

Intravezikální imunoterapie v léčbě karcinomu močového měchýře: dlouhodobé výsledky

MUDr. Petr Hušek, FEBU¹, MUDr. Jaroslav Pacovský, Ph.D.¹, MUDr. Miroslav Podhola, Ph.D.²,
prof. MUDr. Miloš Brodák, Ph.D.¹

¹Urologická klinika UK a FN Hradec Králové

²Fingerlandův ústav patologie UK a FN Hradec Králové

Cíl: BCG (Bacillus Calmette-Guérin) je oslabené mykobakterium původně vyvinuté jako vakcinace proti tuberkulóze. Při intravezikální aplikaci této vakcíny byl prokázán protinádorový efekt se signifikantním snížením pravděpodobnosti progresu onemocnění u pacientů s high grade NMIBC (Non Muscle Invasive Bladder Cancer) a CIS (Carcinoma In Situ) po kompletní endoresekcí tumoru (TUR). Cílem naší práce bylo zhodnotit soubor 82 pacientů, kteří na našem pracovišti podstoupili léčbu BCG vakcínou v letech 2001–2017.

Metoda: Bylo retrospektivně hodnoceno: věk, pohlaví, životní styl (kouření), velikost tumoru, přítomnost či nepřítomnost CIS, EORT skóre rekurence a progresu. Pacienti byli rozděleni do skupiny BCG úspěch a BCG selhání. Do skupiny BCG selhání byli zařazeni pacienti s recidivou high grade tumoru a CIS či s progresí do MIBC nebo dokonce zemřeli na karcinom močového měchýře během sledování.

Výsledky: Doba sledování pacientů byla od 2 do 13 roků. Úspěch BCG léčby byl pozorován u 68 % pacientů, selhání BCG léčby bylo u 32 % pacientů. Ve skupině selhání se jednalo o rekurenci onemocnění u 23 % pacientů a progresi onemocnění u 9 % pacientů. 5 % pacientů zemřelo na karcinom močového měchýře. Průměrná doba do selhání BCG terapie byla deset měsíců.

Závěr: V našem souboru pacientů byl potvrzen dobrý klinický efekt BCG instilační terapie u pacientů high grade NMIBC a CIS močového měchýře s minimálním výskytem komplikací.

Klíčová slova: BCG, karcinom močového měchýře, CIS.

Immunotherapy in the bladder cancer treatment: long-term results

Aim: BCG is an attenuated mycobacterium developed as a vaccine for tuberculosis that has demonstrated antitumor activity in BC (bladder cancer) intravesical instillation after complete endoresection of tumor (TUR), and significantly reduces the progression risk of high grade NMIBC and CIS. Aim of article was an evaluation of 82 patients who underwent BCG procedure in our clinical center between 2001–2017.

Methods: We retrospectively evaluated age, gender, tumor size, smoking, CIS presence, recurrence and progression EORT score in time resection. Patients were divided to two groups: BCG success and BCG failure. BCG failure group are patients with recurrence high grade tumor and CIS or with progression to MIBC or died due to bladder cancer during follow-up.

Results: Time of follow-up was from 2 to 13 years. BCG success was demonstrated by 68 % patients, and BCG failure by 32 % patients. There was recurrence in 23 % patients and progression in 9 %. 5 % patients died due to bladder cancer. An average time to failure of BCG therapy was 10 months.

Conclusion: We confirmed good clinical outcomes BCG instillation therapy for patients with high grade NMIBC and CIS with low rate side effects.

Key words: BCG, bladder cancer, CIS.

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Petr Hušek, FEBU, petr.husek@fnhk.cz

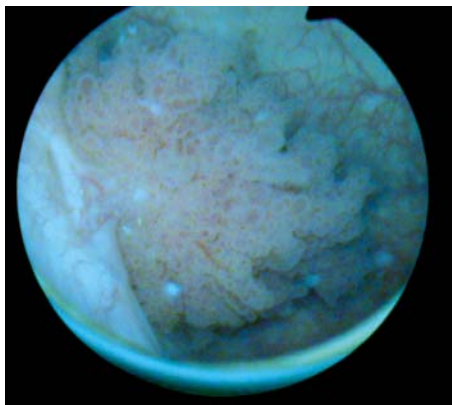
Urologická klinika UK a FN, Sokolská tř. 850, 500 05 Hradec Králové

Cit. zkr: Urol. praxi 2020; 21(4): 182–186

Článek přijat redakcí: 31. 5. 2020

Článek přijat k publikaci: 8. 6. 2020

Obr. 1. High grade karcinom – endoskopický pohled (zdroj: archiv Urologická klinika FN HK)



Obr. 3. Carcinoma in situ – endoskopický pohled (zdroj: archiv Urologická klinika FN HK)

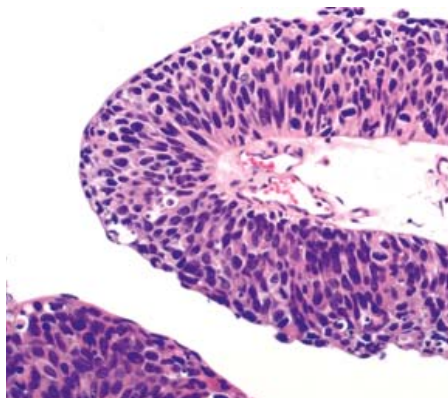


Úvod

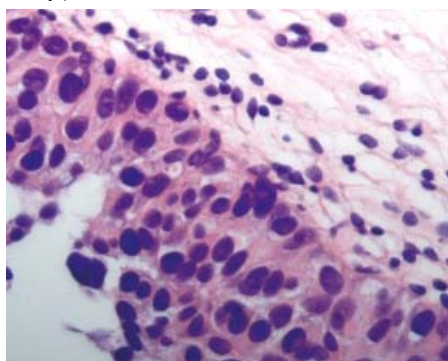
Karcinom močového měchýře je druhou nejčastější malignitou postihující močové cesty. Až 75 % pacientů je postiženo neinvazivní formou (Non Muscle Invasive Bladder Cancer – NMIBC) postihující pouze sliznici a podslizniční tkáň (obrázky 1 a 2). Carcinoma in situ (CIS) je velmi specifickou podskupinou NMIBC, jedná se o nepapilární plochou nádorovou lézi, která je snadno přehlédnutelná při cystoskopickém vyšetření. Až u 54 % pacientů s CIS, pokud nejsou adekvátně léčeni, přechází nádor do invazivní nebo metastatické formy (obrázky 3 a 4).

Pacienti s NMIBC jsou indikováni k transuretrální resekci tumoru (TUR), a to samostatně nebo v návaznosti na adjuvatní léčbu. Ta spočívá v intravezikální chemoterapii či Bacillus Calmette-Guérin (BCG) intravezikální imunoterapii. BCG je oslabené mykobakterium původně vyvinuté jako vakcína proti tuberkulóze. Při intravezikální aplikaci této vakcíny byl prokázán protinádorový efekt se signifikantním snížením pravděpodobnosti progresu onemocnění u pacientů s NMIBC high grade tumory a CIS. Základem léčby MIBC

Obr. 2. High grade karcinom – mikroskopický obraz (zdroj: prim. MUDr. M. Podhola FÚP FN HK)



Obr. 4. Carcinoma in situ – mikroskopický obraz (zdroj: prim. MUDr. M. Podhola FÚP FN HK)



(Muscle Invasive Bladder Cancer) je radikální cystektomie, tedy rozsáhlý chirurgický výkon, výrazně mutilující pacienty s výrazným dopadem na kvalitu jejich života. Nutnou součástí výkonu je zajištění derivace moči. Pacienti s high grade NMIBC a CIS jsou hraniční skupinou mezi NMIBC a MIBC, kde je možno volit konzervativní či radikální léčebný přístup. Konzervativní léčba spočívá v kompletní endoresekcii tumoru a adjuvatní intravezikální BCG imunoterapii. Radikální léčba tkví v radikální cystektomii. V současnosti neexistuje klinicky využitelný marker, který by pomohl optimalizovat léčbu. Na jedné straně existuje riziko ze selhání konzervativní terapie, na druhé straně pak neadekvátní mutilace pacienta spojená s radikální cystektomií (*overtreatment*).

Cíl

Na našem pracovišti má BCG instalační terapie dlouhodobou tradici a patří ke standardní léčbě indikovaných pacientů. Cílem práce bylo zhodnocení dlouhodobých výsledků léčby pacientů s využitím instalace BCG vakcíny.

Soubor a metoda

Retrospektivně jsme zhodnotili data 82 pacientů s povrchovým high grade karcinomem

močového měchýře (Ta, T1, CIS), kteří prodělali instalační BCG terapii po kompletní endoresekcii tumoru na našem pracovišti mezi lety 2001–2017. Základní soubor byl rozdělen podle klinické odpovědi do dvou podskupin; na skupinu s dobrou odpovědí (BCG úspěch) a skupinu se selháním léčby (BCG selhání). Do skupiny BCG úspěch byli zařazeni pacienti bez recidivy high grade karcinomu či CIS po dobu sledování. Do skupiny pacientů s BCG selháním byli zařazeni pacienti, kde došlo buď k rekurenci high karcinomu či CIS bez ohledu na rozsah recidivy. Dále pak sem byli zařazeni pacienti s progresí onemocnění do MIBC či úmrtím na chorobu během doby sledování. Výskyt low grade recidivy (pTa) karcinomu močového měchýře během sledování není selháním léčby, tito pacienti byli též zařazeni do skupiny BCG úspěch. Doba sledování pacientů byla 2 až 13 roků.

K zařazení do studie musely být splněny následující podmínky: kompletní hluboká resekce tumoru s přítomností svaloviny detruzoru ve vzorku, žádná předchozí instalační terapie, kompletní tříměsíční indukční terapie BCG vakcínou následovaná udržovací BCG terapií. Schéma podávání udržovací BCG terapie není jednoznačně definováno žádnými doporučeními. Na našem pracovišti je dodržován protokol udržovací BCG terapie, spočívající v aplikaci BCG vakcíny v tříměsíčních cyklech. V každém cyklu jsou podány tři dávky v týdenních intervalech. Doba trvání udržovací terapie byla minimálně 12 měsíců, pokud nedošlo k selhání terapie dříve. Pacienti absolvují každé tři měsíce kontrolní cystoskopii. Tyto definované podmínky splnilo 66 pacientů a ti byli zařazeni do studie.

Během sledovaného období byly k instalační imunoterapii využity dva komerčně dostupné preparáty. Do přelomu roku 2012–2013 byl používán preparát ImmuCyst® (Sanofi Pasteur S.A., Lyon, Francie, 81 mg, kmen Connaught) do jeho výpadku na trhu. Následně byl tento preparát nahrazen přípravkem BCG-medac® (medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate, Hamburg, Německo, 80 mg, kmen RIVM/1). Pacienti, kde pro úplný výpadek BCG na trhu nebylo možno dokončit výše uvedené schéma podávání BCG vakcíny, byli z této studie vyřazeni. Vzhledem k tomu, že na základě výsledků metaanalýz studií nebylo zjištěno signifikantních rozdílů léčby BCG vakcínou rozdílných kmenů či výrobců, jsme analyzovali náš soubor pacientů jako celek, bez ohledu na použitý preparát (1). Oba užívané preparáty by-

ly podávány striktně dle doporučení výrobce. Pacient vždy omezil příjem tekutiny čtyři hodiny před instilací a dvě hodiny po ní. Před samotnou instilací byl močový měchýř řádně vyprázdněn. Preparát byl instilován do močového měchýře jednorázovou cévkou za sterilních podmínek. Zavedení močového katétru musí vždy být zcela volné, atraumatické. BCG vakcína by měla být instilována do měchýře pod nízkým tlakem. Doba trvání samotné instilace je dvě hodiny, je vhodné pravidelné přetáčení pacienta na lůžku po 15 minutách, tak aby vakcína přišla do kontaktu s celým povrchem sliznice močového měchýře. Po dvou hodinách aplikace instilační medium pacient vymočí.

U sledovaného souboru jsme hodnotili demografická data: věk, pohlaví, životní styl (kouření). Dále jsme hodnotili charakteristiky nádoru: velikost tumoru (< 3 cm/≥ 3 cm), přítomnost či nepřítomnost CIS ve vzorku. U všech tumorů se vypočítalo EORT skóre rekurence a progresu. Pokud došlo k selhání léčby, byla hodnocena doba do selhání a jeho závažnost (rekurence, progresu, smrt). Pro porovnání věku a skóre mezi skupinami byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Pro parametrická data byl užít χ^2 test. Dále jsme hodnotili i výskyt závažných komplikací spojených s BCG léčbou.

Výsledky

Celkově byla hodnocena data 66 pacientů. BCG úspěch po dobu sledování byl pozorován u 45 (68 %) pacientů, selhání BCG léčby bylo u 21 (32 %) pacientů. Ve skupině selhání se jednalo o rekurenci onemocnění u 15 (23 %) pacientů a progresi onemocnění u 6 (9 %) pacientů. Tři (5 %) pacienti zemřeli na karcinom močové měchýře. Průměrná doba do selhání BCG terapie byla deset měsíců.

Obě skupiny pacientů (úspěch BCG/selhání BCG) byly homogenní bez statisticky významných odchylek. Mezi oběma skupinami BCG nebyl signifikantní rozdíl v pohlaví, velikosti tumoru, přítomnosti CIS a kuřáctví. BCG selhání bylo spojené s vyšším skóre rekurence ($p=0,0109$). Skóre progresu nebylo spojeno se statistickou signifikací s BCG selháním v naší skupině pacientů ($p=0,188$). Data jsou prezentována tabulkou (tabulka 1).

V našem souboru se vyskytla alergická reakce u 3 (3,6 %) pacientů na podanou BCG vakcínu. Všechny byly zvládnuté ambulantně vysazením léčby a protialergickou terapií. Závažné kompli-

kace se objevily u 2 (2,4 %) pacientů. Jednalo se BCG sepsi s rozvojem BCG pneumonie (BCGitis). Oba stavy byly zvládnuty intenzivní protišokovou terapií s následovanou dlouhodobou antituberluzózní léčbou. Oba stavy byly s nejvyšší pravděpodobností spojeny s poraněním močové trubice během cévkování.

Diskuze

Karcinom močového měchýře je typickou malignitou vyššího věku. Častěji se vyskytuje u mužů, což je dáno větším zastoupením kuřáků mezi muži a častějšímu vystavení mužů rizikovým faktorům v zaměstnání. V porovnání s ostatními regiony patří Česká republika k zemím s nejvyšším výskytem karcinomu močového měchýře nejen v rámci EU, ale i celosvětově. S naší celkovou incidencí 13,2/100 000 obyvatel jsme na 5. místě v EU a 8. místě v celosvětovém porovnání (2). V době diagnózy je průměrně 75 % nádorů ve stadiu do svalů neinvazujícího nádoru stadia Ta, T1 či *carcinoma in situ* (CIS) (3).

Diagnostika karcinomu močového měchýře je založena na klinických symptomech, zobrazovacích a endoskopických event. cytologických vyšetřeních. Nádorové markery jsou jistě budoucností diagnostiky a sledování pacientů s karcinomem močového měchýře. Ze známých nádorových markerů zatím bohužel žádný nedosáhl takové senzitivity či specifity, aby mohl být využit v běžné klinické praxi. Léčba NMIBC je založena na snaze o kompletní endoskopické odstranění tumoru a to samostatně či ve spojení s intravezikální instilační léčbou.

Intravezikální chemoterapie spočívá v aplikaci mitomycinu-C (případně epirubicin, doxorubicin méně častěji) do močové měchýře. Jako neefektivnější se jeví okamžitá jednorázová aplikace do 24 hodin (nejlépe do 2 hodin) po provedené endoresekcii s cílem zabránit implantačním metastázám v močovém měchýři po endoresekcii (4). Užívání následné intravezikální

chemoterapie je spojeno s problematikou nejasného dávkování a doby trvání léčby. Smysluplná se zdá jen u níže rizikových pacientů, kde snižuje pravděpodobnost recidivy (5).

Intravezikální BCG instilační terapie je určena pro vysoce rizikové pacienty s *high grade* tumorem a CIS. Potřeba je však zdůraznit, že její využití v léčbě *high grade* NMIBC a CIS je jedním z neúspěšnějších využití imunoterapie v léčbě nádorového onemocnění (6, 7, 8, 9). BCG instilační terapie je spojena s celou řadou otázek a problémů. Jedním z problémů jsou časté výpadky BCG vakcíny na trhu s léčiv v posledních letech. Následkem toho je snížená dostupnost BCG vakcíny pro klinické využití, a to nezdědka vede k nedodržení schématu podávání. Další dlouhodobě problematickou záležitostí je správná aplikace a dávkování BCG vakcíny. Obecná shoda je pouze na indukční terapii BCG, která spočívá v aplikaci šesti dávek v jednotýdenních intervalech. Zejména pak v udržovací BCG terapii jsou významné rozdíly mezi jednotlivými pracovišti, pokud je vůbec podávána. Z posledních doporučení EAU Guidelines má nejlepší dlouhodobé výsledky tři roky trvající udržovací léčba. Schéma léčby zahrnuje vždy tři dávky v intervalu jednoho týdne a to v 3., 6., 12., 18., 24., 30., a 36. měsíci (10, 11).

Dobrá účinnost BCG vakcíny je vykoupena celou řadou nežádoucích efektů. Nicméně závažnější vedlejší účinky jsou popsány u méně než 5 % pacientů (12). Nejčastější jsou lokální komplikace způsobené iritací sliznice močového měchýře BCG vakcínou, jako je cystitida či hematurie. Tyto obtíže jsou většinou snadno zvladnutelné a nebývají důvodem přerušení léčby. Jak již bylo řečeno, závažné komplikace s BCG instilační terapií jsou vzácné a téměř vždy jsou spojeny s nedodržením zásad správného podávání či kontraindikací. Systémová reakce organismu je spojena s průnikem mycoplasmat do krevního řečiště (BCG septikemie), což vede k bouřlivé imunitní odpovědi. Mezi takto závažné stavy

Tab. 1. Demografická charakteristika obou podskupin pacientů

Charakteristika	BCG selhání (n = 16)	BCG úspěch (n = 41)	p
Věk (průměr)	68 (51–79)	67 (42–84)	0,901
Kouření n (%)	8 (50 %)	30 (73 %)	0,0619
Mužské pohlaví n (%)	13 (81 %)	34 (83 %)	1,00
Velikost tumoru nad 3 cm n (%)	7 (44 %)	22 (54 %)	0,770
Skóre rekurence (průměr)	10 (6–13)	8 (2–12)	0,0109
Skóre progresu (průměr)	14 (10–20)	12 (5–20)	0,188
Přítomnost CIS n (%)	5 (31 %)	14 (34 %)	1,00

p – porovnání mezi skupinou pacientů BCG selhání a BCG úspěch

Tab. 2. EORT (European Organization for Research and Treatment of Cancer) nomogram k učení rizika recidivy/progrese nádoru měchýře (zdroj: zdravi.euro.cz)

Faktor		Recidivy	Progrese
Počet			
solitární		0	0
2 až 7		3	3
více než 8		6	3
Velikost			
do 3 cm		0	0
nad 3 cm		3	3
Primo/rec			
primozáchyt		0	0
do roku		4	2
po roce		2	2
Invaze			
Ta		0	0
T1		1	4
CIS			
ne		0	0
ano		1	6
Grade			
G1		0	0
G2		1	0
G3		2	5
Celkové skóre		0 až 17	0 až 23
Skupina	Skóre recidiv	1 rok	5 let
I	0	15 % (10–19 %)	31 % (24–37 %)
II	1–4	24 % (21–26 %)	46 % (42–49 %)
III	5–9	38 % (35–41 %)	62 % (58–65 %)
IV	10–17	61 % (55–67 %)	78 % (73–84 %)
Skupina	Skóre progrese	1 rok	5 let
I	0	0,2 % (0–0,7 %)	0,8 % (0–1,7 %)
II	2–6	1 % (0,4–1,6 %)	6 % (5–8 %)
III	7–13	5 % (4–7 %)	17 % (14–20 %)
IV	14–23	17 % (10–24 %)	45 % (35–84 %)

patří BCG sepse, BCG pneumonitida, vzácně byly popsány i BCG hepatitida, BCG osteomyelitida či artritida. Léčba těchto komplikací vyžaduje zejména v první fázi intenzivní protišokovou

terapii. Po zvládnutí akutního stavu pak následuje mnohaměsíční léčba antituberkulotiky. Tyto závažné stavy si vyžadují úzkou spolupráci mezi urologem intenzivistou a pneumologem. Je však důležité říci, že BCG instilační terapie je při dodržení zásad správné aplikace bezpečnou léčebnou metodou, kde terapeutický benefit výrazně převyšuje rizika možných komplikací.

Přes uspokojivé klinické výsledky léčby BCG vakcínou, je celá řada pacientů, u kterých dochází k selhání této léčby. V dnešní době neexistuje biochemický marker, který by dokázal předurčit selhání BCG léčby. Určitou formou pomoci je určování skóre rekurence či progrese onemocnění dle doporučení Evropské urologické společnosti (tabulka 2) (13).

Výzkum epigenetických změn by mohl být této snaze nápomocen. Nejvíce v tomto směru jsou prozkoumané a popsány změny DNA metylace. Změny metylací hrají důležitou roli v karcinogenezi u velké části nádorových onemocnění, včetně karcinomu močového měchýře (14, 15, 16, 17). Metylce DNA představuje kovalentní chemická vazba metylové skupiny na C-5 (uhlík v pozici 5) cytosinového kruhu. Nejčastěji se metylace cytosinu vyskytuje v místě sekvence 5'-CG-3', je zprostředkována DNA cytosin-metyltransferázou. Změny metylací v daných oblastech DNA mohou vést následně ke změně exprese tohoto genu. V procesu karcinogeneze patří mezi nejvýznamnější změny metylace CpG ostrůvků v promotorových oblastech tumor supresorových genů. Tyto změny mohou vést k nastartování procesu karcinogeneze v normální buňce (18, 19). Znalost metylační změny by mohla být využita v odhadu léčebné odpovědi na BCG instilační terapii a určit nevhodné pacienty k BCG léčbě, u kterých je na místě časný radikální léčebný přístup (20, 21, 22).

U pacientů, u kterých selže konzervativní přístup s BCG terapií, je pouze oddáleno radikální řešení, tedy radikální cystektomie s nutností derivace moči. Tato časová prodleva v řádu mě-

síců může mít zásadní dopad na onkologickou prognózu pacienta (22). Zlatým standardem léčby BCG selhání zůstává radikální cystektomie. Ostatní alternativní způsoby mají onkologicky výrazně horší výsledky (24, 25, 26). Informací, eventuálně klinických studií stran alternativní léčby, je minimálně. Je několik studií, kde bylo dosaženo relativně dobrého efektu při pokračování BCG udržovací terapie či opakování indukční terapie přes BCG selhání (27, 28). V současné době probíhá klinická studie s užitím sunitinibu u pacientů s BCG refrakterním high grade invazivním karcinomem močového měchýře (29).

Závěr

V našem souboru pacientů byl potvrzen dobrý klinický efekt BCG instilační terapie u pacientů high grade NMIBC a CIS močového měchýře. Meta-analýzy klinických studií potvrdily příznivý efekt léčby BCG ve srovnání jen se samotnou endoresekcí tumoru či endoresekcí spojenou s instilační chemoterapií (30, 31). BCG terapie snižuje u této skupiny pacientů riziko progrese až o 27 % (32). Bez léčby až 54 % pacientů s CIS progreduje v invazivní karcinom močového měchýře (33). U našich pacientů nebyla spojena přítomnost CIS ani vyšší skóre progrese s vyšším rizikem selhání léčby, což neodpovídá očekávaným předpokladům. Vysvětlením může být pravděpodobně nedostatečná velikost souboru.

Na základě našich výsledků je BCG intravezikální instilační terapie účinná metoda léčby high grade NMIBC a carcinoma *in situ* (CIS) močového měchýře. Možný léčebný benefit pro pacienta stále převyšuje rizika spojená s léčbou. Nezbytností je plná informovanost pacienta o možných komplikacích. Pokud jsou dodržena pravidla správného podávání a kontraindikace je BCG vakcína bezpečnou metodou léčby. Slabým místem využití v klinické praxi však zůstává obtížná predikovatelnost selhání léčby BCG vakcínou

Práce byla podpořena programem Progres Q40/04.

LITERATURA

1. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; 168(5): 1964–1970.
2. <http://www.svod.cz>.
3. Compérat E, Larré S, Roupret M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, Houéde N, Roy C, Durand X, Varinot J, Vordos D, Rouanne M, Bakhri MA, Bertrand P, Jeglinski SC, Cussenot O, Sou-

lié M, Pfister C. Clinicopathological characteristic of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch* 2015; 466(5): 589–94. doi: 10.1007/s00428-015-1739-2. Epub 2015 Feb 20.

- 4. Oosterlinck W, Kurth KH, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in sin-

gle stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 1993; 149(4): 749–753.

- 5. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes MR, Birtle A, Gudjonsson S, De Nunzio C, Okamura K, Kaasinen E, Solsona E, Ali-El-Dein B, Tatar CA, Inman BA, N'Dow J, Oddens JR, Babjuk M. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage

- pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol* 2016; 69(2): 231–44. doi: 10.1016/j.eururo.2015.05.050. Epub 2015 Jun 16.
6. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; 116(2): 180–183.
 7. Lamm DL, Thor DE, Harris SC, Reyna JA, Stogdill VD, Radwin HM. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Urol* 1980; 124(1): 38–40.
 8. Drake T, Hicks J. BCG in bladder cancer: the morales of the story. *Eur Urol Suppl* 2014; 13: e334.
 9. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guérin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol* 2008; 179(1): 53–56. Epub 2007 Nov.
 10. Oddens J, Brausi M, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, Gontero P, Hoeltl W, Turkeri L, Marreud S, Collette S, Oosterlinck W. 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(3): 462–472. doi: 10.1016/j.eururo.2012.10.039. Epub 2012 Nov 2.
 11. Martínez-Piñero L, Portillo JA, Fernández JM, Zabala JA, Cadierno I, Moyano JL, Solsona E, Unda M, Beardo P, Rodríguez-Molina J, Chantada V, Palou J, Muntanola P, Alonso Dorrego JM, Pérez-García FJ, Silva JM, Chesa N, Montesinos M, Ojea A, Madero R, Martínez-Piñero JA. Maintenance Therapy with 3-monthly Bacillus Calmette-Guérin for 3 Years is Not Superior to Standard Induction Therapy in High-risk Non-muscle-invasive Urothelial Bladder Carcinoma: Final Results of Randomised CUETO Study 98013. *Eur Urol* 2015; 68(2): 256–62. doi: 10.1016/j.eururo.2015.02.040. Epub 2015 Mar 18.
 12. van der Meijden AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W, Hoeltl W, Bono AV; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. Maintenance Bacillus Calmette-Guérin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol* 2003; 44(4): 429–434.
 13. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49(3): 466–465; discussion 475–7. Epub 2006 Jan 17.
 14. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A, Heredero O, Palacios A, Urrutia M, Fernández JM, López-Blatrán A, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagn* 2011; 13(1): 29–40. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.008. Epub 2010 Dec 23.
 15. García-Baquero R, Puerta P, Beltran M, Alvarez-Mújica M, Alvarez-Ossorio JL, Sánchez-Carbayo M. Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors. *Tumour Biol* 2014; 35(6): 5777–5786. doi: 10.1007/s13277-014-1767-6. Epub 2014 Feb 28.
 16. Ibragimova I, Dulaimi E, Slifker MJ, Chen DY, Uzzo RG, Cairns P. A global profile of genes promoter methylation in treatment-naïve urothelial cancer. *Epigenetics* 2014; 9(5): 760–773.
 17. Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, Hülend H, Jones PA, Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41(17): 2769–78. Epub 2005 Oct 19.
 18. Chmelařova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Beranek M, Palicka V. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2013; 15(2): 160–163. doi: 10.1007/s12094-012-0894-z. Epub 2012 Jul 19.
 19. Chmelařová M, Křepinská E, Spaček J, Laco J, Nekvindová J, Paříčková V. Methylation analysis of tumour suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha)* 2012; 58(6): 246–50.
 20. Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol* 2011; 60(1): 131–40. doi: 10.1016/j.eururo.2011.04.020. Epub 2011 Apr 16.
 21. Alvarez-Múgica M, Fernández-Gómez JM, Cebrían V, Fresno F, Escaf S, Sánchez-Carbayo M. Polyamine-modulated factor-1 methylation predicts Bacillus Calmette-Guérin response in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder carcinoma. *Eur Urol* 2013; 63(2): 364–70. doi: 10.1016/j.eururo.2012.05.050. Epub 2012 Jun 5.
 22. Husek P, Pacovsky J, Chmelařova M, Podhola M, Brodák M. Methylation status as a predictor of intravesical Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy response of high grade non-muscle invasive bladder tumor. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2017; 161(2): 210–216. doi: 10.5507/bp.2017.008. Epub 2017 Mar 22.
 23. Kulkarni GS, Hakenberg OW, Gschwend JE, Thalmann G, Kassouf W, Kamat A, Zlotta A. An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer. *Eur Urol* 2010; 57(1): 60–70. doi: 10.1016/j.eururo.2009.08.024. Epub 2009 Sep 1.
 24. Takenaka A, Yamada Y, Miyake H, Hara I, Fujisawa M. Clinical outcomes of bacillus Calmette-Guérin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder. *Int J Urol* 2008; 15(4): 309–313. doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02012.x.
 25. Kaasinen E, Wijkström H, Malmström PU, Hellsten S, Du-chek M, Mestad O, Rintala E. Alternating mitomycin C and BCG instillations versus BCG alone in treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: a nordic study. *Eur Urol* 2003; 43(6): 637–645.
 26. Solsona E, Iborra I, Ricós JV, Monró JL, Dumont R, Almenar S. Extravesical involvement in patients with bladder carcinoma in situ: biological and therapy implications. *J Urol* 1996; 155(3): 895–899; discussion 899–900.
 27. Daniels MJ, Barry E, Schoenberg M, Lamm DL, Bivalacqua TJ, Sankin A, Kates M. Contemporary oncologic outcomes of second induction course BCG in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *Urol Oncol* 2019; S1078–1439(19)30218–2. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.05.018. [Epub ahead of print]
 28. Herr HW, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guérin refractory superficial bladder tumors. *J Urol* 2003; 169(5): 1706–1708.
 29. Zahoor H, Mir MC, Barata PC, Stephenson AJ, Campbell SC, Fergany A, Dreicer R, Garcia JA. Phase II trial of continuous treatment with sunitinib in patients with high-risk (BCG-refractory) non-muscle invasive bladder cancer. *Invest New Drugs* 2019; 37(6): 1231–1238. doi: 10.1007/s10637-018-00716-w. Epub 2019 Jun 24.
 30. Han RF, Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology* 2006; 67(6): 1216–1223.
 31. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int* 2004; 93(4): 485–490.
 32. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guérin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; 168(5): 1964–1970.
 33. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am* 1992; 19(3): 499–508.