

MTBVAC, UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS QUE INICIA LOS ESTUDIOS DE EFICACIA, 100 AÑOS DESPUÉS DE BCG

DISCURSO LEÍDO EN LA ACADEMIA DE FARMACIA «REINO DE ARAGÓN»
EL DÍA 31 DE MAYO DE 2022

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO
DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA
ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS

PRECEDIDO DE LA PRESENTACIÓN DEL SECRETARIO
Y ACADÉMICO DE NÚMERO
DE LA ACADEMIA DE FARMACIA «REINO DE ARAGÓN»
ILMO. SR. D. IGNACIO ANDRÉS ARRIBAS



ACADEMIA DE FARMACIA “REINO DE ARAGÓN”

Zaragoza

2022

MTBVAC, UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS QUE INICIA LOS ESTUDIOS DE EFICACIA, 100 AÑOS DESPUÉS DE BCG

DISCURSO LEÍDO EN LA ACADEMIA DE FARMACIA «REINO DE ARAGÓN»

EL DÍA 31 DE MAYO DE 2022

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO
DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA

ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS

PRECEDIDO DE LA PRESENTACIÓN DEL SECRETARIO
Y ACADÉMICO DE NÚMERO
DE LA ACADEMIA DE FARMACIA «REINO DE ARAGÓN»

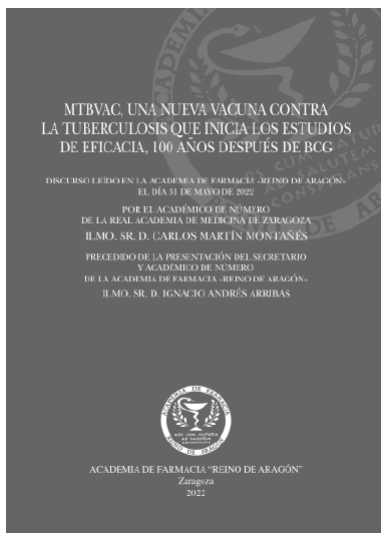
ILMO. SR. D. IGNACIO ANDRÉS ARRIBAS



ACADEMIA DE FARMACIA “REINO DE ARAGÓN”

Zaragoza

2022



Edita:

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza

Distribuye:

Academia de Farmacia "Reino de Aragón"

Imprime:

Cometa, S.A.
Ctra. Castellón, km 3,400 – 50013 Zaragoza

Depósito Legal:

Z. 791-2022

*En memoria del Excmo. Sr. D. Manuel José López Pérez,
Presidente fundador de la Academia de Farmacia “Reino de Aragón”,
y gran impulsor del “Proyecto Vacuna Tuberculosis”
como rector Magnífico de la Universidad de Zaragoza*

Sumario

<i>Discurso de Presentación</i>	
Sr. D. Ignacio Andrés Arribas.....	7
<i>Conferencia MTBVAC, una nueva vacuna contra la tuberculosis que inicia los estudios de eficacia, 100 años después de BCG</i>	
Sr. D. Carlos Martín Montañés.....	13
De la actual vacuna contra la tuberculosis BCG, al nuevo candidato MTBVAC.....	16
Búsqueda de nuevas vacunas con mejor protección contra las formas respiratorias de la enfermedad que BCG.....	16
Investigación y Desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis.....	19
MTBVAC concebido en la Universidad de Zaragoza siguiendo los principios clásicos de la vacunología de Pasteur utilizando nuevas tecnologías de Ingeniería Genética.....	23
Aislamiento del patógeno humano, atenuación por inactivación de los genes: <i>phoP</i> y <i>fadD26</i>	24
Estudio de la atenuación y protección en diferentes modelos animales: ratón, cobayas y primates no humanos.....	27
BIOFABRI una compañía biofarmacéutica española socio de la Universidad de Zaragoza para el Desarrollo Industrial y Clínico de MTBVAC	29
MTBVAC del laboratorio al primer ensayo clínico en humanos en Suiza	31
MTBVAC de los estudios Fase 1 en adultos sanos en Suiza al estudio Fase 1b en recién nacidos en Sudáfrica	33
Estudios Fase 2 en adultos y Fase 2 en recién nacidos en Sudáfrica: Seleccionando la dosis de MTBVAC para los estudios de eficacia.....	36
MTBVAC listo para iniciar ensayos de eficacia de Fase 3 en países del África subsahariana con una alta incidencia de tuberculosis	39

Datos clave de eficacia recientes en primates no humanos que respaldan la evaluación de eficacia de Fase 3.....	40
Estudio de los efectos no específicos MTBVAC: tratamiento del cáncer de vejiga, y tratamiento del asma e interferencia con otras vacunas.....	41
Explorando nuevas rutas de administración para BCG y MTBVAC.....	42
Consideraciones finales.....	43
Agradecimientos.....	45
Ensayos clínicos de MTBVAC.....	48
Bibliografía.....	49

Discurso de Presentación

Ilmo. Sr. D. Ignacio Andrés Arribas

Secretario y Académico de Número

Excelentísimo Presidente de la Academia de Farmacia «Reino de Aragón»
Excelentísimas y Distinguidas Autoridades,
Excelentísimos e Ilustrísimos Señoras y Señores académicos,
Señoras y Señores,
Queridos amigos.

Mis primeras palabras, forzosamente, han de ser de gratitud a la Academia por concederme el privilegio de presentar a una persona excepcional, como es el Dr. Carlos Martín Montañés. Es tradicional que se efectúe de modo sintético un bosquejo biográfico del conferenciante. No resulta fácil, ni siquiera a grandes brochazos, sintetizar la laboriosidad del Dr. Martín Montañés, que se encuentra en la actualidad entre los mejores investigadores a nivel internacional en la búsqueda de erradicar una de las enfermedades infecciosas más mortíferas en la historia de la humanidad: la tuberculosis.

El doctor Carlos Martín Montañés es zaragozano de pura cepa, nacido en la calle de Azoque y hoy vecino de la calle Santa Cruz en el Centro Histórico.

Persona de larga labor docente e investigadora que tras concluir los estudios de Medicina en la Universidad de Zaragoza en 1982, la inició en el Departamento de Microbiología y Parasitología, formándose en tan prestigiosa escuela zaragozana con el profesor Gómez Lus, al que siempre ha considerado como su admirado mentor. Realizó su doctorado dirigido por su maestro sobre los mecanismos de resistencia bacteriana con premio extraordinario (1985). Su estancia postdoctoral la realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Cantabria para estudiar los mecanismos de transposición en bacterias. De ahí, pasó a París, al Instituto Pasteur, en la Unidad de Genética Microbiológica dirigida por el Prof. Julián Davies, formando parte del equipo de la profesora Brigitte Gicquel. La principal actividad de investigación del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza fundado en 1992 es profundizar en el conocimiento multidisciplinar del bacilo de la tuberculosis para aumentar las herramientas de prevención y control de la enfermedad, trabajando en diferentes líneas: epidemiología molecular de la tuberculosis; bases moleculares de la resistencia en micobacterias; transposición y latencia en *Mycobacterium tuberculosis*; construcción y desarrollo de nuevas vacunas.

Permaneció cinco años que le marcaron su futuro de forma definitiva, siendo nombrado, al cabo de ellos, investigador del Instituto, doctorándose al propio

tiempo en Bioquímica por la Universidad de París VII (1994), describiendo en esta tesis la transposición de bacterias del transposon Tn610 aislado en una cepa de *Micobacterium. fortuitum* de la colección de Gómez Lus. Obtuvo el título de diplomado en Inmunología general y de las infecciones (Instituto Pasteur París 2000) y en Vacunología (Annecy 2015).

En estos momentos, el profesor Carlos Martín Montañés es:

- Desde 2005 Catedrático de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza
- Director del grupo de investigación del Gobierno de Aragón *Genética de Micobacterias*.
- Director del grupo CIBERES de Enfermedades respiratorias del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.
- Miembro fundador de la red de tuberculosis en Latinoamérica y Caribe (1995). Ha recibido varios premios en investigación: Biomédica 1995, 2006, Premio Aragoneses del año en Ciencia y Tecnología 2010; en el mismo año recibió el Premio Aragón Investiga;
- Académico de Número de la Real Academia de Medicina, desde 2015.
- Miembro del comité asesor de la Iniciativa Europea de vacuna para la tuberculosis.
- Co-inventor de varias patentes sobre “Vacuna contra la Tuberculosis” propiedad de la Universidad de Zaragoza, licenciadas en exclusiva a Biofabri como socio industrial y clínico desarrollador de MTBVAC.
- Ha publicado más de ciento noventa publicaciones internacionales citadas más de 9.700 veces en los últimos años (índice h de 45), algunos de ellos en colaboración con los profesores Rafael Gómez Lus, Julian. Davies (hoy en Vancouver) y con la profesora Brigitte Gicquel.
- La investigación del Dr. Martin ha sido financiada continuamente por los Programas de Investigación Nacionales y de la Unión Europea desde la formación de su Grupo de investigación en 1992.
- Su trabajo se centra en la investigación y desarrollo de nuevas vacunas vivas contra la tuberculosis. Él y su equipo han construido y caracterizado la vacuna MTBVAC, hoy en ensayos clínicos.
- Actualmente trabaja en diversos proyectos de investigación financiados por la Unión Europea en tuberculosis colaborando con grupos de investigación de Europa, África y América Latina. Es miembro del Steering Committee Iniciativa TBVI de Vacunas contra la Tuberculosis con más de 30 años de experiencia en genética de micobacterias.
- Medalla del Justicia de Aragón 2021
- Recientemente, en el mes de abril, ha sido nombrado Director de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal (Universidad Zaragoza).

El mismo don Santiago padeció, tras su etapa militar en Cuba, tuberculosis pulmonar, que comenzó con hemoptisis en el zaragozano café de la Iberia, jugando al ajedrez con su amigo el capitán Ledesma, favorecido el proceso por la malaria y disentería que don Santiago había padecido en Cuba. Su padre cuidó con su energía habitual a Santiago y lo envió junto con su hermana Pabla a terminar de curar el proceso en Panticosa y San Juan de la Peña.

La vacuna zaragozana del Prof. Martín Montañés contra la tuberculosis, la MT-BVAC primera vacuna viva atenuada derivada de *M. tuberculosis* es el tema central de su trabajo y de la conferencia. Cabe decir que esta vacuna es propiedad de la Universidad de Zaragoza, licenciada en exclusiva a Biofabri como socio industrial y clínico desarrollador. Está en fase de ensayos clínicos en Sudáfrica, que se han realizado durante dos años en recién nacidos y en la actualidad se están finalizando dos ensayos clínicos de definición de dosis en adultos. Las autoridades sanitarias sudafricanas han colaborado dando el visto bueno a la culminación de dichos ensayos. Además de la Universidad de Zaragoza, Carlos Martín como investigador principal, del patrocinio de Biofabri, cuenta también con la colaboración del Instituto Pasteur entre otros grupos de trabajo.

Cabe señalar que es la primera vacuna viva atenuada de origen humano en iniciar sus ensayos en humanos. Estos estudios forman parte de las pruebas para afirmar su seguridad y su capacidad inmunogénica, continuadores de los ensayos clínicos realizados con treinta y seis adultos, voluntarios suizos en Lausana realizados entre 2013 y 2014.

Esta nueva vacuna diseñada por ingeniería genética por el grupo de investigación de genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza que dirige nuestro conferenciante es firme candidata a sustituir a la actual BCG por su mayor eficacia.

Recordemos que la vacuna BCG, de la que se cumplen ahora cien años, protege contra diferentes formas de tuberculosis en niños, mientras que su protección en adultos es muy variable del 0 al 80%. Se trata, además, de vacuna utilizada masivamente desde 1926. La vacuna propuesta del profesor Martín Montañés pretende activar el sistema inmunitario para que pueda reconocer al agente infeccioso y proteja a largo plazo frente a la enfermedad respiratoria, la forma más común del proceso. Todos esperamos que su utilización suponga un gran avance médico para la salud mundial, dado que un tercio de la población está infectada por esta bacteria que se propaga a través del aire y la aparición, cada vez más frecuente, de micobacterias multirresistentes. Cada año hay diez millones de nuevos casos en el mundo y mueren casi dos millones de personas en el mismo periodo. Sin duda la enfermedad que mayor número de muertes ha generado en la historia de la humanidad.

Además el conferenciante y su equipo ha ampliado nuevas líneas de investigación, destacando:

- La administración respiratoria de vacunas vivas atenuadas de BCG a MTB-VAC.
- Estudio de los efectos inespecíficos de las vacunas vivas atenuadas BCG y MTBVAC: BCG disminuye la mortalidad en los niños y estudios recientes

muestran que esta inmunidad entrenada puede proteger contra otras enfermedades respiratorias.

- Uso de BCG y MTBVAC en el cáncer de vejiga, asma e interferencia con otras vacunas.

Gracias de nuevo Sr. Presidente por permitirme efectuar esta presentación al discurso del doctor Martín Montañés. Muchas gracias Carlos por tu presencia esta tarde en nuestra Academia. Gracias por el privilegio de tu amistad. A todos los presentes gracias por su atención.

*MTBVAC, una nueva vacuna
contra la tuberculosis
que inicia los estudios de eficacia,
100 años después de BCG*

Dr. D. Carlos Martín Montañés

Académico de Número
de la Real Academia de Medicina de Zaragoza

Excelentísimo Presidente de la Academia de Farmacia «Reino de Aragón»

Excelentísimas y Distinguidas Autoridades,

Excelentísimos e Ilustrísimos Señoras y Señores académicos,

Señoras y Señores,

Queridos amigos

Es para mí un honor aceptar la invitación de la Junta de Gobierno de la Academia de Farmacia «Reino de Aragón» a través de su secretario y académico de número el Ilmo. Sr. D. Ignacio Andrés Arribas y presentar nuestro trabajo en la investigación y desarrollo de una nueva vacuna contra la tuberculosis, con el título: MTBVAC, una nueva vacuna contra la tuberculosis que inicia los estudios de eficacia, 100 años después de BCG. Los resultados que presentaré son el fruto del trabajo de un gran número de investigadores de distintas disciplinas y de personas que creen de forma entusiasta y decidida en el proyecto de hacer posible una nueva vacuna contra la tuberculosis y a los que desde el inicio de mi charla quiero expresar mi enorme agradecimiento por el privilegio de presentar el trabajo en equipo.

Como ha indicado en su introducción el Ilmo. Sr. D. Ignacio Andrés Arribas, secretario de esta academia y amigo, el trabajo se enmarca en la Escuela de Microbiología de la Universidad de Zaragoza del Profesor Gómez Lus, donde desde 1980 me inicié en la microbiología en la Facultad de Medicina, estudiando las bases moleculares de la resistencia a antibióticos y su diseminación a través de plásmidos y transposones que amplié con un trabajo de 5 años de aprendizaje en Biología Molecular e Ingeniería Genética en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, bajo la dirección de los Profesores Juanma García Lobo y Fernando de la Cruz. En 1987 iniciamos la colaboración que duraría otros 5 años en el Departamento de *Génie Génétique*, que dirigía el Profesor Julian Davies, con la pionera en la Genética del bacilo de la tuberculosis, la Dra Brigitte Gicquel directora de la Unidad de *Génétique Mycobactérienne* del Instituto Pasteur de París.

Y ya a partir del año 1992 que se inicia la andadura del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza donde decenas de investigadores se han formado y han contribuido de forma esencial en la consecución de los resultados que hoy les voy a presentar en el camino hacia una nueva vacuna contra la tuberculosis.

1. DE LA ACTUAL VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS BCG, AL NUEVO CANDIDATO MTBVAC

El 18 de Julio del pasado año 2021 se administró por primera vez la vacuna Bacille Calmette-Guérin (BCG) a un recién nacido, cuya madre había muerto de tuberculosis en el Hospital de Charité de París. Hoy 100 años más tarde, BCG, continúa siendo la única vacuna autorizada y en uso contra la tuberculosis, pero dada a su limitada protección contra las formas respiratorias, responsables de la transmisión de la enfermedad es necesario encontrar nuevas vacunas contra la tuberculosis. En los últimos 25 años se han construido cientos de nuevos candidatos de vacunas contra tuberculosis que han sido ensayados en modelos preclínicos y 14 de ellos están actualmente en desarrollo clínico.

MTBVAC es uno de estos candidatos. Basado en un aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* atenuado. Los 25 años de descubrimiento, construcción y caracterización de vacunas de MTBVAC han seguido los principios de Pasteur, y en el proceso, BCG ha servido como un patrón oro de referencia para establecer la seguridad y la eficacia protectora de los nuevos candidatos a vacunas contra la tuberculosis. MTBVAC contiene todo el repertorio de antígenos de *M. tuberculosis*, y en el presente año 2022 está listo para iniciar ensayos de eficacia de Fase 3 en recién nacidos en países endémicos de tuberculosis en África.

La eficacia de BCG se extiende más allá de la protección contra la tuberculosis, y se ha demostrado que confiere inmunidad no específica heteróloga para otras enfermedades y BCG reduce la mortalidad por todas las causas en los primeros meses de vida. Hoy, la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce la importancia de que cualquier nueva vacuna contra la tuberculosis diseñada para la administración al nacer, debe mostrar similares beneficios inespecíficos como BCG vía mecanismos de inmunidad entrenada y/o reactividad cruzada de inmunidad en respuestas a otros patógenos.

Estudios recientes brindan un fuerte apoyo a la capacidad de MTBVAC de inducir inmunidad entrenada y han demostrado que confiere protección heteróloga no específica similar a BCG.

La investigación sobre rutas de alternativas de administración de MTBVAC, como puede ser la respiratoria, podrían ser clínicamente factibles, lo que podría hacer posible su administración universal facilitando en un futuro los programas de erradicación de la tuberculosis.

2. BÚSQUEDA DE NUEVAS VACUNAS CON MEJOR PROTECCIÓN CONTRA LAS FORMAS RESPIRATORIAS DE LA ENFERMEDAD QUE BCG

La vacuna centenaria Bacille Calmette-Guérin (BCG) es una de la más utilizada de todas las vacunas actuales en el mundo [1,2] y está incluida en la lista de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de medicamentos esenciales [3]. Desde 2004, alrededor de 100 millones de niños en todo el mundo se vacunan con BCG cada año, siendo su cobertura a nivel mundial superior al 90% [4] (Figura 1). En

los bebés, BCG, disminuye la mortalidad y confiere una protección parcial contra las formas diseminadas de la enfermedad, miliar y tuberculosis meníngea [4]. Sin embargo, en adolescentes y adultos, la eficacia de BCG es muy variable, con un rango de 0 a 80% de protección en diferentes partes del mundo, dependiendo de diferentes factores que incluyen condiciones socioeconómicas, presencia de micobacterias, o el clima [5]. Otra posible hipótesis sobre la eficacia variable de BCG en adultos y adolescentes es que se cree que su inmunidad protectora podría disminuir [1,4,5], aunque hay evidencia de largos tiempos de protección [6-8].

Vaccine 39 (2021) 7221–7222



Editorial

100 years of the Bacillus Calmette-Guérin vaccine

COBERTURA BCG $\geq 90\%$



Figura 1: BCG una de las vacunas más usada en todo el mundo. Para la actual vacuna de la tuberculosis BCG, con 100 años en uso, la cobertura actual es superior al 90% en todo el mundo.

A pesar del uso generalizado de la vacuna BCG, la tuberculosis sigue siendo la enfermedad transmisible que causa gran número de muertes y casos cada año, considerándose una gran amenaza de salud pública a nivel mundial y por ello es esencial conseguir nuevas vacunas con una mejora eficacia que BCG en la protección contra la tuberculosis respiratoria, que es la forma transmisible de la enfermedad.

La tuberculosis en humanos esta mayoritariamente causada por *M. tuberculosis*, principalmente por las tres variantes o linajes modernos llamados L2, L3 y L4, transmitiéndose en la mayoría de los casos de persona a persona por siendo la fuente un enfermo con tuberculosis respiratorias. De cada 10 personas que se infectan por *M. tuberculosis* 1 desarrolla la enfermedad y sin tratamiento el 50% de las personas con tuberculosis muere [9].

Las tasas de incidencia y mortalidad de tuberculosis han ido disminuyendo lentamente desde principios del siglo XXI, pero la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2019 más de 10,0 millones el número de nuevos casos y más de 1,4 millones de muertes fueron causadas por la enfermedad a nivel

mundial [1]. La mortalidad por tuberculosis sólo ha sido superada por la pandemia de COVID-19 que en 2020 provocó 2 millones de muertes según lo informado por la OMS [9] (Figura 2). La tuberculosis y la COVID-19 son ambas enfermedades de transmisión respiratoria y se estima que debido a la pandemia de COVID-19, y al confinamiento ha disminuido el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis, con lo que se estima que las muertes por tuberculosis podrían aumentar hasta un 16% en los próximos cinco años [10]. En los países de ingresos altos, la tuberculosis afecta principalmente los ancianos, como la COVID-19, mientras que en países en desarrollo con bajos recursos, cada año la tuberculosis afecta principalmente a adultos jóvenes y de mediana edad, los miembros más productivos de la sociedad por lo que el impacto en la economía de los países en desarrollo es enorme.

A nivel mundial, unos 50 millones de personas están hoy infectados con cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes a Isoniacida y Rifampicina (TB-MDR), los fármacos de primera generación más eficaces para tratar la enfermedad, y con otras cepas con una resistencia extendida a fármacos de segunda generación, como quinolonas y aminoglucósidos entre otros fármacos (TB-XDR). Estas nuevas cepas de *M. tuberculosis* MDR y XDR dificultan enormemente el tratamiento de la tuberculosis y pueden ser el origen de futuras epidemias de tuberculosis MDR, XDR y pueden convertirse en Totalmente Resistentes a los fármacos hoy en uso (TB-TDR) siendo una amenaza para posibles futuras pandemias para las que no existiría tratamiento (Figura 3).

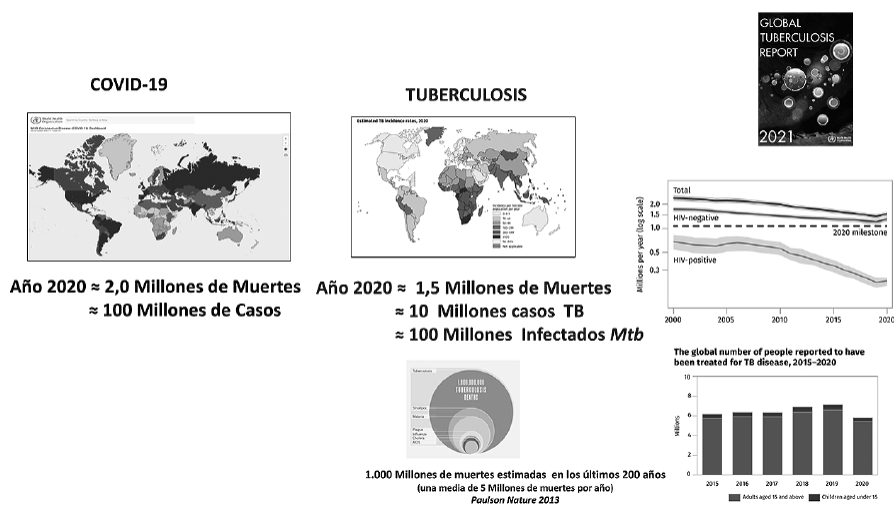


Figura 2: COVID-19 y tuberculosis dos enfermedades infecciosas de transmisión respiratoria. La mortalidad por tuberculosis sólo ha sido superada por la mortalidad por SARS-Cov2 en los dos últimos años. Se calcula que la tuberculosis ha causado más de 1000 millones de muertos en los últimos 200 años. Tras el descenso continuado del número de casos y muertes causada por la tuberculosis desde el año 2000, en el año 2020 ha habido un repunte debido a la pandemia de COVID-19, disminuyendo además el número de tratamientos con lo que se prevé un aumento de número de casos en los próximos años.

TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE HOY

1.- Aparición de cepas resistentes a los fármacos: (1990 MDR; 2000 XDR; 2010 TDR)



2.- Pandemia de SIDA (1980)

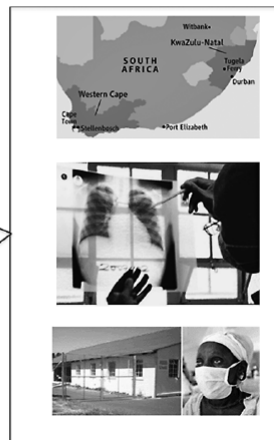
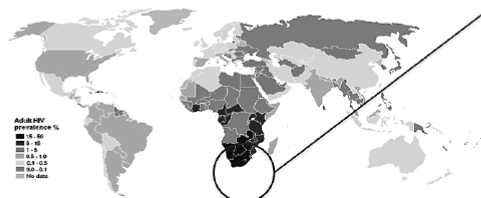


Figura 3: La asociación de SIDA y tuberculosis es tremendamente mortífera. En los años 90 del siglo XX aparecieron cepas Multirresistentes (MR) asociadas al SIDA y desde los inicios del siglo XXI se han descrito cepas resistentes a la mayor parte de los fármacos en uso (XDR) o totalmente resistentes (TDR).

La Estrategia Fin de la Tuberculosis de la OMS (END-TB) busca a reducir la morbilidad por tuberculosis en un 90 % y la mortalidad por tuberculosis en un 95 % para 2035. Para lograr este ambicioso objetivo necesitamos urgentemente tener nuevos diagnósticos más rápidos y accesibles, encontrar nuevos fármacos que permitan acortar el tiempo de tratamiento y desarrollar nuevas vacunas preventivas eficaces contra las formas pulmonares de tuberculosis pulmonar, única forma de poder erradicar la enfermedad en un futuro próximo [11].

3. INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

La investigación en nuevas vacunas contra la tuberculosis ha sido identificada como una prioridad para la OMS, siendo su objetivo disponer de vacunas que protejan contra la enfermedad pulmonar tuberculosis en adultos, así como nuevas vacunas con mayor eficacia que BCG para administrar en recién nacidos [12].

En los últimos 25 años la investigación en nuevas vacunas contra la tuberculosis ha sido muy intensa. Actualmente 14 vacunas candidatas se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico, desde la Fase 1 (decenas de voluntarios) , Fase 2 (centenas de voluntarios) hasta la Fase 3(miles de voluntarios) [13,14]. Los 14 candidatos los podemos incluir en tres diferentes categorías de estrategias de vacunación:

1. Vacunas preventivas subunidades basadas en la fusión de una o más proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, que pueden ser vehiculadas a su vez, bien por vectores virales que codifican para los genes de los antígenos, o bien sintetizadas en el laboratorio y administradas con adyuvante. Estas vacunas se administran en personas previamente vacunadas con BCG con el objetivo de aumentar la inmunidad a BCG;
2. Vacunas terapéuticas con bacilos inactivados, cuya finalidad es su uso en personas previamente infectadas con *M. tuberculosis*, se denominan “vacunas terapéuticas” y su objetivo es disminuir el tratamiento de la tuberculosis latente (LTBI) .
3. Vacunas preventivas basadas en el bacilo atenuado, que tienen como objetivo el reemplazo de la actual vacuna BCG al nacimiento y/o que además puedan prevenir la tuberculosis respiratoria en adolescentes y adultos (Figura 4).

DIVERSIDAD DE LOS 14 CANDIDATOS A VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS EN ENSAYOS CLINICOS

SUBUNIDADES / Nuevos Adyuvantes	SUBUNITS		VECTORES VIRALES			WHOLE CELL MYCOBACTERIA		
	ADJUVANTED		VIRAL VECTORED			INACTIVATED		
	ORIGIN	ADJUVANT/ VIRAL VECTOR	CONTENT IN <i>M. tuberculosis</i> T-CELL ANTIGENS	ORIGIN	SOURCE	METHOD FOR ATTENUATION/ INACTIVATION	CONTENT IN <i>M. tuberculosis</i> T-CELL ANTIGENS	
VECTORES VIRALES	VIRAL VECTORED	Chadox MVA USA	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 1	<i>M. vaccae</i> <i>M. vaccae</i> ®	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 1	<i>M. indicus</i> <i>pranii</i>	Heat	?
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. vaccae</i> <i>M. obsoleta</i>	Heat	?
		TBTFUdual	Chimeras Adenovirus + MVA	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	Detailized fragments of <i>M. tuberculosis</i> in a liposomal formulation	?
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2B	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
	SUBUNITS	MVA/Ag85A	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2B	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
		MVA/Ag85A	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
SUBUNIDADES / Nuevos Adyuvantes	ADJUVANTED	MVA/Ag85A	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2B	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
		MVA/Ag85A	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
	SUBUNITS	MVA/Ag85A	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2B	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
		MVA/Ag85A	Adenovirus	Ag85A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2B	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	
					<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	<i>M. tuberculosis</i> Phase 2A	?	

Figura 4: 14 Diferentes candidatos de vacuna contra la tuberculosis. Las vacunas subunidades, basados en vectores virales y proteínas con nuevos adyuvantes y vacuna con bacterias completas bien, inactivadas diseñadas para su uso como vacunas terapéuticas o bacterias vivas atenuadas diseñadas para reemplazar a la actual vacuna BCG al nacimiento y que además puedan prevenir la tuberculosis respiratoria en adolescentes y adultos (modificada [4]).

El mayor reto en el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis es comprender los mecanismos por los cuales *M. tuberculosis* se evade y escapa a las respuestas inmunitarias del huésped. Sin un buen conocimiento de las bases inmunológicas de la protección contra la tuberculosis, es muy difícil diseñar vacunas con un número limitado de antígenos como las vacunas subunidades que puede proteger contra la enfermedad.

Como el profesor Douglas Young indicó, necesitamos nuevas vacunas contra la tuberculosis que protejan contra la enfermedad y necesitamos entender los mecanismos de la inmunología de la enfermedad para obtener estas vacunas [15] (Figura 5). Por eso es muy importante estudiar la dinámica inmune huésped-patógeno de *M. tuberculosis*, ya que el 90% de los infectados con tuberculosis no desarrollan la enfermedad.

Los avances en la genética de las micobacterias se hicieron por primera vez en la década de 1980, con más de 20 años de retraso con respecto a *Escherichia coli*, principalmente debido a la dificultad en manipulación y la patogenicidad de algunas especies de micobacterias, concretamente *M. tuberculosis*, que es un patógeno de transmisión respiratoria, que tarda semanas en crecer y debe manipularse en laboratorios de seguridad biológica nivel 3.

“Necesitamos comprender mejor la inmunología de la tuberculosis para desarrollar nuevas vacunas y necesitamos nuevas vacunas eficaces para comprender los mecanismos de protección contra la tuberculosis”.

“We need a better understand of the immunology of tuberculosis to develop new vaccines and we need new effective vaccines to understand the mechanisms of protection against TB.”



Douglas Young “New TB vaccines for the future”
Symposium Fundación Areces, Zaragoza, 2010



Figura 5: Douglas Young: No conocemos los mecanismos de protección contra la tuberculosis. Para la tuberculosis como para el Sida o la Malaria no conocemos una correlación de protección. La protección contra tuberculosis necesita de una inmunidad celular que hoy no esta perfectamente comprendida. Por eso la eficacia contra las formas respiratorias de tuberculosis de una nueva vacuna debe probarse en países endémicos y a su vez una vacuna eficaz nos permitirá comprender la inmunidad que confiere la protección.

Este retraso en el desarrollo de herramientas genéticas de micobacterias dificultaba la construcción de nuevas vacunas vivas atenuadas contra la tuberculosis. En los años 80 del siglo XX, antes de la aparición del SIDA, la OMS tenía como objetivo la eliminación de la tuberculosis para el año 2.000 y pocos investigadores se pusieron a trabajar a nivel molecular con el bacilo de la tuberculosis, al ser lento y difícilmente manipulable a nivel genético y además patógeno.

La profesora Brigitte Gicquel en Europa (Instituto Pasteur de Paris) y el Dr William Jacobs (Albert Instein Institut, Nueva York) fueron los pioneros en el de-

sarrollo de la genética de las micobacterias. La Dra G Brigitte Gicquel desarrollo técnicas que permiten introducir ADN en micobacterias así como protocolos de inactivación de genes en *M. tuberculosis* por ingeniería genética [16-21]. Estas metodologías permitieron construir MTBVAC de un aislado clínico de origen humano. La construcción de vacunas vivas atenuadas es tediosa y una estrategia muy laboriosa frente a otro tipo de vacunas, ya que implica comenzar desde cero y teniendo que demostrar en una primera etapa la atenuación y la seguridad del candidato a vacuna y luego el aumento de inmunidad y de protección frente a la tuberculosis primero en modelos animales y luego en clínica.

En el año 2005 se celebró en Ginebra una reunión de consulta donde todos los implicados e interesados en el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis, desde científicos investigadores, a los fabricantes de vacunas, y los reguladores, se reunieron con el objetivo de definir los criterios de seguridad para que las vacunas de vivas atenuadas pudieran entrar en ensayos clínicos, revisando los pasos necesarios para su primera evaluación clínica en humanos (Fase 1). Como resultado de esta consulta de la OMS, se llegó al “Consenso de Ginebra” para el desarrollo de nuevas vacunas vivas contra la tuberculosis [22].

MTBVAC fue diseñado y construido cumpliendo los requisitos marcados por el Consenso de Ginebra con dos premisas principales :

1. Contener dos mutaciones estables, por eliminación de genes, lo que evita la reversión de la virulencia del bacilo de una sola mutación y
2. No contener marcadores de resistencia a antibióticos, para evitar la diseminación de genes de resistencia al medio ambiente.

MTBVAC muestra en diferentes modelos animales perfiles similares de seguridad y biodistribución a la actual vacuna BCG [23] y una mejor protección contra la tuberculosis [24–27].

A fecha de hoy, MTBVAC sigue siendo el primer y único candidato a vacuna, viva atenuada, genéticamente modificada, basado en el patógeno humano *M. tuberculosis* y que cumple los requisitos del consenso de Ginebra para su desarrollo clínico.

Siguiendo el consejo de las autoridades regulatorias, en España la Agencia Española del Medicamento y productos sanitarios (AEMPS) en Suiza (Swissmedic), en Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la OMS, BCG se ha utilizado en todos nuestros estudios como patrón de referencia en el desarrollo preclínico, clínico e industrial de MTBVAC.

La principal ventaja de utilizar vacunas vivas cuya construcción ha sido basada en métodos racionales atenuación de *M. tuberculosis* es su capacidad para mantener la totalidad del repertorio antigénico incluyendo los antígenos inmunodominantes que están ausentes en BCG. Las deleciones cromosómicas en los genes de virulencia proporcionan seguridad y estabilidad genética con el objetivo de que MTBVAC confiera respuestas inmunitarias más específicas y duraderas en humanos, que BCG y que pueda proporcionar protección contra todas las formas de la enfermedad principalmente las formas respiratorias, responsables de la transmisión.

4. MTBVAC CONCEBIDO EN LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA SIGUIENDO LOS PRINCIPIOS CLÁSICOS DE LA VACUNOLOGÍA DE LOUIS PASTEUR CON NUEVAS TECNOLOGÍAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

MTBVAC y BCG son ambas vacunas vivas atenuadas. MTBVAC se construyó a partir de una cepa *M. tuberculosis* causante de tuberculosis en humanos y BCG se construyó a partir de una cepa de *Mycobacterium bovis* causante de tuberculosis en bóvidos. Tanto *M. tuberculosis* como *M. bovis* pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (MTBC). Los miembros del MTBC tienen más del 99,95% de similitud a nivel de nucleótidos, con una idéntica secuencia de ARNr 16S y una estructura de población estrictamente clonal sin evidencia de transferencia horizontal de genes reciente [28]. Tanto *M. tuberculosis* como *M. bovis* derivan de un ancestro común del MTBC [29]. Hoy en día, los análisis de secuenciación del genoma global han demostrado que en relación con el patógeno adaptado a humanos *M. tuberculosis*, *M. bovis* tiene un contenido de genes ligeramente más pequeño, debido a numerosas deleciones genómicas perdiendo regiones que denominamos, regiones diferenciales (RD), que van desde RD4 a RD11 [30]. La pérdida de estas regiones, y en concreto RD9 y otros RDs específicos en *M. bovis*, permiten componer el árbol evolutivo de MTBC.

Como resultado del proceso de repetir el cultivo 230 veces en medio enriquecido de laboratorio de *M. bovis* fue atenuada entre 1908 y 1921 y hoy sabemos

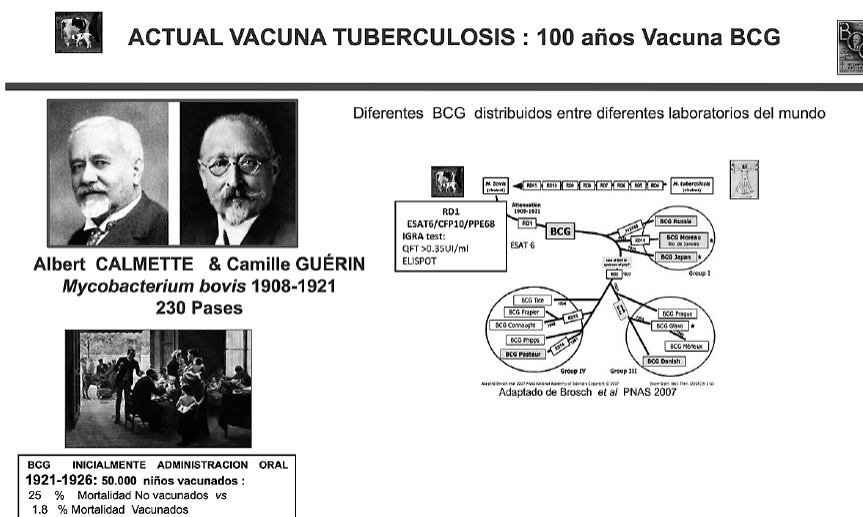


Figura 6: Construcción de la actual vacuna contra la tuberculosis BCG . Albert Calmet y Camille Guérin atenuaron una cepa de *Mycobacterium bovis* que causaba tuberculosis en las vacas y la atenuaron con la tecnología de la época, subclutivando 230 veces durante 13 años (*M. bovis* tarda en crecer de 3-4 semanas) en medio de cultivo en el laboratorio. En los 5 años de ensayos clínicos observaron una disminución de mortalidad de 10 veces en los bebés vacunados con BCG, no solo mortalidad por tuberculosis sino por otras enfermedades infecciosas. Actualmente diferentes cepas e BCG se usan como vacuna en clínica y todas ellas derivadas de *M. bovis* y no de *Mycobacterium tuberculosis*.

que BCG contiene alrededor de 100 genes menos en relación con *M. tuberculosis* [29] (Figura 6). Entre los genes perdidos esta la delección de la región RD1, que codifica para el sistema de secreción de proteínas ESX-1 (ESAT6), y que se considera la delección más relevante para la atenuación de BCG [30]. Hoy sabemos que los epítomos que reconocen las células T están evolutivamente extremadamente conservados en los diferentes aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* [31,32] y es importante resaltar que las regiones perdidas en las cepas BCG también contienen potentes proteínas antigénicas con un gran número de epítomos.

Un análisis actualizado basado en estudios previos [33,34], encuentra que de los 1.603 epítomos de células T humanas identificados y validados experimentalmente en *M. tuberculosis*, 433 de ellos (27 %), están ubicados en regiones de RD ausentes en BCG Pasteur. Estos epítomos se distribuyen en RD1 (307 epítomos), RD2 (59 epítomos), RD11 (42 epítomos), y pequeños porcentajes en RD 3-10, 13 y 14. La gran cantidad de epítomos ausentes en BCG se encuentra ubicada en solo cinco proteínas antigénicas dentro del RD1, y son ESAT6 (112 epítomos), CFP10 (95 epítomos) y PPE68 (79 epítomos) y dentro de RD2, la proteína MPT64 (24 epítomos) y la que codifica Rv1985c (23 epítomos) [35]. Estos estudios respaldan aún más la hipótesis de que la pérdida de estos epítomos ausentes en BCG podrían potencialmente afectar el reconocimiento de células T humanas dando como resultado la falta de reconocimiento por el sistema inmunitario del huésped y por lo tanto la no protección contra las formas de tuberculosis respiratorias [33,34,36,37].

5. AISLAMIENTO DEL PATÓGENO HUMANO, ATENUACIÓN POR INACTIVACIÓN DE LOS GENES: *PHOP* Y *FADD26*

La primera pregunta que se plantea a la hora de diseñar una nueva vacuna viva atenuada basada en el patógeno humano *M. tuberculosis* es ¿Qué genes seleccionar para la atenuación de *M. tuberculosis*?

La idea de la construcción de MTBVAC surge de lo que aprendimos de la epidemia en España a principios de la década de 1990, que fue causada por una cepa de *M. bovis* multirresistente (MDR) responsable de más de 100 muertes entre pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH). Este brote de tuberculosis MDR se produjo en los años 90 antes de que se instaurará el tratamiento antiretroviral contra el VIH que hoy hace aumenten los linfocitos CD4 de los pacientes y hace del SIDA una enfermedad crónica [38–40]. El brote fue muy inusual, ya que, aunque *M. bovis* puede causar enfermedad en los humanos, su transmisión por vía respiratoria entre humanos es extremadamente infrecuente.

Tras la caracterización molecular de esta cepa de *M. bovis* causante del brote de tuberculosis MDR y que posteriormente se convirtió en extensivamente resistente a la mayor parte de los medicamentos antituberculosos (XDR) [41]. A esta cepa *M. bovis* XDR la denominamos “cepa B”. Los estudios moleculares de la cepa B mostraban una copia extra de la de la secuencia de inserción *IS6110* cuando se comparaba con otras cepas de *M. bovis* había saltado delante del *phoP*.

El salto de *IS6110* delante gen *phoP* confería un aumento de su transcripción, comportándose *IS6110* como promotor. Estudios posteriores mostraron que esta hiper expresión del gen *phoP* era el responsable del aumento de la transmisión y la virulencia de la “cepa B” *M. bovis* XDR causante de la mortalidad de más de 100 pacientes [38,42,43] (Figura 7).

BROTE DE TUBERCULOSIS MDR (XDR) *Mycobacterium bovis*

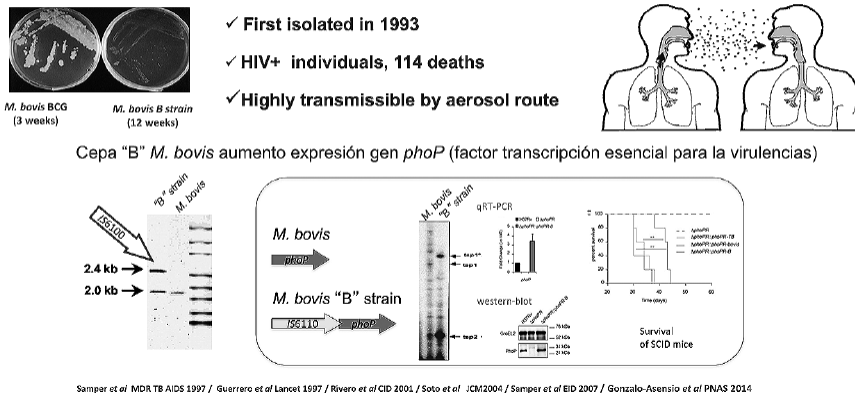


Figura 7: Una cepa de *Mycobacterium bovis*, “cepa B”, causó un brote de tuberculosis multirresistente (MDR) entre pacientes VIH positivos enfermos de SIDA. Esta cepa B causando más de un centenar de muertes. La inserción de una copia extra de la secuencia de inserción *IS6110* delante del gen que codifica para el factor de transcripción *PhoP* aumentando su expresión y viéndose que este aumento de expresión era responsable del aumento de virulencia en dicha cepa.

Estos estudios nos llevaron a plantear la hipótesis de que la proteína *PhoP*, parte del sistema de dos componentes *PhoP/PhoR*, podría ser esencial para la virulencia de *M. tuberculosis* y por lo tanto, su inactivación en una cepa clínica de *M. tuberculosis* podría atenuar la virulencia del bacilo tuberculosis humano e hipotéticamente podría ser utilizado como vacuna [43] (Figura 8).

MTBVAC fue construido y caracterizado siguiendo los requisitos de seguridad del Consenso de Ginebra [22], y en este sentido fue diseñado para contener dos delecciones genéticas estables independientes, sin marcadores de resistencia a antibióticos. Las delecciones estables se realizaron inactivando en primer lugar el gen *phoP* (Rv0757) y una segunda mutación en el gen *fadD26* (Rv2930). Los dos genes codifican importantes factores de virulencia garantizando que no revierta la virulencia [23]. La cepa original utilizada para la construcción de MTBVAC fue el aislado clínico de *M. tuberculosis*, Mt103 original de un paciente con tuberculosis, pertenece a la variante L4 de *M. tuberculosis*, y que representa la variante de mayor distribución en Europa, África y América causante de tuberculosis en humanos [44] (Figura 9).

Papel esencial del *phoP* en la virulencia de *M. tuberculosis*:

Racional para la construcción MTBVAC

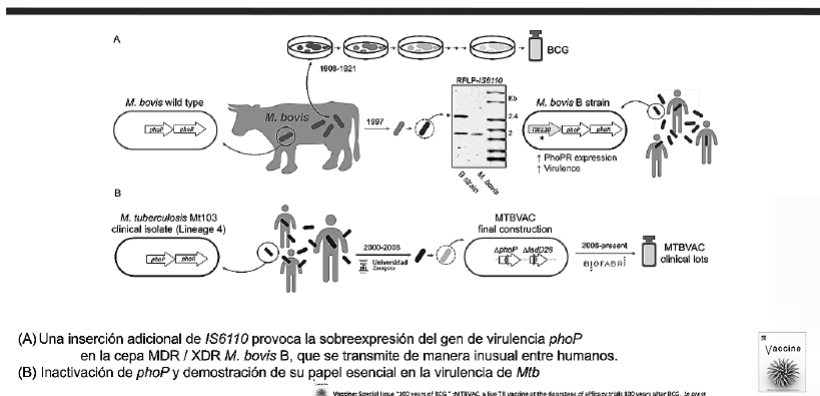


Figura 8: Racional para la construcción de MTBVAC. Mientras BCG fue desarrollada por la atenuación de una cepa de *M. bovis* tras cultivarla en el laboratorio. La epidemia de *M. bovis* multirresistente nos indicó el papel esencial del gen *phoP* en la virulencia de *M. tuberculosis*, con lo que la inactivación en una cepa de clínica de *M. tuberculosis* conserva los antígenos del bacilo humano con una atenuación similar a la presente vacuna BCG [84].

El gen *phoP* fue elegido debido a nuestras observaciones previas de que el sistema de dos componentes PhoPR es esencial para la virulencia de *M. tuberculosis* [43]. Nuestros estudios muestran que PhoP regula más del 2 % de los genes de *M. tuberculosis*, la mayoría de los cuales están implicados en la virulencia del bacilo [45], y Entre los genes regulados por PhoP se encuentran otros factores de transcripción, como , WhiB6 [46] o el control ARN no codificantes, como el *mcr7* que a su vez regula el sistema de secreción TAT, y la mutación del gen *phoP* conduce a una secreción excesiva de antígenos mayores de tuberculosis, como los antígenos del complejo Ag85 (Figura 9) [47].

Otros genes de virulencia relevantes para el aumento de la inmunidad de la vacuna MTBVAC y regulados por PhoP son genes implicados en el metabolismo de lípidos (p. ej., *pks2*, *pks3*) necesarios para la biosíntesis de las aciltrehalosas derivadas de poliquétidos (DAT, PAT) y sulfolípidos (SL1), lipídicos que se encuentran en la pared externa del bacilo de la tuberculosis e interfirieron con el reconocimiento de *M. tuberculosis* por el sistema inmunitario del huésped, por lo que la vacuna MTBVAC perdería estos lípidos y así el sistema inmunitario podría reconocer mejor los antígenos de *M. tuberculosis*. [48,49]. Entre otros genes regulados por PhoP está el locus *espACD*, implicado en la secreción del antígeno principal y la virulencia factor ESAT6, por lo que los mutantes *phoP* son incapaz de exportar ESAT6 con lo que pierde su virulencia, aunque son capaces de producirlo y retenerlo en el interior de la bacteria (Figura 9) [22,50,51].

Para cumplir con los requisitos de Ginebra, el segundo gen seleccionado para la construcción de MTBVAC fue el gen *fadD26*. El gen *fadD26* es el primer gen de un enorme operón requerido para la biosíntesis y exportación de phthiocerol dimi-

cocerosato (PDIM), el principal lípido de la pared celular asociado a la virulencia de *M. tuberculosis* [52-55]. La evidencia reciente indica que PDIM están involucrados en la ruptura fagosomal en concierto con ESAT-6 [52,56,57] (Figura 9) y todas las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en clínica lo producen y la pérdida de PDIM en el subcultivo de cepas de *M. tuberculosis* conlleva a su atenuación.

DIFERENCIAS MAYORES DE LA ACTUAL VACUNA BCG vs MTBVAC

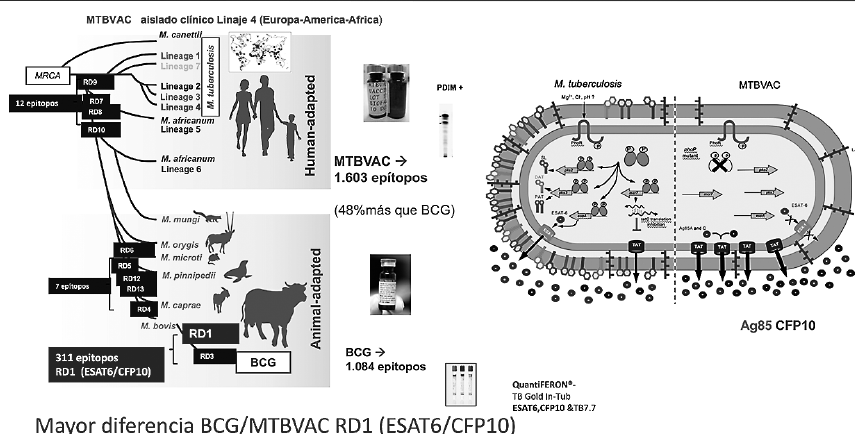


Figura 9: Diferencias mayores entre la vacuna actual BCG y MTBVAC. *MTBVAC fue construida a partir de un aislado clínico de M. tuberculosis del Linaje 4, el más frecuentemente aislado en todo el mundo. Contiene más de 1.600 epítomos reconocidos por los linfocitos CD4 humanos. BCG construida a partir de una cepa de M. bovis, con gran número de antígenos seleccionados conteniendo un 50% menos de epítomos que MTBVAC. Las diferencias mayores de la cepa vacunal MTBVAC y una cepa patógena de M. tuberculosis, son la pérdida de MTBVAC de los lípidos externos que interfieren con la inmunidad del huésped, la ausencia de la secreción del factor de virulencia ESAT6 y la secreción de CFP10 y mayor secreción de Antígeno 85 proteínas muy inmunógenas no presentes en BCG. Figuras diseñadas por **Jesús Gonzalo Asensio** dirige la línea de investigación “Evolución de la patogenicidad adaptativa del complejo M. tuberculosis” dentro del Proyecto Vacuna tuberculosis y Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Zaragoza.*

6. ESTUDIO DE LA ATENUACIÓN Y PROTECCIÓN EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES: RATONES, COBAYAS PRIMATES NO HUMANOS

Como se describe en los requisitos del segundo consenso de Ginebra para vacunas de micobacterias vivas, todos los estudios de caracterización preclínica de las nuevas vacunas candidatas contra la tuberculosis deben usar BCG como patrón oro de referencia, de modo que cualquier nueva vacuna viva atenuada debe ser al menos tan segura como BCG y mostrar una mejora significativa de protección a la enfermedad de tuberculosis en los modelos animales [51]. Entre 2001 y 2011, se realizaron estudios rigurosos de seguridad preclínica, eficacia protectora e inmunogenicidad con MTBVAC en colaboración con diferentes laboratorios indepen-

7. BIOFABRI UNA COMPAÑÍA BIOFARMACÉUTICA ESPAÑOLA SOCIO DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA PARA EL DESARROLLO INDUSTRIAL Y CLÍNICO DE MTBVAC

Pasar de la investigación básica, en el ambiente académico de una Universidad, al desarrollo clínico de un producto, ya sea fármaco o vacuna, requiere la colaboración de un socio industrial que verdaderamente apueste por el desarrollo de proyecto. Esta transición del laboratorio a la empresa, es lo que en ciencia se denomina coloquialmente como el “Valle de la muerte”, en el que las inversiones únicamente públicas no son suficientes y se necesita de la apuesta arriesgada de empresas que crean en el proyecto.

Para este paso en el año 2006 la Universidad de Zaragoza recibió una ayuda de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT) a través de Genoma España para la producción del lote piloto en GMP (Good Manufacturing Practice) de MTBVAC, imprescindible para pasar de los estudios preclínicos a los estudios clínicos en humanos. A través de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la Universidad de Zaragoza, comenzó una larga búsqueda de compañías farmacéuticas en diferentes países europeos, que pudieran producir el lote clínico de MTBVAC actuando como Organización de Investigación por Contrato (CRO, Contract Research Organization por sus siglas en inglés). Finalmente, la Universidad de Zaragoza contactó con la empresa CZ Veterinaria, farmacéutica española, con sede en Porriño, Vigo Galicia.

CZ Veterinaria se dedicaba a la producción de diversas vacunas veterinarias a nivel internacional y tenía una enorme experiencia en el trabajo con micobacterias patógenas de crecimiento lento como *Mycobacterium paratuberculosis*, para la producción de la vacuna Gudair contra la Enfermedad de Jonne’s Disease en el ganado y de *M. bovis* para la producción de la tuberculina para el diagnóstico de la tuberculosis en animales. Esta enorme experiencia garantizaba la producción de MTBVAC en GMPs y a través de un servicio CRO para la producción de productos farmacéuticos en GMP. Esto fue financiado por un proyecto del programa INNO-CASH concedido a la Universidad de Zaragoza por la FECYT, con el Compromiso de la empresa Biofabri de invertir en el desarrollo Industrial y Clínico de MTBVAC. Para dar este paso fue esencial el apoyo decidido de Esteban Rodríguez, director de CZ Veterinaria impulsor del proyecto y de todo su equipo. Tras esta primera colaboración CZ Veterinaria se implicó de lleno en el proyecto MTBVAC y decidió la creación de una empresa filial llamada Biofabri para desarrollar y fabricar vacunas de uso humano.

En el año 2008 la Universidad de Zaragoza y Biofabri deciden aunar sus esfuerzos y firman un acuerdo para el desarrollo industrial y clínico de MTBVAC. Biofabri apuesta por el desarrollo industrial de MTBVAC como un liofilizado similar al utilizado en la administración actual de la actual vacuna BCG, con una formulación de conformidad con las GMPs y cumpliendo la normativa regulatorios para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de la vacuna liofilizada MTBVAC [23] (Figura 11).

El éxito del desarrollo preclínico y GMP de MTBVAC para apoyar la primera evaluación clínica de Fase 1 en humanos fue el resultado de la estrecha colabora-

ción entre Biofabri, Universidad de Zaragoza, y la Iniciativa Europea Vacuna Tuberculosis sin fines de lucro (TBVI) [13]. Desde 2008, el proyecto MTBVAC ha recibido la colaboración de expertos externos que asesoran el desarrollo preclínico, regulatorio, GMP y clínico de MTBVAC, facilitado a través de los equipos de expertos en desarrollo industrial de MTBVAC (PDT Product Developing Team) y del desarrollo clínico de MTBVAC (CDT, Clinical Development Team), de TBVI [23,27]. Con la ayuda de los PDT y CDT de MTBVAC se solicitó el asesoramiento científico de las autoridades nacionales a la Agencia Española del Medicamento y productos Sanitarios (AEMPS) por ser España el país donde se realizaba la fabricación de la vacuna por la empresa Biofabri con la subsiguiente revisión y aprobación de sus instalaciones para la producción de MTBVAC.

En el año 2012 UNIZAR y Biofabri firman un nuevo acuerdo por el cual Biofabri es, oficialmente, el fabricante industrial autorizado por la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) y licenciatario exclusivo de MTBVAC. Comprometiéndose en ser el patrocinador e impulsor del desarrollo industrial y del desarrollo clínico de MTBVAC en colaboración con la Universidad de Zaragoza, propietario intelectual del MTBVAC.

ACUERDO PARA EL DESARROLLO CONJUNTO DEL PROYECTO “VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS”



Universidad de Zaragoza

BIOFABRI



2008



Figura 11: Acuerdo para el desarrollo de MTBVAC: Universidad de Zaragoza-Biofabri. En el año 2008 siendo Manuel López rector de la Universidad de Zaragoza, se firmó el acuerdo de colaboración de la Universidad de Zaragoza con la empresa Biofabri perteneciente al grupo Zenda, para desarrollar una nueva vacuna contra la tuberculosis. En la fotografía la Dra Brigitte Gicquel del Instituto Pasteur de París, yo mismo, el rector Manolo López, Esteban Rodríguez consejero delegado del grupo CZ (CZ Veterinaria y Biofabri) y Rafael Camacho director de Genoma España.

Hoy la compañía española Biofabri, perteneciente al grupo Zendal, es el socio industrial de la Universidad de Zaragoza y licenciatario exclusivo de MTBVAC. Biofabri es responsable del desarrollo industrial y clínico de MTBVAC y espónsor de los ensayos clínicos en colaboración con la Universidad de Zaragoza, TBVI, IAVI y las Universidades y Centros de los países donde se desarrollan los ensayos clínicos, Suiza, Sudáfrica, Senegal y Madagascar.

8. MTBVAC DEL LABORATORIO AL PRIMER ENSAYO CLÍNICO EN HUMANOS EN SUIZA

Se planificó el primer estudio de MTBVAC en humanos en Suiza, ya que al tratarse MTBVAC de una vacuna viva atenuada, buscamos un país europeo de nuestro entorno con una enorme experiencia en ensayos clínicos Fase I en vacunas de SIDA y Tuberculosis. Para ello Biofabri con la colaboración del PDT y del CDT de TBVI contactó con las autoridades reguladoras suizas (Swissmedic). Después de una revisión minuciosa de todos los datos preclínicos, biodistribución y toxicología previamente obtenidos con la vacuna experimental, recibió el asesoramiento de los reguladores de Swissmedic para la producción del lote clínico de MTBVAC.

Nuevos estudios fueron diseñados y realizados para lograr la caracterización del liofilizado de la formulación final de MTBVAC que entraría en el ensayo clínico. Los nuevos estudios del lote final de MTBVAC incluyeron toxicidad formal y tolerancia local en ratones, y 6 meses estudios de distribución de órganos, persistencia/aclaramiento y excreción en modelos bien establecidos de tuberculosis en ratones y cobayos. En todos los estudios empleó la actual vacuna BCG licenciada en Europa BCG SSI (Staten Serum Institut de Copenhague) de grado clínico en formulación de liofilizado para 10 dosis de 0.1ml tras su constitución con diluyente, una formulación idéntica a la de MTBVAC.

En todos los estudios se incluyó BCG como patrón oro de referencia comparador estándar, la misma cepa que fue utilizada como control en el ensayo de Fase I en adultos. Todas las pruebas *in vitro* e *in vivo*, en ratones y cobayos para la liberación del lote clínico liofilizado de MTBVAC, se establecieron siguiendo las normas de Farmacopea Europea y las directrices de la OMS para la producción y el uso de BCG liofilizado (BCG SSI) de grado clínico liofilizado.

En el año 2010 se realizaron estudios preclínicos de MTBVAC solicitados por las autoridades suizas (Swissmedic). Los estudios los realizaron compañías autorizadas independientes y financiados por el programa INNOCASH del Gobierno de España. El diseño de estos estudios fue el resultado de la estrecha colaboración entre la Universidad de Zaragoza, Biofabri y TBVI.

Los estudios adicionales de seguridad y toxicidad mostraron que la formulación liofilizada de MTBVAC es, al menos, tan segura como BCG SSI, resultando ser algo menos reactogénica en ratones y cobayos [23]. Los estudios en ratones recién nacidos mostraron que el MTBVAC liofilizado y BCG SSI presentan perfiles comparables de seguridad y ausencia de toxicidad, mostrando los animales un comportamiento, crecimiento y desarrollo normal y una supervivencia de los 6 meses

que fue diseñado el experimento, no observándose ningún efecto en el desarrollo de órganos analizados en la necropsia [58].

Todos datos obtenidos en los estudios preclínicos de MTBVAC, así como su producción industrial de los lotes clínicos liofilizados en GMP llevaron a obtener la aprobación reglamentaria de los reguladores médicos suizos (Swissmedic) que dieron luz verde a la aprobación de la primera evaluación clínica en humanos en adultos sanos en Lausana, Suiza, en octubre de 2012, siendo la primera vez en la historia de la vacunología que una vacuna viva atenuada derivada de una cepa clínica de *M. tuberculosis* era ensayada en humanos [23,27,60] (Figura 10). El primer ensayo clínico se realizó en voluntarios adultos sanos (Fase 1) en el Hospital Universitario de Lausana (CHUV) y dirigido por el Prof. François Spertini (NCT02013245). El promotor del estudio fue Biofabri y fue cofinanciado por la Fundación Gates, a través de la iniciativa europea TBVI (Figura 12) [60].

Después de 11 años de intensa investigación y estudios con animales, la aprobación en octubre de 2012 para entrar en la Fase 1 MTBVAC hasta llegar a la de la actual vacuna BCG SSI, utilizada como control de dosis en humanos una evaluación clínica de MTBVAC fue un hito muy importante en el proyecto Vacuna tuberculosis. Los objetivos primarios de esta Fase 1 fueron estudiar la seguridad y la tolerancia local de MTBVAC en comparación con BCG SSI y como objetivo secundario el estudio de la inmunogenicidad en voluntarios adultos sanos sin antecedentes de vacunación BCG, o exposición a tuberculosis (PPD-negativo) y/o VIH [60]. La Fase 1 incluyó un total de 36 voluntarios adultos entre 18 y 45 años. En el estudio doble ciego los voluntarios se vacunaron aleatoriamente con MTBVAC o con BCG, escalándose la dosis de MTBVAC.

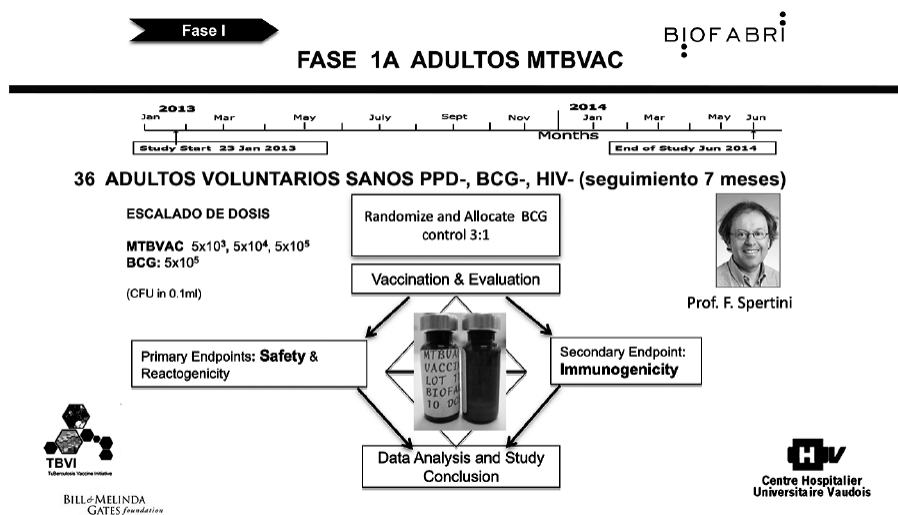


Figura 12: Fase 1 Seguridad de MTBVAC en adultos Sanos en Suiza. La Fase 1 incluyó un total de 36 voluntarios adultos entre 18 y 45 años. En el estudio doble ciego los voluntarios se vacunaron aleatoriamente con MTBVAC o con BCG, escalándose la dosis de MTBVAC. Investigador Principal Profesor François Spertini.

El estudio se dividió en 3 cohortes de 12. El estudio se inició con la cohorte 1, en el que 9 voluntarios fueron vacunados con la dosis más baja de MTBVAC (10x3) y 3 vacunados con el control BCG (10x5) de forma aleatoria, distanciándose en el tiempo cada vacunado. Tras 2 meses un comité de expertos externos independientes (DSMB: Data and Safety Monitoring Board) comprobó la seguridad y aprobó el paso a la vacunación de la cohorte 2. La cohorte 2 incluía 9 vacunados con MTBVAC dosis intermedia (10x4) y 3 vacunados con el control BCG (10x5). Tras comprobar la seguridad de esta cohorte por DSMB, se vacunó la cohorte 3 que incluía 9 vacunados con MTBVAC dosis intermedia (10x5) y 3 vacunados con el control BCG (10x5). Al final del estudio disponíamos de 4 grupos. Nueve voluntarios vacunados con una dosis baja de MTBVAC, 9 voluntarios con una dosis intermedia de MTBVAC y 9 voluntarios con una dosis alta de MTBVAC, similar a la dosis de BCG, así como 9 voluntarios vacunados con BCG (Figura 12).

La conclusión de este primer estudio en humanos mostró que la vacunación con MTBVAC es, al menos, tan segura como BCG y no produce efectos adversos mayores. Los datos de inmunogenicidad mostraron que MTBVAC confería una respuesta inmunológica que aumenta con la dosis (dosis dependiente) que alcanzaba su pico a las 4 semanas de la vacunación, siendo la magnitud de la respuesta dependiente de la dosis administrada de MTBVAC. El grupo vacunado con la dosis más alta de MTBVAC mostró mayor respuesta de linfocitos T CD4 + de memoria que reconocían varias citoquinas (IL2+TNFa+INFg) que el grupo vacunado con BCG siendo mayor el número de individuos que reaccionó a MTBVAC (4) que a BCG (1). Si bien no se pudo obtener una significación estadística de la inmunogenicidad conferida por la vacuna MTBVAC, debido al bajo número de participantes estudiados en la Fase 1, estos resultados abren el camino al ensayo en bebés (Fase 1b) y sucesivos estudios con un número mayor de voluntarios (Fase 2). El estudio Fase 1 demostró que la inyección intradérmica la vacunación con MTBVAC fue al menos tan segura como la BCG y la vacuna MTBVAC no inducía efectos adversos graves en ninguna de las tres dosis. Los resultados muestran un excelente perfil de seguridad y una inmunogenicidad superior a BCG; favoreciendo el desarrollo clínico de MTBVAC y su ensayo en países endémicos con alta incidencia de tuberculosis, en los que se pueda demostrar su eficacia. Estos resultados se publicaron en la revista *Lancet Respiratory Disease* en diciembre de 2015 [60].

9. MTBVAC DE LOS ESTUDIOS FASE 1 EN ADULTOS EN SUIZA AL ESTUDIO FASE 1B EN RECIÉN NACIDOS EN SUDÁFRICA

Para obtener el permiso de las autoridades sudafricanas resultaron fundamentales los resultados positivos obtenidos en adultos en un país con baja incidencia de tuberculosis como Suiza. Permitió iniciar el ensayo clínico de MTBVAC de Fase 1b, en recién nacidos, en una región endémica con una alta incidencia de tuberculosis. El estudio se realizó en, Sudáfrica, siendo la Dra. Michele Tameris investigadora principal (NCT02729571) y BIOFABRI el promotor (sponsor) (Figura 13). El estudio fue cofinanciado por el Fondo Noruego de Cooperación (NORAD), a través de la iniciativa europea TBVI. Worcester es un centro de ensayos clínicos de vacunas de tuberculosis y pertenece a la Iniciativa

Sudafricana para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis (SATVI). Dispone de una enorme experiencia por haber realizado la Fase 2b de eficacia de la vacuna MVA85A de la Universidad de Oxford [61]. El diseño del estudio se estableció para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de MTBVAC en recién nacidos, frente a la vacuna BCG [62].



Figura 13: Visita Sudáfrica en Diciembre de 2015 preparatoria para el inicio de la Fase 1b vacunación de los bebés en Worcester (Sudáfrica). De izda. a Dcha.: Eduardo Almenara (OTRI Universidad de Zaragoza) Juana Doce (Directora de registros Biofabri, Grupo Zendal) Eugenia Puentes (Directora de I&D de Biofabri, Grupo Zendal) Helen Mearns (Universidad de Ciudad del Cabo) Michele Tameris (Investigadora Principal del Estudio de MTBVAC, Iniciativa Sudafricana Vacuna Tuberculosis SATVI), Bernard Fritz (Iniciativa Europea Tuberculosis TBVI), Dessislava Marinova (Universidad de Zaragoza), detrás: Oswaldo Alvarez (Biofabri). Carlos Martín (Universidad de Zaragoza).

La Fase 1b incluyó una seguridad brazo en adultos sanos antes de la vacunación de los bebés recién nacidos. Como paso previo de seguridad una cohorte de 18 adultos sanos previamente vacunados con BCG y no infectados con el bacilo de la tuberculosis y VIH negativos, 9 se vacunaron con BCG y 9 con MTBVAC a la misma dosis. Este estudio finalizó con éxito, en diciembre de 2015, sin eventos adversos mayores relacionados con la vacuna. En enero de 2016 se inició la etapa de vacunación del recién nacidos que finalizó en septiembre de 2016 (Figura 14).

Para los recién nacidos el estudio se diseñó de forma similar al de adultos en Suiza. Corresponde a un estudio doble ciego con un escalado de dosis de MTBVAC, comenzando por una cohorte de 12 bebés de los que 9 recibieron una dosis 100 veces menor que la actual BCG y 3 recibieron BCG. Se comprobó su seguridad du-

rante dos meses y se analizaron sus resultados por el comité de expertos independientes (DSMB), antes de iniciar la vacunación de la segunda cohorte. Doce recién nacidos a los que se aumentó la dosis de MTBVAC en 9 y otros 3 fueron vacunados con BCG. Tras comprobarse la seguridad de esta segunda cohorte se vacunó una tercera cohorte de 9 bebés con una dosis de MTBVAC, idéntica a la empleada con BCG, de 50.000 bacterias atenuadas (10x5) por voluntario y otros 3 bebés fueron vacunados con BCG. Al final del estudio se obtienen 4 grupos de 9 bebés vacunados con dosis baja de MTBVAC, 9 con la dosis intermedia de MTBVAC y 9 con dosis alta de MTBVAC similar a BCG, así como 9 bebés vacunados con BCG que actúan como grupo control. Esta Fase 1b en recién nacidos tuvo como objetivo avanzar a la Fase 2a para identificar la dosis a utilizar en los futuros estudios de eficacia de MTBVAC. Los resultados de esta Fase 1b mostraron una seguridad de MTBVAC en las tres dosis utilizadas muy similar a BCG y una inmunogenicidad similar a BCG (10x5) en los bebés vacunados con MTBVAC a la dosis media (10x4) y una inmunidad mayor que BCG cuando se utilizó la misma dosis de MTBVAC que BCG (10x5). Dada la baja inmunidad conferida por los bebés vacunados con la dosis más baja de MTBVAC 10x3, esta dosis se eliminó en la siguiente Fase 2a diseñada para la selección de dosis [62]. El ensayo de Fase 1b de MTBVAC confirmó la seguridad de la vacuna y una mayor inmunogenicidad en comparación con la misma dosis de BCG SSI, sugestivo del contenido antigénico más amplio [61].

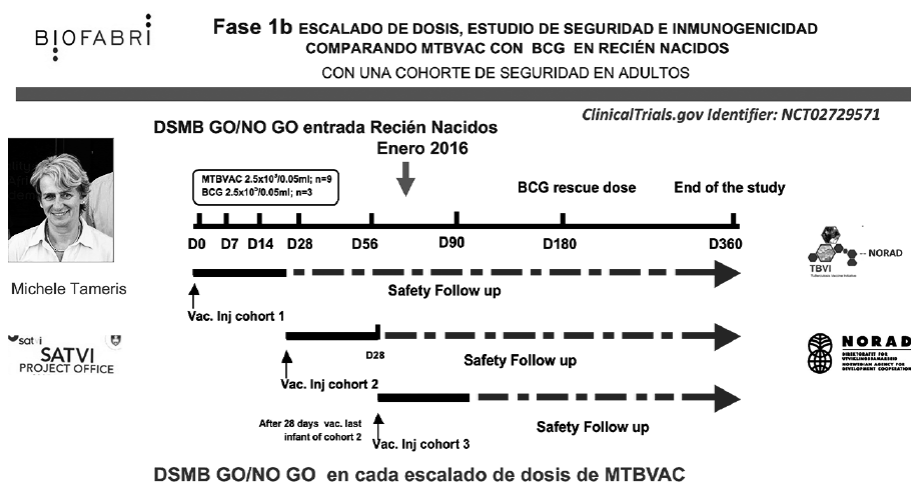


Figura 14: Fase 1a Seguridad de MTBVAC en recién nacidos en Sudáfrica. La Fase 1b incluyó un total de 36 voluntarios bebés recién nacidos de madres sudafricanas, con un brazo de seguridad previo en adultos sudafricanos de 9 voluntarios vacunados aleatoriamente con la dosis más alta de MTBVAC o BCG. En el estudio doble ciego los voluntarios se vacunaron aleatoriamente con MTBVAC o con BCG, escalándose la dosis de MTBVAC. Investigadora Principal del estudio la Dra Michele Tameris.

10. ESTUDIOS FASE 1B/2A EN ADULTOS Y FASE 2A EN RECIÉN NACIDOS EN SUDÁFRICA: SELECCIONANDO LA DOSIS DE MTBVAC PARA LOS ESTUDIOS DE EFICACIA.

Biofabri ha establecido dos planes de desarrollo clínico independientes para el uso de MTBVAC por la vía de administración intradérmica, la que se utiliza actualmente para la vacuna BCG. Por un lado, una de las estrategias de vacunación se centra en MTBVAC como vacuna preventiva administrado en recién nacidos, y si muestra una mejor protección de reemplazar a la actual BCG. Por otro lado el desarrollo MTBVAC como vacuna preventiva en adolescentes y adultos previamente vacunados con BCG que viven en países con alta incidencia de tuberculosis sin o con infección previa por *M. tuberculosis*. El desarrollo de MTBVAC para adolescentes y adultos se realiza en colaboración con IAVI (US International AIDS Vaccine Initiative, que asumió los proyectos no finalizados de la iniciativa americana AERAS). Desde hace dos años el proyecto MTBVAC cuenta con la colaboración del Centro Nacional de Medicina Tropical del Instituto de Salud Carlos III para el diseño de estudios de eficacia de MTBVAC en adolescentes y adultos a través de su director Agustín Benito.

Fase 1b/2a MTBVAC en adultos con y sin infección latente de tuberculosis en Sudáfrica (A-050) (NCT02933281). El espónsor del estudio es International AIDS Vaccine Initiative (IAVI) y colaboran Biofabri, S.L. la Universidad de Zaragoza, SATVI y TBVI. Se estudia la inmunogenicidad y seguridad de Fase 1b/2a, doble ciego, aleatorizado, controlado con BCG y escalado de dosis en 144 adultos sanos con y sin tuberculosis latente (LTBI). Todos los participantes han recibido la vacuna BCG previa en la infancia. El producto en investigación es MTBVAC en cuatro dosis diferentes: 5 x 10x3 CFU, 5 x 10x4 CFU, 5 x 10x5 CFU y 5 x 10x6 CFU utilizándose BCG como control (5 x 10x5 CFU). El estudio se completó en septiembre de 2021 y actualmente se están realizando los estudios de inmunología que se esperan estén disponibles en unos meses (Figura 16).

Los participantes que cumplieron con los criterios de inclusión/exclusión fueron aleatorizados dentro de una cohorte de estudio para recibir una dosis única de revacunación con MTBVAC o BCG administrada por vía intradérmica el día 0 del estudio. El estudio se lleva a cabo en en Sudáfrica. Los participantes se inscribieron en una de las ocho cohortes y se les realizará un seguimiento de los puntos finales de seguridad e inmunogenicidad hasta el día 365 del estudio. Las cohortes 1-8 incluyen 72 participantes QFT negativos (cohortes 1-4) y 72 QFT positivos (cohortes 5-8). Los participantes serán aleatorizados dentro de cada cohorte, para recibir MTBVAC (N=96) o BCG (N=48). Las cohortes se inscribirán como se describe en el protocolo, siempre que no se activen reglas de pausa/detención.

Los objetivos primarios de esta Fase 2a en adultos son estudiar la seguridad y reactogenicidad de MTBVAC en escalado de dosis crecientes en comparación con la vacuna BCG durante un año. Se recogieron las reacciones adversas en el sitio de la inyección, así como las posibles reacciones adversas graves. Como objetivos secundarios se estudia la diferencia en la respuesta de las células T entre las diferentes dosis de MTBVAC por el porcentaje de células T CD4 y CD8 específicas de MTBVAC que producen cualquiera o una combinación de citocinas relevantes

en los días de estudio 0, 28, 56, 182 y 365. También se estudian la de tinción de citoquinas intracelulares (ICS) de sangre completa (WB) estimulada de 12 horas con diferentes antígenos, así como los resultados cualitativos y cuantitativos de la prueba QuantiFERON® TB (QFT) los días 28, 56, 84 y 182 en los voluntarios de las cohortes de 1 a 4 que fueron QFT negativos al inicio del estudio mediante la técnica de QFT Gold Plus.

La Fase 2a en recién nacidos Estudio de seguridad e inmunogenicidad para definir la dosis de MTBVAC en neonatos sudafricanos (MTBVAC-03) (NCT03536117). El espónsor es Biofabri, S.L. y los colaboradores: Iniciativa sudafricana de vacunas contra la tuberculosis (SATVI), la Universidad de Zaragoza y la Iniciativa de vacuna contra la tuberculosis (TBVI). La Fase 2 a en bebés consiste en un estudio de definición de dosis de MTBVAC para evaluar la seguridad, la reactogenicidad, la inmunogenicidad y el potencial de conversión y reversión de IGRA en los recién nacidos sudafricanos vacunados con MTBVAC. Un total de 99 recién nacidos no expuestos al VIH y sin vacunación previa con BCG serán aleatorizados para recibir BCG 2,5 x 10x5 CFU (n=24) o MTBVAC en uno de los tres niveles de dosis (n=75). La asignación será doble ciego. La inscripción será secuencial en 3 cohortes de dosis creciente de MTBVAC (Cohorte 1: n=25 MTBVAC 2,5 x 10x4 y n=8 BCG; Cohorte 2: n=25 MTBVAC 2,5 x 10x5 y n=8 BCG; Cohorte 3 : n=25 MTBVAC 2,5 x 10x6 y n=8 BCG). El aumento de la dosis se escalonará para permitir una evaluación gradual de la seguridad; la selección final de la dosis para la Cohorte 3 se basará en todos los datos de seguridad e inmunogenicidad disponibles (Figura 15 y 16).

MTBVAC IN NEWBORNS: KICK-OFF MEETING IN SOUTH AFRICA



JUNE 2018



BIOFABRI

Ingrid Murillo, Clinical Research Director of Biofabri

Figura 15: Reunión de inicio del Proyecto EDCTP de la Fase 2 a selección de dosis de MTBVAC en recién nacidos en junio de 2018 en Sudáfrica. La Fase 2a incluye un total de 99 voluntarios bebés recién nacidos de madres sudafricanas. Investigadora Principal del estudio la Dra Michele Tameris. Directora de Desarrollo clínico de MTBVAC de Biofabri Ingrid Murillo (circulo en la foto).

Los objetivos primarios de esta Fase 2a en recién nacidos son estudiar las posibles reacciones adversas locales y sistémicas relacionadas con la vacunación de MTBVAC durante un año (365 días). Se realizó análisis de inmunogenicidad midiendo las células T CD4 y CD8 que expresan citocinas específicas en sangre total. Como objetivos secundarios se estudia la cinética de conversión y reversión de QFT inducida por MTBVAC 365 días después de la vacunación estudiando cuantitativa y cualitativamente por el ensayo QFT Gold Plus hasta el día 365 después de la vacunación.

Actualmente MTBVAC han completado los dos ensayos de Fase 2 de seguridad e inmunogenicidad, en SATVI Sudáfrica, como BCG como comparador de referencia, con el objetivo de poder seleccionar la dosis que se utilizará en los estudios Fase 3 de eficacia. Una Fase 1b/2a adolescentes y adultos previamente en vacunados con BCG con o sin infección latente previa con *M. tuberculosis* (NCT02933281) y la Fase 2a en recién nacidos (NCT03536117).

Para los dos estudios la fase de vacunación y el año de seguimiento ha sido completada. Los resultados de seguridad de ambos estudios son muy esperanzadores y los estudios de inmunogenicidad puedan estar disponibles en los próximos meses.



Figura 16: Diseño de la Fase 1b/2a en adultos Fase 2a y Fase 3 en recién nacidos
Actualmente MTBVAC han completado los dos ensayos de Fase 2 de seguridad e inmunogenicidad, en SATVI Sudáfrica, como BCG como comparador de referencia, con el objetivo de poder seleccionar la dosis que se utilizará en los estudios Fase 3 de eficacia.

11. MTBVAC LISTO PARA INICIAR ENSAYOS DE EFICACIA DE FASE 3 EN PAÍSES DEL ÁFRICA SUBSAHARIANA CON UNA ALTA INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS

La Fase 3 de Evaluación de eficacia, seguridad e inmunogenicidad de MTBVAC en recién nacidos en África subsahariana (MTBVACN3) (NCT04975178) esta planificada y lista para su inicio. El objetivo principal del estudio es demostrar la seguridad, la inmunogenicidad y la mejora de la eficacia de la nueva vacuna viva atenuada contra *M. tuberculosis* MTBVAC en un ensayo de eficacia de Fase 3 en lactantes no infectados por el VIH nacidos de madres infectadas y no infectadas por el VIH en comparación con BCG. La propuesta se basa en un grupo de socios de desarrollo de vacunas contra la tuberculosis en Europa y África subsahariana establecido en un proyecto anterior respaldado por EDCTP. La propuesta creará una red de instituciones en tres países africanos endémicos de TB con capacidad de laboratorio mejorada para realizar estudios inmunológicos de vacunas contra la TB y muestras de biobancos para descubrir correlatos inmunológicos de protección mediada por vacunas. El espónsor del estudio es Biofabri, S.L y colaboran TBVI, el Institut Pasteur de Madagascar, el Biomedical Research Center EPLS de Senegal, la Universidad de KwaZulu y el Wits Health Consortium.

El número de bebés participantes estimado es de 6960 que de forma aleatoria se les administrará o BCG o MTBVAC. MTBVAC y BCG se administran por vía intradérmica en la región deltoidea izquierda. Se definirá una dosis reconstituida de 0,05 ml de MTBVAC en función de los resultados de la Fase 2a. MTBVAC es fabricado por Biofabri. MTBVAC está formulado se presenta como pellet liofilizado en viales de 20 dosis (0,05 mL/dosis, después de la reconstitución con agua estéril para inyección). La vacuna MTBVAC será liberada y distribuida por BIOFABRI, e importada a los sitios después de la aprobación de la autoridad reguladora local. Los viales de MTBVAC deben almacenarse en la farmacia del sitio entre -20°C y -40°C. Se utilizará un vial de vacuna para cada participante. Como control se utilizará la vacuna comercial BCG. Una dosis reconstituida de 0,05 ml de BCG contiene $2,5 \times 10^5$ CFU. La vacuna de control será la vacuna BCG disponible y recomendada en Sudáfrica en el momento del ensayo. La vacuna BCG producida por AJ Biologics (anteriormente Staten Serum Institute) es la única vacuna BCG (cepa danesa) actualmente autorizada para uso de rutina en Sudáfrica. El volumen de inyección de BCG recomendado para recién nacidos (0,05 ml, después de la reconstitución con diluyente de BCG) contiene aproximadamente $2,5 \times 10^5$ CFU (rango 1-4 x 10×5 CFU). Los viales de vacuna BCG deben conservarse en la farmacia del centro a 2-8°C.

Para el ensayo de eficacia de Fase 3 en bebés recién nacidos se ha obtenido autorización por los comités éticos y las autoridades regulatorias correspondientes en Sudáfrica (NCT04975178) y se espera su inicio en los próximos meses. Se trata de un estudio multicéntrico en Sudáfrica, Madagascar y Senegal, y el proyecto recibió recientemente una financiación parcial a través de la iniciativa Europea EDCTP 2 (Ensayos Clínicos de Europa y los Países en Desarrollo).

12. DATOS CLAVE DE EFICACIA RECIENTES EN PRIMATES NO HUMANOS QUE RESPALDAN. EVALUACIÓN DE EFICACIA DE FASE 3

Desde las primeras etapas del desarrollo clínico de MTBVAC, los reguladores nacionales y europeos han destacado la importancia de evaluar la inmunogenicidad y la eficacia de los lotes clínicos liofilizados MTBVAC en un modelo animal superior como primates no humanos (NHP) con el fin de proporcionar datos que puedan acelerar y ayudar a las decisiones pasar a los ensayos de eficacia en los que la dosis y ruta de vacunación fuera similar a los ensayos clínicos y posteriormente los animales fueran expuestos a un desafío con *M. tuberculosis* por vía aerosol a baja dosis, simulando la ruta de infección de transmisión respiratoria que ocurre en humanos.

Estudios de eficacia de MTBVAC en un modelo de macaco *M. tuberculosis*, promovido por AERAS (con financiación de la Fundación Bill y Melinda Gates), se realizaron en Inglaterra en los laboratorios de la Public Health England (PHE). Una parte del estudio ha publicado en el año 2021 por White *et al.* por el grupo de Sally Sharpe [26], demostrando que una sola vacunación intradérmica con MTBVAC administrada a macacos rhesus adultos sin tratamiento previo con BCG fue bien tolerado y confirió una mejor protección para los animales vacunados con una sola dosis intradérmica de MTBVAC que los no vacunados y que los vacunados con una sola dosis intradérmica de BCG frente a la exposición en aerosol a *M. tuberculosis*.

La protección de los animales vacunados con MTBVAC respecto a los vacunados con BCG fue significativamente mejor para la mayoría de parámetros estudiados de anatomía patológica y enfermedad. El estudio mostró la concordancia entre los perfiles inmunológicos de los animales vacunados con MTBVAC y los resultados que se habían obtenidos en los ensayos clínicos de MTBVAC en humanos en Fase 1 en adultos y Fase 1b en bebés.

Globalmente los resultados publicados muestran y una protección contra la infección respiratoria de *M. tuberculosis* significativamente mejor para los animales vacunados con MTBVAC que los vacunados con BCG apoyando el desarrollo clínico de MTBVAC y su estudio en Fase 3 de eficacia para su estudio como vacuna profiláctica contra la tuberculosis en bebés.

Respecto al uso de MTBVAC en adolescentes y adultos previamente vacunados con BCG al nacimiento e infectados o no con tuberculosis latente los estudios en cobayos mostraron una protección superior cuando se administra MTBVAC que en los controles o los animales vacunados con BCG [25], lo que apoya que la pérdida de la eficacia de BCG, podría mejorarse con la posterior revacunando con MTBVAC.

13. ESTUDIO DE LOS EFECTOS NO ESPECÍFICOS MTBVAC: TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE VEJIGA, DEL ASMA E INTERFERENCIA CON OTRAS VACUNAS

La vacunación con BCG confiere reducción significativa de enfermedades infecciosas no tuberculosas y una reducción de todas las causas de mortalidad en bebés en las primeras 6 semanas de vida [63]. Esta protección no específica se relaciona con una reactividad cruzada del sistema inmunitario no adaptativo que protegería contra enfermedades que pudieran causar otros patógenos [63, 70] y debida al entrenamiento del sistema inmune innato por medio de reprogramación metabólica y epigenética de las células inmunitarias a través de un proceso denominado «inmunidad entrenada» un tema de estudio de enorme actualidad y transcendencia en el campo de la vacunología y muy estudiada en los últimos 10 años. Este efecto se atribuye las vacunas vivas hoy en uso incluidas la triple vírica, polio oral o rotavirus [63,65].

La OMS considera la importancia de estudiar en los nuevos candidatos a vacuna contra la tuberculosis que puedan en un futuro reemplazar a BCG estudiar si deberán ser capaces de inducir inmunidad entrenada y conferir unos efectos heterólogos similares a los que confiere BCG [12]. En este contexto, una de las líneas prioritarias de investigación de nuestro grupo es estudiar los efectos no específicos conferidos por MTBVAC en modelos celulares y animales y así como sus potenciales usos terapéuticos y es el investigador senior de nuestro grupo de investigación, Juan Ignacio (Nacho) Aguilo el responsable de esta línea de investigación.

La instilación intravesical de BCG es actualmente la terapia de primera línea para pacientes con cáncer de vejiga no musculo invasivo [71]. Nuestros estudios con MTBVAC como terapia contra el cáncer de vejiga *in vitro* y *in vivo* en modelo preclínico muestra la capacidad de MTBVAC para colonizar en células de tumores de vejiga humana en un grado mucho mayor que BCG y un mayor efecto antitumoral en un modelo murino *in vivo* y su potencial uso en clínica (Figura 17) [66].

Nuestros trabajos recientes muestran la capacidad de BCG o MTBVAC para revertir el asma en ratones, al poder estas vacunas vivas desencadenar una respuesta celular T de memoria específicas de alérgenos confiriendo un marcado perfil Th1 con efectos terapéuticos contra el asma grave (Figura 17) [67].

En colaboración con el grupo del Prof. Mihai Netea [68], encontramos que MTBVAC es capaz de generar inmunidad entrenada *in vitro* en células mieloides primarias humanas, resultando una mejor respuesta tras el desafío secundario con Lipopolisacaridos (LPS) bacterianos. Estos estudios se complementan con estudios *in vivo* en ratones que demuestran la capacidad de MTBVAC para inducir inmunidad entrenada en inmunocompetentes y ratones inmunocompetentes y también en ratones inmunocomprometidos (SCID). En colaboración con el equipo de José Yuste del Centro Nacional de Referencia de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III estudiamos que MTBVAC confiere protección heteróloga contra un desafío letal con *Streptococcus pneumoniae* en un modelo murino experimental de neumonía (Figura 17).

Interesados en el estudio de la posible interferencia de MTBVAC con otras vacunas incluidas en el calendario vacunal de los niños, estudiamos la administración de MTBVAC o BCG antes de la vacunación con la vacuna Difteria, Tétanos y Tosferina acelular (DTaP) en ratones: Nuestros estudios mostraron que tanto BCG como MTBVAC desencadenan una respuesta de inmunidad celular Th1 que aumenta la respuesta inmunitarias celular contra la Difteria, el Tétanos y la Tosferina. Así mismo cuando estudiamos la respuesta humoral esta mejoró aumentando la producción de anticuerpos contra los antígenos de las tres enfermedades. Datos que se correlacionaron con los estudios epidemiológicos en humanos que mostraron que la incidencia de Tosferina es 10 veces menor en los países que usan DTaP y BCG en comparación con los países que usan solo DTaP, lo que sugiere potencial impacto beneficioso de la vacuna BCG en la protección contra la tos ferina conferido por DTaP [69] (Figura 17).



Universidad

Zaragoza

BCG	MTBVAC
BCG, TRATAMIENTO DE PRIMERA LINEA CANCER NO INVASIVO DE VEJIGA. Morales et al 1976 Journal of Urology. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)58737-6	MTBVAC, EFICACIA TERAPÉUTICA EN MODELO PRECLÍNICO DE CÁNCER DE VEJIGA. Alvarez-Aguedas et al 2018 Trans Med. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931524418300513
BCG, INMUNIDAD "ENTRENADA" EN CÉLULAS HUMANAS. Kleinnijenhuis et al 2012 Proc Natl Acad Sci USA. https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109	MTBVAC, INMUNIDAD "ENTRENADA" EN CÉLULAS HUMANAS. (REPROGRAMACION EPIGENOMICA Y METABOLICA). Tarancon et al 2020 Plos Pathogens. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008404
BCG, PROTECCION HETEROLOGA FRENTE A MORTALIDAD POR INFECCIÓN POR <i>Candida albicans</i> EN RATÓN Kleinnijenhuis. Kleinnijenhuis et al 2012 Proc Natl Acad Sci USA. https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109	MTBVAC, PROTECCION HETEROLOGA CONTRA LA INFECCION POR <i>Streptococcus pneumoniae</i> EN MODELO EXPERIMENTAL EN RATÓN Tarancon et al 2020 Plos Pathogens. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008404
BCG, EFECTO TERAPEUTICO FRENTE A ASMA. Tarancon et al 2021 Ebiomedicine. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103186	MTBVAC, EFECTO TERAPEUTICO FRENTE A ASMA. Tarancon et al 2021 Ebiomedicine. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103186
TRABAJO EN EQUIPO DE VACUNAS, EFECTO BENEFICIOSO DE LA VACUNACION PREVIA CON BCG / DTaP (difteria, tétanos, y pertussis acelular). Broset et al 2021 Ebiomedicine. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103254	TRABAJO EN EQUIPO DE VACUNAS, EFECTO BENEFICIOSO DE LA VACUNACION PREVIA MTBVAC / DTaP (difteria, tétanos, y pertussis acelular). Broset et al 2021 Ebiomedicine. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103254

Figura 17: Estudios de los efectos no específicos de las vacunas BCG y MTBVAC, línea de investigación dirigida por el investigación Senior de nuestro Grupo Nacho Aguiló

14. EXPLORANDO NUEVAS RUTAS DE ADMINISTRACIÓN PARA BCG Y MTBVAC

Los estudios previos de nuestro grupo, dirigidos por Nacho Aguiló mostraban en modelo de ratón que la administración por vía pulmonar de BCG confería un aumento de la inmunidad dependiendo de la dosis [72]. y que era dependiente de la producción de la interleuquina L7 [73], lo mismo se vio para MTBVAC [74] y más recientemente demostramos que la administración pulmonar de BCG induce la activación de macrófagos residentes en los pulmones y confiere protección a largo plazo contra la tuberculosis, destacando el papel de células como los monocitos en conferir una memoria no antes identificada. [75].

Dos estudios han sido publicados recientemente por el grupo de Frank Verreck evaluando la inmunidad innata y adaptativa inducida después de la administración

mucosal de MTBVAC y BCG a los pulmones en macacos [76,77]. El estudio de Dijkman *et al.*, [77]. Estos trabajos demuestran que la vacunación pulmonar con MTBVAC en macacos rhesus induce respuestas inmunitarias especificidad antigénica más amplia que BCG, contra proteínas presentes en MTBVAC y ausentes en BCG. El estudio de Vierboom *et al.*, [78] muestra que la administración por vía mucosal de BCG o MTBVAC a macacos Rhesus, induce una inmunidad entrenada que la vía intradérmica estándar vacunación. Además, la vacunación mucosa mejoró producción de citoquinas innatas por monocitos derivados de la sangre y la médula ósea asociados con recableado metabólico, propio de la inmunidad entrenada.

Rutas de vacunación como la respiratoria que podrían facilitar las campañas de vacunación serían una muy buena herramienta para futuras campañas de erradicación de la tuberculosis al facilitar su administración de forma más fácil y universal.

15. CONSIDERACIONES FINALES

Dada la naturaleza de MTBVAC, la vacuna conserva todo el repertorio de epítomos de células T descrito para patógenos MTBC incluidos los principales antígenos inmunodominantes ESAT-6, CFP-10 y PPE68 que están ausentes en la actual vacuna BCG debido a la pérdida de RD1. A pesar de su pequeño peso molecular, estas tres proteínas son inusualmente inmunogénico y contiene 285 del total de 1603 epítomos descritos en *M. tuberculosis*, reconocido por haplotipos MHC humanos [35]. En línea con esta observación, nuestros estudios preclínicos publicados por Aguilo *et al.* [24] han demostrado que la inmunidad contra ESAT-6 y CFP-10 conferidos después de la vacunación MTBVAC notablemente se correlaciona con una mayor eficacia de la vacuna en relación con la BCG. Además, la reactogenicidad ESAT-6/CFP-10 conferida por MTBVAC importante para mejorar la protección en ratones se demostró que depende en el fondo genético del huésped, lo que demuestra la capacidad exclusiva del haplotipo H-2 k (MHC II) de la cepa de ratón C3H, pero no de las dos cepas de ratón comúnmente utilizadas BALB/c y BL6/C57, para reconocer los péptidos derivados de ESAT-6 y CFP-10. Nuestros estudios aclarar la importancia de la genética del huésped en la protección inducida por la vacuna.

Especialmente importante para la investigación de nuevas vacunas contra la tuberculosis para adultos es el estudiar si la presencia de micobacterias ambientales puede afectar a la eficacia de la vacuna como ocurre con BCG [81]. Esto se deberá de tener en cuenta para el diseño de ensayos clínicos en diferentes latitudes geográficas [81]. Recientemente hemos estudiado la protección de MTBVAC en el contexto de la genómica evolutiva de *M. tuberculosis*, donde variantes de MTBVAC construidas en de diferentes aislados clínicos pertenecientes a linajes 2 (que incluye las cepas de Beijing) y 3 (L2 y L3) juntas con la vacuna MTBVAC original, derivada de L4, se compararon contra BCG en modelos de ratón [82]. Estudios de seguridad en ratones inmunocomprometidos mostraron que MTBVAC-L2 era menos atenuado que BCG Pasteur, mientras que el MTBVAC original fue encontrado incluso más atenuado que BCG, y MTBVAC-L3 mostró un fenotipo intermedio. Estudios de eficacia en inmunocompetentes los ratones contra el desafío con aerosol L2, L3 y L4 mostraron resultados similares o protección superior en comparación

con BCG Pasteur para los tres Vacunas MTBVAC [82]. Todos estos estudios indican que MTBVAC podría proteger clínicamente contra los tres linajes modernos de tuberculosis (L2, L3 y L4) que causan más del 95% de los casos de tuberculosis en humanos y apoyar los ensayos de eficacia de Fase 3.

En los seres humanos, los estudios muestran que entre el 60 y el 80 % de las personas pueden responder a estos dos antígenos [79,80], haciéndonos hipotetizar que la reactogenicidad inducida por la vacuna MTBVAC a ESAT-6 y CFP-10 podría conferir una mejor protección en estos individuos (en comparación con BCG), lo que tendría un impacto evidente en la transmisión de la tuberculosis. La realización de ensayos clínicos en diversas regiones geográficas para tener en cuenta las diferencias genéticas entre individuos, proporcionarían información valiosa la confirmación de esta hipótesis. En apoyo de esta hipótesis tenemos los estudios de cohortes de personas con infección latente (que reconocen ESAT-6 y CFP-10 por una infección previa con *M. tuberculosis*) están protegidos contra la reinfección por *M. tuberculosis* que los no infectados.

BCG es la única vacuna contra la tuberculosis hoy en uso. Durante cien años y ha servido para proporcionar nuevos conocimientos sobre la vacunación contra la tuberculosis [83, 84], y sirve de modelo para el diseño y desarrollo de cientos de nuevos candidatos a vacunas contra la tuberculosis que buscan mejora su efectividad contra las formas de tuberculosis respiratorias, responsable de la transmisión de la enfermedad.

MTBVAC es uno de estos candidatos en ensayos clínicos. Basado en un aislado clínico vivo atenuado de *M. tuberculosis*, los 25 años de descubrimiento, construcción y caracterización de la vacuna MTBVAC han seguido los principios de Pasteur y utilizando la actual BCG como patrón de oro de referencia para los estudios de seguridad y eficacia.

MTBVAC, contiene el repertorio completo de antígenos de *M. tuberculosis*, y muestra una protección superior eficacia en los modelos preclínicos de ratón, co-bayo y primates no humanos y una seguridad similar en comparación con BCG.

MTBVAC es el primer y único candidato de su naturaleza en desarrollo clínico listo para iniciar los ensayos de eficacia de Fase 3 doble ciego en recién nacidos por vía de administración intradérmica en países con tuberculosis endémica en los próximos meses.

Si estos estudios de eficacia Fase 3 muestran una mejor protección que BCG para la tuberculosis respiratoria, permitiría solicitar la autorización de MTBVAC.

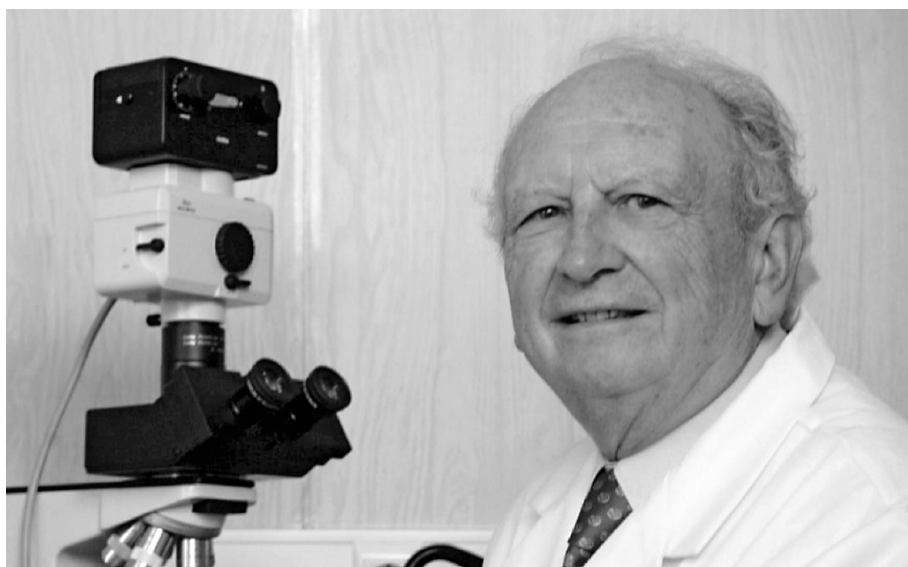
Los estudios recientes de MTBVAC muestran la capacidad de inducir inmunidad entrenada y conferir protección heteróloga inespecífica similar a BCG. BCG es reconocida por su capacidad de inducir inmunidad no específica a otras enfermedades heterólogas y disminuir la mortalidad en los primeros meses de vida. La OMS reconoce la importancia de que cualquier nueva vacuna contra la tuberculosis diseñada para la administración al nacer, debe mostrar beneficios no específicos similares a los conferidos por BCG, vía mecanismos de inmunidad entrenada y/o reactividad cruzada de respuestas inmunitarias adaptativas a otros patógenos.

Entre las líneas actuales de investigación de MTBVAC del grupo se encuentran el tratamiento del cáncer de vejiga y del asma, que en modelos animales han mostrado una efectividad igual o mayor que BCG y los ensayos en humanos podrían mostrar su potencial.

Una de las líneas de investigación es el estudio de nuevas rutas alternativas de administración de MTBVAC, como la administración por vía respiratorias por aerosol. La vía respiratoria se plantea clínicamente factible en los modelos animales y podría facilitar la administración universal de la vacuna para futuras estrategias de erradicación de la tuberculosis a largo plazo.

16. AGRADECIMIENTOS

Como he indicado en la introducción nuestro el trabajo se enmarca en la Escuela de Microbiología de la Universidad de Zaragoza del Profesor Don Rafael Gómez Lus en la que me he formado y aprendí directamente de él y guió mi formación profesional, aconsejándome sobre los centros y personas que pudieran completar mi formación. Mis conocimientos en Genética de micobacterias y la entrada en el mundo de la tuberculosis se lo debo a la Dra Brigitte Gicquel del Instituto Pasteur de Paris. La Profesora Brigitte Gicquel, fue pionera en la Genética de las Micobacterias. En los inicios de su grupo de investigación me acogió en su equipo como su primer posdoctoral.



Profesor Don Rafael Gómez Lus. Catedrático de Microbiología y Parasitología y Medicina Preventiva, de la Universidad de Zaragoza. Licenciado en Medicina y Cirugía y Doctor en Medicina, se especializó en parasitología en Hamburgo. Fue jefe Provincial de Sanidad, jefe del Servicio de Bacteriología del Instituto Municipal de Higiene de Zaragoza director del mismo. (Foto Heraldo de Aragón).



Brigitte Gicquel

Profesora Brigitte Gicquel pionera en la Genética del bacilo de la tuberculosis, directora de la Unidad de Génétique Mycobactérienne en su despacho del Instituto Pasteur de Paris. (“Chevalier” de la Légion d’Honor de Francia en el año 2004).



INSTITUT PASTEUR



Universidad Zaragoza

GGM
GRUPO DE GENÉTICA DE MICOBACTERIAS



Esther Pérez



Ainhoa Arbues

ciberes
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES EMERGENTES

TB-VAC 2020

Jesús Gonzalo

Luis Solans
Irene Pérez
Esther Broset
Juan Calvet
Elena Campos
Ignacio Aguiló
Eduardo Moreo
Elena Mata
Samuel Álvarez
Raquel Tarancón

José Antonio Aínsa*

Santiago Ramón
Ainhoa Lucía
Santiago Uranga
Ana Belén Gómez
Dessi Marinova
Ana Pico
Begoña Gracia
Isabel Otañal*
M^a José Iglesias *
Sofía Samper *

Grupo de Apoptosis, Inmunidad y Cáncer

Alberto Anel
Julian Pardo

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Emergentes

Marta Monzón
Juan J Badiola

universidad de zaragoza



ii Instituto de Investigación Sanitaria Aragón

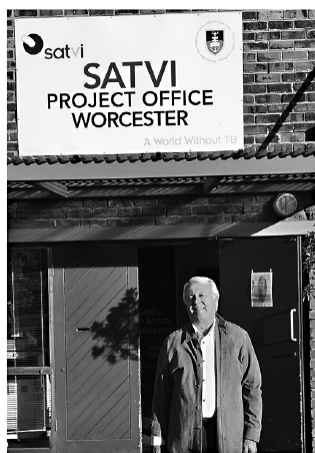
Parte del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza año 2014.
Delante: Jesús Gonzalo-Asensio, Ana Picó, Ana Belén Gómez, Begoña Gracia, Nacho Aguiló, Nedra Meftahi, Detrás: Carlos Martín, Irene Pérez, Alberto Cebollada, Sofía Samper, Samuel Álvarez, Santiago Uranga, Carmen Lafoz, Isabel Otañal y José Antonio Aínsa.

La construcción y desarrollo de MTBVAC ha sido continuamente financiado por proyectos de investigación españoles en los últimos 25 años (actualmente RTC-2017-6379-1). Proyecto europeo de vacuna MTBVAC está vinculado al programa de I+D de vacunas contra la tuberculosis de la Vacuna contra la TuBerculosis Consorcio TBVAC2020 (TBVI), apoyado por la Comisión Europea en el marco del programa Horizonte 2020, (64338).

La Fase 1b/2a en adolescentes vacunados con BCG y adultos con y sin infección previa por *M. tuberculosis* se lleva a cabo en colaboración con IAVI y se financia con fondos del INH y CDRMP del gobierno de los Estados Unidos. Actualmente el ensayo clínico de definición de dosis de Fase 2 en curso en recién nacidos cuenta con la financiación Asociación de ensayos clínicos de la Unión Europea EDCTP2 “RIA-2016-V-1637” MTBVACN2.

La Fase 3 de eficacia de MTBVAC en recién nacidos es financiada parcialmente por el programa de la Unión Europea ECDTP2 a través de “RIA2019S-2652” Ensayo de eficacia de MTBVACN3: “MTBVAC en recién nacidos: Ensayo de fase 3 controlado, doble ciego, aleatorizado para evaluar la seguridad, eficacia e inmunogenicidad de MTBVAC administrado en VIH sanos no expuestos no tratados y VIH recién nacidos no expuestos en regiones endémicas de tuberculosis del África subsahariana”.

A la izquierda se han añadido las fotos de Esther Pérez que realizó la primera construcción del prototipo a vacuna basado en el mutante *phoP* y Anhoa Arbues quien construyó la vacuna MTBVAC. **Página de Web del grupo <http://genmico.unizar.es/>.**



Esteban Rodríguez



D. Esteban Rodríguez. Consejero delegado de Biofabri perteneciente al grupo Zendal. Esteban desde el inicio creyó en el proyecto Vacuna Tuberculosis. Su equipo de Biofabri y todo el grupo Zendal quienes son la clave en el Desarrollo Industrial y Clínico de MTBVAC.



Parte del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza 20 de diciembre 2021. En la entrega de la Medalla del Justicia de Aragón Iglesia de Santa Isabel de Portugal (San Cayetano) de Zaragoza.

17. ENSAYOS CLÍNICOS DE MTBVAC

1. MTBVAC Fase 1 Seguridad e Inmunogenicidad en Adultos “Dose-Escalation Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of MTBVAC Vaccine in Comparison With BCG Vaccine” (ClinicalTrials.gov : NCT02013245)

Resultados publicados en: Spertini et al Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet Respir Med.* 2015 Dec;3(12):953-62. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00435-X. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26598141. [60]

2. MTBVAC Fase 1b Seguridad e Inmunogenicidad en Recién Nacidos “Dose-escalation Safety and Immunogenicity Study to Compare MTBVAC to BCG in Newborns With a Safety Arm in Adults (MTBVAC-Ph1b)” (ClinicalTrials.gov : NCT02729571)

Resultados publicados en: Tameris et al.MTBVAC Clinical Trial Team. Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. *Lancet Respir Med.* 2019 Sep;7(9):757-770. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30251-6. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31416768. [62]

3. MTBVAC Fase1b/2a Seguridad e Inmunogenicidad y selección de dosis en Adultos

“MTBVAC Study in Adults With and Without Latent Tuberculosis Infection in South Africa” (ClinicalTrials.gov NCT02933281)

Estudio finalizado: Se esperan resultados en el año 2022

4. MTBVAC Fase 2 Seguridad e Inmunogenicidad y selección de dosis en Recién Nacidos: “Dose-Defining Safety and Immunogenicity Study of MTBVAC in South African Neonates” (ClinicalTrials.gov: NCT03536117)
Estudio finalizado: Se esperan resultados en el año 2022
 5. MTBVAC Fase 3 recién nacidos “Efficacy, Safety and Immunogenicity Evaluation of MTBVAC in Newborns in Sub-Saharan Africa (MTBVACN3)” (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04975178)
Inicio del estudio 2022, pendiente de la aprobación final de la modificación del protocolo de las autoridades de Sudáfrica, Senegal y Madagascar
- * *Parte de este trabajo ha sido publicado en diciembre del año 2021 en el número especial de la revista "VACCINE" titulado "100 years of the Bacillus Calmette-Guérin vaccine" [85]*

18. BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO. World Health Organization Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.2020.
- [2] <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/bcg>. BCG Vaccine.
- [3] WHO. World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. Geneva: World Health Organization. hdl:10665/325771. 2019.
- [4] WHO. BCG vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record. 8 (93): 73-96. 23 February 2018 Geneva, Switzerland 2018.
- [5] Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, et al. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 1995;96:29-35.
- [6] Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, Howard RS, Moulton LH, Rhoades ER, et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA* 2004;291:2086-91.
- [7] Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, Beynon R, Mangtani P, Sterne JA, et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis. *Health Technology Assessment* 2013;17(1-372):v-vi.
- [8] Nguipdop-Djomo P, Heldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: a retrospective population-based cohort study. *Lancet Infectious Diseases* 2016;16:219-26.
- [9] WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>.
- [10] Cilloni L, Fu H, Vesga JF, Dowdy D, Pretorius C, Ahmedov S, et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic a modelling analysis. *EClinicalMedicine*. 2020;28:100603.

- [11] WHO. WHO End TB Strategy. WHO/CDS/TB/2018.29 - World Health Organization 2018. , https://www.who.int/tb/End_TB_brochure.pdf?ua=1.
- [12] WHO. WHO Preferred Product Characteristics for New Tuberculosis Vaccines. Ordering code: WHO/IVB/18.06 2018.
- [13] www.tbvi.eu. TuBerculosis Vaccine Initiative (TBVI).
- [14] Martin C, Aguilo, N., Marinova, D., & Gonzalo-Asensio, J. . Update on TB vaccine pipeline. Applied Sciences (Switzerland), 10(7) <http://doi.org/10.3390/app10072632>. 2020.
- [15] Douglas Young P. Research and development of new TB vaccines. International TB Vaccine Symposium Paraninfo Building, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain. Sponsors/Organizers: Fundación Ramón Areces, TBVI, University of Zaragoza3-4 June 2010.
- [16] Pelicic V, Jackson M, Reyat JM, Jacobs Jr WR, Gicquel B, Guilhot C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:10955-60.
- [17] Guilhot C, Otal I, Van Rompaey I, Martin C, Gicquel B. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. Journal of Bacteriology 1994;176:535-9.
- [18] Gicquel B. Towards new mycobacterial vaccines. Developments in Biological Standardization 1994;82:171-8.
- [19] Guilhot C, Gicquel B, Davies J, Martin C. Isolation and analysis of IS6120, a new insertion sequence from *Mycobacterium smegmatis*. Molecular Microbiology 1992;6:107-13.
- [20] 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.
- [21] Raney MG, Rauzier J, Lagranderie M, Gheorghiu M, Gicquel B. Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a “mini” mycobacterium-Escherichia coli shuttle vector. Journal of Bacteriology 1990;172:2793-7.
- [22] Kamath AT, Fruth U, Brennan MJ, Dobbelaer R, Hubrechts P, Ho MM, et al. New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. Vaccine. 2005;23:3753-61.
- [23] Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, Puentes E, et al. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. Vaccine. 2013;31:4867-73.
- [24] Aguilo N, Gonzalo-Asensio J, Alvarez-Arguedas S, Marinova D, Gomez AB, Uranga S, et al. Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Communications 2017;8:16085.
- [25] Clark S, Lanni F, Marinova D, Rayner E, Martin C, Williams A. Revaccination of Guinea Pigs With the Live Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine MTBVAC Improves BCG's Protection Against Tuberculosis. Journal of Infectious Diseases 2017;216:525-33.

- [26] White AD, Sibley L, Sarfas C, Morrison A, Gullick J, Clark S, et al. MTBVAC vaccination protects rhesus macaques against aerosol challenge with *M. tuberculosis* and induces immune signatures analogous to those observed in clinical studies. *npj Vaccines* 2021;6:4..
- [27] Marinova D, Gonzalo-Asensio J, Aguilo N, Martin C. MTBVAC from discovery to clinical trials in tuberculosis-endemic countries. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:565-76.
- [28] Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:3684-9.
- [29] Boritsch EC, Brosch R. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: New Insights into Pathogenicity and Drug Resistance. *Microbiol Spectr*; 2016. p. 4.
- [30] Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5596-601.
- [31] Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyper-conserved. *Nature Genetics* 2010;42:498-503.
- [32] Yruela I, Contreras-Moreira B, Magalhaes C, Osorio NS, Gonzalo-Asensio J. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Exhibits Lineage-Specific Variations Affecting Protein Ductility and Epitope Recognition. *Genome Biol Evol*. 2016;8:3751-64.
- [33] Zhang W, Zhang Y, Zheng H, Pan Y, Liu H, Du P, et al. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS ONE* 2013;8:e71243.
- [34] Copin R, Coscolla M, Efsthadiadis E, Gagneux S, Ernst JD. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette- Guérin (BCG). *Vaccine*. 2014;32:5998-6004.
- [35] Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Martin C, Aguilo N. MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. *Frontiers in Immunology* 2017;8:1803.
- [36] Copin R, Wang X, Louie E, Escuyer V, Coscolla M, Gagneux S, et al. Within Host Evolution Selects for a Dominant Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* while T Cells Increase Pathogen Genetic Diversity. *PLoS Pathogens* 2016;12: e1006111.
- [37] Zhang L, Ru HW, Chen FZ, Jin CY, Sun RF, Fan XY, et al. Variable Virulence and Efficacy of BCG Vaccine Strains in Mice and Correlation With Genome Polymorphisms. *Molecular Therapy* 2016;24:398-405.
- [38] Gonzalo-Asensio J, Malaga W, Pawlik A, Astarie-Dequeker C, Passemar C, Moreau F, et al. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:11491-6.
- [39] Iglesias MJ, Ibarz D, Cebollada A, Comin J, Jimenez MS, Vazquez MC, et al. The value of the continuous genotyping of multi-drug resistant tuberculosis over 20 years in Spain. *Scientific Reports* 2020;10:20433.

- [40] Rivero A, Marquez M, Santos J, Pinedo A, Sanchez MA, Esteve A, et al. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:159-61.
- [41] Sagasti S, Millan-Lou MI, Soledad Jimenez M, Martin C, Samper S. In-depth analysis of the genome sequence of a clinical, extensively drug-resistant *Mycobacterium bovis* strain. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;100:46-52.
- [42] Gonzalo-Asensio J, Perez I, Aguilo N, Uranga S, Pico A, Lampreave C, et al. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *PLoS Genetics* 2018;14:e1007282.
- [43] Perez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Molecular Microbiology* 2001;41:179-87.
- [44] Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nature Genetics* 2016;48:1535-43.
- [45] Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, Huygen K, Hernandez Pando R, Thole J, et al. *PhoP*: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS ONE* 2008;3:e3496.
- [46] Solans L, Aguilo N, Samper S, Pawlik A, Frigui W, Martin C, et al. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies *WhiB6* as a novel ESX-1 component. *Infection and Immunity* 2014;82:3446-56.
- [47] Solans L, Gonzalo-Asensio J, Sala C, Benjak A, Uplekar S, Rougemont J, et al. The *PhoP*-dependent ncRNA *Mcr7* modulates the TAT secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* 2014;10:e1004183.
- [48] Chesne-Seck ML, Barilone N, Boudou F, Gonzalo Asensio J, Kolattukudy PE, Martin C, et al. A point mutation in the two-component regulator *PhoP-PhoR* accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Journal of Bacteriology* 2008;190:1329-34.
- [49] Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, et al. The virulence-associated two-component *PhoP-PhoR* system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:1313-6.
- [50] Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P, et al. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by *PhoP*. *PLoS Pathogens* 2008;4:e33.
- [51] Walker KB, Brennan MJ, Ho MM, Eskola J, Thiry G, Sadoff J, et al. The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine*. 2010;28:2259-70.
- [52] Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs Jr WR. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999;402:79-83.

- [53] Trivedi OA, Arora P, Vats A, Ansari MZ, Tickoo R, Sridharan V, et al. Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Molecular Cell* 2005;17:631-43.
- [54] Kirksey MA, Tischler AD, Simeone R, Hisert KB, Uplekar S, Guilhot C, et al. Spontaneous phthiocerol dimycocerosate-deficient variants of *Mycobacterium tuberculosis* are susceptible to gamma interferon-mediated immunity. *Infection and Immunity* 2011;79:2829-38.
- [55] Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, et al. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:19845-54.
- [56] Augenstreich J, Arbues A, Simeone R, Haanappel E, Wegener A, Sayes F, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cellular Microbiology* 2017;19.
- [57] Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Pando RH. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* *fadD26* mutant. *Clinical and Experimental Immunology* 2005;141:21-8.
- [58] Aguilo N, Uranga S, Marinova D, Monzon M, Badiola J, Martin C. MTBVAC vaccine is safe, immunogenic and confers protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* in newborn mice. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;96:71-4.
- [59] Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, et al. The live *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine*. 2006;24:3408-19.
- [60] Spertini F, Audran R, Chakour R, Karoui O, Steiner-Monard V, Thierry AC, et al. Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet Respir Med*. 2015;3:953-62.
- [61] Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA et al ; MVA85A 020 Trial Study Team. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013 Mar 23;381(9871):1021-8.
- [62] Tameris M, Mearns H, Penn-Nicholson A, Gregg Y, Bilek N, Mabwe S, et al. Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7:757-70.
- [63] Prentice S, Nassanga B, Webb EL, Akello F, Kiwudhu F, Akurut H, et al. BCG-induced non-specific effects on heterologous infectious disease in Ugandan neonates: an investigator-blind randomised controlled trial. *Lancet Infectious Diseases* 2021.
- [64] Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends in Immunology* 2013;34:431-9.

- [65] Arts RJ, Carvalho A, La Rocca C, Palma C, Rodrigues F, Silvestre R, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 2016;17:2562-71.
- [66] Alvarez-Arguedas S, Uranga S, Martin M, Elizalde J, Gomez AB, Julian E, et al. Therapeutic efficacy of the live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine, MTBVAC, in a preclinical model of bladder cancer. *Transl Res*. 2018;197:32-42.
- [67] Tarancon R, Mata E, Uranga S, Gomez AB, Marinova D, Otal I, et al. Therapeutic efficacy of pulmonary live tuberculosis vaccines against established asthma by subverting local immune environment. *EBioMedicine*. 2021;64:103186.
- [68] Tarancon R, Dominguez-Andres J, Uranga S, Ferreira AV, Groh LA, Domech M, et al. New live attenuated tuberculosis vaccine MTBVAC induces trained immunity and confers protection against experimental lethal pneumonia. *PLoS Pathogens* 2020;16:e1008404.
- [69] Esther Broset JP-S, Alex I. Kanno, Nacho Aguilo, Ana Isabel Dacosta, Irene Rivero-Calle, Jesus Gonzalo-Asensio, Camille Locht, Luciana C.C. Leite, Carlos Martin, Federico Martín-Torres. BCG vaccination improves DTaP immune responses in mice and is associated with lower pertussis incidence in ecological epidemiological studies. *EBioMedicine* 65 (2021) 103254 <https://doi.org/101016/j.ebiom2021103254>. 2021.
- [70] Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *Journal of Urology* 1976;116:180-3.
- [71] Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Ifrim DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:17537-42.
- [72] Aguilo N, Toledo AM, Lopez-Roman EM, Perez-Herran E, Gormley E, Rullas-Trincado et al. Pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers dose-dependent superior protection compared to that of subcutaneous vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Apr;21(4):594-7.
- [73] N. Aguilo, S. Alvarez-Arguedas, S. Uranga, D. Marinova, et al. Pulmonary but not subcutaneous delivery of BCG vaccine confers protection to tuberculosis-susceptible mice by an interleukin 17-dependent mechanism. *J. Infect. Dis*. 213, 831-839 (2016).
- [74] Aguilo N, Uranga S, Mata E, Tarancon R, Gómez AB, et al Respiratory Immunization With a Whole Cell Inactivated Vaccine Induces Functional Mucosal Immunoglobulins Against Tuberculosis in Mice and Non-human Primates. *Front Microbiol*. 2020 Jun 18;11:1339.
- [75] Mata E, Tarancon R, Guerrero C, Moreo E, et al N. Pulmonary BCG induces lung-resident macrophage activation and confers long-term protection against tuberculosis. *Sci Immunol*. 2021 Sep 24;6(63):eabc2934.
- [76] Dijkman K, Aguilo N, Boot C, Hofman SO, Sombroek CC, Vervenne RAW, et al. Pulmonary MTBVAC vaccination induces immune signatures previously correlated with prevention of tuberculosis infection. *Cell Rep Med*. 2021;2:100187.
- [77] Vierboom MPM, Dijkman K, Sombroek CC, Hofman SO, Boot C, Vervenne RAW, et al. Stronger induction of trained immunity by mucosal BCG or MT-

- BVAC vaccination compared to standard intradermal vaccination. *Cell Rep Med.* 2021;2:100185.
- [78] Lindestam Arlehamn CS, McKinney DM, Carpenter C, Paul S, Rozot V, Makgotlho E, et al. A Quantitative Analysis of Complexity of Human Pathogen-Specific CD4 T Cell Responses in Healthy *M. tuberculosis* Infected South Africans. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005760.
- [79] Millington KA, Fortune SM, Low J, Garces A, Hingley-Wilson SM, Wickremasinghe M, et al. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:5730-5.
- [80] Barreto ML, Pilger D, Pereira SM, Genser B, Cruz AA, Cunha SS, et al. Causes of variation in BCG vaccine efficacy: examining evidence from the BCG REVAC cluster randomized trial to explore the masking and the blocking hypotheses. *Vaccine.* 2014;32:3759-64.
- [81] Perez I, Uranga S, Sayes F, Frigui W, Samper S, Arbues A, et al. Live attenuated TB vaccines representing the three modern *Mycobacterium tuberculosis* lineages reveal that the Euro-American genetic background confers optimal vaccine potential. *EBioMedicine.* 2020;55:102761.
- [82] Scriba TJ, Mizrahi V. Renewing the Fight Against TB with an Old Vaccine. *Cell* 2020;180:829-31.
- [83] Sakula A. BCG: who were Calmette and Guérin?. *Thorax* 1983;38:806-1283.
- [84] Martín C, Marinova D, Aguiló N, Gonzalo-Asensio J. MTBVAC, a live TB vaccine poised to initiate efficacy trials 100 years after BCG. *Vaccine.* 2021 Dec 8;39(50):7277-7285.

Edición patrocinada por:



Colegio
Oficial
Farmacéuticos
Zaragoza