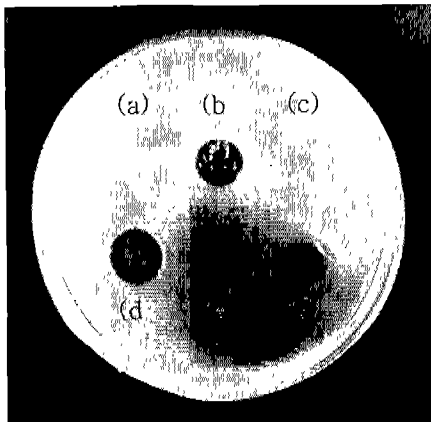


그림 7. Fibrin plate test 한 polyurethane sheet를 다시 PBS(pH 7.4)에서 16시간 세척 후 실시한 fibrin plate test  
 Fig. 7. Fibrin plate test of polyurethane treated with PPA-II and LK after washing it in PBS(pH 7.4) for 16hrs

반응물질과 생성물질의 spectrum을 비교 분석하였다. (a)는 PPA-II의 spectrum로서 2125.48  $\text{cm}^{-1}$ 에서 보이는 peak은 PPA-II에 치환된 4 azidophenyl 작용기로 인한 것임을 알 수 있었다. 또한 1712.73과 3437.00  $\text{cm}^{-1}$ 에서 보이는 peak으로부터 4 azidophenyl 작용기가 poly(acrylic acid)에 amido bond로 결합된 것을 알 수 있었다. 그림 2와 같은  $^1\text{H}$  NMR spectrum의  $\delta 6\sim 7$  (4H) peak은 4-azidophenyl 작용기에 존재하는 proton으로부터 생긴 signal임을 알 수 있었고 또한  $\delta 4.8$ 에서 관찰되는 peak은 HDO로 인한 proton signal임을 알 수 있었다.  $\delta 6\sim 7$ 에서 보이는 benzene ring의 proton signal이 매우 약하기 때문에 증폭시켜야만 확인할 수 있었다[1]. 합성된 PPA II의 분광학적 성질을 알아보기 위하여 0.004%의 PPA-II를 1 cm cell에 넣어 254 nm UV light ( $3.2 \text{ mW/cm}^2$ )로 각각 일정한 시간동안 조사하여 그 wavelength scan spectrum을 얻었다. 그 결과 그림 3과 같이 60 초 동안 UV light 조사시, 269.5 nm에서의 PPA II 최

대흡광도가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 PPA-II의 4-azidophenyl 작용기가 UV light에 의해 nitrene으로 decomposition되었기 때문이다[6]. 아울러 조사시간이 길어짐에 따라 PPA-II의 최대 흡광파장이 269.5에서 246.5 nm로 blue shift되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 shift는 amido 결합형성으로 인한 azidophenyl 작용기의 electron delocalization때문으로 판단된다[5].

#### PU 표면에 PPA-II고정화와 LK 고정화

PU 표면에 PPA-II를 고정하기 위한 전체 반응 모식도는 그림 4와 같다. PPA-II는 0.5, 1 및 5%의 농도로 PU 표면에 도포하였으며 이것을 완전히 건조한 후 254 nm UV light ( $3.2 \text{ mW/cm}^2$ )로 5분 동안 광반응 하였다. 반응이 되지 않은 PPA-II는 증류수 세척으로 제거하였다. PPA II와 PU와의 반응 가상도는 그림 5와 같다. 예측되는 반응 mechanism은 phenylazide가 UV light에 의하여 singlet phenylnitrene으로 되고 이것은 연속하여 cyclic heterocumulone이 된 후 이것은 안정된 isomer를 형성하기 위하여 nucleophile과 반응을 한다는 것이다. PU인 경우 PU backbone에 존재하는 nitrogen과 반응하여 PU 표면에 고정된다는 이론이 가능하다[11]. 그러나 5% 정도의 고농도로 PU 표면에 도포된 PPA-II는 UV light 조사시 intra reaction을 하여 PU 표면에 gelation을 형성하였을 가능성도 배제할 수 없다. Gelation은 PU에 graft반응이 계속 일어나 gelation이 되는 경우와 graft반응과는 관계없이 PPA-II가 homopolymerization되는 경우인데 그림 5와 같은 mechanism에서는 graft보다는 homopolymerization이 일어날 가능성이 많다고 판단된다. 여러 농도의 PPA-II로 표면제실된 PU는 toluidine blue를 사용하여 표면에 유도된 carboxyl 작용기의 농도를 측정하였다[9]. 0.5, 1 및 5% 각각 39.6, 161.8 및 181.5  $\text{nmol/cm}^2$ 의 carboxyl작용기의 농도를 측정할 수 있었다. 1%와 5%에서 측정된 carboxyl 작용기의 농도 차이가 상대적으로 작

은 것은 PU 표면에 고농도로 도포된 PPA-II로 인한 광반응시 생성된 gelation때문으로 생각된다. Gelation 된 PPA-II는 세척시 제거될 가능성이 있으며 이는 최종적으로 PU 표면의 carboxyl 작용기의 농도감소를 가져올 수 있다. 또한 일정 면적에 PPA-II를 처리하는 것이므로 carboxyl 작용기가 유도될 수 있는 한계 농도가 존재할 가능성도 있다. 이러한 가능성으로 인해 1% 이상의 PPA-II를 사용하여 polyurethane 표면에 carboxyl 작용기를 유도하는 것이 LK의 fibrinolytic activity를 최대로 할 수 있을 것으로 판단된다. PPA-II가 고정된 PU 표면에 최종적으로 LK를 EDC반응으로 고정하였다. 반응용액의 pH를 4.5로 맞추기 위하여 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하였으며 반응 시간도 16시간으로 하였다.

### PU 표면에 PPA-II를 통하여 고정된 LK의 fibrinolytic 활성도

고정된 LK의 fibrinolytic 활성도를 알아보기 위하여 fibrin plate를 이용하였다. LK는 fibrin을 직접 digestion하는 것으로 보고되어 있다[12]. 이러한 LK의 성질로 인해 LK는 생체재료의 항혈전성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대되고 있으며 이러한 LK를 생체재료로 사용되는 PU 표면에 고정하는 것은 의미가 크다고 할 수 있다. 고정된 LK는 fibrin plate test를 통해 그 활성도를 *in vitro* 상태에서 확인 가능하다. 그러므로 0.5, 1 및 5% PPA-II로 처리된 PU를 1 cm 직경의 circle sheet로 만들어 PPA-II의 농도에 따른 활성도 정도를 조사하였다. LK를 고정하기 위한 반응조건은 1000 $\mu\text{l}$ 의 0.05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 4.5)용액에서 0.03 M의 EDC, 100 $\mu\text{g}$  LK를 첨가하여 반응하였다. 그림 6의 (a), (b), (c)는 PPA-II를 처리하지 않은 control polyurethane sheet로서 (a)는 LK를 첨가하지 않은 것, (b)는 LK, EDC 모두 처리한 것, (c)는 EDC를 처리하지 않은 control 실험군이다. 또한 (d), (e), (f)는 각각 0.5, 1, 5 %의 PPA-II를 처리한 polyurethane sheet에 LK, EDC 모두 동일조건으로 처리한 실험군이다. 그림 6에서 볼 수 있듯이 고정된 PPA-II 농도에 따른 LK의 활성도 변화에는 차이가 없었다. 그러나 (b)와 같이 LK가 공유 결합되지 않고 단순히 흡착된 정도라도 그 활성도는 (d), (c) 및 (f)의 경우와 유사하게 관찰되었다. 그러므로 fibrin plate test를 한 PU sheet를 다시 PBS로 16시간 세척한 후 다시 fibrin plate test를 실시하였다. 그 결과 그림 7 (d), (e) 및 (f)에서 볼 수 있듯이 PPA-II를 통하여 고정된 LK는 활성도가 여전히 남아 있는 반면 (b)의 단순 흡착된 LK는 활성도가 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 공유결합으로 고정된 LK는 지속적인 fibrinolytic 활성도를 보이는 것을 뜻한다. LK가 공유결합된 PU가 생체재료로서 사용 가능하리던 소독시 LK의 활성도 감소가 없어야 한다. 그러나 E. O. gas 소독시 LK활성도는 약 30% 감소하는 것으로 보고되었다[13]. 그러므로 PPA-II를 통한 LK가 공유결합된 PU를 E. O. gas로 소독한 후 fibrinolytic 활성도를 조사하였다. 그림 8에서 볼 수 있듯이 LK의 활성도는 감소하였다. 그러나 (f)의 5% PPA-II로 고정된 LK는 상대적으로 활성도가 감소되는 경

도가 약하였고 이는 5% PPA-II를 통한 PU 표면에 LK를 고정한다면 이는 항혈전성 생체재료로 개발 가능하다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

## 결론

본 연구에서는 생체재료로 사용되는 PU 표면에 LK를 고정하기 위한 가교제로서 광반응성 poly(acrylic acid)를 합성하였다. 합성된 광반응성 poly(acrylic acid)는 4-azidophenyl 작용기가 잔기에 11-14% 치환된 물질로서 PU 표면에 도포한 후, 254 nm UV light(3.2 mW/cm<sup>2</sup>)를 5분 동안 조사시, 표면에 carboxyl 작용기를 최대 181.5 nmol/cm<sup>2</sup> 까지 유도할 수 있었다. 이러한 반응을 통하여 유도된 carboxyl 작용기를 이용하여, LK를 PU표면에 공유결합할 수 있었다. 공유결합으로 고정된 LK는 단순 결합된 LK보다 fibrinolytic 활성도가 지속적으로 관찰되었다. 이러한 방법은 LK를 폴리우레탄의 특정 부위에 원하는 농도로 고정할 수 있음을 시사한다. 아울러 모든 반응이 수용액 상에서 이루어지므로 유기용매에 의해 변형이 일어나는 3차원 PU 모형물에 적용이 가능하다고 판단된다.

본 연구는 교육부 1996년도 학술연구조성비(유전공학연구) (96 019-F0065)에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 참고 문헌

1. Y.C.Tseng and K.Park, "Synthesis of photoreactive poly ethylene glycol and its application to the prevention of surface-induced platelet activation", J. Biomed. Mater. Res., Vol.26, pp. 373-391, 1992
2. Y.Nakayama and T.Matsuda, "Novel surface fixation technology of hydrogel based on photochemical method: Heparin-immobilized hydrogelated surface", J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem., Vol. 31, pp. 977-982, 1993
3. T.Sugawara and T.Matsuda, "Synthesis of phenylazido-derivatized substances and photochemical surface modification to immobilize functional groups", J. Biomed. Mater. Res., Vol.32, pp. 157-164, 1996
4. Y.B.J.Aldenhoff, A.P.Pijpers and L.H.Koole, "Synthesis of a new photoreactive derivative of dipyridamole and its use in the manufacture of artificial surfaces with low thrombogenicity", Bioconjugate Chem., Vol.8, pp. 296-303, 1997
5. G.Chen, Y.Ito, Y.Imanishi, A.Magnani, S.Lamponi, and R.Barbucci, "Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithrombogenicity", Bioconjugate Chem., Vol.8, pp. 730-734, 1997
6. G.L'abbe, "Decomposition and addition reaction of organic azide", Chem. Rev., Vol.69, pp. 345-363, 1969
7. M.Mihara, H.Sumi, K.Akazawa, T.Yoneda and H.Mizu-

- moto, "A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*", Japan. J. of Physiol., Vol.41, pp. 461-472, 1983
8. Y.Park, J.Kim, B.Min, J.Sco, and J.Jeong, "Rapid purification and biochemical characteristics of lumbrokinase III from earthworm for use as a fibrinolytic agent", Biotechnology Letters, Vol.20, No.2, pp. 169-172, 1998
9. N.Nakajima, and Y.Ikeda, "Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media", Bioconjugate Chem., Vol.6, No.1, pp. 123-130, 1995
10. Y.Ito, S.Kondo, G.Chen, and Y.Imanishi, "Patterned artificial juxtacrine stimulation of cell by covalently immobilized insulin", FEBS Letters, Vol.403, pp. 159-162, 1997
11. Y.B.J.Aldenhoff and L.H.Koole, "Studies on a new strategy for surface modification of polymeric biomaterials", J. Biomed. Mater. Res., Vol. 29, pp. 917-928, 1995
12. G.H.Ryu, D.K.Han, S.Park, M.Kim, Y.I.Kim, and B.Min, "Surface characteristics and properties of lumbrokinase-immobilized polyurethane", J. Biomed. Mater. Res., Vol.29, pp. 403-409, 1995
13. Y.Park, E.Ryu, H.Kim, J.Jeong, J.Kim, S.Jeon, Y.Jo, W.Kim, and B.Min, "Characterization of antithrombotic activity of lumbrokinase immobilized polyurethane valves in total artificial heart.", Artificial Organ., in press. 1999