

인체 내부 환경 변화 모사에 따른 삼투압 기반 약물주입펌프의 기능 평가 연구

윤철환^{1*} · 안재홍^{1*} · 박도^{1*} · 이재연^{2*} · 박천권³ · 박민² · 최영빈^{2,3,4}

¹청담고등학교, ²서울대학교 바이오엔지니어링협동과정,
³서울대학교 의학연구원 의용생체공학연구소, ⁴서울대학교 의과대학 의공학교실

Studies on Osmotically Driven Drug Infusion Pump Under the Change in Body-Simulating Environment

Chul Whan Yoon^{1*}, Jae Hong Ahn^{1*}, Doh Park^{1*}, Jae Yeon Lee^{2*}, Chun Gwon Park³,
Min Park² and Young Bin Choy^{2,3,4}

¹Chungdam High School, Seoul, Republic of Korea

²Interdisciplinary Program in Bioengineering, College of Engineering, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

³Institute of Medical & Biological Engineering, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

⁴Department of Biomedical Engineering, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

(Manuscript received 26 November 2015; revised 8 December 2015; accepted 9 December 2015)

Abstract: Various types of implantable drug delivery devices have attracted significant attention for several decades to improve drug bioavailability and reduce side effects, thus enhancing therapeutic efficacy and patients' compliance. However, when implanted into the body, the devices may be influenced by the changes in physiological condition, such as temperature, pH or ionic concentration. Thus, the drug release rates could be also altered concurrently. Therefore, in this work, we employed an implantable ALZET[®] Osmotic Pump, which has been widely used to locally deliver various therapeutic agents and examined the effect of pH, temperature and ionic concentration on its drug release rate. For this, we performed in vitro cell tests to simulate the condition of local tissues influenced by the altered drug release rates, where we used diclofenac sodium as a model drug.

Key words: drug delivery, osmotic pump, pH, temperature, ionic concentration

1. 서 론

약물전달시스템(Drug delivery system)은 인간의 질병 치료 효과 및 효능을 극대화하기 위하여, 약물을 효율적으

*These authors contributed equally as first authors in this work.

Corresponding Author : Young Bin Choy
Department of Biomedical Engineering, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon Dong, Chongno Gu, Seoul 110-799, Korea
Tel: +82-2-740-8592 (+82-10-6460-7359)
E-mail: ybchoy@snu.ac.kr

이 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원을 받아 수행하였음(HI14C2194).

로 전달해 체내에서 약물의 생체이용도(bioavailability)를 높이고, 체내에서의 약물에 의한 부작용을 줄이기 위한 약물의 제형 및 제제를 개발하는 기술이다[1,2]. 특히, 이러한 약물전달시스템을 구현하기 위해서 정제, 캡슐, 주사제, 패취제 등이 개발되어 사용되고 있으며, 이와 더불어 이식형 약물전달 기기들도 연구 및 개발되고 있는 추세이다[3-5]. 대표적인 예로, 고분자 기반의 서방형 약물 전달(sustained drug release)시스템의 경우에는 약물이 탑재된 고분자 분해(degradation) 또는 약물의 농도 구배에 따른 확산(diffusion)에 의해서 약물이 방출되기 때문에, 한 번의 투여로 장기간 약물을 전달할 수 있다는 장점이 있으나[6,7] 정교하게 약물 방출형상을 제어하기 어렵다는 단점도 가지

고 있다[8,9]. 특히, 일정한 양의 약물을 지속적으로 방출하는 선형 약물전달이 유리한 항염증, 통증완화 약물과 같은 경우에는 이러한 확산에 의한 약물 전달 방법론으로는 성취하기가 어렵다는 문제점이 있다.

이러한 선형 약물전달을 가능하게 하는 대표적인 예로, 삼투압에 기반한 ALZET® Osmotic Pumps 와 같은 이식형 약물전달기기를 들 수 있다[10].

하지만, 이러한 삼투압 기반 약물전달기기는 체내의 pH, 온도, 이온 농도 등 다양한 환경에 의해서 물리적, 화학적인 영향을 받을 수 있으며, 이로 인해서 미리 예측한 약물 방출속도와 다른 형상이 구현될 수 있다는 문제점이 있을 수 있다. 특히, 체내의 국소적 부위에 장기간의 서방형 약물 전달을 하는 경우, 체내 환경에 따라 약물 방출속도가 달라지게 되면 조직 주변에 미리 계획한 약물의 농도를 유지하기 어려울 수 있다. 특히 이러한 급격한 약물 농도 변화는 주변 조직에 예상치 못한 다양한 부작용을 야기할 가능성도 있다.

그래서, 현 연구에서는 이러한 문제점을 기반으로 체내 환경에 따라 이식형 약물전달기기가 영향을 받았을 때 약물 방출형상이 어떻게 달라지는 지를 확인하고, 세포 실험을 통한 모사 환경에서 이와 같이 변화된 약물 방출형상이 주변 조직에 끼치는 영향을 확인해 보고자 하였다. 이를 위해서, ALZET® Osmotic Pumps를 이용하여 체내에서 일어날 수 있는 pH, 온도, 이온 농도를 다양화한 환경에서 약물 방출형상의 변화를 관찰하였다[11]. 또한, 모델 약물로써 현재 임상에서 사용되고 있는 대표적인 진통소염제 중 하나인 diclofenac sodium을 이용하여 실험 및 평가 하였다.

II. 연구 방법

1. 펌프 내 약물 탑재

4 mg의 diclofenac sodium(모델 약물)을 100 ml PBS (phosphate buffered saline, pH = 7.4) 용액에 완전히 녹여 40 µg/ml 농도의 용액을 만든다. 그리고 나서, ALZET® Osmotic Pump body에 diclofenac sodium 용액 2 ml를 탑재하였다(그림 1). 다음으로, flow moderator를 ALZET® Osmotic Pump body에 끼우고, flow moderator의 상단에 있는 polyethylene cap을 뺀다(그림 1). 그 후, cap을 제거하여 노출된, 약물이 방출되는 통로 역할을 하는 금속 튜브에 실리콘 튜브 한쪽 끝을 연결한다. 실리콘 튜브에 이미 제작한 diclofenac sodium이 녹아 있는 용액을 채우고, brain kit를 실리콘 튜브 나머지 끝에 연결함으로써, 최종적인 diclofenac sodium이 탑재된 약물전달 펌프를 완성한다. 약물 용액을 채우기 전후의 펌프 무게를 측정하여, 실제 약물 탑재량의 재현성을 확보한다($80.56 \pm 1.96 \mu\text{g per pump}$).

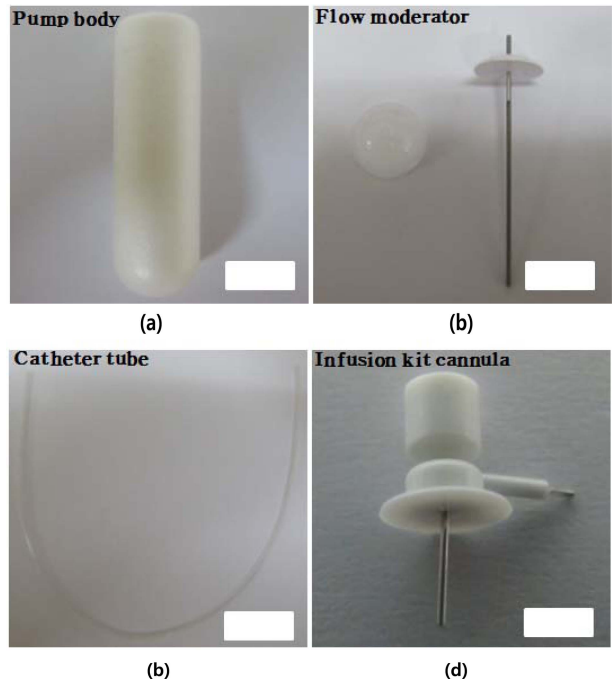


그림 1. ALZET® Osmotic Pump의 구성품들의 이미지. (a-c)그림에 있는 눈금자의 길이는 1 cm이며, (d)그림에 있는 눈금자의 길이는 0.4 cm이다.

Fig. 1. Optical images of components consisting of ALZET® Osmotic Pump. The scale bars are (a-c) 1 cm and (d) 0.4 cm, respectively.

2. pH, 온도, 이온농도 변화에 따른 약물 전달 펌프로부터 약물 방출 실험

약물이 탑재된 약물전달 펌프가 주변환경에 의해서 영향을 받아서 약물 방출형상이 어떻게 달라지는지를 확인하기 위해서 다음과 같은 조건에서 약물 방출 실험을 수행하였다.

(1) pH 변화에 따른 약물 방출 실험

pH가 각각 5, 7.4인 PBS용액 20 ml에 약물이 탑재된 ALZET® Osmotic Pump를 완전히 담근 후, 펌프에 연결된 catheter tube의 한쪽 끝에 결합된 infusion kit cannula를 2 ml의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 기반 미디어 안으로 넣는다. 이렇게 준비된 시스템을 37°C incubator에 넣은 후, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일째 되는 날 각각 꺼내서, 방출된 약물이 녹아 있는 미디어를 모으고, 새로운 2 ml의 미디어로 교체한다.

(2) 온도 변화에 따른 약물 방출 실험

pH가 7.4인 PBS용액 20 ml에 약물이 탑재된 ALZET® Osmotic Pump를 완전히 담근 후, pH변화에 따른 약물 방출 실험 방법과 동일하게 infusion kit cannula를 2 ml의 미디어 안으로 넣는다. 이렇게 준비된 시스템을 37°C, 42°C

incubator에 각각 넣은 후, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일째 되는 날 각각 꺼내서, 방출된 약물이 녹아 있는 미디어를 모으고, 새로운 2 ml의 미디어로 교체한다.

(3) Ion concentration에 따른 약물 방출 실험

20 ml의 pH가 7.4인 PBS용액과 DI water 각각에 ALZET® Osmotic Pump를 완전히 담근 후, 펌프에 연결된 catheter tube의 한쪽 끝에 결합된 infusion kit cannula를 2 ml의 미디어 안으로 넣는다. 이렇게 준비된 시스템을 37°C incubator에 넣은 후, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일째 되는 날 각각 꺼내서, 방출된 약물이 녹아 있는 2 ml의 DI water를 모으고, 새로운 2 ml의 DI water으로 교체한다.

(4) 미디어 내의 약물량 분석

시간별로 모은 미디어를 자외선분광기(UV-spectrophotometer, UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용, 276 nm에서 분석하여 방출된 약물의 양을 정량적으로 분석하였다.

3. 세포 실험

세포 실험을 통한 모사 환경에서 온도에 따라 달라진 약물 방출량이 국소적인 부위에 전달되었을 때 주변 조직에 주는 영향을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 현 연구에서는 MG-63 세포를 사용하였는데, 이는 현 연구에서 사용한 모델 약물인 diclofenac이 MG-63 세포의 증식에 영향을 준다고 보고 되어 있기 때문이다[12]. 현 연구에서는 96 well plate에 5.0×10^3 개의 MG-63 세포를 seeding하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 incubation 시킨 후, 기존의 media는 제거하고 37°C와 42°C의 각각 다른 온도 환경에서 방출된 약물 농도를 모사한 용액을 각각 serum free medium과 1:1로 섞어서 세포가 있는 well에 넣어 주었다. 그 후 1, 2, 3 일간 Ez-cytox를 이용하여 증식된 세포 수를 측정하였다. Ez-cytox 분석은 제공된 매뉴얼에 따라 진행하였으며, 450 nm에서 microplate reader (VERSA max, Molecular Devices, USA) 를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

III. 연구 결과 및 고찰

ALZET® Osmotic Pump는 펌프 내에 존재하는 salt sleeve에 의해서 펌프 외부와 펌프 내부 간의 삼투압차이에 의해서 작동한다(그림 2). 이어서, salt sleeve에 의해서 생기는 삼투압에 의해서 펌프 외부에 존재하는 물이 펌프를 둘러싸고 있는 반투막(semipermeable membrane)을 통과하게 된다. 이렇게 투과된 물은 약물이 녹아 있는 용액이

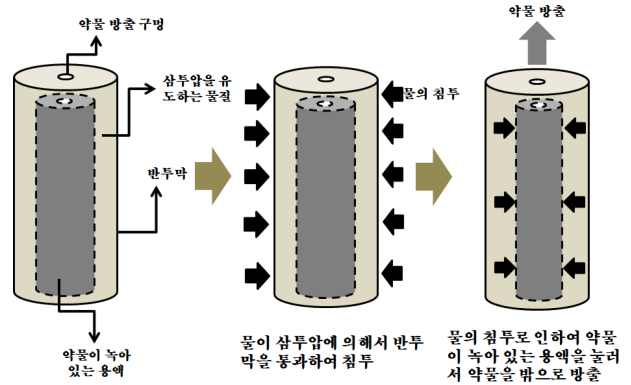


그림 2. ALZET® Osmotic Pump의 작동원리를 설명하는 도식도. Fig. 2. Schematic illustration of actuation principle of ALZET® Osmotic Pump.

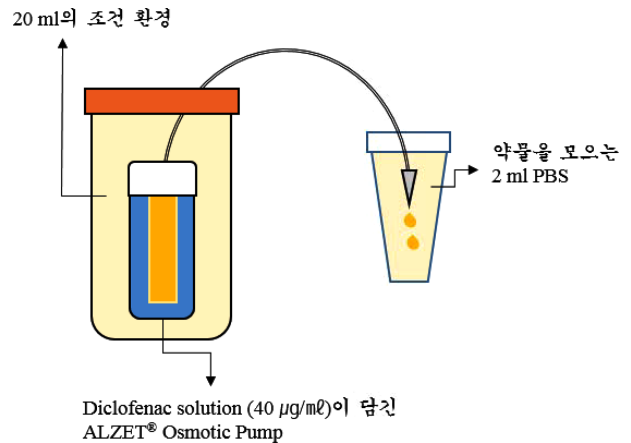


그림 3. In vitro 약물 방출형상 실험의 도식도. Fig. 3. Schematic illustration of In vitro drug release test.

재된 유연한(flexible) 저장소(reservoir)를 누르게 되고, 이 힘에 의해서 저장소에 들어 있는 약물이 녹아 있는 용액이 flow moderator를 통하여 펌프 밖으로 방출하게 된다. 그리고, 지속적이고 일정한 압력이 작용하게 되어 일정한 속도로 약물이 방출되게 된다. 이러한 삼투압 작동 원리 때문에 체내 이식 후 펌프 주변에 환경 변화가 생기면 ALZET® Osmotic Pump를 통한 약물 방출 속도가 달라질 수 있다.

그래서, 현 연구에서는 체내에서 나타날 수 있는 다양한 환경 변화를 모사하여 이에 따라 약물 방출속도가 어떻게 변하는지를 평가하고자 하였다. 우선, 체내 조직 및 기관들이 다양한 pH를 가질 수 있다는 생물학적 배경지식을 바탕으로 pH가 5일 때, 7.4일 때 이에 따라서 ALZET® Osmotic Pump가 어떤 영향을 받는 지 평가하였다. 체내 pH 조건은 일반적으로 중성에 가까운 7.4 이나 염증 반응 등이 있는 조직 주위에서는 산성화된 환경을 만든다고 알려져 있다 [13]. 그림 4에 보면 알 수 있듯이, pH의 변화는 ALZET® Osmotic Pump에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 즉,

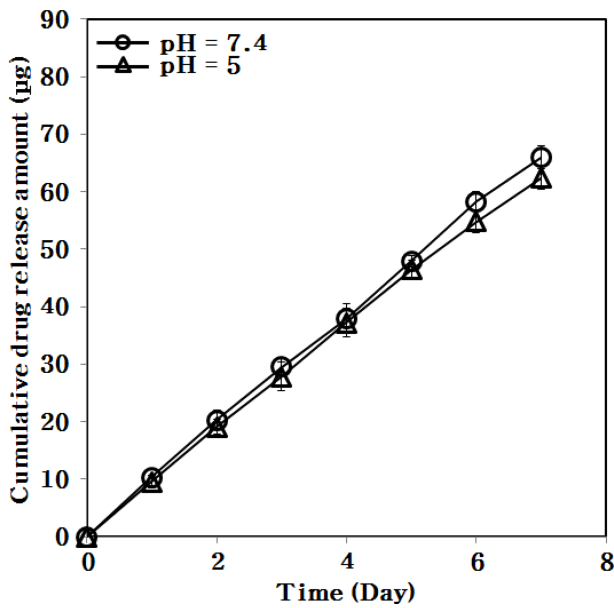


그림 4. pH 변화에 따른 in vitro 약물 방출형상.
Fig. 4. In vitro drug release profile at different pHs.

pH 7.4일 때, 약물 방출 속도는 약 $8.91 \pm 0.27 \mu\text{g/day}$ 이며, pH 5 일 때는 약 $9.42 \pm 0.28 \mu\text{g/day}$ 으로, pH의 변화에 따른 약물 방출속도는 $0.5 \mu\text{g/day}$ 정도의 차이 밖에 보이지 않았다.

294

두 번째는 온도에 따라서 ALZET® Osmotic Pump가 어떤 영향을 받는지 평가하기 위하여, 정상인 체온인 37°C 과 질환에 의한 고열 등으로 체온이 상승한 환자들에게 나타날 수 있는 체온인 42°C에서 각각 온도의 영향에 의해 약물 방출형상이 달라지는지를 확인하였다[14]. 그림 5에서 알 수 있듯이, 37°C에서는 약물 방출 속도가 약 $9.81 \pm 0.23 \mu\text{g/day}$ 이며, 이에 반해 42°C에서는 약 $11.85 \pm 0.53 \mu\text{g/day}$ 으로, 온도가 증가하였을 때 약물 방출속도가 급격히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 ALZET® Osmotic Pump의 약물 방출속도는 다음과 같은 식 (1)으로 표현될 수 있다[15];

$$Q = Q_0[0.141e^{(0.051T)} - 0.007\pi + 0.12] \quad \text{식 (1)}$$

{Q = pumping rate ($\mu\text{l/hr}$), Q_0 = specific pumping rate ($\mu\text{l/hr}$), T = temperature ($^\circ\text{C}$), π = osmotic pressure (atm)}

식 (1)을 이용하여 37°C와 42°C에서의 Q값의 비를 비교하였을 때, 약 1.27가 계산되었으며, 실제 실험을 통하여 얻은 약물 방출속도를 비교하였을 때는 약 1.21배가 나왔다. 식을 이용하여 얻은 비와 실험을 통하여 얻은 비를 비교하였을 때 거의 유사함을 알 수 있었고, 이를 통해 실험을 통해 얻은 온도 상승에 따른 약물 방출속도 증가 비율이 타당성이 있음을 확인하였다.

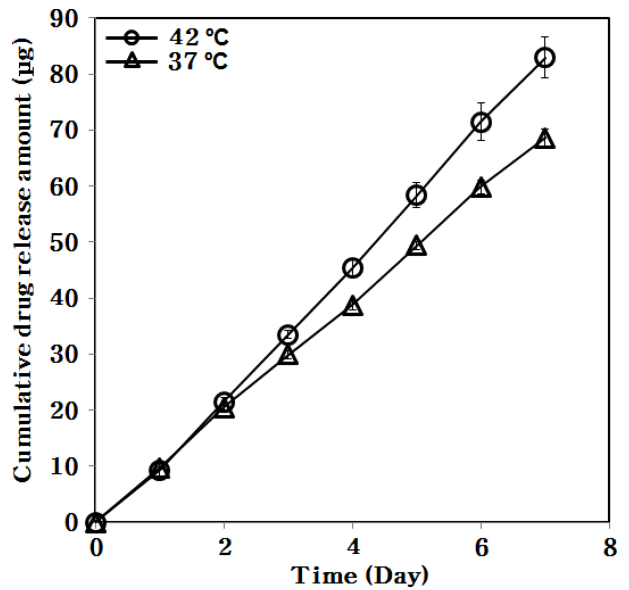


그림 5. 온도 변화에 따른 in vitro 약물 방출형상.
Fig. 5. In vitro drug release profile at different temperatures.

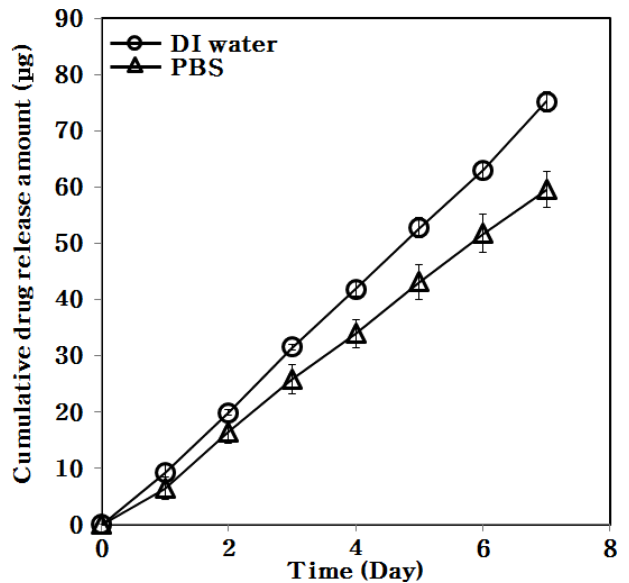


그림 6. 이온농도 변화에 따른 in vitro 약물 방출형상.
Fig. 6. In vitro drug release profile at different ionic concentrations.

마지막으로 생체 내 용액들의 이온 농도(ion concentration) 및 삼투압농도(osmolarity)와 동일하게 제작된 phosphate buffered solution (PBS)와 이온화가 매우 낮은 3차중류수인 DI water 환경 안에서 ALZET® Osmotic Pump가 영향을 받아 약물 방출속도가 어떻게 변하는 지 확인하였다. 그림 6에서 보면 알 수 있듯이, DI water, PBS 환경 속에서의 약물 방출속도는 각각 약 $10.74 \pm 0.26 \mu\text{g/day}$, 약 $8.50 \pm 0.46 \mu\text{g/day}$ 으로 나타났으며, 이 결과를 토

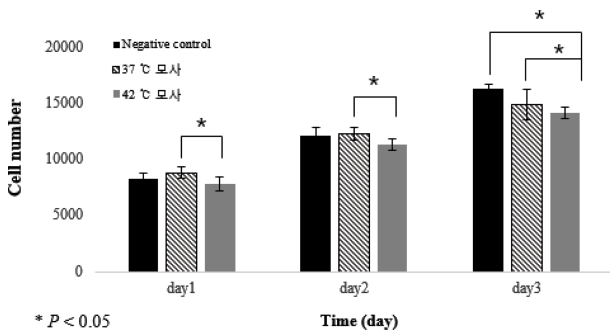


그림 7. 온도 변화에 따라 달라진 약물 방출형상이 MG-63 세포의 증식에 1, 2, 3 일간 미치는 영향.

Fig. 7. MG-63 cell proliferation influenced by drug release rates at 37°C and 42°C after 1, 2 and 3 day incubation.

대로 DI water 환경 내에서 약물방출속도가 약 1.26배 정도 증가한 것을 알 수 있었다. 하지만, 실제 체내에서는 DI water와 같이 이온화 상태가 급격히 낮은 조건이 존재하지 않는다는 점을 고려할 때에 이온 농도에 의한 약물방출량 변화는 미미할 것으로 판단할 수 있다.

위 실험 결과에 기반하여, 현 연구에서는 Osmotic Pump 원리에 의한 약물전달 시 약물 방출량 변화에 있어서 체온에 의한 영향이 가장 주요함을 알 수 있었다. 이러한 온도 변화 조건에서 달라진 약물 방출량이 체내 국소 조직에 주는 영향을 알아보기 위해 세포 실험을 진행하였다. 정상 체온 조건인 37°C와 고열 조건인 42°C에서 달라진 약물 방출량을 모사한 각각 다른 농도의 약물 용액을 MG-63 세포에 전달하고 1, 2, 3 일간 증식한 후 관찰한 결과, 모든 경우 세포 수가 37°C보다 42°C그룹에서 통계적으로 유의하게 낮음을 알 수 있었다. 특히, 3일 차에는 42°C그룹이 약물이 없는 control 그룹과 비교 시에도 통계적으로 유의하게 낮음을 확인할 수 있는데, 이는 약물이 지속적으로 다른 농도로 노출될 시 국소 조직에 주는 영향 차도 더욱 커질 수 있음을 시사하였다.

V. 결 론

이 연구를 통하여, 이식형 삼투압 기반 약물전달 펌프를 대표하는 ALZET® Osmotic Pump를 이용해 다양한 생체 내 환경 변화를 모사하여 각 경우의 약물 방출속도를 평가하였다. 염증 반응 등과 같은 요인으로 발생할 수 있는 조직 내 산성화는 약물 방출속도에 큰 영향을 주지 않았으나, 온도 변화에 대해서는 약물 방출속도가 최대 20% 정도 증가할 수 있음을 시사하였다. 또한, 펌프가 이식된 주변 조직 내 체액의 이온농도도 펌프의 약물 전달속도에 영향을 줄 수 있을 것이라고 예상되나 일반적으로 체액 내 이온농도의 변화가 극심하게 나타나지 않는다는 점을 고려하여 그에 대

한 변화는 크지 않을 것으로 예상할 수 있었다. 이러한 결론을 바탕으로 향후 임상에서 환자들에게 삼투압 기반 이식형 약물전달 펌프를 사용하기 위해서는 환자의 체온 변화가 약물 방출속도의 예측 측면에서 가장 큰 요소가 될 것이라고 판단된다. 특히, 이와 같이 달라진 약물 방출량은 국소 조직에 영향을 줄 수 있으며 이러한 차이는 노출되는 기간이 길수록 더 클 수 있음을 시사하였다.

References

- [1] L. Allen, and H.C. Ansel, *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, Philadelphia, United states of America: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp. 832.
- [2] K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, and K.M. Shakesheff, "Polymeric systems for controlled drug release", *Chem Rev*, vol. 99, no. 11, pp. 3181-3198. 1999.
- [3] T.M. Allen, and P.R. Cullis, "Drug delivery systems: entering the mainstream", *Science*, vol. 303, no. 5665, pp. 1818-1822. 2004.
- [4] A.C. Richards Grayson, I.S. Choi, B.M. Tyler, P.P. Wang, H. Brem, M.J. Cima, et al., "Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device", *Nat Mater*, vol. 2, no. 11, pp. 767-772. 2003.
- [5] D.V. McAllister, M.G. Allen, and M.R. Prausnitz, "Microfabricated microneedles for gene and drug delivery", *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 2, pp. 289-313. 2000.
- [6] S.S. Davis, and L. Illum, "Polymeric Microspheres as Drug Carriers", *Biomaterials*, vol. 9, no. 1, pp. 111-115. 1988.
- [7] A. Kumari, S.K. Yadav, and S.C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids Surf, B*, vol. 75, no. 1, pp. 1-18. 2010.
- [8] S.D. Allison, "Analysis of initial burst in PLGA microparticles", *Expert Opin Drug Delivery*, vol. 5, no. 6, pp. 615-628. 2008.
- [9] Y. Yeo, and K.N. Park, "Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems", *Arch Pharmacol Res*, vol. 27, no. 1, pp. 1-12. 2004.
- [10] R.K. Verma, S. Arora, and S. Garg, "Osmotic pumps in drug delivery", *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 21, no. 6, pp. 477-520. 2004.
- [11] P. Cuevas, J. Burgos, and A. Baird, "Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo", *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 156, no. 2, pp. 611-618. 1988.
- [12] L. Diaz-Rodriguez, O. Garcia-Martinez, M.A. Morales, L. Rodriguez-Perez, B. Rubio-Ruiz, and C. Ruiz, "Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line", *Biol Res Nurs*, vol. 14, no. 1, pp. 98-107. 2012.
- [13] A. Lardner, "The effects of extracellular pH on immune function", *J Leukoc Biol*, vol. 69, no. 4, pp. 522-530. 2001.
- [14] E. Song, H. Jung, H. Lee, J. Kim, H. Kim, and Y. Lee, "The Production of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) microparticles using supercritical carbon dioxide", *Clean Technol*, vol. 12, no. 2, pp. 53-61. 2006.
- [15] G. Healing, and D. Smith, *Handbook of pre-clinical continuous intravenous infusion*, London, United Kingdom: Taylor & Francis, 2000, pp. 265-281.