

헤파린화 혈액 적합성 고분자 재료

한 동 근 · 김 영 하

1. 머리말

의료용 재료는 생체조직 또는 혈액과 접촉할 때 원칙적으로 발생하는 생체의 거부현상을 억제하는 성질인 생체적합성(biocompatibility)이 요구된다. 즉 생체조직은 이물질에 의하여 염증을 일으키거나 대식세포 및 섬유소의 이상발달등을 일으키며, 이를 억제하는 조직용화성(tissue compatibility)이 필요하다. 또한 혈관의 손상시나 혈액이 이물질과 접촉시에는 혈액중의 혈소판(platelet) 및 여러 응고인자들에 의하여 복잡한 경로를 통하여 응혈(혈전, thrombus)이 발생되며, 이러한 응혈을 억제하는 혈액적합성(blood compatibility) 혹은 항응혈성(antithrombogenicity) 재료가 이상적이다. 따라서 혈액과 직접 접촉하는 인공심장, 인공심폐기, 인공신장, 인공혈관 및 카테타(catheter)용으로서 혈액 자체의 지혈 기능에는 아무런 변화를 주지않으면서도 응혈이 생기지 않는 인공재료의 개발이 요망되고 있다.

혈액의 응고현상(clotting)은 여러 독립공정이 복합적으로 일어나는 매우 복잡한 현상으로서 많은 연구노력에도 불구하고 아직 완전히 규명되지 못하고 있다. 혈액응고현상에 관한 자세한 것은 문헌을 참고하기 바람이며, 여기서는 응혈을 촉진 또는 방지하는 요소에 관하여 간단히 논의하겠다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 혈액과 접촉된 표면은 순간적으로 단백질이 흡착되며, albumin의 흡착은 fibrinogen, γ -globulin의 흡착된 경우보다 응혈이 지연된다. 그리고 혈소판이 흡착되는데, 혈소판은 활성화되어 변형응집되며 응혈촉진인자를 방출

한다. Prostaglandin들은 혈소판의 응집활성화를 억제하며 ADP(adenosine diphosphate)들은 반대로 촉진한다. 다음에는 내부(intrinsic) 및 외부(extrinsic) 응고기구가 활성화되어 여러 응고인자의 연속적인 참여로 생성된 fibrin과 백혈구로 구성된 응혈이 생성된다. 한편 생성된 응혈은 urokinase 등에 의하여 다시 환원되는 경로를 가지고 있다.

완전한 혈액적합성 재료개발을 위해서는 혈액응고기구의 완전한 규명과 재료의 물성인자 즉 화학적 조성, 표면물성과 혈액적합성과의 관계규명이 선행되어야 함은 물론이다.

Fig. 2는 현재까지 연구된 혈액적합성 재료를 분류한 것으로 그 연구방향은 다음의 2가지로 크게 나눌 수 있다. 하나는 원칙적으로 혈액적합성을 가지는 재료개발로서, 혈액성분과의 상호작용을 약하게 하는 흡착억제형과 혈소판 활성억제형들 들 수 있다. 또한 유사내막 형성형은 재료표면에 형성된 유사내막의 혈액적합성을 이용하는 일종의 혼성(hybrid)재료이다.

또 하나는 선용계 활성화효소(unokinase)나 응혈형성을 억제하는 생리활성물질(heparin 또는 prostaglandin)을 재료표면에 고정화하거나 혹은 서서히 방출시켜서 혈액적합성을 얻는 방법이다¹⁾. 이 중 헤파린이 혈액응고 억제제로 가장 효과적인 것으로 알려져 있다²⁾. 여기에서는 헤파린의 구조와 기능, 헤파린화 혈액적합성 고분자재료의 종류 및 항응혈성의 평가등에 대해서 기술하고자 한다.

2. 헤파린의 구조 및 기능

헤파린은 선형의 음이온성 탄수화물로서 glucosamine(GlcN)과 uronic acid를 함유한 tetrasaccharide 반복구조로 이루어진 다분산성의 불균일한 물

<접수 : 1987년 12월 15일>

한국과학기술원 고분자화학연구소

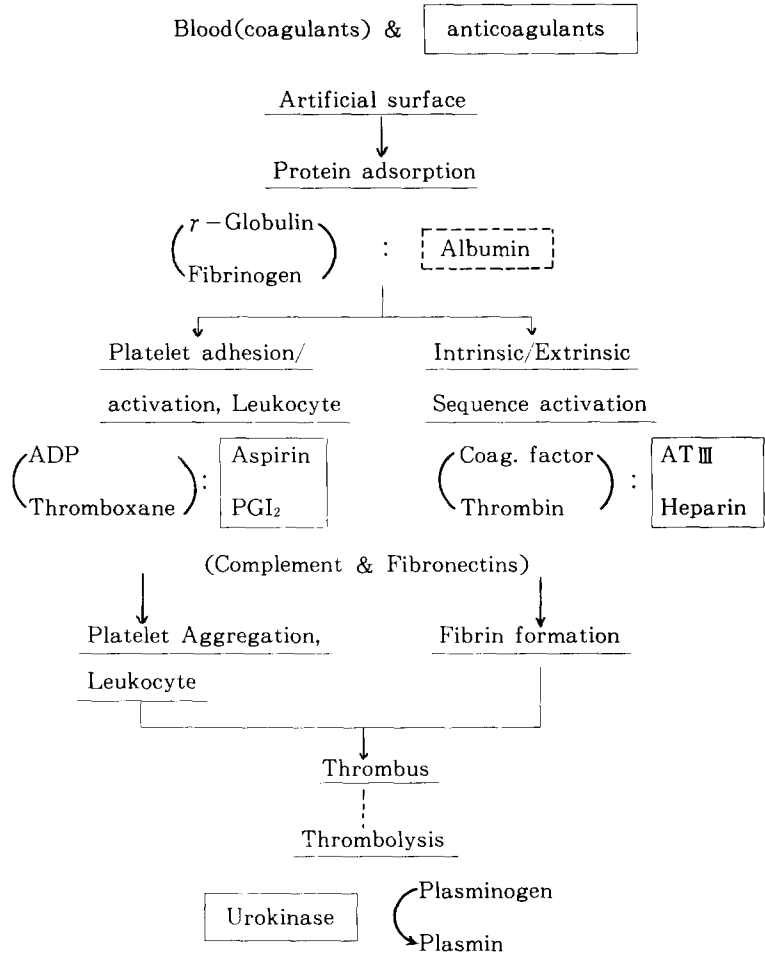


Fig. 1. Clotting scheme, participating coagulants () and anticoagulants □

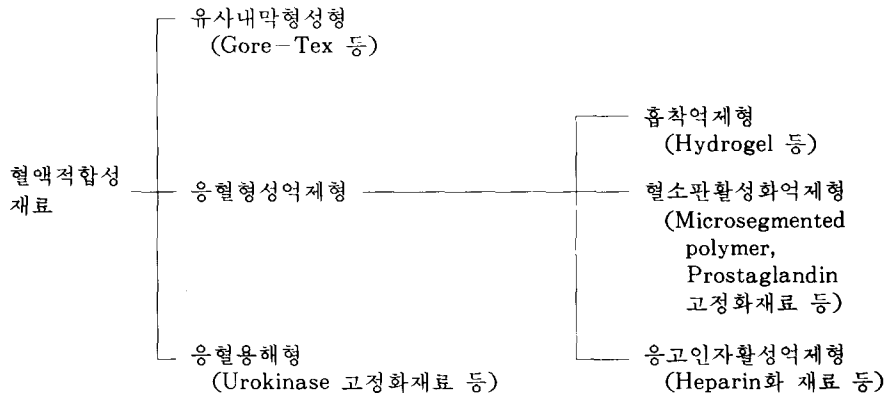


Fig. 2. Classification of blood compatible materials

질이며³⁾ 그 화학적 구조는 Fig. 3과 같다. 이 헤파린은 분자량이 7,000~20,000으로서⁴⁾ 출처에 따라 분자량 및 분자량 분포와 그 화학적 구조가 다양하며(Table 1), 물에는 잘 녹으나 포름아미드 이외의 유기 용매에는 녹지 않는다.

헤파린은 분자량에 따라 생리활성도가 다르며, 고활성(360 IU/mg)의 헤파린은 다음과 같은 서열(sequence)을 가진 tetrasaccharide 사슬구조를 주

로 형성하고 있다. 반면에 저활성(12 IU/mg) 헤파린은 이러한 tetrasaccharide 구조함량이 8.5%에 불과하므로⁵⁾, 이러한 서열이 antithrombin III(AT III)의 결합요소로 믿어진다.

L-iduronic acid → N-acetylated D-glucosamine-6-sulfate → D-glucuronic acid → N sulfate D-glucosamine-6-sulfate →

한편 헤파린의 수용액 상에서의 입체형태는 논란

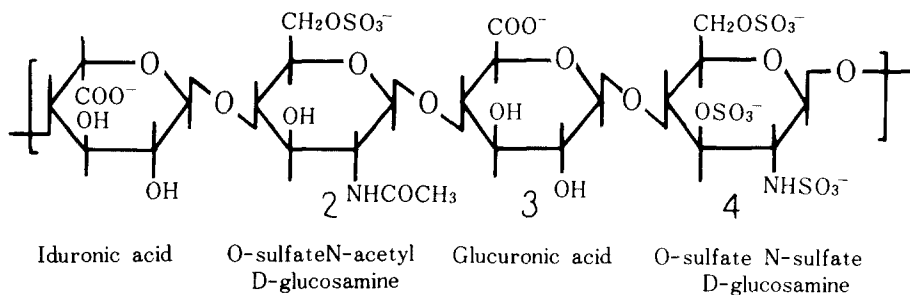


Fig. 3. Chemical structure of heparin

Table 1. Analyses of standard heparins

Iduronic acid % of total uronic acid	Glucuronic acid % of total uronic acid	Hexosamine (%)	Acetyl (%)	Sulfate (%)	Sulfate (N-)	Content (O-)
47~75	30~64	20~26	0.4~2.5	25~34	0.74~0.98	0.86~1.56

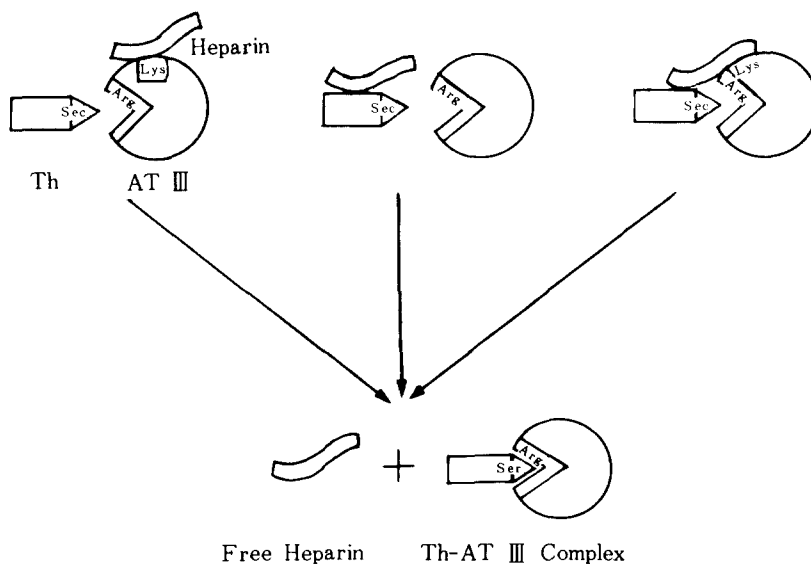


Fig. 4. Anticoagulating mechanism of heparin

의 대상이 되고 있지만 거의 나선형이나 코일형으로 보고 있다⁶⁾. 따라서 헤파린의 혈액응고 억제활성은 분자량에 따라 다르며, 저분자량의 헤파린이 높은 anti-Xa 활성을 가지고 고분자량의 헤파린은 높은 혈액응고 억제효과를 나타낸다고 알려져 있다⁷⁾.

헤파린의 기능은 ATⅢ와 결합하여 혈액응고제인 thrombin의 기능을 억제하는 것이며, 헤파린과 ATⅢ의 친화성이 클수록 촉매효과는 증가하게 된다. 이러한 헤파린-ATⅢ-트롬빈 비활성화의 정확한 메카니즘은 알려지지 않았으나 다음의 3가지 가설이 있다(Fig. 4). 가장 널리 받아들여진 이론으로는 (a)와 같이 헤파린이 먼저 ATⅢ에 결합한 다음 이 헤파린-ATⅢ가 트롬빈과 쉽게 반응하여 complex를 형성하는 것이다⁸⁾. 두번째 모델(b)은 헤파린이 먼저 트롬빈에 결합한 후 헤파린-트롬빈이 ATⅢ와 반응하는 것이며⁹⁾, 세번째 모델(c)는 헤파린이 트롬빈과 ATⅢ사이에서 다리역할을 해서 3성분계의 complex를 형성한다는 가설에 토대를 두고 있다¹⁰⁾.

따라서 이러한 가설로부터 헤파린의 혈액응고 억제효과는 헤파린이 혈장단백질인 ATⅢ(Mw = 65,000)와 결합함으로써 혈액응고인자들, factor XIIa, XIa, Xa, IXa, 트롬빈에 대한 ATⅢ의 비활성화능력을 증가시킴으로써 결과적으로 트롬빈에 의한 피브리노겐으로부터 피브린으로 전환을 억제하여 항응혈성을 증가시킨다^{11,12)}.

3. 헤파린을 처리한 고분자재료

현재 의료용 고분자재료에 헤파린을 처리하는 방법으로 다음과 같이 몇가지로 분류할 수 있다¹³⁾.

- 1) 헤파린의 분산(heparin dispersion)
- 2) 이온결합을 이용한 헤파린 흡착(ionically bound heparin)
- 3) 공유결합을 이용한 헤파린 고정화(covalently immobilized heparin)

이외에도 헤파린 conjugate와 헤파린 유사물질(heparinoid)도 이용할 수 있다.

3-1. 헤파린의 분산

헤파린을 재료표면에 분산시키는 방법은 일반적으로 헤파린을 고분자 용액과 혼합하여 캐스팅(cas-

ting)하거나 다른 고분자 물질에 코팅하는 것이 있다.

① 실리콘/헤파린¹⁴⁾

헤파린을 실리콘고무 또는 실리콘고무에 콜로이드성 그래파이트를 혼합한 고분자에 분산시켜서 각각 "Hepacone"과 "Hepacone-G"를 만들었으며 얻어진 고분자 matrix는 헤파린의 확산에 의해서 항응혈성을 갖는다고 보고되었다.

② PHEMA/헤파린 PGE₁¹⁵⁾

고분자 matrix로부터 헤파린의 조절방출(controlled release)이 많이 연구되고 있다. 헤파린은 혈소판의 점착 및 변형과는 거의 무관하기 때문에 이를 보완하기 위하여 prostaglandins(PGE₁, PGI₂, PGD₂)을 헤파린과 함께 고분자 matrix에 결합시킴으로써 혈액의 내부응고인자뿐만 아니라 항혈소판 상호작용을 조절할 수 있다. 즉 헤파린과 PGE₁ 동시에 polyhydroxyethylmethacrylate(PHEMA)에 물리적으로 분산시킨 경우 헤파린과 PGE₁이 약 10시간 정도 방출되는 것을 확인할 수 있었다¹⁶⁾.

③ PU, PVC/헤파린 fractions²⁾

다분산성인 헤파린으로부터 ATⅢ에 활성이 높은 저분자량 fraction을 분리하여 고분자에 혼합방출시켜 좋은 결과를 얻고 있다^{17,18)}. 이러한 저분자량의 헤파린은 분자량이 5,000이하로 혈액의 응고인자인 Xa의 활성을 억제시켜 준다. Polyurethane(PU)과 poly(vinylchloride)(PVC)막에 저분자량의 헤파린 fraction을 적용했을때 통상의 다분산성 헤파린보다 방출속도가 크며, 반면에 혈소판의 응집도 더 적은 것으로 알려져 있다.

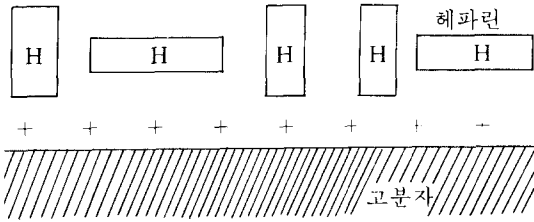
④ 에폭시수지/헤파린¹⁹⁾

에폭시수지에 혼합된 헤파린이 응혈형성을 막아주는 역할을 하는 효과가 있어서 약 2주일동안 항응혈성을 나타내었다.

3-2. 이온결합을 이용한 헤파린 흡착

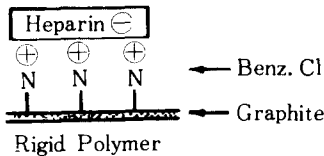
헤파린은 다가 음이온 고분자이므로 양이온 결합제를 사용하거나 고분자에 양이온을 미리 도입시킨 다음 이온결합으로 헤파린을 결합시킨다. 결합된 헤파린은 이온교환에 의하여 서서히 방출되므로 항응혈성이 비교적 장시간 유지된다.

3-2-1. 양이온이 흡착된 표면에 헤파린의 결합



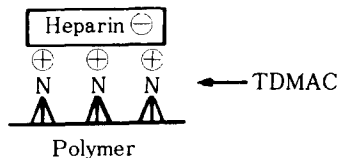
1) Graphite-Benzalkonium-헤파린(GBH)법²⁶⁾

최초로 행해진 헤파린화는 Gott에 의한 GBH법으로서, 고분자를 graphite 현탁용액에 담근 후 benzalkonium chloride(BC) 흡착시키고 이것을 헤파린 수용액에 넣어서 이온결합으로 헤파린을 흡착시킨다. 그러나 얻어진 graphite표면은 brittle하기 때문에 대부분의 생체재료에 적용할 수가 없다.



2) TDMAC-헤파린^{21, 22)}

GBH법을 개량한 것으로 graphite대신에 tridodecylmethylammonium chloride(TDMAC)를 사용하여 헤파린을 이온결합으로 흡착시키는 방법이다.

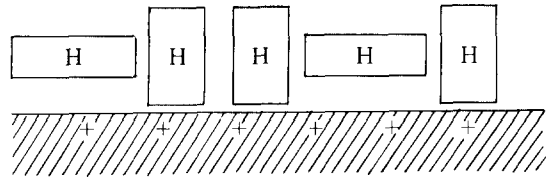


이 방법은 *in vivo*에서 단시간 우수한 항응혈성을 나타내지만 시간에 따라 TDMAC가 씻겨 나가므로 장시간 효능이 지속되지 않고, 또한 TDMAC의 독성때문에 실용화에는 문제가 있다.

이외에도 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)²³⁾, cetylamine hydrochloride(CAHL)²³⁾, cetylpyridium chloride(CPC)^{24, 25)}와 헤파린의 착화물 형성, octadecylamine hydrochloride(ODAHCl)²⁶⁾, hexadecylamine hydrochloride(HDAHCl)²⁷⁾,

hexadecylpyridium bromide(HDPB)²⁸⁾에 헤파린을 결합하여 고분자 표면에 코팅하는 방법들이 있다.

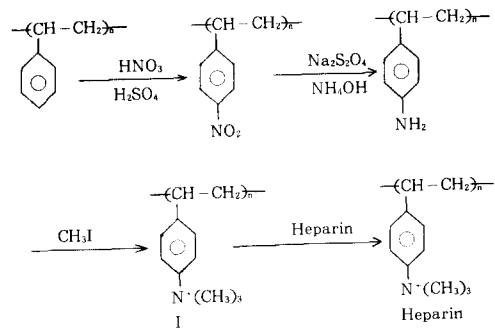
3-2-2. 양이온성 고분자표면에 헤파린의 결합



전술한 양이온성 계면활성제를 이용한 헤파린화 재료는 계면활성제 및 헤파린의 용출로서 그 효과가 매우 짧다. 따라서 고분자표면에 양이온성 관능기를 화학적으로 도입함으로써 헤파린의 방출속도를 느리게 할 수 있다. Leininger가 4급암모늄화 폴리스티렌을 사용한 이후²⁹⁾ 여러가지 4급 암모늄 양이온성 관능기를 포함한 고분자에 헤파린을 이온결합으로 결합시키는 연구가 보고되었다.

1) 4급암모늄화 폴리스티렌/헤파린

헤파린이 결합된 4급암모늄화된 폴리스티렌은 우수한 항응혈성을 가지는 것으로 보고되어 있다. 즉 trimethylamino-polystyrene은 아래와 같이 제조되었으며²⁹⁾, 클로로메틸화된 폴리스티렌의 아미노알킬화도 연구되었다^{30, 31)}.

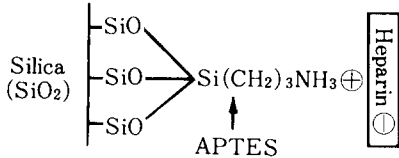


또한 염화메틸벤젠을 경화제로 이용한 에폭시수지³²⁾나 폴리올레핀, 실리콘, polytetrafluoroethylene (PTFE)에 염화메틸화스티렌의 그라프트 공중합체^{33, 34)}등이 보고되고 있다.

2) 4급암모늄화 아민을 포함하는 고분자/헤파린

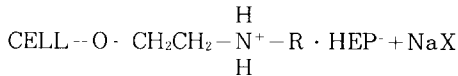
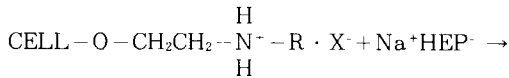
① APTES^{35, 36)}

결합제의 하나인 γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES)를 실리콘고무중에 포함되어 있는 충전제인 실리카의 -OH기에 화학결합시킨 다음 염산염으로 만들어 헤파린결합에 이용하였다.



② 셀룰로즈유도체

인공신장에 이용되는 셀룰로즈계 막의 항응혈성을 증가시키기 위하여 헤파린 결합이 보고되고 있다. 이 제조공정은 셀룰로즈의 -OH기에 immonium ion을 반응시킨 후 폴리에틸렌아민을 처리하여 아미노에틸화 셀룰로즈필름을 만든 다음 헤파린과 이온결합시켰다³⁷⁾.



또한 N, N' diethylaminoethyl cellulose acetate (DEAECA)에 헤파린을 그래프트시켜서 막을 만들었으며, cellulose acetate(Eastman E-394-60)와 DEAECA를 같이 캐스팅한 다음 신장투석용 막으로 하기 위해서 헤파린화하였다^{38, 39)}.

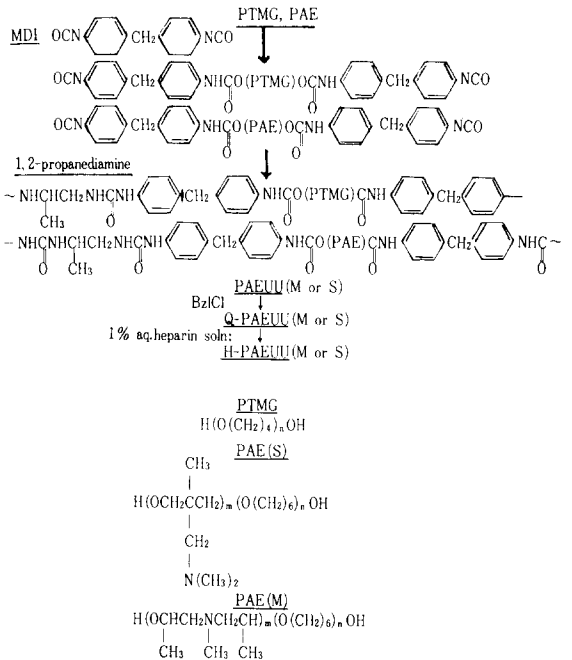
③ 폴리우레탄유도체

최근 폴리우레탄(PU)은 우수한 기계적 물성과 항응혈성으로 인공장기용 소재로 많이 쓰이고 있고, 이의 항응혈성을 더욱 높이기 위하여 헤파린화가 연구되고 있다.

Gardner⁴⁰⁾등을 alicyclic amine을 경화제로 이용한 폴리우레탄(non-disV)에 ³⁵S-헤파린을 포름아이드용액 및 황산수용액에서 반응 부착시켰다. 부착된 헤파린의 양은 0.4~1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었으며 5mm이하의 소구경혈관에 응용을 위한 항응혈성비교가 수행되었다.

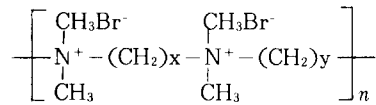
최근에 Imanishi⁴¹⁾는 아미노폴리올(PAE)을 포함

하는 폴리우레탄(PAEUU)을 만들어 4급암모늄화하고 헤파린을 결합시켜 우수한 항응혈성을 보고하였다.



④ Ionene⁴²⁾

고분자 주쇄에 양이온의 원자를 함유하고 있는 것을 ionene고분자라고 부르며 간단한 예는 다음과 같다. 이와같은 ionene 고분자 분자쇄중의 4급암모늄에 헤파린을 결합시킬 수 있다.

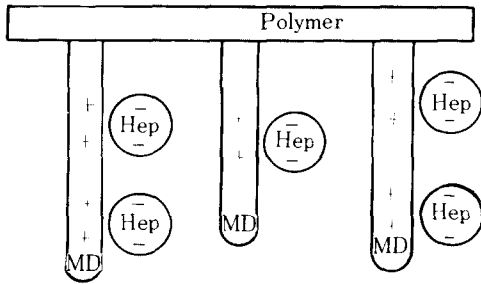


또한 ionene 구조를 가지고 있는 블록고분자인 SPSA3와 폴리우레탄의 유도체인 Adiprene L167에 대한 헤파린화 연구가 보고되어 있다^{43, 44)}.

⑤ 아크릴계 고분자⁴⁵⁻⁴⁸⁾

Tanzawa등은 염화비닐/에틸렌/초산비닐 공중합체에 친수성인 methoxypolyethyleneglycolmonomethacrylate(MnG)와 양이온성 N, N' dimethylaminoethylmethacrylate(DAEM)를 그래프트 공중합시켰다(H-RSD). 이렇게 친수화된 고분자에는 상당히 많은 양의 헤파린이 그래프트된 고분자 내부에까지 흡착된다. 이 그래프트 공중합체는 기계적 성질, 친수성기의 생체적합성 및 헤파린화에 의한

항응혈성을 동시에 나타내며 제조시 단량체의 조성으로 함수율을 조절함으로써 표면에서 헤파린을 미량씩 장기간 일정속도로 방출시킬 수 있다고 한다. 또한 trunk 고분자로 PVC와 PAN를 각각 이용하여 같은 방법으로 처리해서 친수화된 HPSD 및 PANBr를 얻었다.



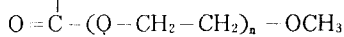
Trunk polymer, Graftmer R₃ : Copoly(vinylchloride/ethylene vinyl acetate)

PVC : polyvinylchloride

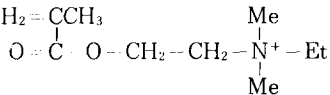
PAN : polyacrylonitrile

MD : Copoly (MnG/DAEM)

MnG : CH₂=CCH₃



DAEM : CH₂=CCH₃



Hep : Heparin

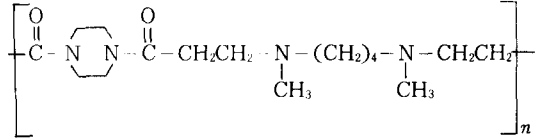
3) 폴리비닐피리딘/헤파린

헤파린이 처리된 폴리비닐피리딘은 헤파린의 방출이 오랫동안 지속된다. 즉 폴리비닐피리딘 코팅 후 헤파린 흡착된 폴리머 필름은 항응혈성이 개선되었다고 보고되었다⁴⁹⁾.

또한 스티렌/2 메틸 5-비닐피리딘 공중합체, 부타디엔/비닐피리딘 공중합체도 응용되었다²⁹⁾.

4) Polyamido-amine/헤파린^{50,51)}

Polyamido amine(PAA)은 고분자 주쇄에 아미도기와 삼급아민기를 포함하고 있는 수용성고분자이다. 가교된 PAA는 plasma와 혈액을 포함한 수용액상에서 헤파린을 정전기적 인력으로 선택적으로 흡착한다. 이와같이 헤파린을 흡착한 PAA를 고분자 표면에 그래프트하여 항응혈성 표면을 목표하는 연구가 PU, PVC, 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET)에 시도되었다.



5) Protamine/헤파린⁵²⁾

간단한 단백질인 protamine은 collagen과 같은 물질에 헤파린의 결합을 증가시키는데 사용된다. 즉 protamine sulfate용액을 collagen이 풍부한 물질인 porcine ureter에 흡착시킨 다음 glutaraldehyde로 가교시키면 collagen과 protamine이 complex를 형성한다. 이 collagen-protamine complex가 헤파린과 이온결합함으로써 우수한 항응혈성을 갖는 porcine ureter를 만들 수 있다.

3-3. 공유결합을 이용한 헤파린의 고정화

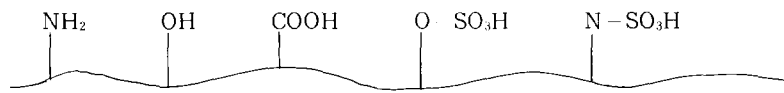
전술한 헤파린이 고분자표면에 이온결합되거나 또는 고분자내에 물리적으로 분산된 헤파린화 고분자시스템은 시간이 경과함에 따라 헤파린이 방출되어 항응혈성이 손실되는 경향이 있다. 따라서 헤파린을 공유결합에 의하여 고분자표면에 고정화함으로써 헤파린 소실을 방지하여 장기적 항응혈성 재료를 목표로 하는 많은 연구가 계속되고 있다.

헤파린을 고분자에 공유결합시키는데는 적당한 헤파린의 관능기를 선택하여야 한다. Fig. 5에 보는 바와 같이 헤파린은 히드록시기, 아미노기와 카복시기의 관능기를 가지고 있으므로 다양한 방법으로 헤파린과 고분자간의 공유결합을 유도할 수 있으나⁵³⁾, 헤파린의 항응혈성이 손실되지 않는 반응조건하에서 행하여야 한다. 때때로 고분자기질(substrate)에 따라 재료표면이 균열 또는 거칠어지거나 불투명화와 같은 손상이 우려되므로 주의해야 한다.

3-3-1. 화학적 결합제 사용

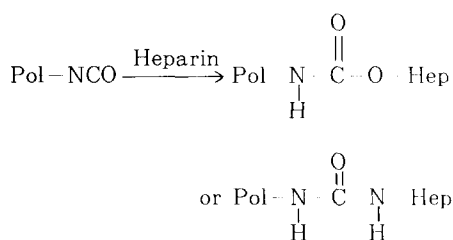
1) Isocyanate/헤파린

고분자에 이소시아네이트기를 도입한 다음 이것을 헤파린의 히드록시기 및 아미노기와 각각 결합시켜서 우레탄 및 요소반응으로 헤파린을 고정화한다.

Heparin : 

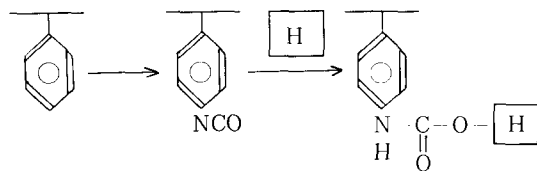
Potential Attachment Groups	Concentration (mole/mg hep)	Effect of Blocking on Anticoagulant Activity
OH	$\sim 2 \times 10^6$	10~20% block : minimal loss (APTT)
SO ₃	3.05×10^6	~ 8% block : complete loss
COOH	1.68×10^6	10~20% block : minimal loss
NH ₂	5×10^8	> 50% block : no anticoagulant activity blocking : minimal loss

Fig. 5. Functional groups of heparin



① PS-NCO + 헤파린⁵⁴⁾

Halpern은 폴리스티렌(PS) 주쇄에 몇 가지 반응을 경유하여 이소시아네이트기를 도입시켜서 얻은 p-isocyanato-PS를 헤파린의 히드록시기와 반응시켰다. 이렇게 얻어진 PS beads는 전술한 이온결합에 의해서 헤파린화 된 PS beads보다 항응혈성이 좋았다.



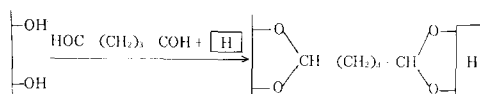
② PU-NCO, PU-PEG-NCO · 헤파린⁵⁵⁾

기계적 물성 및 항응혈성이 우수한 폴리우레탄(PU) 표면에 hexamethylenediisocyanate(HMDI)를 반응시켜 자유 이소시아네이트기를 도입한 후 직접 헤파린을 고정화시키고(PU HMDI-Hep), 또한 소수성인 PU표면에 친수성을 유도하기 위하여 PU-NCO활성화된 표면에 polyethyleneglycol(PEG)을 도입시킨 다음 같은 방법으로 헤파린의 고정화를 행하였다(PU-PEG-HMDI-Hep). 이렇게 고정화된 헤파린화 PU는 안정한 공유결합을 형

성하였으며 *invitro* 및 *exvivo* 시험 결과 우수한 항응혈성의 개선을 나타내었다.

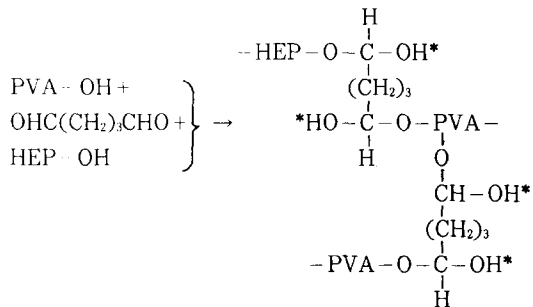
2) Glutaraldehyde/헤파린

Glutaraldehyde(GA)를 이용하여 고분자 주쇄의 히드록시기와 헤파린의 히드록시기간의 아세탈반응에 의해서 고정화하는 방법이다.



① PVA-GA + 헤파린^{56,57)}

Merrill등은 polyvinylalcohol(PVA) 하이드로겔과 헤파린의 히드록시기를 산촉매하에서 GA를 이용하여 PVA에 헤파린을 결합하였다. 반응 도중 불안정한 헤미아세탈 결합인 -OH*는 에탄올로 처리함으로써 PVA의 사슬에 cyclic acetal의 형성을 최소화 할 수 있으며 이러한 에탄올처리는 헤파린의 항응혈성의 확성에는 거의 아무런 영향을 주지 않았다. 헤파린화된 PVA하이드로겔은 응혈시간의 연장 및 항응혈성의 개선을 보였는데 이는 혈액으로의 헤파린의 탈착보다는 오히려 응혈인자의 흡착에 기인한다고 결론내리고 있다.



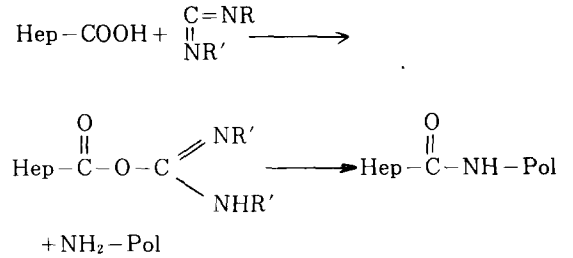
hollow fiber artificial kidney(HFAK)를 만들어 양(sheep)에 시도하여 좋은 결과를 얻은 이래 급성 및 만성 요독증(uremic) 환자에게도 임상시험을 넓혀나가고 있다. HFAK의 항응혈성의 발현은 헤파린의 작은 양이 혈액으로의 유출에 기인한다고 보고 있다.

④ Pol-OH + CNBr + H₂N-헤파린⁶⁶⁾

Sepharose, PHEMA와 PVA표면에 각각 CNBr을 반응시킨 후 헤파린을 고정화하였다. Sepharose 또는 PHEMA에 고정화된 헤파린은 상당히 긴 plasma recalcification time을 나타낸 반면에 PVA의 경우는 큰 영향이 없었다.

4) Carbodiimide/헤파린

카르복시기를 활성화시키는 carbodiimide(CDI)를 이용하는 방법으로 즉 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC)나 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide(CMC)와 같은 CDI를 결합제로 하여 고분자와 헤파린간의 공유결합을 유도한다.



① Pol-OH + CNBr + ε-ACA + CDI + H₂N-헤파린⁶⁷⁾

폴리실리콘 필름에 15% HEMA와 5% NVP의 모노머를 수용액 상태에서 방사선의 유도중합으로 그라프트시켜 얻은 공중합체중 PHEMA의 히드록시기를 CNBr로 활성화시킨 다음 직접 헤파린을 고정화하거나 또는 spacer arm인 ε-amino caproic acid(ε-ACA)를 반응시키고 계속해서 CDI를 가하여 헤파린과 공유결합을 유도한다. 표2는 각 공정마다 헤파린을 처리하여 최종 고분자와 비교한 것으

Table 2. Bonding heparin to hydrogels

"Active" surface and bonding type		μg Heparin on Film	μg Heparin/cm ²
Hydrogel		(Phys. adsorption)	16.5
Hydrogel + BrCN		(Bonded directly)	27.1
Hydrogel + BrCN + ε-ACA		(Phys. adsorption)	29.3
Hydrogel + BrCN + ε-ACA + CDI		(Phys. adsorption)	5.7
Hydrogel + BrCN + ε-ACA + CDI		(Bonded via "arm")	173

로 ϵ -ACA가 존재할 때 헤파린의 고정화가 증가함을 볼 수 있다.

② Pol-NH₂+CDI+HOOC-헤파린⁶⁵⁾

Schmer는 가용성인 CDI를 이용하여 ϵ -amino carboxyl agarose 유도체의 아민기에 헤파린을 공유결합시켰으며, 이 방법은 전술한 CNBr을 이용한 방법보다도 고정화된 헤파린의 함량이 많을뿐만 아니라 ATIII와 결합할 수 있는 헤파린의 능력도 증가함을 나타내었다. 또한 Danishefsky등⁶⁶⁾은 상기한 방법으로 aminoethyl agarose의 아민기와 헤파린의 카르복시기 사이의 아마이드결합으로 헤파린을 고정화하여 *in vitro*응혈시간의 연장을 확인하였다. 특히 Kim등^{69,70)}은 여러가지 diaminoalkane의 spacer arm을 갖는 agarose겔에 헤파린을 CDI로 고정화하였다. Fig. 6과 같이 diaminoalkane agarose의 카르복시기에 고정화된 헤파린의 항응혈성 활성은 spacer의 탄소수가 10개이상일 때 급격한 증가를 보이지만 그 이하에서는 단지 최소한의 활성을 나타내었으며, 고정화수율은 spacer의 메틸렌기가 최고 8개까지는 증가하다가 그 이상에는 오히려 감소함을 보이는데 이는 spacer arm이 길어짐에 따라 소수화되어서 사슬이 접혀지기 때문인 것으로 보고 있다. 또 이들은 PU표면을 가수분해한 다음 같은 방법으로 헤파린을 고정화하여 응혈시간 측정결과 미처리 PU에 비해서 1시간이상의 연장을 보였다⁷¹⁾.

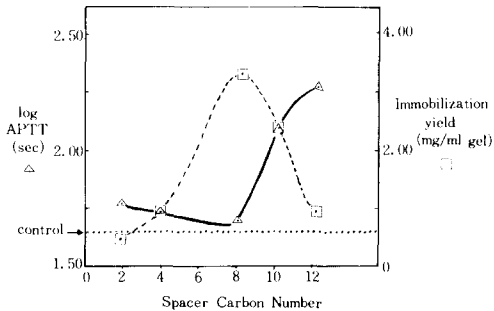


Fig. 6. Immobilization and bioactivity vs. spacer arm length(agarose).

③ Collagen-NH₂+CDI+HOOC-헤파린⁷²⁾

헤파린의 카르복시기를 먼저 CDI로 활성화 한 다음 collagen의 ϵ -아미노기에 공유결합으로 고정화하였다. 반응시 헤파린의 고정화는 팽윤도가 적을수록 또한 수축온도가 증가할수록 안정하게 공유

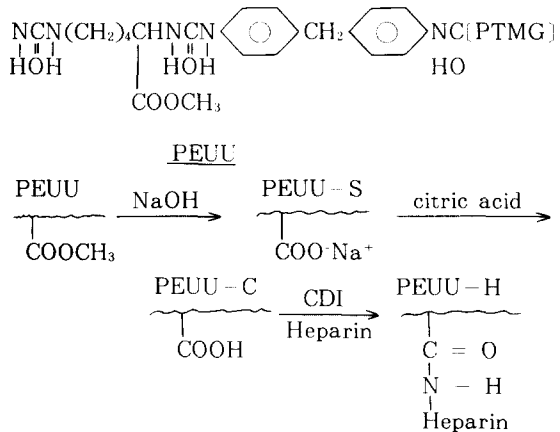
결합하였으며, 얻어진 헤파린화 collagen의 항응혈성은 미처리 재료보다 월등함을 나타내었다.

④ PS-PEG-NH₂+CDI+HOOC-헤파린⁷³⁾

Isocyanate-semitelechelic 폴리스티렌 oligomer와 amino-telechelic PEG oligomer를 결합시켜 PS-PEG-NH₂의 블록공중합체를 합성한 다음, 여기에 CDI를 사용 헤파린을 고정화하여 PS-PEG-Hep의 triblock 공중합체를 합성하였다. 이 블록공중합체는 불균일한 미세 상분리 표면구조를 나타내는데 이러한 친수성 및 소수성의 분리구조는 정상적인 혈관의 내피세포층과 유사해서 혈소판의 응집 및 변형을 억제하는 역할을 하게 된다.

⑤ PEUU-COOH+CDI+H₂N-헤파린⁷⁴⁾

최근 Imanishi등은 PU합성시 chain extender로 L-lysine methyl ester(L-Lys-OMe)를 사용하여 polyetherurethaneurea(PEUU)를 만들어서 항응혈성의 메카니즘을 연구하고 있다. 합성된 PEUU의 -COOCH₃를 -COOH로 변형시킨 다음 CDI에 의해서 헤파린화 공유결합으로 고정화하였다. 이러한 헤파린화 PEUU는 약간의 혈소판의 응집 및 변형만을 보였으며 또한 응혈 system을 비활성화하기 때문에 우수한 항응혈성을 나타냈다고 보고하고 있다.



3-3-2. 중합

헤파린을 화학적 또는 방사선화학적으로 처리하면 라디칼이 형성되고, 이것이 모노머의 중합을 유도하여 헤파린과의 공중합체를 생성한다. Labarre 등은 헤파린의 히드록시기와 cerium(IV)염과의 반응으로 생성된 라디칼을 이용하여 헤파린/메틸 메

타크릴레이트(MMA) 공중합체를 제조하여 상당한 응혈시간의 증가를 가져왔다^{75, 76)}.

유사한 방법으로 Baquey 등^{77, 78)}은 cerium(IV)산 화 대신에 헤파린을 γ 선 조사(radiation)로 얻은 라디칼을 사용해서 아크릴산 혹은 dacron 공중합체를 만드는데 응용하였다. 또한 Mester 등⁷⁹⁾과 Plate 등^{80, 81)}은 헤파린을 먼저 acrylation한 다음 적당한 친수성 모노머와 호모 혹은 공중합할 수도 있고 또는 PAAm에 고정화시킬 수도 있다고 제안하였다.

3-3-3. 이온결합과 공유결합의 조합

Lagergren 등⁸²⁾은 폴리프로필렌(PP) 표면에 양이온의 계면활성제(surfactant)를 도입시킨 다음 헤파린과 이온결합시키고, 여기에 다시 GA로 공유결합시켜서 안정한 헤파린화 monolayer 표면을 만들었다. 이러한 monolayer의 항응혈성 시험 결과 응혈시간의 연장을 가져 왔으며 A-V shunt 시험은 12시간이상의 patency를 유지하였다.

3.4. 헤파린 conjugate

고분자에 헤파린을 단독으로 처리하지 않고, 혈액응고인자인 Xa와 트롬빈을 비활성화하기 위하여 antithrombin III(ATIII)을 같이 고정화하거나 또는 혈소판의 응집 및 변형을 줄이기 위해서 헤파린과 알부민 혹은 prostaglandin(PGE₁)의 conjugate를 만드는 연구가 계속되고 있다.

3-4-1. 헤파린-ATIII conjugate⁸³⁾

Miura 등은 헤파린과 ATIII을 CNBr법으로 Sepharose 4B, PVA, PHEMA와 실리콘이 코팅된 나일론에 고정화하여 항응혈성의 활성을 검토하였다. 같이 고정화된 헤파린은 헤파린 또는 ATIII만을 각각 고정화한 것보다 훨씬 높은 항응혈성을 나타내었다.

3-4-2. 헤파린-알부민 conjugate⁸⁴⁻⁸⁶⁾

헤파린화 표면은 피브린의 형성을 억제시키는 반면에 알부민화 표면은 혈소판의 응집을 감소시킨다. 이러한 관점으로부터 최근 Kim 등은 헤파린과 알부민의 conjugate를 만들어 고분자에 CDI법으로 반응시켜서 상당한 혈소판의 감소를 확인하였다. 또한 이러한 conjugate를 Biomer나 PVC에 코팅하였

을 때 미처리 표면과 비교해서 plasma recalcification time이 현저하게 연장되었다.

3-4-3. 헤파린-Prostaglandin(PGE₁) conjugate⁸⁷⁾

전술한 고분자 matrix에 혼합 분산시킨 헤파린과 PGE₁는 각각 방출되면 혈소판의 응집방지와 APTT의 연장을 가져오지만, 실제 적용은 방출속도가 다르기 때문에 곤란하다. 따라서 Kim 등은 헤파린-PGE₁ conjugate를 합성하여 A-V shunt 시험 결과 미처리 shunt와의 항응혈성의 차이는 크지 않았으나 혈소판의 활성이 감소됨을 관찰할 수 있었다.

Table 3은 여러가지 고정화 재료의 항응혈성을 나타낸 것으로 헤파린-ATIII에 용혈촉진제인 urokinase를 같이 고정화 함으로써 보다 우수한 항응혈성을 가지게 할 수 있다⁸⁸⁾.

Table 3. Antithrombotic activity of immobilized samples

Materials Immobilized	Schematic Representation	Anti-thrombotic activity
Bovine Serum Albumin	BSA	-
Heparin	Hep	+
ATIII - Heparin	ATIII Hep	++
Urokinase	UK	+
ATIII - Heparin Urokinase	ATIII Hep + UK	+++
ATIII - Heparin & Urokinase	ATIII Hep UK	+++

3.5. 헤파린 유사물질

헤파린은 생체내 분해를 일으킬 뿐만 아니라 고가이기 때문에 최근 헤파린 유사재료의 사용이 다음의 2가지 방향으로 개발되고 있다. 하나는 헤파린과 비슷한 구조의 화합물을 폴리에틸렌, 폴리이소프렌, 폴리스티렌으로부터 만드는 것으로⁸⁹⁻⁹²⁾ 대표적인 것은 cis-1,4 polyisoprene으로부터 유도된 polyelectrolyte⁹³⁾, sulfonated polystyrene, methy-

lated polystyrene^{91,92,94})이다. 또 하나는 자연적으로 생체분해하지 않는 헤파린 유사 polysaccharide의 사용으로, 대표적인 예는 chitin과 그 유도체⁹⁵⁻⁹⁷) 및 dextran⁹⁸)을 들 수 있다.

4. 헤파린화 고분자재료의 항응혈성 평가

헤파린화 고분자의 항응혈성은 이온결합이나 공유결합과 같은 헤파린의 결합형태, 헤파린의 방출 여부 및 혈소판 집착에 대한 헤파린의 활성등이 중요한 인자로 작용하게 된다. 이중 가장 먼저 생각해야 할 문제는 헤파린이 항응혈성 효과를 발휘하기 위하여 혈액과 접촉시 반드시 고분자로부터 점차적으로 방출되어야 하는가 하는 것이다. 여기에 대해서는 헤파린이 방출되어야 한다는 의견과 헤파린의 방출이 필요치 않다는 견해가 상반되고 있다. Wilson¹⁰⁰)에 따르면 헤파린의 방출이 없을 때도 항응혈성이 개선된다는 보다 믿음직한 의견을 제시한 바 있다.

또한 헤파린의 방출여부는 헤파린이 고분자에 어떤 형태로 결합되어 있는가와 밀접한 관계가 있다. 이온결합된 헤파린은 혈액과 접촉시에 고분자로부터 방출되어 항응혈성을 나타낼 것이다. Tanzawa⁴⁶)은 이온결합 헤파린화 고분자에 있어서 항응혈성을 나타내기 위한 헤파린의 최적방출속도는 $4 \times$

$10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 이라고 보고하였으며 Idezuki⁴⁷)나 Miyama⁴⁵)등의 실험결과도 거의 일치하였다. 또한 Schmer⁴⁴)는 헤파린화 hollow fiber artificial kidney (HFAK)의 헤파린 방출속도가 $1.35 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 이면 충분하다고 평가하고 있다. 특히 Fourt⁴⁹)는 이온결합된 헤파린의 표면중량과 항응혈성 효과를 분석한 결과, 항응혈성의 기준을 100분이상의 응고시간으로 할 때, GBH 표면일 경우 $0.2 \sim 0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이고 PVPyr 필름일 경우 $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 정도가 항응혈성의 임계값임을 기술하기도 하였다.

반면에 헤파린이 공유결합에 의해서 고정화된 고분자의 항응혈성은 해석하는데 상당한 어려움이 있다. 즉 헤파린화 고분자의 항응혈성의 개선이 고정화된 헤파린의 활성에 의한 것인지 아니면 물리적으로 흡착된 헤파린의 용출에 의한 것인지가 의문이기 때문이다. 일반적으로 고정화된 헤파린 표면에 혈액이 접촉하면 단백질이 흡착된다. 만약 흡착된 단백질이 혈액응고인자들을 포함하고 있다면 in-vitro 응혈시간은 연장될 것이다. 이것은 헤파린의 생리학적 거동의 결과라기 보다는 오히려 응고인자들의 비특정적인 흡착의 결과로 볼 수 있다.

Table 4는 여러가지 표면에 부착된 헤파린의 함량을 나타낸 것으로, 헤파린이 공유결합이나 이온결합시 결합되는 표면에 따라 헤파린의 농도가 달라진다. 또한 이온결합된 헤파린은 어떤 경우에 있어

Table 4. Estimates of surface heparin loadings

Ionic bonding		Covalent bonding	
Surface	Heparin Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Surface	Heparin Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Graphite-benzalkonium	1.6	PVA	13.8
Various polymer-TDMAC	1.1~186	SBS	93~252
PET-APTES	0.4	NVP/VA	0.39~3.1
PET-HDPB	1.0	Silicone-CICN	50~100
PU-diamine	0.4~1.8	HEMA/NVP	2.06~12.6
DEAECA	58~63	PU-diaminoalkane	1.27~2.4
Cellulose-Ethyleneimine	4~700	PU PEG	1.45~6.6
PVPyr	3	PEUU	24.5~40.4
PU-PAA	4.2~48		

Table 5. Characterization of ionic & covalent coupled heparin

이온결합에 의한 헤파린도입	공유결합에 의한 헤파린 고정화
1. 도입된 헤파린의 용출에 의해 항응혈작용	1. 고정화된 헤파린에 의해 항응혈작용
2. 헤파린이 쉽게 용출되어 단기적 항응혈효과	2. 고정화 헤파린에 의해 장기적 항응혈효과
3. 도입된 헤파린의 항응혈작용이 항상 관찰됨.	3. 고정화방법, spacer arm등의 영향에 따라 항응혈성 효과가 달라짐.

서도 항응혈성을 나타내고 있으나, 공유결합된 헤파린은 고정화 방법, spacer arm등의 영향에 따라 항응혈성의 효과가 달라진다. Table 5는 헤파린의 결합방법에 따른 특성을 비교한 것으로 이들 헤파린화 고분자의 결합형태는 헤파린방출의 용이성과 헤파린의 항응혈성의 효과등을 고려하여 결정하게 된다.

한편 헤파린화 표면에 대한 혈소판의 거동에도 많은 연구보고가 되고 있다. 헤파린은 혈소판의 접착을 증가^(100,101) 혹은 감소시키며⁽¹⁰²⁾ 또는 아무런 영향을 주지 않는다⁽¹⁰³⁾는 등의 여러가지 의견이 분분하다. Lam⁽¹⁰⁴⁾과 Salzman^등⁽¹⁰⁵⁾은 헤파린이 전술한 polysaccharide의 혼합물이므로 ATⅢ에 대한 친화성 및 혈소판에 대한 반응성이 다르다고 보았으며 고분자량의 헤파린 fraction(Mw=20,000)이 저분자량의 헤파린 fraction(Mw=7,000)보다 혈소판으로의 반응성이 더 좋음을 확인하였다.

헤파린화 고분자가 항응혈성에 미치는 영향은 헤파린이 부착되는 고분자표면의 활성자리의 분포와 배열에 원인이 있으며 이것이 단백질의 흡착과 혈소판과의 상호작용에 영향을 미치게 된다.

5. 맺 는 말

지금까지 혈액적합성 헤파린화 고분자재료의 몇 가지 제조방법 및 항응혈성의 평가에 대해서 기술하였다. 이러한 혈액적합성 재료에 대한 연구는 항응혈성에 영향을 미치는 표면구조인자들, 즉 표면에너지, 음이온전하, 미세 상분리구조와 배체체적효과등과의 상관관계에 대해서 보다 상세한 검토가 있어야 될 것으로 사료되며, 특히 이들의 성질을 어떠한 방법으로 조합시켜서 상승적인 효과를 발휘할 수 있는가가 새로운 혈액적합성 재료개발의 핵심이 될 것이다.

또 생리활성물질의 고정화재료에 대해서도 헤파린, urokinase나 prostaglandin등의 단독 고정화가

많이 연구되고 있지만 혈관내피조직의 다양성을 고려하면 이들 생리활성물질의 복합적인 고정화를 필요로 한다. 특히 헤파린화 고분자재료는 출처에 따라 헤파린의 조성이 다를 뿐만 아니라 여러가지 고분자 기질을 사용하고 시험하는 혈액의 종류 또한 다르며 헤파린화의 기술도 다양하기 때문에 헤파린화 고분자재료의 설계시 각별한 유의가 요망된다.

참 고 문 헌

- 1) S.W. Kim et al, *J. Biomed. Mater. Res.*, 16, p.629, (1982).
- 2) S.W. Kim et al., *Am. Soc. Artif. Int. Organs*, 6, p.76, (1983).
- 3) Jaques, L.B., *Science*, 206, p.528, (1979).
- 4) Horner, A.A., "*Heparin Chemistry and Clinical Usage*", Academic ; NY, p.37, (1976).
- 5) Rosenberg, R.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 72, p.1218, (1979).
- 6) Yuan, L. et al., "*Advanced in Experimental Medicine and Biology*", vol 52, p.39, (1974).
- 7) Barrowcliffe, T.W. et al., *Br. J. Haematol*, 41, p.573, (1979).
- 8) Rosenberg, R.D. et al., *J. Biol. Chem.*, 248, p. 6490, (1973).
- 9) Macovich, R. et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 379, p.193, (1975).
- 10) Holmer, E. et al., *Eur. J. Biochem.*, 93, p.1, (1979)
- 11) S.W. Kim, et al., *J. Poly. Sci, Poly, Symp.*, 6b p.429, (1979).
- 12) T.W. Barrowcliffe, et al., *Haemostasis and Thrombosis*, p.712, (1981).
- 13) S.W. Kim, et al., *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 1(3), p.229, (1985).

- 14) Hufnagel, C.A., et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 146, p.262, (1968).
- 15) Ebert, C.D., et al., "Controlled Release of Bioactive Material", *Academic, N.Y.* p.107, (1980).
- 16) Ebert, C.D. et al., "Medical Applications of Controlled Release", Vol II, p.77, (1984).
- 17) Andersson, L.O., et al., *Thromb. Res.*, 9, p.575, (1976).
- 18) Holmer, E., et al., *ibid.*, 18, p.861, (1980).
- 19) I.O. Salyer., et al., *J. Biomed Mater. Res. Symp.*, 1, p.105, (1971).
- 20) Gott, V.L. et al., *Science*, 142, p.1297, (1963).
- 21) Leininger, R.I., et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, 12, p.152, (1966).
- 22) Grode, G.A., et al., *ibid.*, 15, p.1, (1966).
- 23) Lagergren, H., et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 56, p.381, (1968).
- 24) Schmer, G., et al., *TASAIO*, 22, p.654, (1976).
- 25) Schmer, G., et al., *ibid.*, 23, p.177, (1977).
- 26) Lagergren, H.R., et al., *ibid.*, 17, p.10, (1971).
- 27) P. Olsson, et al., *Thromb, Haemostasis (stuttgart)*, 37, p.274, (1977).
- 28) L.S. Hersh, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 1, p.99, (1971).
- 29) R.I. Leininger, et al., *TASAIO*, 12, p.151, (1966).
- 30) V.L. Gott, et al., *Bibl. Haematol*, 29, p.863, (1968).
- 31) V.L. Gott, et al., *Surgery*, 63, p.60, (1968).
- 32) I.O. Salyer, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 1, p.105, (1971).
- 33) J.E. Wilson, *J. Macromol. Sci. Chem.*, A11, p. 2113, (1977).
- 34) J.E. Wilson, *ibid.*, A 16, p.769, (1981).
- 35) L.S. Hersh, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 3, p.471, (1969).
- 36) R.L. Merker, et al., *Artificial Heart Program Conference Proceeding, NIH*, p.29, (1969).
- 37) R.A. Britton, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 2, p.429, (1968).
- 38) A.S. Chawla, et al., *Biomat., Med. Devices, Artif. Organs*, 2, p.157, (1974).
- 39) E.E. Martin, et al., *J. Macromol. Sci.-Chem.*, A 4, p.635, (1970).
- 40) D.L. Gardner, et al., *TASAIO*, 15, p.7, (1969).
- 41) Y. Imanishi, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, p.971, (1986).
- 42) A. Rembaum, et al., *J. Macromol. Sci. Chem.* A 4(3), p.715, (1970).
- 43) A. Rembaum, et al., *Biomat., Med. Devices, Artif. Organs*, 1, p.99, (1973).
- 44) S.P.S. Yen, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 1, p.83, (1971).
- 45) H. Miyama, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 11, p.251, (1977).
- 46) H. Tanzawa, et al., *TASAIO*, 19, p.189, (1973).
- 47) Y. Idezuki, et al., *ibid.*, 21, p.436, (1975).
- 48) H. Miyama, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, p.895, (1986).
- 49) L. Fourt, et al., *TASAIO*, 12, p.155, (1966).
- 50) P. Ferruti, et al., *Makromol. Chem*, 186, p.2291, (1985).
- 51) P. Ferruti, et al., *Polym. Mat. Sci. Eng.*, 53, p.420, (1985).
- 52) Y. Noishiki, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, p.337, (1986).
- 53) P.W. Heyman, *Univ. of Utah, Master thesis* (1984).
- 54) B.D. Halpern, et al., *Adv. Chem. Ser.*, 87, p.197, (1968).
- 55) Y.H. Kim, et al., *A Study on the Development of Biocompatible Polymer (I), (II), (III), KAIST report* (1985~87).
- 56) E.W. Merrill, et al., *J. Appl. Physiol.*, 29, p.723, (1970).
- 57) E.W. Merrill, et al., *U.S. Patent* 3,658, 745, (1972).
- 58) N.A. Peppas, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 11, p. 423, (1977).
- 59) N.A. Peppas, et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 24, p.404, (1978).
- 60) M.F.A. Goosen, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 13, p.347, (1978).
- 61) M.V. Sefton, et al., *ibid.*, 10, p.33, (1976).
- 62) C.I. Simionescu, et al., *Polym. Prep.*, 27(2), p.

- 52, (1986).
- 63) Grode. G., et al., *Artificial Heart Program Conference Proceedings, NIH*, p.19, (1969).
- 64) R.D. Falb, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 283, p.396, (1977).
- 65) Schmer, G., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 18, p.321, (1972).
- 66) Y. Miura, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, p.619, (1980).
- 67) A.S. Hoffman, et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 18, p.10, (1972).
- 68) Danishefsky. I., et al., *Thromb. Res.*, 4, p.237, (1974).
- 69) S.W. Kim, et al., *Biomaterials ; Interfacial Phenomena and Applications*, 199, p.161, (1982).
- 70) C.D. Ebert, et al., *Thromb. Res.*, 26, 43, (1982).
- 71) P.W. Heyman, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 19, p.419, (1985).
- 72) K. Raghunath, et al., *ibid*, 17, 613, (1983).
- 73) T. Okano, *Personal Communication*.
- 74) Y. Imanishi, et al., *ibid*, 20, p.1157, (1986).
- 75) D. Labarre, et al., *J. Polym. Sci. Symp.*, 47, p.131, (1974).
- 76) M. Jozefowicz, et al., "Chemistry and Biology of Heparin", *N.Y.* p.475, (1981).
- 77) Ch. Baquey, et al., *Ann. Phys. Biol. Med.*, 9 (2), p.131, (1975).
- 78) Ch. Baquey, et al., *Innov. Tech. Biol. Med.*, 2 (4), p.379, (1981).
- 79) L. Mester, et al., *Ann. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 77, p.113, (1978).
- 80) Plate, N.A. et al., *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 244(6), p.1505, (1979).
- 81) Plate, N.A., et al., *26th Int. Symp. on Macromolecules*, p.1522, (1979).
- 82) H.R. Lagergren, et al., *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 17, p.10, (1971).
- 83) Y. Miura, et al., *Biochimie*, 62, p.595, (1980).
- 84) W.E. Hennink, et al., *Thromb. Res.*, 29, p.1, (1983).
- 85) W.E. Hennink, et al., *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 29, p.200, (1983).
- 86) S.W. Kim, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 18, p.911, (1984).
- 87) H. Jacobs, et al., *J. Controlled Release*, 2, p.313, (1985).
- 88) Y. Miura, et al., *Artif. Organs, Japan*, 9, p.863, (1980).
- 89) H.P. Gregor, et al., *Polym. Sci. Technol. U.S.A.*, 7, p.51, (1975).
- 90) T. Beugeling, et al., "Biocompatibility of Implant Materials" *London* p.187, (1976).
- 91) C. Fougnot, et al., *Ann. Biomed. Eng.*, 7, p.429, (1979).
- 92) C. Fougnot, et al., *ibid.*, 7, p.441, (1979).
- 93) S.W. Kim, et al., *J. Polym. Sci. Letter*, 21, p.1, (1983).
- 94) C. Fougnot, et al., *Biomaterials*, 3, p.465, (1982).
- 95) C. Muzzarelli, et al., *Int. Symp. Polym. Med.*, p.52, (1982).
- 96) H. Fukuda, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51 (4), p.1142, (1978).
- 97) H. Fukuda, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 12, p.531, (1978).
- 98) M. Mauzac, et al., *Biomaterials*, 3, p.221, (1982).
- 99) J.E. Wilson, *Polym. Plast. Tecàno. Eng.*, 16 (2), p.119, (1981).
- 100) J. Lindon, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 91, p.47, (1979).
- 101) M.A. Goosen, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 13, p.347, (1979).
- 102) H. Lagergren, et al., *Surgery*, 75, p.643, (1974).
- 103) C.D. Ebert, et al., *Throm. Res.*, 26, p.43, (1982).
- 104) L.H. Lam, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 283, p.404, (1978).
- 105) F.W. Salzman, et al., *J. Clin. Invest.*, 65, p.64, (1980).