

# Development of Multifunctional Cationic Polysaccharide Hydrogels for Inhibition of Postoperative Tumor Recurrence and Metastasis

서희승<sup>1\*</sup>, 임재성<sup>1</sup>, 박천권<sup>1</sup>  
고려대학교 바이오의공학과<sup>1</sup>

## Development of Multifunctional Cationic Polysaccharide Hydrogels for Inhibition of Postoperative Tumor Recurrence and Metastasis

Hee Seung Seo<sup>1\*</sup>, Jeasung Lim<sup>1</sup>, Chun Gwon Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Intelligent Precision Healthcare Convergence, Sungkyunkwan University, Suwon, Kyunggi-do 440-746, South Korea

\*bona91@skku.edu

### Abstract

Cancer recurrence and metastasis after tumor resection surgery remains a significant cause of treatment failure. Moreover, when the lesion is close to a vital vessel, excessive bleeding can be fatal to the patient. To address these limitations, implantable drug delivery systems have been extensively researched. Since cationic polysaccharides have antibacterial, mucoadhesion, and blood hemostasis properties, they have been considered as promising biomaterials in the drug delivery and tissue engineering field. In addition, cationic polysaccharides are a type of natural adjuvants, thus can induce dendritic cell (DC) activation to promote T helper 1 (Th1) cell immune responses, macrophage activation, and cytokine production. DCs can promote effective antigen presentation and initiate T cell-mediated immune responses, thereby controlling tumor growth. Based on the above-mentioned outcomes, we demonstrate the feasibility of multifunctional hydrogels with controlled release of anti-cancer drugs as local drug delivery for effective cancer therapy. The multifunctional cationic polysaccharide hydrogel was implanted directly into the surgical site immediately after tumor resection to activate the tumor-related immune cells locally and long-term period via the immune reactive molecules. Thus, the hydrogel was able to suppress a secondary recurrence and metastasis of the tumor. Taken all together, we believe that the multifunctional hydrogel can improve the immunotherapeutic efficacy with minimized undesired side effects.

### 1. 연구 배경

중양 절제 수술 후 암의 재발과 전이는 치료 실패의 중요한 원인으로 남아 있다[1]. 또한 병변이 중요한 혈관에 가까울 때 과도한 출혈은 환자에게 치명적일 수 있다 [2]. 이러한 한계를 해결하기 위해 이식 가능한 약물 전달 시스템이 광범위하게 연구되었다. 양이온성 다당류는 항균, 점막 접착, 혈액 지혈 등의 성질을 가지고 있어 약물전달 및 조직공학 분야에서 유망한 생체재료로 각광받고 있다. 또한 양이온성 다당류는 일종의 천연 보조제이므로 수지상 세포(DC) 활성화를 유도하여 보조 T세포 면역 반응, 대식세포 활성화 및 사이토카인 생성을 촉진할 수 있다 [3]. DC는 효과적인 항원 제시를 촉진하고 T 세포 매개 면역 반응을 개시하여 종양 성장을 제어할 수 있다 [4]. 본 연구는 암 면역치료와 생체물질 기반 약물전달체계를 결합하여 임상적으로 문제가 있는 종양을 절제한 후 암의 재발과 전이를 극복하는 새로운 의료기술에 관한 연구이다. 이 연구는 효과적인 종양 면역 요법을 위해 항종양 면역을 조절하는 다기능성 양이온 하이드로겔을 개발하는 것을 목표로 합니다. 다기능성 양이온 다당류 하이드로겔은 종양 절제 직후 수술 부위에 직접 이식하여 면역 반응성 분자를 통해 종양 관련 면역 세포를 국소적으로, 장기적으로 활성화시켜 종양의 2차 재발 및 전이를 억제할 수 있다. 종합하면, 다기능성 양이온 하이드로겔이 부작용을 최소화하면서 면역 치료 효능을 향상시킬 수 있다.

### 2. 연구 방법

스캐폴드의 다공성 구조는 SEM(JSM-7000F, JEOL Ltd,

Tokyo, Japan)에 의해 분석되었다. <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼은 JNM-ECZ500R(JEOL Ltd.)을 사용하여 500MHz 분광기로 분석하였다. 하이드로겔의 약물 방출 평가를 위하여, 항체(LTF-2)를 탑재한 하이드로겔을 PBS에 넣어 shaking incubator (37°C, 90rpm)에서 일정한 시간 간격으로 배지를 수집하고 새로운 배지로 교체했다. Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용하여 하이드로겔에서 방출된 항체(LTF-2)의 양을 측정했다. 분해도를 평가하기 위하여, 하이드로겔을 1mL의 Lysozyme (10 µg/mL) 과 PBS에서 각각 배양했다. 샘플은 shaking incubator(37°C, 90rpm)에서 배양되었고 완충액은 3일마다 교체되었다. 3일마다 하이드로겔의 무게를 기록하여 변화된 무게를 통해 분해도를 확인하였다. 하이드로겔의 세포독성을 평가하기 위해 D-Plus™ CCK 세포 생존도 분석 키트를 사용하여 분석을 수행했다.

### 3. 연구 결과

다기능성 양이온 하이드로겔은 원통형 형태이며, 주사전자현미경 이미지를 통해 다공성 구조를 확인하였다. 다기능성 양이온 하이드로겔은 다공성 구조를 가짐으로서, 하이드로겔에 탑재된 약물이 국소적이고 지속적인 방식으로 서방출되도록 설계됨을 확인하였다. 그리고 다기능성 양이온 하이드로겔의 구조를 확인하기 위하여, <sup>1</sup>H NMR을 이용하여 하이드로겔의 구조를 분석하였다. 분석결과, NMR Peak가 5.85 ppm 에서 6.2 ppm 나타났다. 이는 양이온성 폴리머와

가교물질이 결합이 되어 양이온 하이드로겔이 합성이 되었음을 나타낸다 (그림 1). 양이온성 다당류 하이드로겔의 유변학적 특성은 회전 레오미터를 사용하여 관찰되었다. 저장 탄성률이 손실 탄성률보다 높기 때문에 다기능성 양이온 하이드로겔이 점탄성 겔 물질임이 입증되었다(그림 2A). 또한 하이드로겔의 분해도를 평가하기 위하여, 준비된 하이드로겔을 PBS 및 리소자임 용액에 노출시켜 시간대별 하이드로겔의 무게 변화를 통해 분해도를 평가하였다. 효소 처리 없이 처음 10일 동안의 하이드로겔의 무게 차이는 리소자임 용액과 거의 일치했으나 그 이후 하이드로겔을 리소자임과 함께 배양하면 분해 속도가 가속화되는 것으로 관찰되었다. 하이드로겔은 60일 동안 점차적으로 분해되었다(그림 2B)..

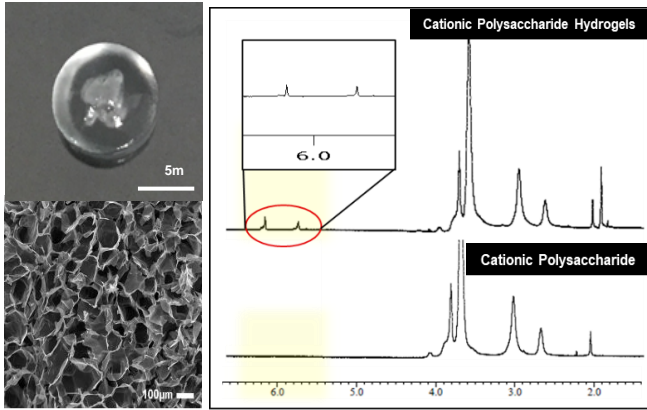


그림 1. 다기능성 다기능 양이온성 다당류 하이드로겔의 주 전자 현미경 이미지, 사진, 1H NMR 결과

다공성 구조를 갖는 하이드로겔은 탑재된 약물을 국소적이고 지속적인 방식으로 방출하도록 설계되었다. 하이드로겔의 약물 방출 능력을 평가하기 위하여, 하이드로겔에 항체를 탑재하여 PBS에 담지 후, 약물 방출 특성을 확인하였다. 그림 2C에서 하이드로겔은 5일 동안 약물이 지속적으로 방출되었다. 이를 통해, 양이온 하이드로겔이 항체의 방출을 연장시키는 것을 확인하였다. 이러한 지속적이고 서방출되는 특성은 전신 및 급성 독성 효과를 예방할 수 있는 기회를 제공한다. 하이드로겔의 세포 독성 평가를 진행하기 위해 마우스 섬유아세포인 L929 세포주를 이용하여 하이드로겔의 독성을 평가하였다(그림 2D). 2% 및 3% 하이드로겔은 L929에 약간의 독성을 나타내었지만, 모든 실험 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타냈다. 따라서, 다기능성 양이온성 하이드로겔은 유의미한 독성도 나타내지 않았다.

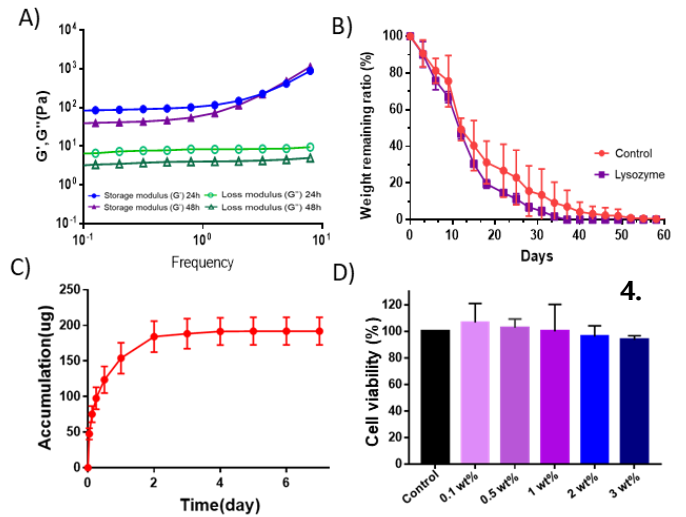


그림 2. 다기능성 다기능 양이온성 다당류 하이드로겔의 물리화학적 특성

#### 4.Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음. (NRF-2019R1A4A1028700),(NRF-2019R1C1C1006300)

#### 5.참고 문헌

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA: A Cancer Journal for Clinicians n/a(n/a).
- [2] J.P. Dutcher, Hematologic abnormalities in patients with nonhematologic malignancies, Hematology/oncology clinics of North America 1(2) (1987) 281-299.
- [3] L. Jia, X. Gao, Y. Wang, N. Yao, X. Zhang, Structural, phenotypic and functional maturation of bone marrow dendritic cells (BMDCs) induced by Chitosan (CTS), Biologicals 42(6) (2014) 334-338.
- [4] E.C. Carroll, L. Jin, A. Mori, N. Muñoz-Wolf, E. Oleszycka, H.B. Moran, S. Mansouri, C.P. McEntee, E. Lambe, E.M. Agger, The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons, Immunity 44(3) (2016) 597-608.