

# 유전자 재조합 Bacille Calmette–Guérin을 이용한 비근육 침윤성 방광암의 면역요법

중앙대학교병원 비뇨기과학교실

진수빈 · 황영미 · 장인호

## Recombinant Bacille Calmette–Guérin for Immunotherapy in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer

Subin Jin, Young Mi Whang, In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Seoul, Korea

Intravesical instillation of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin (BCG) has been used for treating nonmuscle invasive bladder cancer as the forefront of immunotherapy, but BCG is ineffective in approximately 30–40% of cases and disease recurs in up to 50% of patients. Recently BCG is considered an effective vehicle for delivery of antigens due to its unique characteristics, and the genetic control of these mycobacteria is advanced in the search for less toxic and more potent therapeutic agents for bladder cancer immunotherapy. We will discuss current advances in recombinant BCG construction, research, and future directions. (Korean J Urol Oncol 2016;14: 109-117)

**Key Words:** BCG vaccine · Urinary bladder neoplasms · Immunotherapy

### 서 론

방광암은 요로계의 암 중 두번째로 흔한 악성 종양으로 암 사망자의 약 5%가 방광암으로 인하여 발생한다.<sup>1</sup> 방광암의 대부분은 진단 시에 표재성 방광암(nonmuscle invasive bladder cancer, NMIBC)이며, 경요도절제 수술과 방광 내 약물주입요법으로 약 96%의 생존율을 보이나, 70%에서 재발

을 보이며, 30%의 환자에서 근육 침윤성 방광암으로 진행하여 근치적 방광적출술을 요한다.<sup>2,3</sup> 근육 침윤성 방광암은 전체 방광암의 20–30%를 차지하고 근치적 방광적출술에도 불구하고, 환자의 약 절반은 5년 이내에 사망하고, 신보조 및 보조 화학요법의 조합은 전체적인 생존의 연장만을 보여, 평균 생존율은 12–24개월로 나쁜 예후를 보인다.<sup>4,5</sup>

Bacille Calmette–Guérin (BCG) 기반 치료는 현재 표재성 방광암 환자에서 가장 효과적인 방광 내 약물 주입술 치료법이며, 근육 침윤성 방광암으로 진행을 억제하는 유일한 치료법으로 보고되어 있다.<sup>3,6</sup> Morales가 1976년 표재성 방광암의 치료를 위한 BCG의 방광 내 주입을 보고하였으며, 그 후 BCG는 표재성 방광암의 재발 횟수 및 빈도를 감소시키는 것으로 보고되었다.<sup>7,8</sup> BCG에 반응을 보일 비율은 Ta 및 T1 방광암에 대하여 55–65%이고, carcinoma *in situ*에 대해서는 70–75%로 결국 30–45%의 환자는 BCG 요법에 실패하는 것을 의미한다.<sup>8,9</sup> 또한 방광염, 방광자극성 배뇨 증상

Received November 13, 2016, Revised December 8, 2016,

Accepted December 9, 2016

**Corresponding Author:** In Ho Chang

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

E-mail: caucih@cau.ac.kr

Tel: +82-2-6299-1785, Fax: +82-2-6294-1406

· This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea (2015R1A1A1A0500110), and (2015R1A2A1A15054364).



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.

2016 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

및 BCG 패혈증 같은 부작용으로는 BCG 요법을 시행하지 못하는 경우가 환자의 20%에서 관찰된다.<sup>10</sup> BCG 요법의 부작용 및 치료 실패를 극복하기 위하여 BCG를 개선하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 주로 독성이 적고 더 강력한 다른 치료제를 찾기 위한 연구와, 항원의 과발현 또는 외부 항원을 발현하는 재조합 BCG (recombinant BCG, rBCG)를 개발하기 위한 연구로 요약할 수 있다.<sup>11</sup> 본 논문에서는 이중 재조합 BCG의 개발 및 연구 결과에 대하여 설명하고자 한다.

### 표재성 방광암에서 BCG의 작용기전

경요도절제술을 수행한 표재성 방광암의 초기 치료로 방광 내 약물 주입술을 계획하는데, 방광 내 BCG 면역 치료는 근육 침윤성 방광암으로의 진행과 재발의 위험이 높은 중등도 및 저분화 표재성 방광암 환자에게 권장된다.<sup>12</sup> 일반적으로 BCG 치료는 경요도절제술을 시행 2-6주 후부터 매주 6주 동안 시행되고, 그 후 BCG 유지요법은 지역 및 나라마다 차이가 있으나 일반적으로 적어도 12번 이상의 BCG의 방광 내 주입이 재발의 예방에 필수적인 것으로 보고되고 있다.<sup>13</sup>

BCG 면역요법의 기전은 기본적으로는 면역체계를 통하여 항암작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 cytokine 및 면역세포, 그리고 선천적 및 후천적 면역체계의 복잡한 반응이 기전으로 제시되고 있다.<sup>14</sup> BCG 관련 면역세포 및 면역인자는 계속 연구되고 있으나, 생체 내에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구, 자연살해(natural killer)세포와 과립구가 중요한 역할을 수행하고, 대식세포와 수지상 세포도 일정부분 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며, 중요한 면역인자로 tumor necrotic factor (TNF), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Interleukin (IL)-2, IL-8, IL-18, IL-12, interferon (IFN)- $\gamma$  가 보고되어 있다.<sup>15</sup> 면역체계와 별도로 종양 세포에 BCG의 직접적인 효과도 세포 배양 실험에서 보고되고 있는데, 방광암 세포에 대한 BCG의 부착과 내재화는 면역체계를 통하거나 BCG의 직접적인 세포독성을 통해 방광암 세포를 사멸시키는 작용을 한다.<sup>15-18</sup>

### BCG 면역요법의 문제점

BCG 요법의 실패는 BCG의 주입에도 불구하고 방광암이 근절되지 못하거나 재발하는 것을 의미한다.<sup>19</sup> 일반적으로 BCG 치료 실패의 원인으로는 BCG의 주입이 적절하지 않거나, 발견되지 않은 근침윤성 혹은 전이성 방광암이 존재하는 경우, natural resistance-associated macrophage protein 유

전자의 동질이상(polymorphism)이 존재하는 경우, 혹은 BCG에 반응하지 않는 방광암인 경우로 요약할 있다.<sup>20-27</sup>

방광암에 대한 BCG 치료의 또 다른 문제는 심각한 국소 및 전신 부작용이다. BCG 치료를 하는 동안 오직 환자의 16%만 3년간의 주입요법을 완수하는데, 이는 BCG에 의한 부작용 때문이다. BCG 치료의 부작용은 살아있는 박테리아를 이용하기 때문이며, BCG에 의해서 발열, 방광염, 폐렴, 간염, 패혈증으로 진행하여 심한 경우 사망까지 보고되어 있다.<sup>28,29</sup> 일반적으로 BCG 치료의 부작용은 조절되지 않은 면역반응 및 BCG의 증식에 의하여 발생하는 것으로 생각되며, 특히 전신상태가 쇠약하고, 면역체계가 손상된 환자에서 BCG 치료의 가장 심각한 합병증인 전신감염으로 인한 패혈증(BCGosis)이 발생하는 것으로 보고되고 있다.<sup>30</sup>

### 변형 BCG 균주의 개발

재조합 DNA 기술은 결핵 백신과 방광암 면역 치료의 결합을 모두 개선하기 위해 연구되어 왔으며, mycobacteria를 위한 발현 벡터의 발전은 mycobacteria에 다른 DNA의 주입 뿐만 아니라 BCG에서 이중유전자의 다양한 발현을 유도한다. 대장균-mycobacteria 셔틀 플라스미드는 *Escherichia coli* cosmid에 마이코박테리오파지 TM4 ligand의 DNA서열을 결합한 것으로 1987년 Jacobs에 의해 개발되었다. 재조합 DNA 분자는 박테리오파지와 *E. coli* 안의 cosmid처럼 mycobacteria에서 복제할 수 있으나, TM4에서 유래된 shuttle plasmid “cosmid”는 큰 사이즈 때문에 BCG에 주입 시 분해되거나 높은 불안정성을 보였다.<sup>31,32</sup> 이후 몇몇 그룹에서 shuttle vector의 연구가 시작되었고 외부의 발현을 위한 기술과 BCG의 이중유전자는 mycobacteriophage L1 또는 mycobacteriophage L5를 사용한 새로운 shuttle vector와 함께 발전하였다.<sup>33,34</sup> 외부 항원의 발현 및 분비능력을 가진 shuttle vector는 추가적으로 *Mycobacterium fortuitum*에서 분리한 플라스미드 pAL5000의 복제요소를 사용하여 제작된다.<sup>35,36</sup> 또한 IS900을 지닌 통합 plasmid 또한 개발되었고 이는 카나마이신 내성 유전자 Tn903의 안정적인 발현을 보인다.<sup>37</sup> 외부 유전자는 상동 재조합에 의해 안정적으로 mycobacterium의 염색체에 삽입되고, 위치-특정 재조합은 mycobacteriophage L5 와 DNA 전위의 완성 체계를 나타낸다.<sup>36-39</sup> Mycobacteria에서 복제할 수 없는 “suicide” plasmid 안에 카나마이신 내성 유전자를 *Mycobacterium avium*의 IS900와 같이 삽입한 통합 vector가 개발되었으며, 이는 카피 수가 세포당 하나인 위치-특정 통합 vector의 구조와는 대조적으로, 세포당 여러 복사본에서 존재할 수 있는 장점이 있다.<sup>40</sup>

현재, BCG에서 이중 유전자의 발현은 복제 또는 통합

shuttle vector를 사용하여 발현될 수 있는데, 재조합 단백질의 분비는 복제 벡터를 사용하여 획득되지만, 통합 벡터는 안정성을 가진다.<sup>41-43</sup> 대부분의 경우 유전자의 프로모터는 *E. coli-Mycobacterium* shuttle vector를 이용하며, 이중 단백질은 mycobacteria hsp60 또는 hsp70 프로모터의 제어 아래 BCG에서 발현하는데, 이는 전체 BCG 발현 단백질의 10% 까지 고용량으로 발현할 수 있다.<sup>44,45</sup>

재조합 BCG 균주를 개발하는데 문제는 발현 제어 방법으로 항생제 내성 유전자에 의존하는 점이다.<sup>43</sup> 카나마이신 내성 유전자는 *E. coli-Mycobacterium* shuttle vector에서 주로 사용되는 선별 marker이며, *Mycobacterium smegmatis*와 *Mycobacterium tuberculosis*는 카나마이신에 하여 높은 민감성과 낮은 변이율을 나타낸다. 현재 사용되는 mycobacteria vector들의 대다수는 Tn5 또는 Tn903 에서 유래된 카나마이신 내성 유전자를 이용한다.<sup>33,40</sup> 그러나 항생제 선택 marker는 동물실험에서 plasmid vector의 소실로 재조합 BCG 면역 치료 백신의 개발의 사용에 의문이 제기되고 있으며, 항결핵 약물에 대한 내성을 부여할 수 있다는 점에서도 항생제 선별 marker의 사용에 문제점으로 제시되고 있다.<sup>41,46</sup>

선별 marker와 같은 기능을 하는 영양 요구 보완성 (auxotrophic complementation)은 항생제 선택에 대한 대안으로 연구되어 왔다.<sup>43,47</sup> 개념적으로, 영양 요구성 균주는 유전적으로 필수적인 대사 산물(아미노산 등)의 합성에 관련된 유전자를 삭제 및 수정하고, 따라서 성장에 필요한 특정한 성분의 합성 불능을 유도하여 시험관 배양에서는 영양의 외부 공급에 의존하여 증식하지만, 생체 내 조건에서는 그 증식이 제한된다.<sup>48</sup> 이러한 영양 요구성 균주는 처음에 결핵 예방을 위한 BCG 백신 개발에 고안되었으며, 이후 방광암 면역요법 중 BCG 방광 내 주입과 관련된 합병증 및 부작용을 피하기 위해 적용되었다.<sup>30</sup> 또한 영양 요구성 균주는 유전적 결함을 보완하기 위해 episomal plasmid를 포함할 수 있는데, 균주를 유전적으로 더 안정적이게 하기 위하여 vector에 삭제하는 유전자와 함께 삽입하여 생체 모델에서 더 안정적인 면역 반응을 유도할 수 있다. Episomal plasmid로 인한 안정성은 생체 내 세균이 복제 하는 동안 vector 손실의 예방에 효과적이다.<sup>43</sup> BCG 백신을 위해 가장 많이 사용하는 영양 요구성 표적은 아미노산-라이신, 류신, 메사이오닌, 그리고 비타민 판토텐산염 등이 있다.<sup>43,48-53</sup> 하지만 방광암의 면역요법으로 영양 요구성 균주에 대한 연구는 아직까지 *in vitro* 연구만 진행되고 있다.<sup>16</sup>

### 방광암 치료를 위한 유전자 재조합 BCG

유전자 재조합 BCG의 연구 방향은 면역원성 항원의 과

발현 또는 면역반응을 위한 이중 항원을 발현하도록 유전자를 재조합하는 방법으로 연구되고 있으며, 또한 BCG는 강력한 면역원성, 그리고 대식세포와 수지상세포 같은 항원제시세포에서 내재화되는 BCG의 특성으로 인하여 항원 전달을 위한 효과적인 수단으로 생각되고 있다.<sup>54</sup>

### 1. Cytokine 분비 rBCG

이제까지 mycobacteria 및 BCG 유도 면역 반응의 이해의 증가로 다양한 유전자 재조합 BCG (rBCG)가 개발되어 왔다(Table 1). 주로 연구된 유전자 재조합 BCG는 쥐와 사람의 cytokine 발현 BCG이며, 주로 Th1 cytokine이다.<sup>55</sup> O'Donnell 등<sup>56</sup>은 *Mycobacterium hsp60* promotor와  $\alpha$ -항원 신호 서열의 제어 하에 쥐의 IL-2를 분비하는 rBCG 균주를 개발했다. BCG 특정 신호 peptide 융합 단백질과 인플루엔자 바이러스 hemaglutinine epitope를 이용하여, 생물학적으로 활성화된 재조합 단백질의 생산, 분비 및 검출을 확인하였으며, IL-2 분비 rBCG 균주는 야생형 BCG와 비교해서 쥐의 비장세포에 의한 IFN- $\gamma$  분비가 증가함을 보고하였다. Murray 등<sup>57</sup>에 의한 연구에서 쥐 IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , 그리고 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF)는 BCG에 의해 생성되고 활성화됨을 보고하였으며, 카나마이신 내성 유전자, *hsp60* promotor 상류, BCG  $\alpha$ -항원 유전자를 vector로 하여 mycobacteria의 세포막과 벽을 통해서 상기의 cytokine이 분비될 수 있도록 rBCG 균주를 제안하였으며, IL-2, IFN- $\gamma$ , 그리고 GM-CSF의 재조합 형태는 *in vitro* 쥐 감염모델에서 야생형 BCG에 비하여 세포 매개성 면역반응 활성화의 증가를 보고하였다.

재조합 쥐 또는 사람 IL-2 분비 BCG와 사람 IL-8 분비 BCG는 자연살해세포와 세포독성 T 세포의 성숙을 유도하기 위하여 개발되었다.<sup>58-60</sup> Yamada 등<sup>60</sup>은 쥐 IL-2와 알파-항원 rBCG ( $\alpha$ -Ag-IL2)를 개발하였고, 재조합 균주는 기능성 IL-2를 분비할 수 있고 야생형 BCG 및 IL-2 주입과 비교하여 MBT-2 암세포에서 세포독성이 100배 증가함을 보고하였다. 또한 저자들은 rBCG  $\alpha$ -AG-IL-2는 야생 BCG에 비하여 대식세포에 의한 IL-2, TNF, 그리고 IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가함과 항 IL-2 항체가 T 세포와 자연살해세포의 활성을 억제하여 rBCG  $\alpha$ -AG-IL-2 매개 세포독성 작용 및 IFN- $\gamma$  분비를 억제함을 보고하였다.

Luo 등<sup>58,59,61</sup>은 사람 IL-2와 쥐 IL-18을 분비하는 rBCG를 개발하였는데, rBCG-IL18과 rBCG-IL2 모두 용량의존적으로 방광암 MBT-2 세포에 대해 BCG 유도 대식세포의 세포독성이 증가하였고, 야생형 BCG와 비교하여 thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells 배양에서 cytokine (IFN- $\gamma$ ,

**Table 1.** Recombinant BCG developed for bladder cancer immunotherapy

BCG strain	Antigen/gene (organism)	Model	Main results
Pasteur <sup>55</sup>	IL-18 (mouse)	Mice and <i>in vitro</i> (PEC and MBT-2)	(+) IFN- $\gamma$ and GM-CSF in splenocytes culture* (-) IL-10 in splenocytes culture* (+) Host antimycobacterial immunity <sup>†</sup> (+) Cellular proliferation and IFN- $\gamma$ secreting cells <sup>†</sup> (+) Macrophage cytotoxicity against MBT-2 cells <sup>†</sup>
Tokyo <sup>60</sup>	IL-2 (murine)	<i>In vitro</i> (PEC and MBT-2)	(+) Macrophage cytotoxicity against MBT-2 cells <sup>†</sup> (+) IFN- $\gamma$ and IL-12 in PEC culture
Pasteur <sup>66</sup>	IFN- $\alpha$ -2B (human)	<i>In vitro</i> (PBMC and T24, J82, 5637, TCCSUP, UMUC-3 cell lines)	(+) Production of IFN- $\gamma$ and IL-2 by PBMC <sup>†</sup> (+) PBMC cytotoxicity against bladder cancer cell lines <sup>†</sup> (+) Predominant NK and CD8+ T cells in PBMC <sup>†</sup>
Pasteur <sup>67</sup>	IFN- $\alpha$ -2B (human)	<i>In vitro</i> (PBMC)	(+) IFN- $\gamma$ and IFN-inducible protein 10 (IP-10) by PBMC* (-) IL-10 by PBMC*
Danish <sup>7</sup>	IFN- $\alpha$ -2B (human)	<i>In vitro</i> (PBMC and T24, T5637 cell lines)	(+) PBMC proliferation <sup>†</sup> (+) PBMC cytotoxicity against T24 and T5627 bladder cancer cell lines <sup>†</sup>
Pasteur <sup>68</sup>	IFN- $\gamma$ (murine)	Mice and <i>in vitro</i> (splenocytes and MB49 cell line)	(+) Expression of MHC-I on MB49 murine cells <i>in vitro</i> <sup>†</sup> (+) Recruitment of CD4+ T cells into the <sup>†</sup> (+) mRNA expression of IL-2 and IL-4 in murine model <sup>†</sup> (+) Survival with low-dose treatment regimen <sup>†</sup>
Pasteur <sup>59</sup>	IL-2 and IL-18	<i>In vitro</i> (PEC and MBT-2 cell line)	(+) PEC cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells <sup>†</sup> (+) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 production by PEC <sup>†</sup>
Pasteur <sup>57</sup>	IL-4, IL-6, GM-CSF, and IFN- $\gamma$ (murine)	Mice and <i>in vitro</i> (mice splenocytes)	(+) Cellular immune response in mice <sup>†</sup> (+) Antigen-specific T cell response in mice when injected with GM-CSF, IL-2, and IFN- $\gamma$ rBCG strains <sup>†</sup> (+) IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-3, and GM-CSF production by splenocytes <sup>†</sup>
<i>M. smegmatis</i> <sup>69</sup>	TNF- $\alpha$ (human)	Mice and <i>in vitro</i> (mice lymphocytes and splenocytes)	(+) IFN- $\gamma$ production by splenocytes and lymphocytes <sup>†</sup> (-) Subcutaneous tumor-development in the mice receiving recombinant <i>Mycobacterium smegmatis</i> /TNF- $\alpha$ <sup>†</sup> (+) Survival rate in mice <sup>†</sup> (+) Infiltration of CD3+ lymphocytes in tumor sites <sup>†</sup>
Unknown <sup>65</sup>	IFN- $\alpha$ -2B	<i>In vitro</i> (PBMC)	(+) PBMC proliferation* (+) PBMC cytotoxicity against bladder tumor cells*
Moreau <sup>71</sup>	Pertussis toxin (S1PT)	Mice orthotopic tumor model	(-) Tumor bladder weight <sup>†</sup> (+) TNF- $\alpha$ and IL-10 mRNA expression in bladders <sup>†</sup>
Moreau <sup>70</sup>	Pertussis toxin (S1PT)	Mice orthotopic tumor model and <i>in vitro</i> (MB49 and mice splenocytes)	(-) Tumor bladder weight <sup>†</sup> (+) TNF- $\gamma$ and IL-10 mRNA expression in bladders <sup>†</sup> (+) Survival rate <sup>†</sup> (+) Splenocytes cytotoxicity against MB49 cells <i>in vitro</i> <sup>†</sup>
Pasteur <sup>16</sup>	Ag85B ( <i>Mycobacterium bovis</i> )	<i>In vitro</i> (5637 cell line)	(+) 5637 cell death <sup>†</sup> (-) Proliferation of 5637 cells <sup>†</sup> (-) Antiapoptotic genes expression by 5637 cells <sup>†</sup> (+) Pro-apoptotic genes expression by 5637 cells <sup>†</sup> (+) Cell cycle-related and antioxidant enzymes genes expression in 5637 cells <sup>†</sup>
Pasteur <sup>56</sup>	IL-2 (mouse and rat)	<i>In vitro</i> (mice splenocytes)	(+) IFN- $\gamma$ production by mice splenocytes*

+: increased, -: decreased; BCG: bacille Calmette-Guérin, IL: interleukin, PEC: peritoneal exudate cell, IFN: interferon, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, PBMC: peripheral blood mononuclear cell, NK: natural killer, MHC-1: major histocompatibility complex, TNF: tumor necrotic factor, rBCG: recombinant BCG, S1PT: genetically detoxified pertussis toxin.

\*Recombinant strain compared to wild-type BCG and/or BCG carrying empty vector plus exogenous gene/antigen. <sup>†</sup>Recombinant strain compared to wild-type BCG and/or BCG carrying empty vector. <sup>‡</sup>Recombinant strain compared to wild-type BCG and wild-type *M. smegmatis*.

TNF- $\alpha$ , 그리고 IL-6) 생산이 증가함을 보고하였다. 쥐 모델에서, rBCG-IL18과 rBCG-IL2s는 비장세포에 의한 IFN- $\gamma$ 와 GM-CSF 분비 증가, IL-10 분비 감소, 세포 증식, 그리고 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포의 분획이 증가함을 보고하였다.<sup>58</sup> 즉, IL-10은 방광암 세포에 대해서 BCG-매개성 macrophage 세포독성의 저해와 연관성을 가지고 rBCG-IL-2 또는 rBCG-IL-8은 BCG의 면역 반응과 항암 특성을 보강한다는 것을 의미한다.<sup>61</sup>

BCG에 의한 인간 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)을 이용한 시험관 자극시험에서 BCG는 주로 IFN과 TNF와 같은 염증성 사이토카인과 케모카인의 방출을 통하여 방광암세포에 대한 세포독성작용을 매개한다.<sup>62,63</sup> 방광암에서, IFN은 BCG 주입 후에 종양세포에 대한 면역반응에 주요 역할을 하고 polymorphonuclear 세포에서 TRAIL 생산과 방출을 위한 자극을 담당하는 cytokine 중에 하나이다.<sup>64</sup> 여러 연구에서 방광암 치료에 대안으로 IFN을 분비하는 rBCG 균주를 개발하였는데, 인간 IFN- $\alpha$  2B를 분비하는 rBCG 균주 (rBCG-IFN- $\alpha$ )는 T24, J82, 5637, TCCSUP, 그리고 UMUC-3 방광암 세포주에서 PBMC의 자극 및 PBMC 매개 세포독성의 증가를 보고하였다.<sup>7,65-67</sup> Arnold 등<sup>68</sup>은 정위성 쥐 방광암 모델에서 IFN- $\gamma$  분비 rBCG의 방광 내 주입은 방광 내 CD4+ T 세포의 증가 및 IL-2와 IL-4 사이토카인 mRNA의 발현을 유도함을 보고하였는데, 특히 낮은 농도의 rBCG-IFN- $\gamma$ 로도 유도가 가능함을 보고하였다.

다른 mycobacteria 균주를 이용한 유전자 재조합 균주의 개발도 연구되고 있는데, 쥐 TNF- $\alpha$  분비 유전자 재조합 *M. smegmatis* (*M. smegmatis*/TNF- $\alpha$ )가 면역저하 환자에서 부작용 없이 항종양 효과를 증가시키며 보고되었다.<sup>69</sup> *M. smegmatis*/TNF- $\alpha$ 는 mycobacteria 항원 또는 종양 분해물 자극을 통하여 림프구의 IFN- $\gamma$ 의 분비증가를 유발하나, IL-10의 저하는 유발하지 않았으며, *M. smegmatis*/TNF- $\alpha$ 는 면역 정상 MB49 정위성 방광암 쥐 모델에서 야생 BCG와 비교하여 10-20%의 생존율의 증가 및 70%의 무종양 생존율을 보였지만 이 효과는 T 세포와 자연살해 세포기능이 결핍된 누드와 베이지 쥐 모두에서는 소실되었다.<sup>69</sup> *M. smegmatis*는 면역 cytokine을 전달하는 기능을 가지고 방광암 치료를 위해 방광 내 주입 mycobacteria 제제로서 유용하며 BCG와 밀접한 관련이 있는 비병원성 mycobacteria 유기체이기 때문에 방광암 치료를 위해 향후 고려될 수 있다.

## 2. 이종 및 Mycobacteria 항원 발현 rBCG

이종 및 mycobacteria 항원의 포함을 통해 면역 BCG의 속성을 변경하는 것은 외부 항원의 발현 또는 mycobacteria의 항원을 과발현하는 목적으로 연구되고 있다. 최근, genet-

ically detoxified pertussis toxin (S1PT)를 발현하는 BCG 균주는 유전자 신호서열과 *M. fortuitum*  $\beta$ -lactamase promotor의 상위 조절의 융합으로 제작되었는데, rBCG-S1PT는 결핵 백신으로 개발되었고 mycobacteria 단백질에 대한 유도에서 강한 Th1 면역반응 효과를 보였다.<sup>52</sup> 정위성 방광암 쥐 모델에서 시행한 rBCG-S1PT 면역치료는 야생형 BCG 대조군과 비교하여 방광암의 감소와 쥐의 생존비를 증가를 보였으며, MB49 방광암세포주의 세포성장 억제 효과를 보였다.<sup>70,71</sup> 방광 내에 rBCG-S1PT를 주입한 쥐에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-10의 mRNA발현이 증가하였는데, IL-10은 종양 주위세포에서 TNF- $\alpha$  합성의 억제에 관여하는 항염증 cytokine으로 신생혈관 생성을 억제하였다.<sup>72</sup>

또한 표재성 방광암 재발을 방지하기 위한 면역학적 활성 mycobacteria 부성분의 사용은 활발히 연구되어 왔다. Ag85 단백질 복합체는 BCG와 *M. tuberculosis* 모두에 의해 가지고 있는 주요 TH1-자극 및 보호 항원을 포함한 하는데, Ag85B 단백질 분비는 Ag85B 분비 단백질이 mycobacteria 감염의 주요 단계에서 T 세포에 의해 인식되는 강력한 항원이기 때문에 연구의 초점이 되어왔다.<sup>73,74</sup> 면역원성 연구에서 rBCG에서 과발현 Ag85B는 BCG의 면역원성을 증가시키고, 강력한 면역반응을 유도하는 것으로 나타났으며, 시험관 연구에서 Ag85B를 과발현하는 영양요구성 rBCG 파스퇴르 균주(BCG  $\Delta$ leuD/Ag85B)는 야생형 BCG와 공백터가 있는 BCG와 비교하여 시험관 내 세포독성이 우수하고 5637 방광암 세포주에서 전세포사멸 유전자 발현이 증가함을 보고하였으며, BCG  $\Delta$ leuD/Ag85B가 p21과 p53의 발현 증가로 인한 G2/M 세포주기 정지로 암 세포에 대한 효과적인 항증식제제가 될 수 있음을 보고하였다.<sup>16,75</sup> 생체 내에서 항종양제로서 rBCG-Ag85B의 효과는 아직 평가되지 않았지만, 동물과 사람 모델에서 rBCG-Ag85B 백신에 의한 결핵 예방 효과는 보고되고 있다.<sup>76,77</sup>

두 개 이상의 유전자를 이용한 재조합 BCG와 cytokine-결합 유전자를 이용한 DNA 백신은 생백신 대신 방광암 치료를 위한 대안으로 연구되고 있는데, 생균의 점적 주입의 부작용 없이 면역학적으로 활성 mycobacteria 부성분을 사용하는 이점이 있다.<sup>78,79</sup> 지난 10년간, 연구에서는 BCG DNA 백신(poly-rBCG)의 구조는 4가지 BCG 유전자(Ag85A, Ag85B, Mpt64, PstS3)의 조합, ESAT6와 진핵세포 발현 벡터 안에 삽입물과 함께 융합되어 있으며, 쥐 방광암 모델에서 Poly-rBCG가 Th1 면역반응을 유도하고 혈청 IFN- $\gamma$ 와 IL-12의 증가를 유도하며, CD4+/CD8+ T세포의 침윤과 종양내에 자연살해세포의 증식을 유도하고, 종양성장억제를 보였다.<sup>76,77</sup>

## 결 론

지금까지 유전적으로 조작된 BCG 제작의 목적은 높은 치료 효과와 적은 독성을 보이는 모델을 개발하기 위함이었다고, mycobacteria 유전학과 분자 생물학에 대한 지식의 증가와 vector 안정성 및 선택 시스템에서의 개선은 강화된 면역 특성을 가진 여러 BCG 균주를 개발할 수 있게 하였다. Th1의 주된 면역반응은 대부분의 암 종류에 효과적인 종양 근절을 위해 필요하다는 것은 널리 알려져 있으며, BCG 균주의 유전자 조작은 시험관 내 및 방광암의 생체 내 모델에서 항암 효과를 증명하였으며, 여러 유전자 조작 BCG는 외부 항원 혹은 cytokine을 분비하여 Th1 특정 항종양 면역반응의 유도에 효과적인 것으로 보고되었다. 임상시험이 아직 시행되지 않은 점 및 기술적으로 실제 효능이 증명되지 않은 점은 유전자 조작 BCG의 제한점이나, 앞서 언급한 연구들은 유전자조작 BCG 균주가 개선된 방광암 치료제가 될 수 있음을 암시한다.

## 이해관계(Conflict of Interest)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

## REFERENCES

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011;61:212-36
2. Cookson MS, Herr HW, Zhang ZF, Soloway S, Sogani PC, Fair WR. The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15-year outcome. *J Urol* 1997;158:62-7
3. 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
4. Hautmann RE, de Petriconi RC, Pfeiffer C, Volkmer BG. Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: long-term results in 1100 patients. *Eur Urol* 2012;61:1039-47
5. Sternberg CN, Bellmunt J, Sonpavde G, Siefker-Radtke AO, Stadler WM, Bajorin DF, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Chemotherapy for urothelial carcinoma-neoadjuvant and adjuvant settings. *Eur Urol* 2013;63:58-66
6. Sylvester RJ. Bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Urol* 2011;18:113-20
7. Ding GQ, Yu YL, Shen ZJ, Zhou XL, Chen SW, Liao GD, et al. Antitumor effects of human interferon-alpha 2b secreted by recombinant bacillus Calmette-Guérin vaccine on bladder cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13:335-41
8. Morales A, Ottenhof P, Emerson L. Treatment of residual, non-infiltrating bladder cancer with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 1981;125:649-51
9. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, et al. Guideline for the management of non-muscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol* 2007;178:2314-30
10. Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol* 2012; 2012:181987
11. Yuksel ZS, Buber E, Kocagoz T, Alp A, Saribas Z, Acan NL. Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011;20:24-8
12. Ahn JJ, Ghandour RA, McKiernan JM. New agents for bacillus Calmette-Guérin-refractory nonmuscle invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2014;24:540-5
13. Böhle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 2003;170:964-9
14. Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother* 2007;61:299-305
15. 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
16. Begnini 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
17. 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
18. 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
19. Zlotta AR, Drowart A, Huygen K, De Bruyn J, Shekarsarai H, Decock M, et al. Humoral response against heat shock proteins and other mycobacterial antigens after intravesical treatment with bacille Calmette-Guérin (BCG) in patients with superficial bladder cancer. *Clin Exp Immunol* 1997;109:157-65
20. Young RA, Elliott TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 1989;59:5-8
21. Sherman MYu, Goldberg AL. Heat shock in Escherichia coli

- alters the protein-binding properties of the chaperonin groEL by inducing its phosphorylation. *Nature* 1992;357:167-9
22. Halachmi S, Moskovitz B, Maffezzini M, Conti G, Verweij F, Kedar D, et al. Intravesical mitomycin C combined with hyperthermia for patients with T1G3 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 2011;29:259-64
  23. 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
  24. Zargar H, Aning J, Ischia J, So A, Black P. Optimizing intravesical mitomycin C therapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2014;11:220-30
  25. Di Stasi SM, Giannantoni A, Stephen RL, Capelli G, Navarra P, Massoud R, et al. Intravesical electromotive mitomycin C versus passive transport mitomycin C for high risk superficial bladder cancer: a prospective randomized study. *J Urol* 2003;170:777-82
  26. 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
  27. Di Stasi SM, Valenti M, Verri C, Liberati E, Giurioli A, Leprini G, et al. Electromotive instillation of mitomycin immediately before transurethral resection for patients with primary urothelial non-muscle invasive bladder cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2011;12:871-9
  28. Brausi M, Oddens J, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, et al. Side effects of bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. *Eur Urol* 2014;65:69-76
  29. 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
  30. Gan C, Mostafid H, Khan MS, Lewis DJ. BCG immunotherapy for bladder cancer--the effects of substrain differences. *Nat Rev Urol* 2013;10:580-8
  31. Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11473-7
  32. Fennelly GJ, Flynn JL, ter Meulen V, Liebert UG, Bloom BR. Recombinant bacille Calmette-Guérin priming against measles. *J Infect Dis* 1995;172:698-705
  33. Snapper SB, Lugosi L, Jekkel A, Melton RE, Kieser T, Bloom BR, et al. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6987-91
  34. Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3111-5
  35. Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Totsuka M, et al. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect Immun* 1990;58:4049-54
  36. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991;351:456-60
  37. England PM, Wall S, McFadden J. IS900-promoted stable integration of a foreign gene into mycobacteria. *Mol Microbiol* 1991;5:2047-52
  38. Husson RN, James BE, Young RA. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J Bacteriol* 1990;172:519-24
  39. Martin C, Timm J, Rauzier J, Gomez-Lus R, Davies J, Gicquel B. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 1990;345:739-43
  40. Dellagostin OA, Wall S, Norman E, O'Shaughnessy T, Dale JW, McFadden J. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. *Mol Microbiol* 1993;10:983-93
  41. Méderlé I, Bourguin I, Ensergueix D, Badell E, Moniz-Peireira J, Gicquel B, et al. Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. *Infect Immun* 2002;70:303-14
  42. Bastos RG, Borsuk S, Seixas FK, Dellagostin OA. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 2009;27:6495-503
  43. Borsuk S, Mendum TA, Fagundes MQ, Michelon M, Cunha CW, McFadden J, et al. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87:474-80
  44. Dietrich G, Viret JF, Hess J. *Mycobacterium bovis* BCG-based vaccines against tuberculosis: novel developments. *Vaccine* 2003;21:667-70
  45. Stover CK, Bansal GP, Hanson MS, Burlein JE, Palaszynski SR, Young JF, et al. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *J Exp Med* 1993;178:197-209
  46. Shinnick TM. Molecular biology of mycobacterium tuberculosis. In: Gangadharam PR, Jenkins PA, editors. *Mycobacteria: I, basic aspects*. Boston (MA): Springer; 1998;102-130

47. Guleria I, Teitelbaum R, McAdam RA, Kalpana G, Jacobs WR Jr, Bloom BR. Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nat Med* 1996;2:334-7
48. Sampson SL, Mansfield KG, Carville A, Magee DM, Quitugua T, Howerth EW, et al. Extended safety and efficacy studies of a live attenuated double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* as a vaccine candidate. *Vaccine* 2011;29:4839-47
49. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widén D, Whelan A, Hall G, Marsh PD, et al. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and hematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin. *Infect Immun* 2000;68:7094-9
50. Chege GK, Burgers WA, Stutz H, Meyers AE, Chapman R, Kiravu A, et al. Robust immunity to an auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG-VLP prime-boost HIV vaccine candidate in a nonhuman primate model. *J Virol* 2013;87:5151-60
51. Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, Russell RG, Derrick S, Collins FM, et al. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 2002;8:1171-4
52. Nascimento IP, Dias WO, Quintilio W, Hsu T, Jacobs WR Jr, Leite LC. Construction of an unmarked recombinant BCG expressing a pertussis antigen by auxotrophic complementation: protection against *Bordetella pertussis* challenge in neonates. *Vaccine* 2009;27:7346-51
53. Pavelka MS Jr, Chen B, Kelley CL, Collins FM, Jacobs Jr WR Jr. Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:4190-2
54. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guérin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993;178:479-88
55. Luo Y, Henning J, O'Donnell MA. Th1 cytokine-secreting recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and prospective use in immunotherapy of bladder cancer. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:728930
56. O'Donnell MA, Aldovini A, Duda RB, Yang H, Szilvasi A, Young RA, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. *Infect Immun* 1994;62:2508-14
57. Murray PJ, Aldovini A, Young RA. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guérin strains that secrete cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:934-9
58. Luo Y, Yamada H, Chen X, Ryan AA, Evanoff DP, Triccas JA, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) expressing mouse IL-18 augments Th1 immunity and macrophage cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 2004;137:24-34
59. Luo Y, Yamada H, Evanoff DP, Chen X. Role of Th1-stimulating cytokines in bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells. *Clin Exp Immunol* 2006;146:181-8
60. Yamada H, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. Murine IL-2 secreting recombinant bacillus Calmette-Guérin augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J Urol* 2000;164:526-31
61. Luo Y. Blocking IL-10 enhances bacillus Calmette-Guérin induced T helper Type 1 immune responses and anti-bladder cancer immunity. *Oncimmunology* 2012;1:1183-5
62. Böhle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad HD. Effects of local bacillus Calmette-Guérin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol* 1990;144:53-8
63. Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, Kemp D, Zhao W, Zhao X, et al. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer* 2001;92:697-702
64. Brincks EL, Risk MC, Griffith TS. PMN and anti-tumor immunity--the case of bladder cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 2013;23:183-9
65. Fan X, Han R. Study of recombinant human IFN- $\alpha$ -2b bacilli calmette-guerin activated killer cells and against bladder cancer cell in vitro. *Front Med China* 2007;1:377-80
66. Liu W, O'Donnell MA, Chen X, Han R, Luo Y. Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) expressing interferon-alpha 2B enhances human mononuclear cell cytotoxicity against bladder cancer cell lines in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1647-55
67. Luo Y, Chen X, Han R, O'Donnell MA. Recombinant bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing human interferon-alpha 2B demonstrates enhanced immunogenicity. *Clin Exp Immunol* 2001;123:264-70
68. Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, Böhle A, Brandau S. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother* 2004;27:116-23
69. Young SL, Murphy M, Zhu XW, Harnden P, O'Donnell MA, James K, et al. Cytokine-modified *Mycobacterium smegmatis* as a novel anticancer immunotherapy. *Int J Cancer* 2004;112:653-60
70. Andrade PM, Chade DC, Borra RC, Nascimento IP, Villanova FE, Leite LC, et al. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen SIPT in the intravesical treatment of bladder cancer. *Urol Oncol* 2010;28:520-5
71. Chade DC, Borra RC, Nascimento IP, Villanova FE, Leite LC, Andrade E, et al. Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing pertussis toxin on TNF-alpha and IL-10 in a bladder cancer model. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:78
72. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy: review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69
73. Dorhoi A, Reece ST, Kaufmann SH. For better or for worse:



- the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol Rev* 2011;240:235-51
74. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, et al. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1998;48:535-43
75. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL Jr, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 2009;15:267-76
76. Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Immunotherapy for bladder cancer using recombinant bacillus Calmette-Guerin DNA vaccines and interleukin-12 DNA vaccine. *J Urol* 2004;171:1343-7
77. Yu DS, Lee CF, Hsieh DS, Chang SY. Antitumor effects of recombinant BCG and interleukin-12 DNA vaccines on xenografted murine bladder cancer. *Urology* 2004;63:596-601
78. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999;353:1689-94
79. Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, Drowart A, Decock M, Pirson M, et al. What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy? Are six weekly instillations necessary? *Eur Urol* 2000;37:470-7