Bacillus Calmette-Guérin (BCG) 치료 불응성 표재성방광암 환자를 위한 면역항암제로서의 BCG-Cell Wall Skeleton

¹중앙대학교 의과대학 비뇨의학교실, ²중앙대학교 약학대학 약제학교실

황영미¹ · 윤다현¹ · 황광용¹ · 최영욱² · 장인호¹

Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Cell Wall Skeleton as Immunotherapeutic Option for BCG-Refractory Superficial Bladder Cancer

Young Mi Whang¹, Da Hyeon Yoon¹, Gwang Yong Hwang¹,
Young Wook Choi², In Ho Chang¹

¹Department of Urology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

²College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Although intravesical instillation of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the most successful cancer immunotherapy for superficial bladder cancer, the serious side effects are frequently arisen by using live mycobacteria. To allow less toxic and more potent immunotherapeutic agents following intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer, noninfectious immunotherapeutic drug instead of live BCG would be highly desirable. Recently, immune-enhancing adjuvants are considered an effective vaccine immunotherapy for cancer, providing enhanced antitumor effects and boosted immunity. The BCG-cell wall skeleton (BCG-CWS), the main immune active center of BCG, is a potent candidate as a noninfectious immunotherapeutic drug instead of live BCG against bladder cancer. However, the most limited application for anticancer therapy, it is difficult to formulate a water-soluble BCG-CWS due to the aggregation of BCG-CWS in both aqueous and nonaqueous solvents. To overcome the insolubility and improve the internalization of BCG-CWS into bladder cancer cells, it should be developed the lipid nanoparticulation of BCG-CWS, resulting in improved dispensability, stability, and small size. In addition, powerful technology of delivery systems should be applied to enhance the internalization of BCG-CWS, such as encapsulated into lipid nanoparticles using novel packaging methods. Here, we describe the progress in research on effects of BCG-CWS for cancer immunotherapy, development of lipid-based solvent, and packaging method using nanoparticles with drug delivery system. (Korean J Urol Oncol 2019;17:88-95)

Key Words: Bacillus Calmette-Guérin · Cell wall skeleton · Bladder cancer · Adjuvant immunotherapy · Drug delivery system

Received July 17, 2019, Revised August 7, 2019, Accepted August 10, 2019

Corresponding Author: In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, 102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea

E-mail: cauch@cau.ac.kr, Tel: +82-2-6299-1785, Fax: +82-2-6294-1406

ORCID code: <https://orcid.org/0000-0003-0240-1310>

• This research was supported by the National Research Foundation (NRF) of the Republic of Korea (NRF-2016R1D1A1B03933826 and NRF-2019R1I1A1A01061485 to Y.M.W., NRF-2018R1D1A1A02050248 to I.H.C.) and the Korea Health Technology R&D Project (HI17C0710 to I.H.C.).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2019 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

서론

결핵의 예방백신으로 사용되고 있는 *Mycobacterium bovis* 군주 bacillus Calmette-Guérin (BCG)는 현재 표재성방광암 (nonmuscle invasive bladder cancer) 환자의 방광 내 약물 주입 (intravesical live BCG instillation)을 통해 면역항암제로서 효과를 보여왔다.^{1,2} 1970년대 결핵 환자의 Morales에 의해 표재성방광암의 치료로 BCG 항암면역요법이 시도되었고,³ 효과는 인체의 면역기능을 촉진시키거나 인체의 면역기능이 암세포를 인지하여 암세포 일 수 있도록 능력을 키우는 방법으로 폐암을 비롯하여 방광암에 특히 많이 사용되고 있다.⁴ BCG 면역요법은 지금까지 시도된 방광 내 주입 약제 중에서 표재성방광암에서 항암억제제로 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 지금까지의 임상에서 발표된 결과에 의하면 수술만 시행한 군에 비해 BCG를 사용한 군의 종양 재발 억제 효과는 약 44%로 대조군에서의 재발률이 72%였으나, BCG 치료군은 약 28%로 높은 재발 방지 효과를 보였으며,⁵⁻⁷ 방광암 환자의 방광 내 주입요법의 화학적 항암제 mitomycin 투여 효과와 비교하여도 BCG 면역요법의 우수함이 보고되었다.^{8,9} 그러나, BCG 면역항암요법이 항암화학요법과 비교하여 부작용 발생이 더 빈번하며, 배뇨 시 통증과 자극 증상, 방광염 등의 경미한 부작용과 고열을 동반한 전립선염, 폐렴, 간염, 패혈증 및 알러지 반응 같은 BCG가 혈행으로 투입될 때 심각한 부작용도 초래될 수 있다.¹⁰ 또한 면역 단백질(cytokines) Interleukin-2 (IL-2) 나 interferon (IFN)- γ 등은 비특이적(nonspecific)으로 분비되며, 그 효과 또한 20% 이하로써 지속적인 투여가 요구되고 이에 따른 과투여에 의한 독성이 야기될 수 있다.¹¹ BCG 면역요법이 방광암에서 치료 효능이 높기는 하지만, BCG 치료의 한계를 극복하기 위해서는 BCG 본래의 항암면역기능은 극대화하면서 생백신 BCG의 전신감염 등의 위험을 없앨 수 있는 BCG 대체약물의 개발이 요구되는 것이 사실이다. Mycobacteria의 세포벽은 건조중량의 60%로 선천면역 반응을 유도하는 데 강력한 것으로 알려져 있으며 이중에서도 BCG-cell wall skeleton (BCG-CWS)가 사백신의 안정성을 가지면서 강력한 면역항암요법의 adjuvant로서 앞으로의 BCG 대체 물질 연구에 선두적으로 진행되어 왔다. BCG-CWS의 항암면역치료제로서의 임상적 유용성은 1970년대부터 Yamamura 등에 의하여 많이 연구되어 왔다.¹²⁻¹⁴ 이들 연구에서 BCG 대체물로 유망한 BCG-CWS의 제형을 임상에 적용하기 위해서는 거대분자 크기의 BCG-CWS의 크기를 감소시키고, 생백신인 BCG와 달리 세포골격으로 이루어진 사백신을 암세포로의 전달되어야 하는 문제들의 해결이 요구되

며, 이를 해결하기 위한 연구들에 대해 알아보고자 한다.

BCG 항암 면역치료요법의 한계

1. BCG의 항암 면역 작용기전

면역요법은 인체의 면역기능을 촉진시켜 환자의 면역력을 증가시킴으로써 암의 진행을 억제하거나 또는 인체의 면역기능이 암세포를 인지하여 암세포를 죽이는 방법으로 대표될 수 있다. 후자의 경우가 BCG 면역요법이 해당되며 IFN- α , IL-2, keyhole limpet hemocyanin 등의 면역제제가 이용되고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 방광 내 BCG는 fibronectin과 결합하여 integrin을 매개로 상피세포로 내재화된다. 내재화된 BCG는 방광상피세포막 표면의 항원을 표지함으로써 면역인식을 유발하게되고 면역반응과 관련 있는 대식세포, natural killer (NK) 세포, T 림프구 CD4+T 및 CD8+T 세포를 자극하여 T 세포에서 분비되는 각종 사이토카인의 분비를 촉진한다. 정상인과 비교하여 암 환자들의 면역력은 살상 T 림프구 활성이 억제되어 이에 관여하는 사이토카인류의 분비가 감소되었거나, 또는 기능의 변화로 암세포를 공격할 능력이 약하다. 면역세포 T 림프구를 활성화시키기 위해서는 활성화된 CD4+T 보조세포가 CD8+T세포를 자극하여야 하는데, 여기에 T 세포에서 분비되는 각종 사이토카인이 작용하게 된다. 방광암 환자에게 BCG 주입 후 뇨에서 tumor necrotic factor (TNF), TNF-related apoptosis-inducing ligand, IL-2, IL-8, IL-18, IL-12, IFN- γ 등의 사이토카인이 뇨에서 검출되어 이들 면역물질들이 BCG 항암 면역반응의 중요 조절물질로 작용하는 것으로 보여진다.¹⁸ T 림프구의 활성화로 IL-2 및 IFN- γ 가 소량 분비되나, BCG를 주기적으로 지속적 주입하게 되면 다량 분비된다. TNF- α 와 IFN- γ 는 방광암 세포 표면에 각각 class I, II 항원의 표현을 증가시킴으로써 CD4+ 혹은 CD8+ T cell이 BCG에 감염된 종양세포를 인식하도록 해준다. 그럼으로써 종양세포가 파괴되는데, 활성화된 대식세포나 비특이적인 세포가 이 과정에 부가적으로 작용하는 것으로 보인다. BCG로 유도된 대식세포와 호중구(neutrophils)의 증가는 NK, CD4+, CD8+ T 세포 또는 수지상세포를 활성화시키는데 BCG 주입 후 5배 증가된 T 세포가 2-3주 지속되고, 4-5주까지 8배까지 지속됨으로써 1회의 주입만으로도 6개월 이상 지속될 수 있다고 한다.¹⁹ BCG의 항암 면역 효능에 의한 종양억제 효과 외에 암세포의 세포 내 신호전달 체계를 통한 방광암 세포 사멸 등의 작용도 *in vitro* 결과로 보고되고 있으며 이에 대한 더 많은 기전적 연구가 진행되고 있다.²⁰⁻²²

2. BCG 면역요법의 한계

비근침윤성방광암에서 내시경적 절제술(transurethral resection of bladder tumor) 종양학적 결과는 상당히 좋으나, 5년 이내에 30%-80%의 환자에서 방광 내에 재발이 보고되고, 이 중 1%-45%의 환자에서 근침윤성방광암으로 진행이 야기된다.²³ 따라서 내시경적 방광종양절제술 이후에 재발이나 진행을 막기위하여 보조치료를 진행하게 되는데 방광 안으로 주입하는 약물에는 마이토마이신-C (Mitomycin-C) 등의 항암제 또는 BCG 면역요법을 시도한다. 약물의 선택은 기존에 내시경적으로 절제된 방광암의 병기와 정도에 따라 가장 효과적인 약물을 결정하게 된다. BCG 면역요법은 지금까지의 연구를 종합해 볼 때 내시경적 방광종양 절제술 단독 치료나 방광 내 항암화학제 등의 약물 주입과 비교하여 우수한 효능을 보인 것은 사실이지만 모든 환자에게 효과적인 것은 아니며 특히 항암요법 보다 더 많은 부작용이 발생하기도 하고 장기간 투여에 따른 문제점의 해결이 우선되어야 한다.^{24,25} 방광 내 BCG 투여는 6-12주간 매주 1회 투여하는 치료가 표준 치료이나, 재발률과 진행률을 낮추기 위해서는 최소 1년 이상에서 3년까지 장기간 유지하는 것이 필요한 것으로 보고되고 있다.^{26,27} BCG 면역요법을 통한 방광암의 완치에 대한 실패 요인들로는 완전한 종양의 제거가 이루어지지 않아 방광암이 근절되지 못하여 재발하거나, 발견되지 않은 근침윤성 또는 전이성방광암의 존재, natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP1) 유전자의 동질이상(polymorphism), 또는 BCG에 반응하지 않는 방광암의 경우로 보고되고 있다.²⁸⁻³⁰ BCG 면역요법을 실행했을 때 숙주세포의 선천면역반응으로 BCG의 세포 내로 내재화가 매우 어렵다는 또다른 문제점이 야기된다. BCG의 내재화를 증가시키기 위한 기전연구로서, BCG와 Toll-like receptor (TLR) 2 수용체와 결합 후 세포 내 MAPK 경로가 활성화로 항균펩타이드 발현을 증가시키고 이들 항균펩타이드는 세포 내 BCG의 내재화를 차단하는 요인으로써 상위경로인 MAPK 경로를 차단했을 때 BCG의 세포 내 내재화가 증가되었음을 제시하였다.³¹

BCG 대체 치료제로서의 BCG-CWS의 개발

1. BCG-CWS를 통한 BCG-adjuvant 치료제 면역항원 보강

BCG 백신은 감염에 의한 숙주 방어기전으로 강력한 선천면역반응(innate immune response)을 유발하게 되는데 2단계로 분류될 수 있다. 먼저, 백신으로 인해 T 림프구 및 B 림프구상의 항원-특이 수용체를 자극하는 항원을 전달하게

되고 대식세포의 활성화로 항원제시세포(antigen presenting cells, APCs)에 의한 세포독성 단백질 및 싸이토카인 분비를 촉진하여 MHC class II 분자를 다량 발현함으로써 활성화된 T 림프구에 의한 바이러스 감염 세포, 암세포, 세포 내 병원균을 제거한다.^{32,33} 생균 약독화 병원체를 접종하는 생백신 BCG의 경우에는 대식세포를 통한 이러한 신호가 매우 효과적으로 활성화될 수 있지만, 불활성화 백신, 특히 정제된 아단위 백신이나 펩티드 항원인 경우에는 이러한 반응 유도가 저해되어 면역원성이 크게 저하된다. 이를 보완하기 위한 방법으로 선천면역반응을 활성화시키는 adjuvant를 첨가하거나 백신매개체 등을 이용하여 백신항원의 효과를 향상시켜 면역반응을 더욱 강화시킬 수 있다. Adjuvant는 세포의 항원 결합부위에 수지상세포(dendritic cells), 대식세포를 통해 APCs를 자극하여 국소염증반응을 유발하고 T 세포의 활성화를 통해 항원의 면역원성을 증강시킨다.³⁴ Adjuvant에 의한 T 세포의 활성화로 costimulator와 IL-12 등의 싸이토카인을 분비시키고, APCs의 표면에서 MHC class II 발현을 증가시키는 항원을 adjuvant와 병합하면 세포매개 면역과 T 세포 의존 항체생산을 촉진시켜 효과적인 면역반응을 유도할 수 있다. BCG와 같은 결핵균의 면역반응을 일으키면서 생백신의 문제점을 보완한 BCG-CWS는 mycobacteria의 면역반응을 높이기 위한 첨가 물질 즉 adjuvant로써 항체 생산과 세포성 면역의 강화를 위해 항원과 함께 사용된다. BCG의 항암면역 활성을 위한 BCG-derived adjuvant가 일본에서 개발되어 왔으며 Yamamura와 Azuma 그룹의 시도로 살아있는 박테리아와 달리 감염의 위험이 없는 BCG-CWS adjuvant 치료의 초기 연구에 성공하여 component adjuvant의 선구자로 주목되었다.¹³ 대부분의 강력한 adjuvant는 세균 자체이거나 세균의 부산물이며 이 중에서도 mycobacteria의 세포벽 성분이 대표적이며 세포벽은 건조중량의 60%가 복합지질성분으로 BCG의 세포벽 CWS는 mycolic acid, arabinogalactan, peptidoglycan 등이 공유결합으로 구성되어 주요 면역반응을 담당한다. 이외에 lipoarabinomanan, 표면지질, 미코시드가 약 20 nm의 두께로 적층 구조를 이루고 있다. BCG의 세포벽 성분 중에서 세포벽골격(CWS), muramyl dipeptide, trehalose dimycolate, methanol extractable residue 등은 선천면역을 자극시키는 강력한 adjuvant로 알려져 있다. 이들 성분 중 CWS의 mycolic acid, arabinogalactan, peptidoglycan 복합체는 강력한 면역활성 미립자(immunoreactive microparticle)로 면역반응을 촉진시키거나, CTL의 증식과 NK 세포의 활성화를 촉진하여 항암 면역 효능을 가진다고 보고되었다.³⁵ BCG-CWS의 면역활성 기전으로는 TLR2와 TLR4의 발현을 증가시켜 수지상세포 활성화에 의한 강한 선천면역을 일으킨다.^{13,36-39} 최근에는 BCG-CWS에 의해

활성화된 TLR2를 매개로 nuclear factor- κ B 프로모터를 활성화시켜 암세포의 사멸을 유도하였고, adjuvant로 사용하였을 때 효율적으로 항체 생산을 유도시켜 세포독성 T 림프구의 증식을 향상, 면역항암 효과를 나타내었다.^{12,40}

2. BCG-CWS의 면역항암제의 임상적 적용

Mycobacteria의 세포벽은 항원제시 및 염증성 cytokines을 증가시켜 면역반응을 높은 수준으로 유도함에 따라 여러 암종의 치료에 시도되어왔다. 특히 폐암과 위암 초기 환자의 수술 직후 BCG-CWS 보조면역요법을 수행한 후에 종양의 감소를 2년간 예후를 관측하였을 때, 면역요법치료를 하지 않은 환자군과 비교하여 전체 생존율이 통계적으로 유의하게 높은 것으로 나타났다.^{41,42} 폐암 병기 stage III에 해당하는 환자의 BCG 항암면역 치료 시 5년 생존율이 통상적 항암화학요법치료를 받은 환자과 비교하여 5% 이상 증가된다고 보고되었다.⁴¹ 일본의 Osaka Medical Center의 Toyoshima, Hayashi, Kodama 등의 BCG-CWS 단독으로 피하주사로 주입 치료한 현대 임상 적용 방법에 대한 프로토콜을 1994년에 발표하였다. 이들은 전이성폐암 환자의 40%가 수술 후 BCG-CWS 단독으로 항암면역치료로 5년 생존율이 증가되었고, 이들 치료군 환자는 통상적 항암화학요법 환자와 비교해서 15%-20% 생존율이 증가된 것으로 보고하였다.⁴³ 이러한 결과는 부작용이 BCG 생백신보다 적은 BCG-CWS의 효과가 항암화학요법, 방사선치료와 비교해서도 매우 고무적인 결과라 할 수 있다. 그러나 BCG-CWS의 항암 면역백신의 보조 면역제로서 또는 단독 치료의 면역항암 효능을 보인 것은 이들 그룹의 폐암 환자에서 유의적 결과를 보였으나 방광암에 BCG-CWS를 도입하기 어려워 현재까지 방광암 환자의 임상례가 없는 실정이다. 방광암 환자에서 BCG의 방광 내 점적 주입법(intravesical instillation)을 시술할 때 Foley 도관(catheter)으로 BCG를 점적하게 되는데 BCG-CWS는 불용성이 매우 높고 지용성의 구성물질이 뭉쳐(aggregation) 시술하게되면 도관이 막히게 되는 문제로 이를 용해시킬 용매제와 방광 내 세포로의 운반의 문제를 해결해야 한다.

BCG-CWS는 분자량이 매우 크고 수용성 및 지용성 용매 모두에 녹지 않기 때문에 미네랄오일과 Tween 80 계면활성제로 BCG-CWS를 혼합한 후 유화제(oil-in-water O/W emulsion)를 이용하여 용해도를 증가시켜 약물로 투여한 연구가 시도되었다.^{12,43,44} 그러나 이들 BCG-CWS 용해물은 동물과 인체에 투여했을 때 염증반응에 의한 심각한 국소 독성의 부작용이 발생되어 투여 방법 또한 피내주사(intracutaneous injection)로 제한된다.⁴⁰ 결국, O/W 유화제에 녹인 BCG-CWS를 정맥주사(intravenous injection)와 같은 전신 투여(syste-

mic administration) 요법은 불가능하다 할 수 있다. BCG와 BCG-CWS의 항암면역원성의 우수성을 고려한다면 BCG-CWS의 용해도를 해결하고, 전신감염의 위험을 제거하는 시도는 새로운 항암제를 개발하는 것 이상의 가치가 있다 할 수 있다. 이러한 시도로 Nakamura 그룹은 BCG-CWS 나노입자제형(water-dispersible nanoparticle formulation)을 제조하여 정맥 투여 가능성을 제안하고 있으며⁴⁵ 방광암 환자의 임상적 성공을 위해서는 생백신인 BCG의 안정성을 보완한 무독화 BCG-CWS의 분자량을 줄이는 nanoparticle (나노입자) 단위의 분쇄와 정맥 투여보다 안전한 방광 내 주입의 방안이 앞으로 더 연구되어야 할 것이다(Fig. 1).

BCG-CWS의 제형을 위한 용해도 및 분리

BCG-CWS의 정확한 크기는 사용된 용매의 극성에 따라 크기가 좌우되며 정확한 측정이 불가하지만 식염수 같은 수용성 용매(hydrophilic solvents)에서 이중접힌시트구조(double folded sheet structure)를 이루고 있고, 이들 소수성 부분(hydrophobic moieties)간의 결합으로 4.7-67.8 μ m 거대한 응집체를 형성한다.⁴⁶ 반면에 소수성 용매(hydrophobic solvents)에서 0.4-1.1 μ m로써 수용성 용매에 용해시켰을 때 보다 크기가 많이 줄어들었으나 친수성 부분(hydrophilic moieties; peptidoglycan 층)이 안쪽으로 모이면서 다층구조의 시트가 겹쳐지면서 더 밀집된 응집체를 형성한다. 결국 BCG-CWS의 크기는 용매의 극성이 가장 큰 결정 요인이라 할 수 있다. BCG-CWS를 소수성 용매에 용해시켜 더 작은 분자의 제형을 제조할 수 있으나, 앞서 언급했듯이, BCG-CWS를 O/W 에멀전(emulsion)과 계면활성제를 이용하여 용해시켜 투여하였을 때 동물과 인체에 심각한 염증반응을 유발하였다.⁴⁰ 방광암에 치료를 위한 BCG-CWS를 O/W 에멀전화하여 용해시킨 제형은 적용하기에 매우 어렵기 때문에 이를 극복하기 위해서는 무엇보다도 BCG-CWS의 크기를 감소시키고 이를 세포 내로 운반할 약물전달체(drug delivery system)의 개발이 우선되어야 할 것이다. 최근에 Nakamura 그룹은 BCG-CWS를 초음파분쇄를 통해 166 nm 나노 단위의 입자(BCG-CWS encapsulated nano particle, CWS-NP)로 파쇄하여 리포솜에 봉입하는 패키지 방법(liposome evaporated via emulsified lipid)을 개발하여 방광암 마우스 세포와 방광암 마우스 동물 모델에서 효능을 제시하였다.⁴⁷ 세포 내 항원과 BCG-CWS와의 결합 반응의 재현성과 결합 효율을 높이기 위해서는 BCG-CWS가 용해된 부유액에서 BCG-CWS가 단일입자로 균질하게 부유되어 있어야 한다. Nakamura 그룹에서 강조한 균질화된 BCG-CWS 나노 입자의 제조 공정은 BCG-CWS를 pentane 용매와 R8-

Fig. 1. Schema of the present study. Although live bacillus Calmette-Guérin (BCG) has a highly potent adjuvant activity, its use is limited to the treatment of bladder cancer via intravesical administration because of the danger of infections. The noninfectious adjuvant component, BCG-cell wall skeleton (BCG-CWS), is also limited to local injection because of its tendency to undergo aggregation. The nanoparticulated form of BCG-CWS is a highly uniform dispersion without any detectable aggregation. Therefore, BCG-CWS nanoparticle can be applied to the treatment of cancers other than bladder cancer via systemic administration.

modified liposomes에 혼합한 부유액을 초음파 분쇄를 통해 나노 단위의 입자를 만든 후 유기 용매인 pentane을 증발시킨 것으로 CWS-NP/Hyd 방법 및 에탄올에 다시 용해시켜 처리하였다.⁴⁸ 최근까지의 연구를 통해 BCG-CWS의 부유액에 용해도를 증가시키고 BCG-CWS의 거대분자를 나노입자로 절단하는 방법이 BCG-CWS 제형 개발의 주요 방향으로 여겨진다. BCG-CWS를 초음파 파쇄를 이용한 나노입자를 만드는 단계는 기술적으로 큰 노하우를 요하지 않는다. 무엇보다도 파쇄된 BCG-CWS를 부유시켜 용해시킬 용매재의 선택이 중요하며, BCG-CWS 자체는 생백신 BCG와 비교하여 생균에 대한 부작용이 적으나 투여용량이 상대적으로 많이 요구되어 고용량의 투여에 따른 크기의 감소 또한 중요하다 할 수 있다. BCG-CWS의 소수성기가 수용액 또는 친수성 용액에서 서로 엉겨 응집체를 형성하는 문제로 주로 BCG-CWS의 부유액을 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올의 C1-4 알콜 또는 벤질 알코올 등에 이용하여 제조하게 되며 용매에 따라 BCG-CWS의 크기 또한 다양하다.

BCG-CWS의 분리 정제는 1974년 Azuma 그룹에서 발표한 방법으로 최근까지 분리하여 왔으며, 충남대학교 미생물교실에서 정제한 BCG-CWS는 세포벽골격을 2-propanol 또는 알콜류에 부유시켜 BCG-CWS 농도가 10% (건조중량 100 mg/mL)를 유지시켜 응집체를 이루지 않고 -20℃에서 안정한 상태를 유지하였다.⁴⁹ 또한 이들 그룹에서는 BCG-

CWS는 항원의 결합 효율을 정량적으로 평가하고, 응집체가 아닌 단일 입자로 균질하게 부유할 수 있는 부유물을 제조하였다. 용매로 에탄올, 이소프로판올 또는 벤질알콜을 1%-10% (v/v) 함유하는 완충용액에 부유하여 1% 에탄올 내에 0.02% Tween-80 계면활성제 혼합물을 사용하여 항원이 결합된 CWS를 단일 입자수준의 균질한 부유액으로 BCG-CWS의 free carboxyl-group을 일차 아민에 대한 반응성이 높은 유도체로 활성화시켰다. 이들 그룹에서 발명한 BCG-CWS를 대장암의 방사선치료의 adjuvant로 사용하여 *in vitro*와 *in vivo* 모델에서 모두 TLR2의 발현을 활성화시키고 자가포식(autophagy) 반응을 증가시켜 방사선 항암요법에 대한 민감도를 높인다는 결과를 보고하였다.⁵⁰ 따라서 BCG-CWS는 면역항암요법의 adjuvant 보조제로 다양한 암종에 적용될 수 있으며 용해도를 증가시키는 부유액의 결정과 BCG-CWS를 나노입자로 파쇄하여 이를 암세포에 내재화시킬 수 있는 최적의 약물 전달체의 개발이 우선되어야 할 것이다.

결 론

BCG 백신을 이용한 면역항암요법은 화학적 항암요법과 비교하여 방광암에 특화된 효능을 가지고 화학적 항암제 사용으로 인한 부작용은 적은 편이지만, 결국 생체 내에서

mycobacteria의 life cycle을 모방하여 숙주의 면역반응을 유도하는 생백신으로 방광 내로 고용량의 BCG를 주입하게 되면 전신 감염의 위험은 피할 수 없다. BCG-CWS는 BCG 생백신을 대체하여 면역반응을 유도하는 adjuvant로 도입했을 때 여러 암종에 우수함을 보여왔다. 방광암에서 매우 효과적인 BCG 생백신을 대체할 BCG-CWS는 보완되고 개선해야 할 문제점을 해결한다면 방광암의 주요 항암면역제로 유용할 것으로 보인다. 첫 번째로, BCG의 장점을 BCG-CWS에 도입하는 것으로 약물 전달 시스템의 응용이다. 항암물질에 약물전달시스템을 이용하는 가장 주요 목적은 약물을 암 부위를 표적하여 전달함으로써 주위의 정상 조직과 정상 세포를 손상시키지 않는 것이다. 살아있는 생백신 BCG는 항원을 표적하는 능력이 있어 방광벽의 fibronectin을 매개로 결합하여 세포 내로 내재화 된다.⁵¹ 세포벽만 분리한 BCG-CWS는 생백신 BCG와 달리 방광 조직 내로 주입했을 때 세포벽을 침투할 수 있는 능력이 없어 이를 해결하기 위해서는 약물전달시스템 도입이 필수적이다. 이를 통해 BCG-CWS의 방광 조직 내로의 침투 및 암세포와의 결합, 생체 내 균일한 분포, 항암면역 감수성 증대 등으로 BCG 면역요법의 결점과 한계성을 극복한다. 두 번째는 거대 응집체 BCG-CWS를 나노 단위의 입자로 용매에 균질하게 용해시킨 제형으로 완성하는 것이다. 초음파 파쇄기를 통해 BCG-CWS 나노입자의 용매에 분포된 입자들 크기는 100 nm 이하까지 가능하였다. BCG-CWS 나노 구조에 리포솜을 도입함으로써 독특한 물리화학적 및 생화학적 특성을 갖춰 방광암 조직들의 침투 장애를 극복하는 능력을 향상시켜 방광암에서 면역항암요법의 치료제로의 응용에 좋은 재료가 될 것이다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

- Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell MA, Oderda M, Sylvester R, et al. The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2010;57:410-29.
- Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, Nishiyama H, Akaza H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci* 2013;104:22-7.
- Morales A, Ottenhof P, Emerson L. Treatment of residual, non-infiltrating bladder cancer with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 1981;125:649-51.
- Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. *Adv Urol* 2012; 2012:181987.
- Lamm DL. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. *J Urol* 1985;134:40-7.
- Yamamoto T, Hagiwara M, Nakazono M, Yamamoto H. Intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the treatment of superficial bladder cancer. Prospective randomized study for prophylactic effect. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1990; 81:997-1001.
- Pagano F, Bassi P, Milani C, Meneghini A, Maruzzi D, Garbeglio A. A low dose bacillus Calmette-Guerin regimen in superficial bladder cancer therapy: is it effective? *J Urol* 1991;146:32-5.
- Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1991;325:1205-9.
- Bassi P. BCG (Bacillus of Calmette Guérin) therapy of high-risk superficial bladder cancer. *Surg Oncol* 2002;11:77-83.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Compérat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 2013;64:639-53.
- Poppas DP, Pavlovich CP, Folkman J, Voest EE, Chen X, Luster AD, et al. Intravesical bacille Calmette-Guérin induces the antiangiogenic chemokine interferon-inducible protein 10. *Urology* 1998;52:268-75.
- Yamamura Y, Azuma I, Taniyama T, Sugimura K, Hirao F, Tokuzen R, et al. Immunotherapy of cancer with cell wall skeleton of Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guérin: experimental and clinical results. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 277:209-27.
- Azuma I, Ribi EE, Meyer TJ, Zbar B. Biologically active components from mycobacterial cell walls. I. Isolation and composition of cell wall skeleton and component P3. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:95-101.
- Matsumoto M, Seya T, Kikkawa S, Tsuji S, Shida K, Nomura M, et al. Interferon gamma-producing ability in blood lymphocytes of patients with lung cancer through activation of the innate immune system by BCG cell wall skeleton. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1559-69.
- Molto L, Alvarez-Mon M, Carballido J, Manzano L, Guillen C, Prieto A, et al. Intracavitary prophylactic treatment with interferon alpha 2b of patients with superficial bladder cancer is associated with a systemic T-cell activation. *Br J Cancer* 1994;70:1247-51.
- Giannopoulos A, Constantinides C, Fokaeas E, Stravodimos

- C, Giannopoulou M, Kyroudi A, et al. The immunomodulating effect of interferon-gamma intravesical instillations in preventing bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2003;9:5550-8.
17. Jurincic-Winkler C, Metz KA, Beuth J, Sippel J, Klippel KF. Effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bacillus Calmette-Guérin (BCG) instillation on carcinoma in situ of the urinary bladder. *Anticancer Res* 1995;15(6B):2771-6.
18. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11:153-62.
19. Kiselyov A, Bunimovich-Mendrazitsky S, Startsev V. Treatment of non-muscle invasive bladder cancer with Bacillus Calmette-Guérin (BCG): biological markers and simulation studies. *BBA Clin* 2015;4:27-34.
20. Beghini KR, Rizzi C, Campos VF, Borsuk S, Schultze E, Yurgel VC, et al. Auxotrophic recombinant Mycobacterium bovis BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:1543-52.
21. Schwarzer K, Foerster M, Steiner T, Hermann IM, Straube E. BCG strain S4-Jena: an early BCG strain is capable to reduce the proliferation of bladder cancer cells by induction of apoptosis. *Cancer Cell Int* 2010;10:21.
22. Redelman-Sidi G, Iyer G, Solit DB, Glickman MS. Oncogenic activation of Pak1-dependent pathway of macropinocytosis determines BCG entry into bladder cancer cells. *Cancer Res* 2013;73:1156-67.
23. van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009;56:430-42.
24. Gudjonsson S, Adell L, Merdasa F, Olsson R, Larsson B, Davidsson T, et al. Should all patients with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a prospective randomised multicentre study. *Eur Urol* 2009;55:773-80.
25. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Witjes JA. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials. *Eur Urol* 2008;53:709-19.
26. Böhle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 2003;169:90-5.
27. Oddens J, Brausi M, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, et al. Final results of an EORTC-GU cancers group randomized study of maintenance bacillus Calmette-Guérin in intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the urinary bladder: one-third dose versus full dose and 1 year versus 3 years of maintenance. *Eur Urol* 2013;63:462-72.
28. van der Heijden AG, Kiemeny LA, Gofrit ON, Nativ O, Sidi A, Leib Z, et al. Preliminary European results of local microwave hyperthermia and chemotherapy treatment in intermediate or high risk superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2004;46:65-71.
29. Di Stasi SM, Giannantoni A, Giurioli A, Valenti M, Zampa G, Storti L, et al. Sequential BCG and electromotive mitomycin versus BCG alone for high-risk superficial bladder cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006;7:43-51.
30. Søborg C, Andersen AB, Madsen HO, Kok-Jensen A, Skinhøj P, Garred P. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;186:517-21.
31. Whang YM, Jin SB, Park SI, Chang IH. MEK inhibition enhances efficacy of bacillus Calmette-Guérin on bladder cancer cells by reducing release of Toll-like receptor 2-activated antimicrobial peptides. *Oncotarget* 2017;8:53168-79.
32. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996;64:683-90.
33. Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001;60 Suppl 3:iii6-12.
34. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today* 1993;14:281-4.
35. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001;1:20-30.
36. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995;64:29-63.
37. Rhoades ER, Geisel RE, Butcher BA, McDonough S, Russell DG. Cell wall lipids from Mycobacterium bovis BCG are inflammatory when inoculated within a gel matrix: characterization of a new model of the granulomatous response to mycobacterial components. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:159-76.
38. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;68:6883-90.
39. Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, et al. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin peptidoglycan. *Infect Immun* 2003;71:4238-49.
40. Ochiai T, Sato H, Hayashi R, Asano T, Sato H, Yamamura Y. Postoperative adjuvant immunotherapy of gastric cancer with BCG-cell wall skeleton. 3- to 6-year follow up of a randomized clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 1983;

- 14:167-71.
41. Yasumoto K, Manabe H, Yanagawa E, Nagano N, Ueda H, Hirota N, et al. Nonspecific adjuvant immunotherapy of lung cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Res* 1979;39:3262-7.
42. Ochiai T, Sato H, Sato H, Hayashi R, Asano T, Isono K, et al. Randomly controlled study of chemotherapy versus chemimmunotherapy in postoperative gastric cancer patients. *Cancer Res* 1983;43:3001-7.
43. Kodama K, Higashiyama M, Takami K, Oda K, Okami J, Maeda J, et al. Innate immune therapy with a *Bacillus Calmette-Guérin* cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study. *Surg Today* 2009;39:194-200.
44. Hayashi A, Nishida Y, Yoshii S, Kim SY, Uda H, Hamasaki T. Immunotherapy of ovarian cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin: effect of lymphadenectomy. *Cancer Sci* 2009;100:1991-5.
45. Masuda H, Nakamura T, Noma Y, Harashima H. Application of BCG-CWS as a systemic adjuvant by using nanoparticulation technology. *Mol Pharm* 2018;15:5762-71.
46. Uenishi Y, Kawabe K, Nomura T, Nakai M, Sunagawa M. Morphological study on *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 cell wall skeleton (SMP-105). *J Microbiol Methods* 2009;77:139-44.
47. Nakamura T, Fukiage M, Higuchi M, Nakaya A, Yano I, Miyazaki J, et al. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *J Control Release* 2014;176:44-53.
48. Homhuan A, Kogure K, Akaza H, Futaki S, Naka T, Fujita Y, et al. New packaging method of mycobacterial cell wall using octaarginine-modified liposomes: enhanced uptake by and immunostimulatory activity of dendritic cells. *J Control Release* 2007;120:60-9.
49. Paik TH, Lee JS, Kim KH, Yang CS, Jo EK, Song CH. Mycobacterial cell-wall skeleton as a universal vaccine vehicle for antigen conjugation. *Vaccine* 2010;28:7873-80.
50. Yuk JM, Shin DM, Song KS, Lim K, Kim KH, Lee SH, et al. *Bacillus calmette-guerin* cell wall cytoskeleton enhances colon cancer radiosensitivity through autophagy. *Autophagy* 2010;6:46-60.
51. Ludlam GB, Bridges JB. Association of Stevens-Johnson syndrome with antibody for *mycoplasma pneumoniae*. *Lancet* 1964;1:958-9.