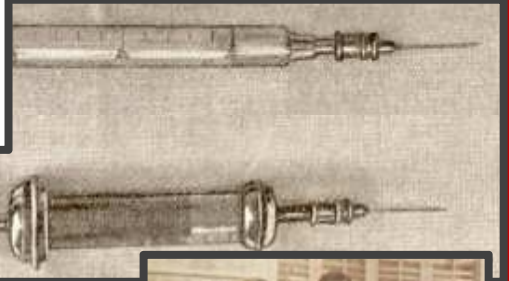
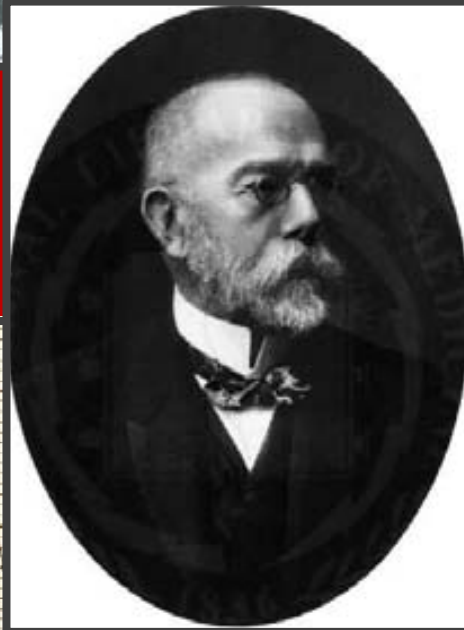


07618
#3
THE
TUBERCULIN DISPENSARY
FOR THE POOR



Tesi Doctoral
Avaluació de la immunogenicitat de la vacuna RUTI® en humans

Cristina Vilaplana i Massaguer
Director de tesi: Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias
Departament de Genètica i Microbiologia, UAB, 2009

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Avaluació de la immunogenicitat de la vacuna RUTI® en humans

Cristina Vilaplana i Massaguer

Unitat de Tuberculosi Experimental

Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Memòria de la tesi presentada per obtenir el grau de Doctor en Microbiologia per la
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, octubre de 2009

Director: Dr. Pere-Joan Cardona



El Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias, professor associat del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma,

Certifica:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi Doctoral titulada **“Avaluació de la immunogenicitat de la vacuna RUTI® en humans”** han estat realitzats per la Cristina Vilaplana i Massaguer sota la seva direcció i considera que és apta per ser presentada per optar al grau de Doctor en Microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància, signa aquest document a Bellaterra, octubre de 2009.

Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias

To the happy few

Stendhal

SUMARI

	pàgina
1. <u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1.1. SITUACIÓ ACTUAL	1
1.1.1. Dades actuals (WHO 2009) sobre la tuberculosi	1
1.1.2. Patogènia	4
1.1.3. La infecció tuberculosa latent i el seu diagnòstic	6
1.1.4. Mesures de control de la ITBL	8
Importància del control de la ITBL	
Aproximació històrica: la BCG	
Duració de la immunitat i protecció de la BCG en humans: estudis actuals	
Quimioprofilaxi de la ITBL	
1.2. HISTÒRIA DEL DESENVOLUPAMENT DE VACUNES CONTRA LA TB AMB CAPACITAT TERAPÈUTICA	13
1.1.5. El bacil de Friedmann	13
1.1.6. La vacuna anti-alfa del Dr. Ferran	15
1.1.7. René Dubos: del concepte interacció hostatger-patògen a la recerca dels marcadors de protecció	16
1.1.8. Història del tractament amb tuberculina	17
Robert Koch i el descobriment de la tuberculina	
Preparació de noves tuberculines	
Els primers mètodes per a la seva administració	
Sir A.E. Wright i el nou mètode d'inoculació basat en dosis repetides a llargs intervals	
El primer intent de trobar un "correlate of protection"	
L'autoinoculació	
Tot continuant fent servir la tuberculina	
1.3. DESENVOLUPAMENT ACTUAL DE NOVES VACUNES	26
1.4. DESENVOLUPAMENT DE LA VACUNA RUTI®	31
1.4.1. Bases científiques de la vacuna RUTI® : el «Rational »	31
1.4.2. De la idea a la clínica: el desenvolupament	34
2. <u>ESTUDIS</u>	39
3. <u>ESTUDI #1: ESTUDI DE LA PRODUCCIÓ D'AUTOANTICOSSOS EN SÈRUM DE RATOLINS VACUNATS AMB RUTI®</u>	41

3.1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ	41
3.2. HIPÒTESI I OBJECTIU	41
3.3. MATERIALS I MÈTODES	42
3.4. RESULTATS	43
3.5. CONCLUSIONS	44
<u>4. ESTUDI #2: DETECCIÓ D' INFECCIÓ TUBERCULOSA DURANT L' SCREENING: AVALUACIÓ DE LA INFLUÈNCIA DEL TST SOBRE LES RESPOSTES IMMUNOLÒGIQUES MESURADES PER TIGRA.</u>	45
4.1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ	45
4.2. HIPÒTESI I OBJECTIU	46
4.3. MATERIALS I MÈTODES	46
4.4. RESULTATS	46
4.5. CONCLUSIONS	50
<u>5. ESTUDI #3: AVALUACIÓ DE LA IMMUNOGENICITAT DE RUTI® EN EL CONTEXT D'UN ASSAIG CLÍNIC DE FASE 1</u>	51
5.1. HIPÒTESI I OBJECTIU	51
5.2. MATERIALS I MÈTODES	51
5.2.1. Disseny	51
5.2.2. Elecció i establiment de tècniques	57
5.2.3. Organització de l'assaig	63
5.2.4. Materials i mètodes	67
Posada a punt de les tècniques. Optimització de les concentracions d'estímul	
Maneig de mostres	
Tècniques a partir de PBMC aïllats de sang perifèrica	
Tècniques a partir sang total	
Tècniques a partir del sèrum	
Mètodes estadístics	
5.3. EXECUCIÓ I RESULTATS OBTINGUTS	79
5.3.1. Reclutament i seguiment de participants	79
5.3.2. Característiques clíniques i demogràfiques basals	80
5.3.3. Assajos per a l'avaluació de la immunogenicitat	81
Tècniques a partir de PBMC aïllats en sang perifèrica	
Tècniques a partir sang total	

5.3.4. Estudi del TST en els voluntaris al final de l'assaig	92
6. <u>DISCUSSIÓ</u>	95
6.1. SOBRE LA PREPARACIÓ I DISSENY DE L'ESTUDI	95
6.2. SOBRE L'ELECCIÓ DE LES TÈCNIQUES EN FUNCIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS	99
6.2.1. Estudi de poblacions cel·lulars	100
6.2.2. Estudi de l'efecte de RUTI® sobre la immunitat cel·lular	100
6.2.3. Estudi de l'efecte de RUTI® sobre la immunitat humoral	104
6.2.4. Valoració dels altres estudis	107
6.3. SOBRE LA SEGURETAT DEMOSTRADA PER LES DIFERENTS DOSIS TESTADES DE LA VACUNA I LA SEVA CORRELACIÓ AMB ELS RESULTATS D'IMMUNOGENICITAT	110
6.4. VALORACIÓ GLOBAL DE LA IDONEÏTAT DE L'ESTUDI DE CARA A FUTURS ASSAJOS DEL DESENVOLUPAMENT CLÍNIC DE LA RUTI®	113
7. <u>CONCLUSIONS</u>	117
8. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	119
9. <u>AGRAÏMENTS</u>	137
10. <u>ANNEXOS</u>	139
10.1. ARTICLE "Origin of immunotherapy with tuberculin. A story of success?", enviat a la revista Microbes and Infection	
10.2. ARTICLE "The Tuberculin Skin Test Increases the Responses Measured by T Cell Interferon-Gamma Release Assays"	
10.3. ARTICLE "Double-Blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI®", acceptat a la revista Vaccine	
10.4. PROCEDIMENT TIPUS EN FORMAT SOP	
10.5. FULLS DE TREBALL PER CADA DIA DE SEGUIMENT DE L'ASSAIG DE FASE 1	
10.6. RESUM DELS PROTOCOLS DE TREBALL	

LLISTA D'ABREVIACIONS

ANA: anticossos antinuclears

BCG: vacuna Bacil Calmette-Guérin

BrHPP: bromohidrina pirofosfat

CEIC: Comitè Ètic d'Investigació Clínica

CFP-10: Culture Filtrate Protein-10

CPT: Cell Preparation Tube

CFU: unitats formadores de colònies (CFU per Colony Forming Units)

CT assaig clinic (CT per Clinical Trial)

DMSO: dimetilsulfòxid

DO: Densitat Òptica

DOT: Directly Observed Treatment

DTH: Hipersensitivitat de tipus retardada

E: Etambutol

ESAT-6: Early Secretory Antigenic Target-6

EA: Efectes Adversos

ECG: Electrocardiograma

EIA: immunoassaig enzimàtic (EIA per Enzyme-Immunoassay)

FCMtb: Fragmented Cells of *M.tuberculosis*

GCP: Good Clinical Practice (GCP)

GMP : Good Manufacturing Practice

GSK: GlaxoSmithKline

HIV: Virus de la Immunodeficiència Humana

ICF: Institut Català de Finances

ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IFI: immunofluorescència indirecta

IFN- γ : Interferó-gamma

INH: Isoniazida

ITBL: Infecció Tuberculosa Latent

LAM: lipoarabinomannà de la micobactèria

MDR-TB: TB multiresistents a fàrmacs

MCC: medi complet

MRC: Medical Research Council

MV: *M. vaccae* inactivat

NTM: micobacteries atípiques o no-tuberculoses (per Non-tuberculous mycobacteria)

OI: Opsonic Index

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PCT: Procalcitonina

PHA: Fitohemaglutinina PHA-L

PPD: tuberculin purified protein derivative

PZA: Pirazinamida

RIF: Rifampicina

SATVI: South African TB Vaccine Initiative

SOP: Standard Operating Procedures

SFU: Spot Forming Units

Spf: specific pathogen-free

T^a: temperatura

TB: Tuberculosis

TIGRA: T-cell based IFN- γ -release assays

TST: Test cutani de la tuberculina (TST per Tuberculin Skin Testing)

UCLA: University of California, Los Angeles

UTE: Unitat de Tuberculosi Experimental

VHB: virus de l'hepatitis B

VHC: virus de l'hepatitis C

Vs: versus

WHO: World Health Organization

XDR: Altament multiresistents

%: tant per cent

1. INTRODUCCIÓ

1.1 SITUACIÓ ACTUAL

1.1.1. Dades actuals (WHO 2009) sobre la tuberculosi (TB)

Des de l'any 1997, la *World Health Organization* (WHO) treballa en una campanya global de control de la TB oferint, entre d'altres, reports anuals sobre les dades actualitzades de la malaltia a nivell mundial. El darrer número de la sèrie de documents és el del 2009, on es troben dades de fins a l'any 2007 i que permet extreure conclusions de les tendències que segueix la malaltia, que es presenten a continuació. Les figures que es presenten en aquest apartat també han estat extretes del mateix report [9]. Globalment, el número estimat de casos incidents de TB al 2007 fou de 9,27 milions totals (Fig. 1).

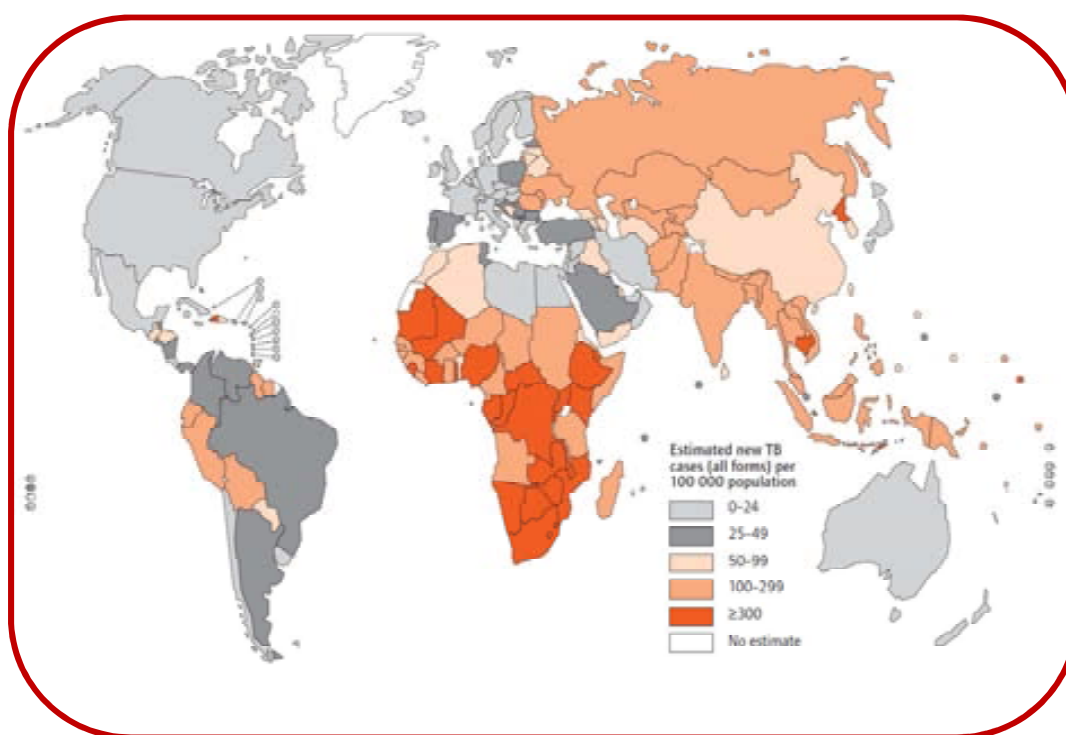


FIG. 1. Incidència estimada de tuberculosi per països, 2007

Això representa un augment respecte a dades anteriors, però és només un augment en termes absoluts com a resultat del creixement poblacional, ja que el número de casos per càpita està decreixent tot i que d'una manera molt lenta (a una ratio de menys d'un 1% cada any) (Fig. 2).

Els objectius d'impacte marcats pel 2015 són parar i començar a revertir la incidència de TB i reduir un 50% les taxes de prevalència i mortalitat.

Els casos prevalents estimats per l'any 2007 foren de 13,7 milions, i les morts en no-infectats pel virus de la immunodeficiència humana (HIV) degudes a TB d'1,3 milions, en decreixement després del pic als anys '90 (Fig. 2). Tot i així, en individus infectats per HIV, la taxa de mortalitat arriba fins a un 33% dels casos incidents de TB en aquest col·lectiu, i fins a un 23% de totes les morts relacionades amb l'HIV. En aquest col·lectiu d'HIV positius, els números referents tant als nous casos

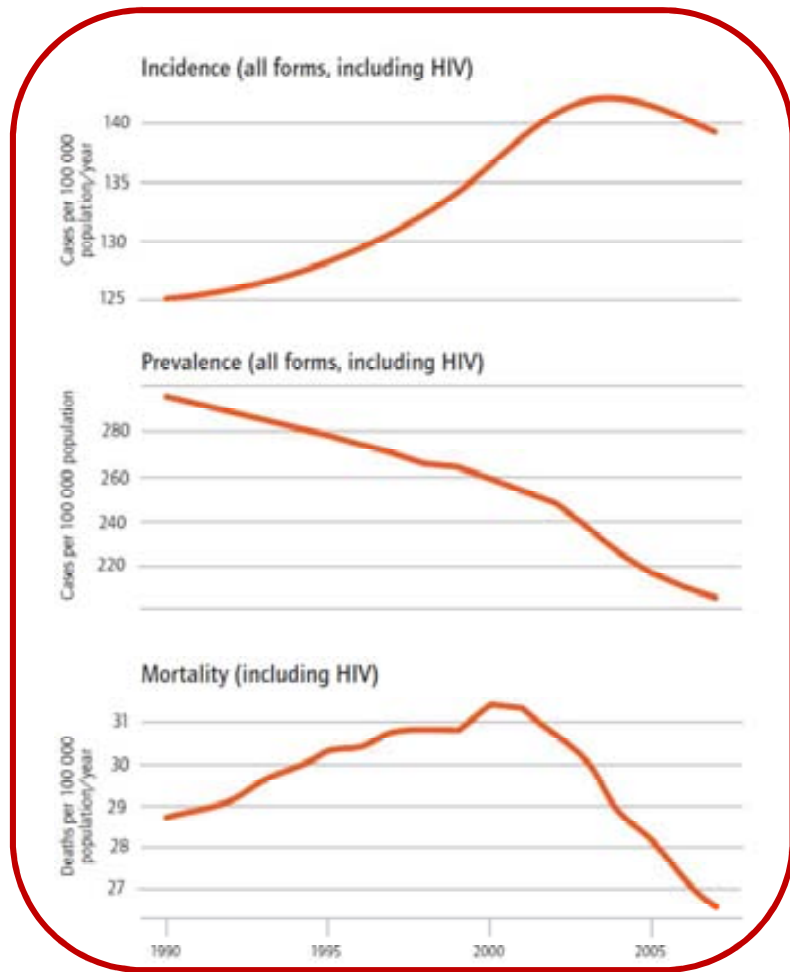
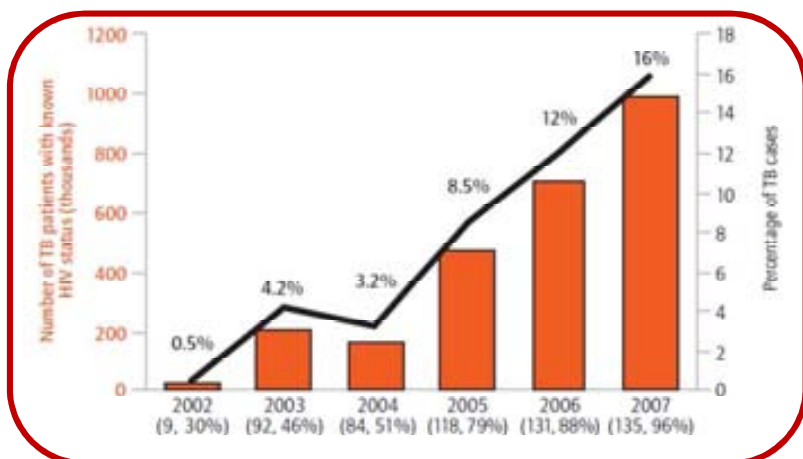


FIG. 2. Incidència, prevalença i mortalitat globals 1990-2007

de TB com a la mortalitat s'ha doblat segons el que s'ha reportat al document de la WHO del 2009 respecte als documents anteriors, però no ha estat un increment real, sinó fruit d'una estimació més ajustada gràcies a noves dades dels anys anteriors. I és que la coinfecció HIV-TB és devastadora en termes globals, fins al punt que un individu infectat amb HIV és fins a 20 vegades més susceptible de patir una TB que

FIG. 3. Testatge de pacients tuberculosos per la infecció per HIV. Dades globals de tots els països, període 2002-2007.



els no-infectats en un país amb HIV endèmica, i de 26-37 vegades més si es tracta d'un país amb prevalença baixa. És cert però que la recent millora de les mesures de detecció, control de malalties concurrents i cobertura amb tractament

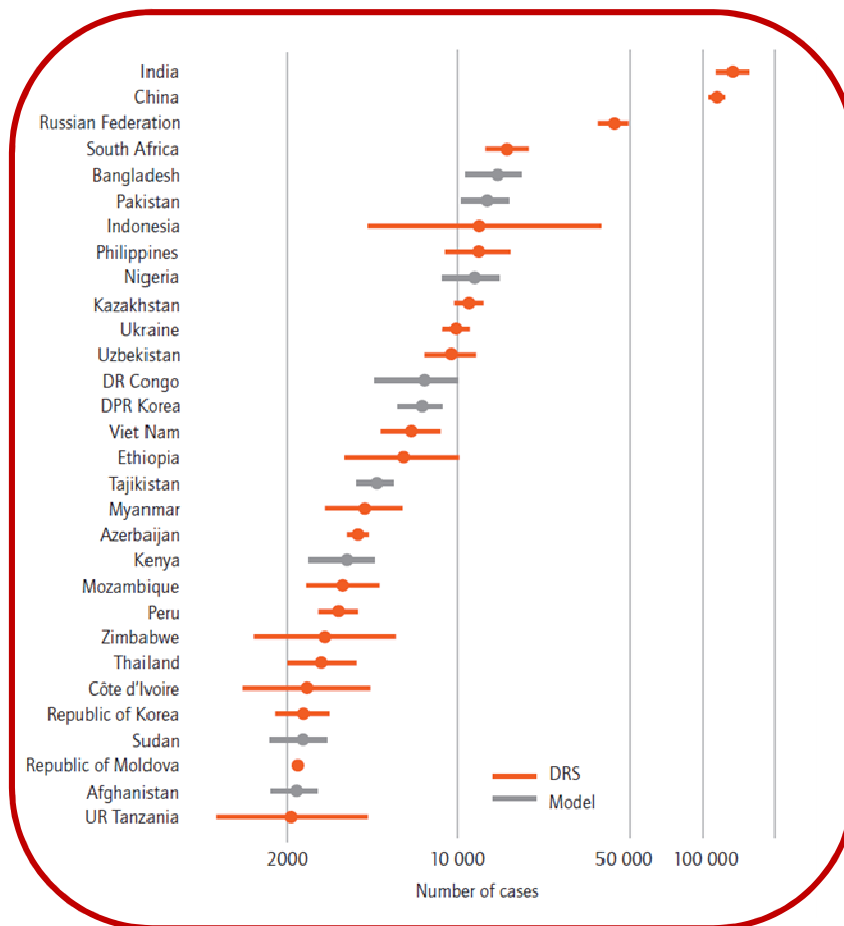


FIG. 4. Països amb els números més alts de MDR-TB estimades

antiretroviral (sobretot a l'Àfrica) ha ajudat sensiblement a la causa de la lluita antituberculosa (Fig. 3).

En quant a les TB multiresistents a fàrmacs (MDR-TB), fins a 0,5 milions de casos han estat estimats en l'últim document, essent la India i la Xina els països on més casos ocorren (Fig. 4), tot i que siguin els països europeus i Sud-Àfrica els qui les

reporten més. Globalment, i d'una manera curiosa, allà on existeix una menor taxa d'èxit en el tractament és a Europa, bàsicament per l'alta mortaltat i el fracàs de tractament a Rússia, fenomen lligat a la resistència a drogues. Fins i tot a Àfrica la taxa és major, tot i que desigual: havent-hi països on la taxa de succès és molt alta, en altres és deplorable, depenent de la taxa de coinfecció amb HIV i de l'existència de sistemes sanitaris defectuosos. Les diferències per sexe segueixen essent un misteri. Mentre que en quant a TB extrapulmonar el ratio home:dona és d'1:1, en la TB pulmonar és d'un home afectat per cada 8 dones, una diferència de gènere de la que caldrien més detalls biològics, epidemiològics, demogràfics, socials i econòmics per tal d'esbrinar-ne les causes associades.

La lluita per assolir els objectius de la WHO pel 2015 en quant a la TB demanda un gran esforç econòmic, que a hores d'ara encara és escàs. Fins a un 88% de la financiació ve dels governs, però és desencoratjador saber que aquest % baixa molt (fins a un 70%) si s'omet de l'anàlisi la Federació Rússia i Sud-Àfrica. La resta de subvencions per a la lluita antituberculosa es sustenta en beques i ajuts del *Global Fund*, i en menor mesura d'altres fonts i iniciatives.

En general doncs, es podria concloure que la TB està decaient molt lentament d'una forma global a tot el món, tot i que encara s'està molt lluny d'aconseguir els objectius de control que la WHO va establir per l'any 2015, i encara més de l'erradicació de la malaltia.

1.1.2. Patogènia

Un cop *M.tuberculosis* arriba a infectar un individu (comunment per via inhalatòria), el bacil és fagocitat per un macròfag (si la porta d'entrada és respiratòria un macròfag alveolar), a dins del qual aconsegueix multiplicar-se causant la mort de la cèl·lula, per a infectar un nou macròfag en ser alliberat alliberat al medi extracel·lular. Aquest creixement desmesurat del bacil comporta per una banda la disseminació hematògena, i per l'altra la presentació dels antigens tuberculosos per part de les cèl·lules dendrítiques a nivell dels ganglis regionals. L'aparició de la resposta immune específica aconseguirà aturar aquest cicle de destrucció de macròfags [12], aquest fenomen sovint associat en el temps a l'aparició d'una resposta d'hipersensibilitat retardada a nivell de la pell, el que es posa de manifest mitjançant la prova cutània de la tuberculina (TST *per Tuberculin Skin Testing*), tècnica tradicionalment usada per al detecció d'infecció tuberculosa. La immunitat específica haurà aconseguit però aturar el procés, empenyent al bacil a un estat no replicatiu (latent) per tal de sobreviure a les condicions d'estrès ambientals que l'hostatger desplega en contra seva. Les lesions tuberculoses o granulomes esdevenen unes estructures compactes però vives, amb una alta dinamicitat, que amb les seves capes cel·lulars ajuden en certa manera a contenir el focus de la infecció. En no aparèixer símptomes es passa a dir que la infecció és latent en contraposició a activa, tal com expliquen Mack et al al document de consens de la TBNET[13]. El problema esdevé en provar d'explicar com el bacil latent aconsegueix

“There is hesitation in acknowledging chance in scientific matters. Yet it is found everywhere, making sport of the efforts of reason. Chance plays a role of considerable importance in tuberculosis”
Canetti [5]

escapar i vèncer les resistències de l'hostatger, recreixent i donant peu a la malaltia plenament manifesta, en alguns casos fins a molts anys després de la primoinfecció [14]. Tradicionalment, s'ha considerat els granulomes unes estructures estanques, on existeix anaerobiosi, i als anomenats factors de ressucitació com als responsables d'aquest despertar dels bacils latents [15]. Darrerament però, a la Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE) s'ha postulat una nova hipòtesi, la Hipòtesi Dinàmica, per a explicar aquest fenomen tot tenint en compte les condicions fisiològiques de reparació de teixits danyats, de dinàmica respiratòria i l'atzar [16]. Segons aquesta hipòtesi, els macròfags escumosos que netegen contínuament el focus infeccions en un intent de drenar els debris cel·lulars per a afavorir la recuperació del parènquima original podrien endur-se bacils en estat no replicatiu al seu interior, ajudant-los a escapar del granuloma. El camí natural d'aquests macròfags és cap a

les vies respiratòries superiors per acabar, un cop deglutits, a l'estòmac, on serien destruïts juntament amb el seu contingut. La dinàmica respiratòria, en el seu continu cicle d'inspiració/espiració, genera la formació d'aerosols, que tenen una finalitat humitejadora i d'escalf de l'aire inspirat que per massa fred i sec podria danyar els espais alveolars. En aquest cicle continu, els aerosols poden incloure els macròfags escumosos que farien el camí invers, podent tornar a una zona del parènquima pulmonar amb una probabilitat que dependria majoritàriament de l'atzar. En trobar-se en unes noves condicions més favorables, en una zona "neta" d'inflamació, el bacil latent escapat podria recomençar el seu creixement, originant una nova lesió (figura 5). Així, aquesta hipòtesi planteja un continu drenatge de bacils de dintre dels granulomes que si bé majoritàriament aconseguiran ser destruïts, en un tant per cent (%) podrien tornar al parènquima i així generar noves lesions, per a tornar-se a escapar, continuant el cicle. Si per atzar una d'aquestes noves lesions ocorregués en una zona altament privilegiada, com l'àpex pulmonar, on coincideixen una alta pressió d'oxigen i una vascularització més pobre, el bacil aconseguiria ràpidament un creixement desmesurat, que acabaria en la formació d'una cavitat, donant la malaltia aguda en el seu sentit més clàssic [17, 18]. D'una manera o altra, la realitat és que els individus infectats són potencialment capaços de desenvolupar la malaltia activa fins a anys després [19], d'aquí a la necessitat d'elaborar noves estratègies terapèutiques per tal d'abordar la ITBL amb la finalitat última d'aconseguir trencar aquesta possibilitat de progressió.

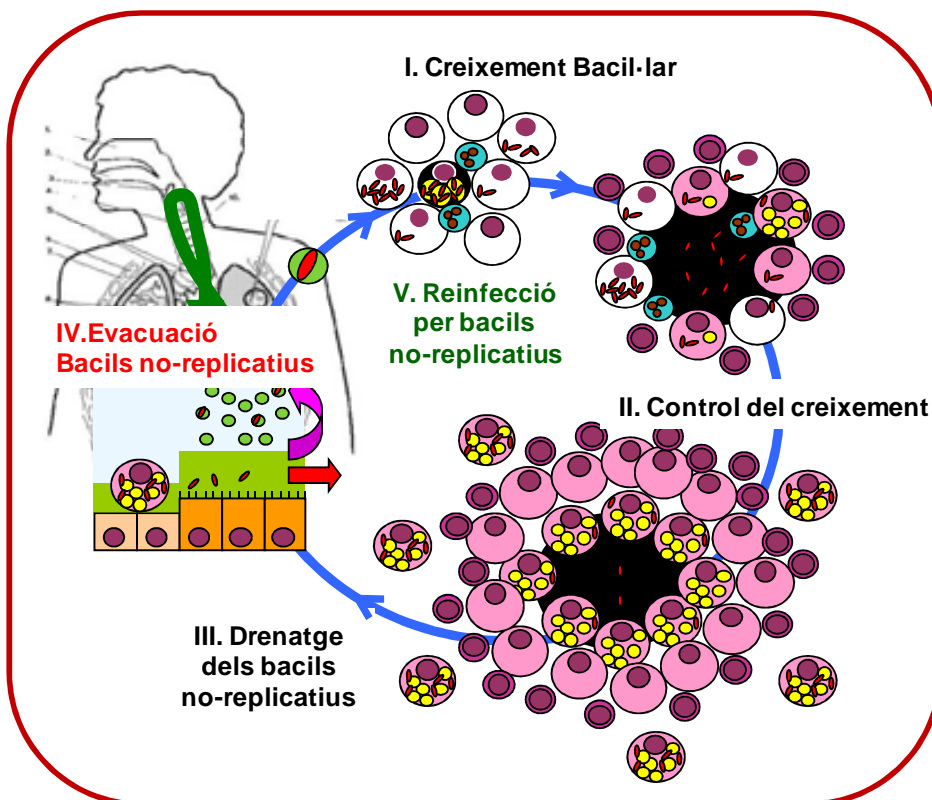


FIG. 5. Cicle de la ITBL. Després de la infecció i el posterior creixement bacil·lar (I), es desencadena la resposta immune que control·la la multiplicació del bacil (II). Posteriorment, els macròfags fagociten els debris cel·lulars i amb ells els bacils no-replicatius (III), drenant cap a l'espai alveolar formant part del fluid alveolar que va ascendint cap a l'espai bronquial superior. La major part del fluid serà evacuat cap a l'esòfag, però una fracció formarà part dels aerosols generats per a acondicionar l'aire exterior que s'inhala. D'aquesta manera els bacils tindrien l'oportunitat de reinfecar el parènquima pulmonar. (Imatge cedida per P.J. Cardona).

1.1.3. La infecció tuberculosa latent i el seu diagnòstic

El terme Infecció Tuberculosa Latent (ITBL) s'usa per descriure l'estat dels individus que es suposen portadors de *M.tuberculosis* vius sense manifestar cap signe o símptoma clínic

“Infection is in many cases the normal state; it is only disease which is abnormal” Dubos [6]

de malaltia activa, mentre que aquesta sovint s'anomena simplement Tuberculosis (TB) [13]. Malauradament, el diagnòstic de la infecció es pot dur a terme únicament per mètodes indirectes. Tradicionalment, des de fa aproximadament un segle, el TST o Mantoux ha estat la tècnica única, aprofitant la important resposta mediada per cèl·lules que genera *M.tuberculosis*, per a mesurar la inducció d'hipersensibilitat de tipus retardada (DTH) després de la injecció intradèrmica de PPD (*tuberculin purified protein derivative*), mescla de fins a >200 proteïnes de *M.tuberculosis*. El seu ampli ús arreu del món i al llarg de tants anys ha permès atribuir-li un valor pronòstic de progressió a malaltia activa, en funció del seu tamany i de l'edat del pacient, valor pronòstic que evidentment a última instància dependrà de les condicions clíniques de cada malalt.

Però el TST no està exempt de desavantatges, obtenint-se poca especificitat en individus vacunats amb la vacuna Bacil Calmette-Guérin (BCG), una baixa sensibilitat en els qui tenen la immunitat cel·lular alterada, i desplegar problemes logístics, tant d'execució com

“La réaction tuberculique positive relève seulement l'existence, vu quelque part dans l'organisme qui réagit, d'un foyer actif ou latent, récent ou ancien, de vie symbiotique d'un bacille, virulent ou non virulent, avec quelque cellule lymphatique, macrophage ou cellule géante. De ce fait, elle perd définitivement du moins toute importance diagnostique, puisque le tour où tous les sujets, hommes ou animaux sensibles à la tuberculose seront, dans un but de prophylaxie, artificiellement imprégnés de bacilles avirulents, il pourra leur arriver de réagir de la même manière que les sujets infectés” Calmette [8]

d'interpretació dels seus resultats[20]. D'altra banda, el descobriment, a mitjans dels anys 90 del segment genòmic RD1 (Region of difference-1), que està absent en la vacuna BCG i que codifica per 2 proteïnes -l'ESAT-6 (per Early Secretory Antigenic Target-6) i el CFP-10 (per Culture filtrate protein-10), va obrir pas al desenvolupament dels nous diagnòstics de la ITBL[21]. Basats en la detecció de les respostes T-específiques cap a aquests dos antígens, tots dos potents dianes de les cèl·lules T helper tipus 1 en individus infectats per *M.tuberculosis*, els TIGRA (per T-cell based IFN- γ -release assays) en la seva forma de kits comercials (T-SPOT TB i QuantiFeron-TB-Gold o QTF-G) s'han convertit en alternativa o recolzament al diagnòstic de la ITBL (segons les *guidelines* americanes o europees, respectivament), essent recomanada la seva realització [22-24]. Amb una alta especificitat, ajuden a reduir el nombre de persones inapropiada tractades en base a resultats falsament positius al TST degut a la prèvia vacunació amb BCG. D'altra banda, la seva alta sensibilitat en nens i en poblacions immunodeprimides (sobretot l'ELISPOT, però en menys

mesura també el QFT-G) ajudarien a detectar amb més cura les poblacions amb ITBL amb alt risc de progressió a malaltia, i conseqüentment subsidiàries de tractament [25].

Malauradament, però, aquestes tècniques encara són d'execució costosa, tampoc no són capaces de discriminar entre infecció i malaltia, i es desconeix encara el seu valor pronòstic. En aquest sentit, els estudis realitzats fins al moment encara no són concluent tot i que apunten a tenir un valor pronòstic en els dos anys següents a la infecció similar al TST essent capaços de discriminar més infeccions reals respecte als possibles falsos positius d'aquest [26-28].

L'aparició dels TIGRA doncs ha exigint tenir-los en compte a l'hora de prendre qualsevol decisió terapèutica, tot i que de diferent manera segons les normatives de cada país. El TST encara és l'eina que s'usa per a estimar la prevalença de ITBL, però la veritat és que el més sensat seria tenir en compte els resultats de totes les proves possibles que estiguessin a l'abast per tal de calcular-la, tal com presentaren Pai *et al* al seu article tan bonic anomenat "Improving the estimation of tuberculosis infection prevalence using T-cell-based assay and mixture models" i publicat al International Journal Tuberculosis Lung Disease al 2008 [11]. En aquest treball, usaven un software per a interpretar els resultats de 719 treballadors de salut en una zona rural de la Índia segons un anàlisi anomenat Latent Class Analysis (LCA). Aquest model mixte està basat en el

concepte de que els resultats observats de diversos tests imperfectes per a la mateixa malaltia

están influenciats per una variable comuna i no observada: la malaltia real. Així, la conclusió seria que de com més tests es disposi per a diagnosticar una infecció, encara que aquests siguin imperfectes, més sabrem sobre aquella infecció. Els resultats que varen presentar són espectaculars: segons aquest model un individu amb el TST i

un QFT-G positiu té fins a 50 vegades més possibilitats de tenir ITBL que un individu amb ambdues proves negatives, i un que tingui un TST- però un QFT-G + tindria una probabilitat de patir ITBL del 85%, tot i que un cas com aquest segons alguns professionals i normatives

TAULA 1. Valors de prevalença de ITBL segons Pai et al. Taula extreta de l'article "Improving the estimation of tuberculosis infection prevalence using T-cell-based assay and mixture models"[11]

Table 3 Results on positive predictive values, sensitivity and specificity from latent class analysis model

Variable	Posterior distribution	
	Median %	95%CrI
P(LTBI+ TST+, QFT-G+)	99.2	99.0-100.0
P(LTBI+ TST+, QFT-G-)	46.0	29.0-65.0
P(LTBI+ TST-, QFT-G+)	85.0	69.0-94.0
P(LTBI+ TST-, QFT-G-)	2.0	1.0-4.0
Sensitivity of TST	79.5	74.9-84.4
Specificity of TST	87.4	82.3-91.8
Sensitivity of QFT-G	89.9	86.1-93.7
Specificity of QFT-G	97.4	94.2-98.9

CrI = credible interval; LTBI = latent tuberculosis infection; TST = tuberculin skin test; QFT-G = QuantIFERON-TB Gold In-Tube assay.

no es tractaria [29]. Els resultats del valor predictiu de la combinació de les proves diagnòstiques d'ITBL obtinguts en aquest estudi es presenten com a taula nº1 [11].

L'altre gran problema de la ITBL és que en ser asimptomàtics, aquests individus es converteixen en el reservori de la TB, ja que en el precís moment en que desenvoluparan una TB activa indubtablement en patiran les conseqüències però també contribuiran a la disseminació de la infecció, perpetuant el cicle vital de la micobactèria. L'única prova indiscutible de l'existència de la infecció latent és l'èxit de l'administració empírica d'Isoniazida (INH) durant 9 mesos a individus que després de ser contactes de persones malaltes de TB tinguin un resultat de TST+, que aconsegueix reduir la probabilitat de progressar a malaltia fins a un 90% [10]. Fou Comstock qui va dir que mentre l'adquisició de la infecció tenia una natura exògena, ja que depenia de l'exposició, la progressió cap a malaltia era de natura endògena [30]. A partir d'aquesta idea, Rieder *et al*, en el seu tribut a Comstock (2007), ja varen apuntar que on calia que els recursos de la recerca incidissin és en identificar els factors addicionals que determinen la probabilitat de que el bacil tuberculós escapi i sigui capaç de mantenir-se latent, més que en els factors que incrementen el risc d'adquirir la TB [31].

1.1.4. Mesures de control de la ITBL

Importància del control de la ITBL

Segons Dubos, els metges que a partir del 1830 van constituir la lliga antituberculosa ja consideraven que la prioritat en la seva lluita era la diagnòsi de la TB en la seva fase més primerenca, a poder ser encara quan encara asimptomàtica, per dues raons primordials: d'una banda poder ajudar al pacient com a individu de cara a augmentar les seves possibilitats de recuperació, i de l'altra protegir la comunitat de manera que en detectar-lo, a partir d'ell es pugués trencar la cadena de transmissió de la infecció [32]. Perquè que els individus infectats són potencialment perillosos per la salut pública queda fora de dubte. Ja Dubos havia dit: "L'últim pas de la conquesta de la TB podria dependre del coneixement dels factors que prevenen que la malaltia es manifesti en forma de malaltia destructiva i progressiva" [32]. Existeixen 3 qüestions bàsiques en l'epidemiologia de la TB: 1) el risc de desenvolupar malaltia al llarg de tota la vida d'un individu; 2) el període d'incubació, és a dir el temps entre la infecció inicial i l'eclosió de la malaltia i 3) l'anomenat serial interval, que és el temps entre la infecció i la transmissió. Mentre que 3) determina la transmissió a tercers, tot depenent del temps entre infecció i infectivitat i de la duració de la infectivitat, 1) i 2) fan referència a la progressió cap a malaltia [33]. S'estima que aproximadament el 10% de les persones infectades desenvoluparan tuberculosi activa (essent el risc més gran en els 2 primers anys post-infecció), % que augmenta fins a un 50% en aquests dos anys si estan

coinfectades pel virus de la immunodeficiència humana (HIV) i tenen un número de CD4 baixos [34, 35].

Però per què això passa només en alguns individus? En quines condicions esdevé el pas d'infecció latent a malaltia? Hi ha nombrosos factors que s'associen a aquesta transició, des de susceptibilitats individuals fins a desordres metabòlics (diabetes), malalties intercurrents o condicions d'immunodepressió, ja sigui per malnutrició, immunodeficiències o drogues [20], i fins i tot característiques intrínseques de la micobactèria (les soques Beijing, no solament s'han associat a més transmissibilitat, sinó a una més alta progressió a la malaltia activa en els individus que infecta)[36]. En síntesi, qualsevol perturbació de la fisiologia de l'individu pot desencadenar una recrudescència de la infecció que aboqui a l'avantatge del bacil i conseqüentment al seu desmesurat creixement que l'hostatger no serà capaç de controlar, decantant l'equilibri hostatger-patògen que existeix en la infecció latent cap a l'eclosió de la malaltia.

Avui en dia, i postulat pel document de consens sobre la ITBL publicat a principis d'any, per al control (estratègia de control de la TB) cal focalitzar-se en la reducció de la incidència de la infecció mitjançant la detecció i tractament dels transmissors, seguint el principi bàsic de que si hi ha menys malalts hi haurà menys transmissió. Però per a l'erradicació (estratègia de l'eliminació de la TB) cal a més treballar sobre la prevalença, és a dir focalitzant l'esforç en la identificació/detecció i el tractament dels individus amb ITBL (que potencialment són els que poden desenvolupar una TB activa en algun moment)[13].

Aproximació històrica: la BCG

Albert Calmette i Camille Guérin van començar les seves experimentacions a partir de 1903, i més extensament a partir de 1906. En aquell moment, s'havia observat que els nens de menys de 2 anys que vivien en ambients familiars infectats convertien la tuberculina en un 40%, xifra que augmentava fins a un 90% si tenien entre 4 i 10 anys. Però només un 20% d'ells desenvolupaven una TB. Calmette va considerar que hi havia 2 idees a extreure d'aquest fet: una era la precocitat de la infecció des de la més tendra infància, i l'altra, que els qui sobreviuen, tenien el que ells anomenaven "una mena de resistència". Això els va dur a la idea de demostrar que calia aconseguir que els òrgans limfàtics de la gent des de l'edat menor possible entressin en contacte amb bacils "**peu offensives et vivants**" (vius i poc ofensius). Aquest concepte naixia de la idea (segons diu Calmette mateix a la seva obra [37]) que com que tard o d'hora els bacils acaben desapareixent (tal com ho demostra el fet que al llarg dels anys l'individu es pot reinfectar i o bé morir o fer una TB important), calia que fossin vius per a mantenir la generació d'immunitat (ja que si foren morts és tan transitòria que no dóna protecció davant d'infeccions virulentes) però essent a la vegada atenuats per a no donar lesions extenses i disseminades.

Calmette i els seus col·laboradors varen observar en bovins que una sola inoculació d'un inòcul baix via digestiva generava TB (pulmonar, ganglionar o pulmonar-ganglionar), els animals convertien el TST i es podien curar. En canvi els animals sotmesos a reinfeccions successives via digestiva repetides a curts intervals no es curaven mai. La conclusió després de la constatació de resultats semblants per altres (Romer en xais i conills porquins, i Grosz, Kraus i Wolk en mono) és que una sola contaminació bacil·lar poc intensa determina una infecció que generalment és benigna i que confereix un cert grau de resistència a reinfeccions subseqüents, mentre que les infeccions a curt termini repetides amb baix inòcul o les infeccions massives condueixen a una TB greu o mortal en un termini variable de temps. En base a això ells deduíren que en humans -com en els animals- la patologia que segueix a la infecció també depèn de 1) l'inòcul, 2) de l'adaptació de l'hostatger al microorganisme i 3) de la freqüència de les infeccions. Aquesta és la idea que els conduí a pensar que un inòcul de bacils vius però sense virulència donaria aquesta resistència, i a partir de la qual desenvoluparen la BCG, basada en cultius de bacils d'origen boví sobre patates cuites en bilis de bou pura glicerínada al 5% i mantingudes a una Tª de 38°C. Malgrat que originàriament la ruta d'administració havia de ser l'oral, finalment es va optar per la vacunació via subcutànea per ser la més còmoda de les que varen avaluar. Però per què calia que fossin bacils vius? Perquè era la inoculació successiva (a un any vista, ja que la immunitat adquirida no sobrepassava els 18 mesos si només es donava una dosi), la que donava contínuament bacils vius en el sistema limfàtic, el que ells observaren que feia que aquells vedells sobrevisquessin a una infecció intravenosa amb bacils virulents. A partir d'aquí ells extrapolaron que si es podien aïllar bacils vius i els vedells seguien vius posteriorment a ser experimentalment infectats era precisament perquè encara quedaven bacils vius dels atenuats circulants que a més mantenien la immunitat. I per què avirulents? La raó d'usar bacils avirulents era perquè consideraven que tots els atemptats duts a terme amb bacils amb virulència normal o afeblida havien demostrat el perill de poder desencadenar una TB mortal donada la variabilitat de les respostes a nivell interindividual. També perquè demostraven que usant bacils vius sempre hi havia disseminació, el que entre altres coses en comportava l'eliminació a través de la llet.

I quina finalitat doncs tenia aquesta vacuna? Amb els resultats obtinguts dels experiments en animals varen decidir plantejar la vacunació amb aquests bacils biliats (BCG) el més aviat possible per a que la immunitat adquirida pogués ajudar a suportar les infeccions posteriors virulentes accidentals (*prémuniton*). La vacunació terapèutica fou exclosa basant-se en que les experiències amb bacils morts/atenuats en individus ja infectats donaven lloc a efectes adversos (manifestos amb el fenomen de Koch) pel que consideraven que calia vacunar els individus ABANS de que s'infectessin, d'aquí a que com que en el moment en que es va desenvolupar la majoria de població adulta ja estava infectada, es focalitzessin en la

vacunació de nens. Tots els assajos en animals (conills porquins i en conills, i després els portats a terme en monos) donaven els mateixos resultats: els animals vacunats sobreviuen a la infecció accidental (per cohabitació amb animals infectats) o artificial (per inoculació directa), però la protecció no s'allargava més enllà d'un any, d'aquí a que Calmette i Guérin suggeríssin la necessitat de reinoculacions.

Duració de la immunitat i protecció de la BCG en humans: estudis actuals

Actualment, l'estudi de la duració de la protecció ha estat estudiada en humans, amb resultats més o menys controvertits. La metaanàlisi de Colditz en situa la durada en aproximadament 10 anys [38], tot i que Aronson et al varen trobar indicis de persistència de la eficàcia de la vacuna fins a 50 anys després de la primera vacunació, encara que anava disminuint al llarg del temps, tot i que l'estudi se centrava en una població molt determinada [39]. Recentment, Weir et al [40], monitoritzant la secreció PPD-específica d'IFN- γ mitjançant un assaig amb sang total, varen demostrar que la vacunació en infants i adolescents genera immunitat de memòria enfront als antígens micobacterians que encara és mesurable fins a 14 anys després, tot i que a partir de 3 mesos a un any ja ha decrescut, i que dels 12 mesos als 3 anys encara es veu més reduïda. Els autors apunten que aquestes dades podrien ajudar a fixar el moment en que una vacuna de *boosting* de la BCG podria ser introduïda, per a arribar a generar una resposta que es pugues mantenir molt més enllà en el temps.

En animals, la vacuna aconsegueix muntar una resposta immune accelerada que limita el creixement de la micobactèria, limitant l'extensió de la malaltia i per tant reduint patologia i perllongant la supervivència dels animals vacunats [8]; d'aquí a que se li suposi capacitat per evitar la progressió de la malaltia. Però és veritat? L'estudi de Madras va demostrar que la vacunació amb BCG no preveu la TB pulmonar en adults joves i adults (l'estudi exclouïa nens) [41]. En canvi en nens es redueix sobre dos terços la incidència de les formes severes, disseminades i especialment les meningitis, sobretot en països d'alta incidència. Conseqüentment, la incidència de morts per TB també es veu reduïda tal com explica el metaanàlisi de Colditz, que representa tots els assajos clínics des de l'any 1983 fins a mitjans dels anys 90 [42]. Però l'eficàcia de la vacuna en general varia des d'un 0 a un 80%, amb una mitja de 50% segons els països i els assajos clínics que l'avaluen, fet que ha estat atribuït a l'ús de diferents soques de la vacuna, la influència de soques de micobactèries atípiques i als diferents materials i mètodes dels estudis (vies d'administració, població diana i fins i tot variables i mètodes per a avaluar la TB activa)[42-45].

Darrerament ha aparegut un altre inconvenient de la BCG. A les àrees on la prevalença d'HIV és molt alta, com a l'Àfrica, la coinfecció HIV-TB succeeix en un alt percentatge, i és allà on es vacuna a més nens, ja que la incidència de TB és tan gran que cal prevenir la TB

disseminada i la meningitis tuberculosa. Però tot i així, recentment estan sortint estudis recolzats pel WHO que fan replantejar les estratègies de vacunació massiva [46-48], ja que en nens infectats per HIV o afectats d'altres immunosuppressions, la vacunació amb BCG pot generar (sobretot si són menors d'1 any) una disseminació de la BCG causant malaltia fins en 1% dels casos, essent possible d'aïllar bacils en LCR, ganglis i demés localitzacions francament lluny del punt d'inoculació, i arribant a causar la mort en un 78% dels casos [49].

Quimioprofilaxi de la ITBL

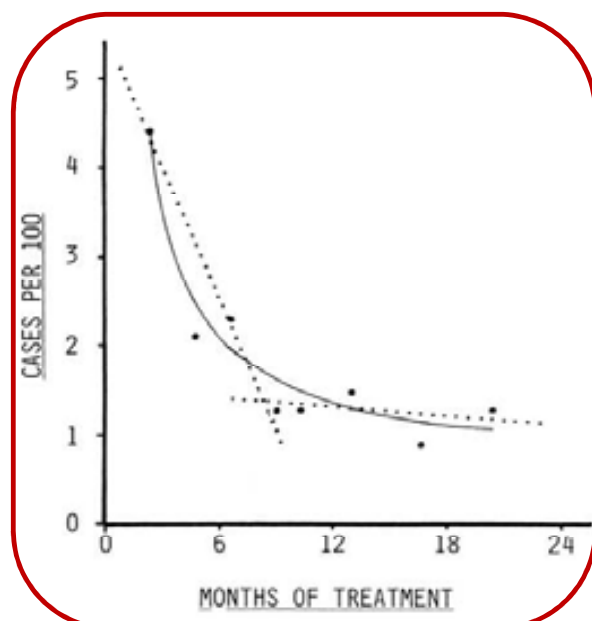
La quimioprofilaxi antituberculosa és l'administració d'un règim de tractament simple específic a individus sans, amb finalitat preventiva: la de prevenir la infecció dels individus exposats al contagi (quimioprofilaxi o quimioprofilaxi primària) o de prevenir la malaltia en els individus ja infectats (quimioteràpia de la infecció o quimioprofilaxi secundària)[50].

Es considera que la decisió de realitzar un TST a un individu implica la decisió de tractar-lo [20]. En principi tot individu amb un TST negatiu i convivent o contacte íntim d'un pacient amb TB pulmonar bacil·lífer seria candidat a quimioprofilaxi primària (que s'hauria de mantenir fins a 3 mesos després d'haver suprimit el contacte o que el focus hagués deixat de ser contagiós [50]. La principal indicació però serien els nens menors de 5 anys, els individus HIV positius i altres tipus de pacients immunodeprimits, i alguns casos seleccionats de nens, adolescents o adults joves [51]. Els individus s'haurien de retestar amb el TST de 8 a 12 setmanes després.

Són subsidiaris de quimioprofilaxis secundària els individus amb infecció recent demostrada (convertors del TST), els coinfectats amb HIV i aquells que tinguin evidències radiològiques de TB inactiva no tractada, i en general tot individu que independentment de la duració de la infecció està en risc de progressar a malaltia activa.

La quimioprofilaxis *standard* es fa amb dosis diàries d'hidracides (Isoniazida: INH). La durada habitual del tractament és de 6 mesos, que es generalment considera suficientment cost-efectiva. S'ha demostrat però que si bé assoleix la reducció de fins a un 60% la taxa de progressió a malaltia

FIG. 6. Taxa de casos de TB (%) en funció dels mesos de tractament amb INH. Extret de "How much INH is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults?" (Comstock, 1999) [10]



activa, es necessiten com a mínim 9 mesos per a reduir-la en un 90% (veure figura 6) [10]. És per això que es recomana que s'allargui fins a 9 mesos com a mínim si es donen les següents condicions: nens, HIV o evidència de lesions antigues de TB a la placa radiogràfica de tòrax.

Els principals problemes del tractament de la ITBL són que és potencialment tòxic (s'ha relacionat especialment amb hepatotoxicitat) i la seva llarga durada, condicions que n'afavoreixen la poca adherència. Diversos règims curts han estat assajats, però molt pocs aprovats per a ser recomanats en casos seleccionats. El règim curt de 3 mesos amb INH+Rifampicina (RIF) també és acceptable, amb una eficàcia similar a la de les hidracides durant 6 mesos i se li suposa una millor adherència. En casos de resistència a INH també es suggeria poder valorar de donar RIF durant 4 mesos, tot i que queda descartat per política de reserva dels medicaments: si s'afegeix resistència a RIF a la prèvia resistència a INH el resultat és una soca MDR. El tractament proposat de RIF més Pirazinamida (PZA) durant 2 mesos també s'ha desestimat per alta incidència de toxicitat en els malalts [52]; i en els casos de contactes de malalts amb tuberculosi multiresistents el que s'ha demostrat com a millor estratègia terapèutica ha estat la monitorització clínica [53].

1.2 HISTÒRIA DEL DESENVOLUPAMENT DE VACUNES CONTRA LA TB AMB CAPACITAT TERAPÈUTICA

*Del bacilo ácido resistente de Koch se le ha extraído todo lo que de el puede extraerse. Se le ha triturado, se le ha lixiviado para extraerle sus ácidos grasos y sus grasas neutras: se le ha disuelto: se le han sacado proteínas, nucleínas, venenos cristalizados, y sin duda, muchas otras cosas que yo ignoro, acaso. Todo ha sido en vano. Las partes no nos han dado lo que nos negó el todo. A pesar de tan ímproba labor –y dígame lo que se quiera– ¿hemos adelantado mucho en la curación, ni en la profilaxis específica de la tuberculosis?
Jaume Ferrán [7]*

El bacil de Friedmann

El professor Friedrich Franz Friedmann, interessat en la mort de dues tortugues del zoo de Berlin, va aïllar en els pulmons dels animals uns bacils molt semblants als causants de TB humana, tan semblants que ni el Pr. Koch va ser capaç de diferenciar-los. En aquell moment (principis del 1900) ja es coneixien arreu les reaccions que es donaven amb l'ús terapèutic de la tuberculina. Partint de la idea de que la curació i prevenció de la TB necessitaria de l'ús d'una vacuna aconseguida a partir de bacils tuberculosos que no fossin virulents per a l'ésser humà i que a la vegada es mantinguessin vius en el punt d'inoculació, Friedmann va treballar en el desenvolupament d'una vacuna a partir dels bacils obtinguts en les tortugues

(bacil de Friedmann, posteriorment classificat com a *M.chelonei*), considerats avirulents per als animals de sang calenta. El 6 de novembre de l'any 1912, el mateix Friedmann féu un anunci davant de la Societat Mèdica de Berlin explicant el seu remei i els resultats obtinguts de la seva aplicació en una població de més de mil individus. Administrada via subcutània, intramuscular, intravenosa, via oral, via conjuntival i fins i tot localment als focus tuberculars, el científic la considerava segura. El tractament consistia en l'administració intramuscular d'una, dues o tres inoculacions separades per llargs intervals [54]. Pedro Guillermo Belmes a la seva revisió [55] ja fa referència a que el més important a tenir en compte a l'hora del seu ús era la dosi, ja que ja després de la inoculació sempre apareixien reaccions locals, bàsicament inflamació que podia arribar a ser fins del tamany duna toronja amb altres símptomes i signes acompanyants (dolor, envermelliment). Si s'inoculava una segona dosi de la vacuna, el nòdul de la primera inoculació empitjorava, pel que es recomanava esperar a que aquest episodi es resolgués (normalment als 3-4 mesos, de vegades no abans d'un any). Friedmann va usar la vacuna primer en ell mateix, després en adults amb TB i més tard en nens amb TB. Els resultats obtinguts en un total de 1182 pacients van ser presentats l'any 1912 i apuntaven a la curació o millora de les lesions tuberculoses en pràcticament tots els casos, si bé Friedmann va remarcar que existia una alta variabilitat interindividual en les respostes, que ell atribuïa a que els pacients estaven en estadis diferents de la malaltia impossibles de classificar. La població subsidiària del tractament incloïa els individus capaços de respondre i els que millor responien eren els que patien formes de TB locals i tènues, sobretot si formes quirúrgiques. Cal remarcar que dels individus amb ptisis i tractats (n=250), un total de 6 es van morir, Friedmann reconeguent l'estat avançat de la malaltia en tots ells, tot plegat recordant molt al tractament amb tuberculina. Una de les altres similituds amb el remei de Koch era l'avantatge de no impedir que el pacient seguís treballant, el que feia el tractament molt popular.

Els resultats del seu ús terapèutic va estimular Friedmann a provar el seu ús profilàctic arribant a tractar fins a aquell moment a un total de 335 nens d'edats compreses entre 1 i 3 anys, si bé 305 d'aquests 335 eren lactants. En els casos de bessons, Friedmann en vacunava un i deixava l'altre de control, una pràctica segurament de valor científic, però que per raons ètiques evidents és reprobable. A tots els nens se'ls practicava la prova diagnòstica de von Pirquet (primordi del TST) abans de la vacunació, fins a un 2% arribant a donar positius i conseqüentment essent investigats epidemiològicament. En un 90% d'aquests casos els pares van resultar ser tuberculosos. La vacunació preventiva dels lactants només generava una infiltració als pocs dies d'un tamany que variava entre un pèsol i una cirera, i que desapareixia entre setmanes i pocs mesos sense deixar traça.

Els treballs de Friedmann en humans van ser ampliat amb una elegant experimentació animal en conills porquins. Després de generar dos grups (un d'animals vacunats amb una

sola dosi intramuscular i un sense vacunar), els conills porquins es sotmetien a una infecció artificial. La supervivència posterior era mesurada, els animals vacunats arribant a viure fins a aproximadament un any (363 dies) quan els no vacunats no superaven els 110 dies. A més, si els animals vacunats preventivament i posteriorment infectats es sotmetien a una dosi terapèutica, aquests vivien fins a 4 vegades més que els animals als que no se'ls administrava cap dosi terapèutica. Això reforçà Friedmann en que la vacuna era útil tan terapèuticament com profilàcticament, i el féu pensar que si bé la immunitat generada per la vacuna es podria mantenir pel continu contacte de l'individu amb *M.tuberculosis* al llarg de la vida, potser caldria inocular més d'una dosi per a mantenir aquesta resposta [56].

És cert que Friedmann va admetre que la seva vacuna era eficaç en el tractament i la prevenció de la TB però que no era capaç d'assegurar quin grau de cobertura s'assolia amb la immunització. I tanmateix, pels seus èxits Friedmann va obtenir el reconeixement del govern Prussià, que li va acabar creant la càtedra d'Investigació en tuberculosi a la Universitat de Berlin, i un capitalista de St.Louis li va arribar a oferir fins a 1.000.000 \$ pels drets exclusius de la comercialització del seu remei a Amèrica [57].

“Inmunizad, cuanto queráis, lotes de animales tuberculizables con bacilos ácido-resistentes atenuados, o muertos o disueltos; con nucleínas, proteínas, sustancias cristalizables, tuberculinas de todas clases, bacterias no ar, ascendientes o descendientes de él, y cuando creáis que los teneis sólidamente inmunizados, cuando hayáis comprobado la formación de anticuerpos homólogos de los antígenos empleados, inoculadles virus tuberculoso natural y no habrá uno solo que resista esta prueba: todos se tuberculizan: todos mueren tuberculosos”
Jaume Ferrán [7]

La vacuna anti-alfa del Dr. Ferrán

El Dr. Ferrán era un català gros, de caràcter fort, i del que es pot deduir dels seus llibres i classes magistrals i conferències, amb una presència que més aviat imposava. Després de descobrir i assajar la vacuna del còlera, es va dedicar a l'estudi de la TB, evidenciant que els bacils de Koch cultivats en medis pobres en nutrients proteics, a T° de 42°C i mantinguts al llarg del temps acabaven donant terbolesa, en la que s'aïllaven uns

bacils que perdien la capacitat de ser àcid alcohol resistent que ell considerava del grup coli (als que va anomenar “bacils alfa”). Ferrán considerava aquests bacils atenuats i inflamatoris, ja que un cop reinoculats a animals aquests no morien en un plaç curt de dies i demostraven una reacció més aviat purament inflamatòria amb menys lesions típiques tuberculoses (tubercles) del que haguessin desenvolupat si haguessin estat inoculats amb bacils frescos de *M.tuberculosis*. Ell, que va considerar que la TB tenia un curs bifàsic amb una primera etapa primordialment inflamatòria seguida duna fase aguda de formació de tubercles que condueix a la mort, va deduir que eren els bacils alfa els responsables de la primera fase. El desenvolupament de la segona fase tuberculínica ocrerria quan l'equilibri entre l'hostatger i les bactèries es trenqués, els bacils alfa convertint-se en bacils de Koch i

per tant virulents. A partir d'aquesta assumpció, també se li va acudir de fabricar un sèrum anti-alfa de cavall, havent hiperimmunitzat prèviament els animals amb cultius d'aquestes bactèries. Així doncs Ferrán, l'any 1897 va proposar vacunar els humans amb aquests bacils atenuats; la vacuna anti-alfa. D'aquesta manera, el subjecte vacunat podia encarar i prevenir el desenvolupament de la fase de formació de tubercles. Aquesta vacuna, anomenada vacuna anti-alfa o antifímica, es va arribar a inocular a moltíssims hospicis d'Espanya i d'Argentina, tenint èxit sobretot en formes locals, eminentment ganglionars [58, 59]. Evidentment també va aixecar molts recels, tant per l'origen conceptual de la vacuna com pel fet d'inocular-se a una població tan gran independentment del seu estat de salut o de malaltia, passant per la incredulitat davant del que Calmette va anomenar "transformisme de les bactèries alfa en bacils de Koch" [8]. La realitat és que en ser administrada tan abastament però no en assajos clínics reglats ni documentats, en principi no es té notícia de cap efecte advers greu però tampoc es coneix amb fiabilitat la seva eficàcia protectora.

René Dubos: del concepte interacció hostatger-patògen a la recerca dels marcadors de protecció

"Think globally, act locally"
René Dubos

El senyor René Dubos fou un enginyer agrònom francès, afectat de febre reumàtica i afincat a Amèrica, que es revel·là un seriós humanista. Al llarg de la seva vida va passar d'estudiar el sòl a l'àmbit de la medicina empès per la idea de que la virulència és la capacitat d'una soca determinada d'un agent infecciós determinat en una fase de creixement determinada, de produir un estat patològic en un hostatger determinat en haver-lo infectat en unes condicions determinades; fent referència a la malaltia i a la relació hostatger-patògen [60]. La primera dona de Dubos va patir tuberculosi, el que li va permetre que els metges del sanatori on s'estava li oferíessin la possibilitat de participar en la recerca de la TB. Dubos en va estudiar pràcticament tots els aspectes, des del descobriment de nous medis que permetíessin un creixement més ràpid de la micobactèria (de 4-10 setmanes a només 7-14 dies), a la búsqueda d'un test sanguini que fos capaç de detectar malaltia activa (que va resultar no eficient), fins a l'estudi de les diferents soques de vacuna BCG i a la unificació de forces per tal d'estandaritzar-ne la seva fabricació. Contrari a la vacunació amb la vacuna de Calmette i Guérin, per ser una vacuna viva que es multiplica i per tant potencialment no segura, ell i els seus col·laboradors van treballar en el desenvolupament d'una vacuna a partir de bacils morts. Amb aquesta finalitat, van produir dues vacunes amb diferents agents per matar els bacils: amb fenol i amb metanol. La primera tenia una immunitat transitòria i escassa. La segona, obtenia resultats similars als de la BCG. El primer treball de camp a gran escala però, que va implicar el laboratori de Dubos en una epidèmia de TB que va assolir una tribu navaja a Arizona, va resultar en el fracàs d'aquesta vacuna. La intenció de vacunar els indis era usar-la com a vacuna terapèutica

(pretenint contribuir a la curació de la població afectada) i com a vacuna profilàctica (per a la prevenció dels que encara no en patien). Tanmateix, el seu ús es va veure desestimat per impossibilitats logístiques: la planta pilot de fabricació no podia engolir la feina, les necessitats implicaven cultius en massa i les reaccions al·lèrgiques entre els treballadors de la planta es succeïen [61]. Però Dubos va formular quelcom que encara es podria aplicar avui, referent a les vacunes: calen mètodes per a avaluar una resposta immune protectora (i encara no s'ha trobat un “*correlate of protection*”) i cal avaluar l'eficàcia d'una vacuna en poblacions diferents, perquè les condicions de cada individu (amb background genètic, cultural i social diferents) el fa susceptible diferent a qualsevol altre davant la TB [32, 62].

Història del tractament amb tuberculina.

**“Tuberculin is not a poison”
Pottenger [2]**

La informació que apareix en aquest apartat ha estat presentada en forma d'article a la revista *Microbes and Infection* i s'adjunta com annex (10.1).

Robert Koch i el descobriment de la tuberculina

Poc després de descobrir el bacil tuberculós, Robert Koch va començar a estudiar com la inoculació de bacils afectava als conills porquins, sans o tuberculosos. Els seus estudis el van dur a les següents observacions:

- 1) La primera infecció establia un grau d'immunitat/protecció
- 2) La inoculació de cultius morts de bacils tuberculosos a animals sans no produïa pràcticament cap reacció, mentre que en els animals infectats aconseguia un efecte sobre les lesions tuberculosos, que tendia a curar-les. Però aquest efecte podia dur a la mort dels animals, a menys de que s'usessin dosis mínimes.

El breu anunci de Koch del descobriment d'un possible remei per a la TB el 4 de juliol de 1890 a l'International Medical Congress de Berlin va desembocar en el paper “A further report on a remedy for tuberculosis”, publicat el 13 de novembre del mateix any, amb la intenció de donar explicacions, ja que, segons les pròpies paraules de Koch: “malgrat totes les precaucions, massa aspectes han arribat al públic, i d'una manera tan exagerada i distorsionada, que em sembla imperatiu, amb l'objectiu de prevenir tota impressió falsa, de donar per fi la meva posició sobre aquest tema” [63]. En aquest report, es donava una descripció de totes les reaccions observades en els individus tractats, així com unes recomanacions d'ús segons la forma i status de la malaltia. El mecanisme d'acció era absolutament desconegut, i s'explicava d'una manera molt llunyana als conceptes d'immunologia. Koch creia que si bé el remei no era bactericida, actuava sobre el teixit tuberculós, ja que havia observat la seva necrosi en els animals infectats que eren inoculats. Si el teixit tuberculós es destruïa, es podia evitar la disseminació per l'organisme i els bacils

continguts a les lesions moririen d'inanició, generant una milloria en els individus tractats. En aquells temps, en Koch era un investigador admirat per tota la comunitat científica, i la TB seguia essent un dels majors problemes del segle, pel que l'anunci va crear un excitament general evidentment exagerat, que va conduir a la peregrinació de milers de metges cap a Berlin, per a aprendre a usar la tuberculina. Koch, si bé empès per la cojuntura personal, professional i política [64-66], no va actuar tant a la lleugera com s'ha dit, ja que des d'un primer moment es va mostrar cautelòs, apuntant a les limitacions i debilitats del tractament. Al "A further report..." ja deia: "Sincerament alerte a la gent en contra l'aplicació convencional i indiscriminada del remei en tots els casos de TB" i "el punt més important d'observar en el nou tractament és la seva aplicació en els casos precoços". En una carta al mateix número de la revista, el Dr. Delépin, ja avisava dels perills de tanta emoció desmesurada: "Estic segur que per tot el que coneixem del Dr. Koch sabem que ell desitja que rebem els seus descobriments no amb escepticisme, però amb un raonable i esperit científic. Un altre curs de les coses abocarà de segur a la decepció i potser a una reacció encara menys assenyada que l'excitació present" [63].

En Koch encara va fer un altre report a l'any 1891 (A still further Report on a remedy for tuberculosis [67]) per comentar les reaccions observades per altres metges que usaven la tuberculina com a agent terapèutic, referint-se a les seves primeres recomanacions d'ús. La veritat és que el remei de'n Koch ràpidament es va guanyar moltes crítiques. Algunes eren bones, referint-se al benefici que aportaven en el tractament de TB localitzades (d'ossos, d'articulacions, de lupus) i sobretot si es combinaven amb tractament quirúrgic per a extreure el teixit tuberculós, quelcom que Koch ja havia apuntat als seus articles [68, 69]. Però la majoria eren negatives, ja que les reaccions severes s'estaven notificant a per tot, i els avantatges eren molts menys que els esperats, de manera que els riscos de seguida varen superar els possibles beneficis del tractament. El fet es que l'ús massiu i indiscriminat per a tractar tot tipus de TB i les conseqüents morts que se'n varen derivar, a més de tots els problemes econòmics implicats en la producció i distribució de la tuberculina varen conduir al descrèdit tant de la reputació de'n Koch com del seu remei [66, 70]. Durant els anys que varen seguir al 1891, l'ús de la tuberculina va ésser confinat a uns pocs recercaires (a tot Europa, però també als Estats Units, on el mateix Trudeau hi va treballar) que encara creien en el la seva capacitat per millorar la salut en alguns dels pacients si se seguien les recomanacions de'n Koch i que varen treballar en demostrar que les reaccions es podien evitar si es tenia cura a l'hora de l'administració. L'any 1891 Lichtheim ja va apuntar que el tractament amb tuberculina podia dur-se a terme sense trobar reaccions, però no va ser fins a l'any 1901 que Goetsch va publicar un article sobre l'experiència de 10 anys treballant amb la tuberculina com a agent terapèutic en un hospital rural. Ell no negava les reaccions, simplement remarcava que aquestes es podien evitar si les dosis eren apropiadament

ajustades [67]. L'ús extès de la tuberculina va contribuir a la notificació de les reaccions adverses del tractament però també a una recerca intensa per a evitar-les. Al llarg dels anys, diverses teories es van desenvolupar per explicar-les : a) ser degudes a un efecte sumatori de la toxina inoculada a la toxina ja present a l'organisme infectat; b) la "teoria diferencial" que creia en l'existència de substàncies antitoxina que equilibraven la malaltia, considerant que la inoculació de la tuberculina desequilibrava el sistema; c) l'existència d'una lisina específica al cos capaç de trencar la tuberculina en petites fraccions tòxiques (teoria de Wolff-Eisner); d) Von Pirquet que les creia degudes a anticossos contra tuberculina (al·lèrgia vacunal); i e) Hipersensibilitat.

Les reaccions eren de 3 tipus: locals, generals i focals. Les reaccions locals (bàsicament envermelliment, dolor i inflamació al punt d'inoculació) eren bastant ben tolerades. Les generals eren de caire inespecífic: febre, mal de cap, malestar i pèrdua de la gana. Les hemoptisis, els dolors pleurítics, l'augment de la tos i la inflamació dels ganglis infectats es consideraven reaccions focals dels llocs d'infecció. Aquestes eren les més temudes, però també les més esperades, ja que el que es volia era provocar reaccions als llocs d'infecció. Però ja que no hi havia manera possible de conèixer els efectes provocats, calia basar-se en l'estat general del pacient, examinat amb cura per determinar si la dosi usada era la correcta, les dosis següents modificades conseqüentment [2].

Preparació de noves tuberculines

El primer intent d'evitar les reaccions fou generar un nou producte. L'anomenada *old tuberculin de Koch*, estava basada en cultius de *M.tuberculosis* crescut en brous amb un 5% de glicerina, esterilitzats, evaporats i filtrats i després d'haver-hi afegit un 0,5% de fenol, filtrats de nou. El mateix Koch va fer noves versions d'aquesta primera tuberculina: la *New Tuberculin*, en que els cultius es matxacaven i es mesclaven amb glicerina per a obtenir les parts insolubles dels cossos bacil·lars (1897) i *l'emulsió de Koch* (1901), pols de bacils resuspensa en una mescla amb glicerina i aigua destil·lada (1:1). Altres tuberculines es varen dissenyar: tuberculines crescudes en medis sense albumosa i la *Tuberculina de Beraneck*, una mescla de cultius filtrats de *M.tuberculosis* crescut en medis sense albumosa més un extracte de cossos bacil·lars en un 1% d'àcid fosfòric [71]. Un dels principals problemes d'aquests productes n'era la preparació, ja que requerien dilucions i aquestes sovint les duïen a terme els mateixos metges abans de la seva administració. El productor de la *tuberculina de Beraneck* va aconseguir millorar aquest fet, ja que es brindava a subministrar les dilucions ja preparades, el que assegurava una millor uniformitat de la preparació [2]. De fet, altres tuberculines apareixien a per tot el món: *la modificació B de von Hunter*, *l'extracte aquòs de Ruck*, *la Behring TC*, i pla més [72]. Però el fet es que les reaccions eren les mateixes independentment de la tuberculina que es fes servir, l'únic que variava era la seva

intensitat, provant que el principi actiu de totes elles era el mateix: les proteïnes dels bacils tuberculosos [2, 68].

Els primers mètodes per a la seva administració

“The best rule to follow: better too little than too much tuberculin!” Salhi [1]

L'altra aproximació que es va fer per a millorar el tractament fou el perfeccionament del mètode d'inoculació, ja que tots els esforços es van concentrar en establir un mètode segur d'administració. Ja que el mecanisme d'acció era absolutament desconegut, es van poder diferenciar dues escoles de terapeutes: els qui creien que la tuberculina generava una immunització real (fet que únicament es podia aconseguir mitjançant dosis altes) i aquells qui creien en una acció curativa mitjançant la immunitat, ço és que la tuberculina feia un *boosting* de la immunitat

prèviament existent, i per tant aconseguible mitjançant dosis petites (ja que dosis majors podien generar dany tissular i l'efecte de l'estímul no sempre és proporcional a la intensitat de l'estímul [1, 67]). Koch va observar que per a aconseguir els efectes que ell volia en els focus tuberculosos li calien dosis altes, encara que aquestes comportessin reaccions. I és que després

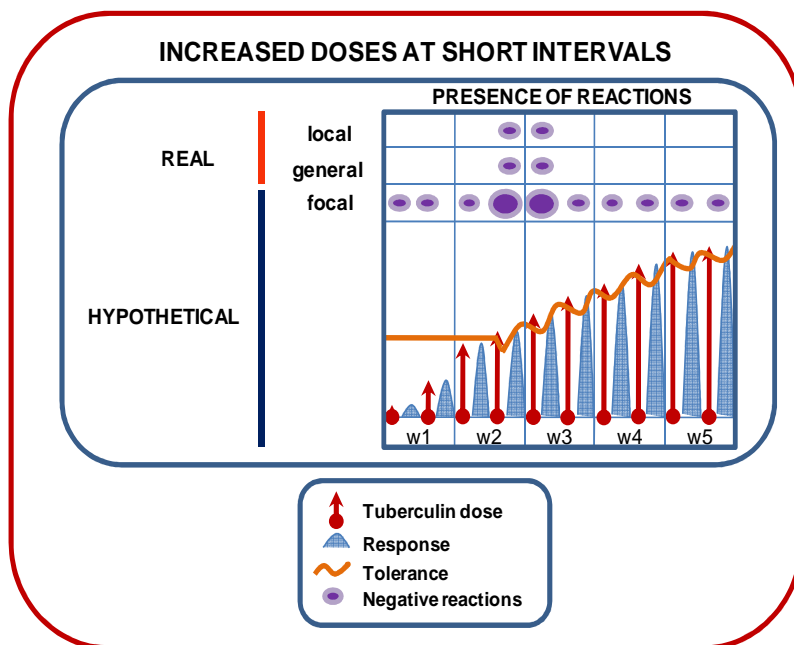


FIG. 7. Mètode d'inoculació basat en dosis de tuberculina incrementades a intervals curts

d'una inoculació seguia una reacció que a la vegada venia seguida per tolerància, i calia una següent dosi major per a superar la tolerància obtinguda. Aquest primer intent de dosatge consistia en petites dosis incrementades a intervals curts i va ser desenvolupat per Ehrlich i els seus col·laboradors a l'any 1891 (figura 7). En Goetsch al 1901 va introduir un nou mètode, que per a evitar reaccions implicava una durada llarguíssima del tractament, i més tard Petrushky pretenia interrupcions al tractament per als casos lleus. Però no va ser sinó Wright qui va ser capaç d'introduir un mètode totalment nou de dosatge, implicant petites dosis a intervals espaiats per a superar el que ell va anomenar les "Fases negatives"[73].

Sir A.E. Wright i el nou mètode d'inoculació basat en dosis repetides a llargs intervals

L'any 1896, Wright, basant-se en l'observació de l'aglutinació de bacils tifoïdeus quan estaven en contacte amb el sèrum d'algú infectat però no amb el sèrum d'algú sa, va considerar aquesta un procés

protector i va decidir d'usar-lo per a distingir la febre tifoïda de la de Malta. Ja feia més de 200 anys que es coneixia que els humans són capaços de generar resistència a les infeccions, quelcom que ja va ser usat com a mètode preventiu per Jenner i Pasteur entre d'altres. Però Wright temia que l'ús de bacteris vius amb aquesta finalitat pogués provocar malaltia aguda, i va advocar per a l'ús de bacteris morts ja que segons ell haurien de generar

igualment immunitat o el que ell anomenava substàncies protectores

de la sang; igualment inspirat pel Dr. Jaume Ferrán, qui ja va preconitzar aquest mètode després del seu èxit amb la vacuna contra el còlera. Així va desenvolupar la vacuna tifoïda per a prevenir la febre tifoïda, i va demostrar en els vacunats un augment d'aglutinines similar al que es podia trobar en aquells qui havien passat un episodi de la malaltia. La idea de la vacunació terapèutica li va sorgir en pensar que ja que les vacunes generaven substàncies protectores, en individus ja infectats podien ajudar igualment a incrementar les substàncies protectores ja presents, ajudant a curar la malaltia. Les vacunes podien servir doncs no solament per a prevenir, sinó també per a curar. A l'any 1902, va observar que els nivells d'aglutinines estaven disminuïts en els afectats d'infeccions estafilocòcciques, però que s'incrementaven si l'individu es tractava amb cultius morts de les bacteris. Però les vacunacions terapèutiques també el van dur a l'observació del que ell va anomenar la Fase Negativa. Quan s'inoculava una vacuna a un individu ja infectat, es podia veure com empitjorava [74]. En Wright creia que la causa d'això era que la vacuna exhauria les substàncies protectores presents de l'organisme, augmentant temporalment la seva vulnerabilitat. Un cop passada, una Fase Positiva ocorria, quan les substàncies protectores augmentaven per a tornar a baixar i tanmateix deixar uns certs nivells residuals [75]. Ell també va atribuir la intensitat de les dues fases a un problema de dosis, i va establir una base general per a tractar infeccions localitzades amb la vacunació amb vacunes

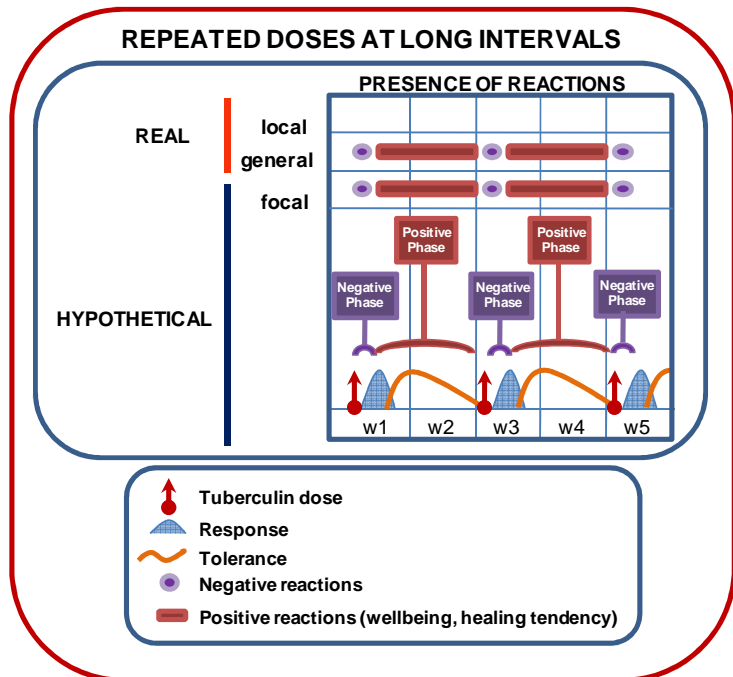


FIG. 8. Mètode d'inoculació basat en dosis de tuberculina repetides a intervals llargs

bacterianes. Si la dosi era massa baixa, la Fase Negativa disminuïa, però podia passar que la Fase Positiva no aparegués; si en canvi era massa alta, la Fase Negativa esdevenia massa llarga i la Fase Positiva podia aparèixer o bé massa tard o no aparèixer [4]. A més, en dos dels casos tractats per ell, va observar una inflamació al lloc d'inoculació que li va recordar les reaccions que es descrivien després de la injecció de la tuberculina de Koch. La seva explicació per a això fou que en inocular la vacuna, el granuloma on les bacteries s'estaven es trencava i aquestes eren espargides a través de la limfa, podent generar nous focus d'infecció si el pacient estava en una fase negativa per culpa d'una dosificació mal regulada. Així, l'objectiu per a evitar la reacció de Koch era saber quan i en quina dosi repetir la tuberculina, ja que ell creia que les reaccions es donaven per una acumulació de Fases Negatives, quan l'objectiu era aconseguir successives Fases Positives per tal d'incrementar la Immunitat. Amb aquesta finalitat va establir un nou mètode de dosificació basat en la inoculació de dosis repetides a llargs intervals (figura 8). Però l'única manera d'estimar l'efecte en un individu inoculat seguia essent la supervisió acurada del seu estat general, pel que Wright va decidir desenvolupar un mètode que pogués mesurar les substàncies protectores de la sang que correlacionessin amb l'efecte real de la vacunació, abans que apareguessin els símptomes de la intoxicació.

El primer intent de trobar un “*correlate of protection*”

L'any 1884, Metchnikoff, seguint els estudis de Pfeiffer, va descriure la capacitat dels leucòcits per fagocitar, considerant aquesta habilitat com la manera més eficient de destruir bacteris. Leishman va desenvolupar a l'any 1902 un mètode simple numèric per a mesurar la fagocitosis. Els observadors que varen seguir aquests estudis, entre ells Wright, van considerar l'existència d'un element incitador al sèrum immune capaç de generar una acció opsonitzadora sobre els bacteris, preparant-les per a la fagocitosis, i en van estudiar la natura [76]. A partir de tots aquests estudis i amb l'ajuda del seu col·laborador, el capità Douglas, Wright va modificar el mètode de Leishman per a avaluar la presència de substàncies protectores a la sang, en un primer intent seriós de factor correlador de l'efecte protector generat per una vacuna. Aquest mètode implicava posar en contacte parts iguals de sèrum, leucòcits prèviament aïllats i un número conegut de bacils, i es duia a terme en paral·lel amb sang d'un pacient i la d'un individu sa que exercia de control, ja que el que s'obtenia era un ratio que ells varen anomenar l'Opsonic Index (OI) [77].

En TB, el primer intent d'estudi de les substàncies tubèculo-tròpiques (segons la nomenclatura d'Ehrlich) el va fer en Koch, amb la intenció de demostrar la presència d'aglutinines en el sèrum dels pacients tuberculosos. En Wright va començar calculant l'OI dels pacients que inoculava amb la vacuna estafilocòccica al St. Mary's Hospital de Londres [78], en un intent de preveure millor les fases negativa i positiva, i després es va decidir a

aplicar-lo als pacients tuberculosos. L'OI en teoria era capaç de distingir entre els pacients tuberculosos de la gent sana i de detectar les fases negatives i positives amb anticipació. Disminuït en els pacients tuberculosos, l'OI també semblava augmentar quan la resposta al tractament amb tuberculina era bona [79, 80]. El mètode va ser ràpidament utilitzat de manera ampla, amb resultats variables [72, 81-84]. Ja a l'any 1910 les crítiques n'acusaven la inespecificitat i l'exagerada subjectivitat. Clive Rivière, que l'usava de forma sistemàtica, va reconèixer que el marge d'error podia arribar a un 20%, i en Wright mateix a l'any 1912 va dir que la vacunació es podia dur a terme de manera segura sense la necessitat d'usarlo [75, 85]. El miratge d'haver trobat un "correlate of protection" s'esvaïa i segueix representant un trencaclosques per als investigadors de TB, però va dur a Wright la idea de l'Autoinoculació.

L'autoinoculació

Wright va observar que el tractament amb tuberculina de vegades produïa variacions en l'OI que li recordaven les variacions que es donaven en alguns casos tuberculosos que cursaven amb febre. Aquesta observació el va empènyer a formular la hipòtesi de que potser es devia a que la infecció implicava un escapament contínuament periòdic de bacils o toxines bacil·lars al torrent sanguini, el que causaria els episodis simptomàtics [76]. Els contemporanis varen adoptar i estudiar aquesta idea. Les primeres evidències d'autoinoculació les va aportar Freeman, que va demostrar com el massatge d'una articulació malalta provocava simptomatologia, així com per altres, relacionant-la a l'exercici, les operacions i l'hiperèmia induïda. L'autoinoculació es va incloure en estratègies diagnòstiques i terapèutiques. Des de l'any 1843 se sabia que l'exercici extenuant podia provocar febre en gent sana, i als tuberculosos se'ls va suposar més sensibles a aquest mètode, ja que segons la teoria de l'autoinoculació les toxines podrien sortir del focus tuberculós i anar a parar a la sang. Penzoldt va decidir fer servir l'exercici per a diagnosticar casos primerencs de ptisis sense febre, i per a establir l'activitat de TB ja diagnosticades. Més endavant, Patterson i Inman van fer servir la idea terapèuticament, combinant l'exercici amb el repòs, quelcom que va esdevenir extès a molts dels sanatoris anglesos [75, 85, 86]. El repòs era una pràctica habitual del continent europeu des de Dettweiler. D'acord amb Canetti, el repòs disminuïa la freqüència de moviments respiratoris, disminuint el trauma respiratori al que estaven subjectes les lesions; reduïa la circulació pulmonar privant les lesions dels factors que inicien el seu estovament; promovia l'estasis circulatori conduint a esclerosis i tenia un efecte inhibitori en noves col·lonitzacions bacil·lars. Aquesta era doncs la base de la col·lapseteràpia (molt en ús, aleshores): incrementar l'efecte del repòs deixant que les regions pulmonars sanes es distinguessin en comptes de les lesionades, disminuint encara més el trauma i afavorint la curació del parènquima danyat [5]. Pottenger també

estava d'acord amb els mètodes que produïen relaxació o compressió del teixit pulmonar afectat, per les mateixes raons. Els efectes positius del repòs s'atribuïen al repòs del cos però també específicament al del pulmó. Amb els mètodes focalitzats en alliberar el pulmó dels moviments respiratoris, les autoinoculacions disminuïen i els teixits, en contreure's, podien curar-se millor; i en disminuir el torrent sanguini a les àrees infectades, la reacció inflamatòria es podia controlar millor i els símptomes es reduïen [87].

Però de repent es va passar a creure en que la capacitat del cos de resistir les infeccions cròniques depenia d'un equilibri amb elles. Una petita quantitat d'antigen seria constantment necessària per a mantenir la resposta immune, però un excés podria sobrepassar aquesta resposta de manera fatal. El repòs esdevenia necessari en l'inici del tractament de la malaltia, abans que res per a controlar l'autoinoculació i restablir l'equilibri, però un cop restablert, calia recuperar cert grau d'autoinoculació, d'una banda per a desenvolupar tolerància enfront l'autotuberculina i per l'altra per tal de mantenir la resposta immune activada. L'exercici podia aportar aquesta font d'antígens des del propi focus infecció, però aquests també es podien aportar externament mitjançant la tuberculina [88].

Tot continuant fent servir la tuberculina

Malgrat el sobtat descrèdit de la tuberculina de seguida a l'inici del seu descobriment, la teràpia amb tuberculina va continuar, i fins i tot va revifar després de la contribució de'n Wright. El cas és que independentment de l'existència de les reaccions que poguessin aparèixer, un munt de metges varen obtenir bons resultats amb una seguretat acceptable. Els mètodes d'administració ràpidament van derivar a 2 (amb variacions, és clar). Ja que seguidament després d'una injecció sobrevenia un grau de tolerància, només es podien fer dues coses: o augmentar la dosi per a sobrepassar la tolerància, o esperar que la tolerància passés. El primer mètode implicava dosis creixents a intervals petits, i es pot relacionar amb la idea inicial de Koch (figura 5). Es va fer servir àmpliament a tot el continent europeu i a Amèrica (i era el que es feia servir a Barcelona) i semblava el mètode més adequat per al tractament de les formes ptísiques. El segon mètode, desenvolupat per Wright, tenia com a objectiu evitar la tolerància i implicava petites dosis constants administrades a llargs intervals, i semblava actuar millor en els casos de TB localitzades (figura 6) [71]. Independentment del mètode usat, els metges feien servir taules de dosificació que els ajudaven a variar les dosis, i desenvoluparen l'habilitat necessària per a administrar empíricament el tractament sense tenir alarmants números de resultats fatals. Existeixen suficients informes per a no dubtar de l'èxit del tractament [1, 67, 71, 81, 89], que en alguns casos seleccionats en contactes de tuberculosos coneguts es va arribar a usar com a vacuna post-exposició [71]. És clar que l'èxit del tractament depenia de l'experiència del metge. No s'administrava a tothom, i es feia sempre en companyia de repòs, aire fresc,

millora de la nutrició, i altres mesures higièniques típiques d'aquell temps. Les estadístiques ensenyen quant abastament utilitzada fou la tuberculina. A l'any 1912 existien a Anglaterra més de 200 institucions que la usaven, i a Alemanya, els sanatoris que la feien servir varen passar de 29% a més d'un 70% en dos anys (1910 al 1912) [71]. Però la TB seguia essent un problema que majoritàriament afectava als pobres, que no podien atendre els sanatoris, bàsicament pel preu. Tot i que a Anglaterra tant l'efecte que tenia la malaltia sobre l'economia del país com el desig d'aïllar les fonts infeccioses van empènyer a la construcció de sanatoris que es fonamentaven en la caritat, els pobres seguien sense anar-hi senzillament perquè no es podien permetre el luxe de perdre la feina. A l'any 1887 sir Robert Philip va obrir el primer dispensari a Edimburg, el *Victoria Dispensary for Consumption and Diseases of the Chest*, i aviat varen aparèixer a tot el món. De l'any 1914 al 1917 de 4 varen augmentar a 371 a Anglaterra; i a l'any 1912 n'existien fins a 600 a Alemanya i 450 a Amèrica [86]. Els dispensaris van esdevenir importants perquè podien assegurar l'administració terapèutica de la tuberculina permetent que els individus poguessin seguir treballant, tal com explicava Camac Wilkinson, que els visitava al seu Dispensari per a pobres de la Kennington Road de Londres. Als dispensaris també es feia *screening* i seguiment de contactes, i el *follow-up* dels pacients fora dels hospitals i sanatoris, ensenyant-los les mesures higièniques bàsiques necessàries per a millorar el seu estat de salut. Ja que es registraven tots els casos, a més representen una font importantíssima de dades d'un valor epidemiològic indubtable. La tuberculina era un remei barat, el seu preu variava entre 6,5 *pences* i 8 *shillings* (abans de l'any 1971, una lliura sterlina estava dividida en 20 *shillings*, i cada *shilling* en 12 *pences*). Però els dispensaris tenien un altre avantatge: el tractament amb tuberculina hi costava 2£/cas, mentres que al sanatori costava 32£ essent l'únic valor tècnic afegit la supervisió mèdica constant [81].

En Wilkinson va fundar amb alguns col·legues la *Tuberculin Dispensary League* i va demanar fons a la *Medical Research Council* (MRC) per a seguir investigant amb la tuberculina. Però totes les seves propostes varen ser denegades, suposadament perquè la MRC tenia el seu propi candidat de tuberculina millorada, malgrat que a l'any 1924 es varen veure obligats a admetre que no obtenia millors resultats que qualsevol altra de les tuberculines [86].

El tractament amb tuberculina es va continuar usant pràcticament a per tot fins l'aparició de la quimioteràpia, en que es va abandonar per l'eficàcia variable que tenia i que depenia de les habilitats de l'administrador i la perillositat dels efectes secundaris. La revisió dels documents antics permet adonar-se amb objectivitat que el seu ús durant pràcticament 50 anys amb resultats força encoratjadors fan pensar que la vacunació terapèutica funcionava, i que per tant és possible. És cert que encara no s'ha trobat un factor que correlacioni amb l'efecte d'una vacuna en la TB, ja que els esforços de la comunitat científica segueix

treballant en el tema. La teoria de l'autoinoculació ensenya que no sempre s'ha pensat en els granulomes com uns organismes estancs, i no està tan lluny de la "Hipòtesi Dinàmica" proclamada pel nostre grup [90]. Però crec personalment que l'error més gran fou abandonar el tractament amb tuberculines per la quimioteràpia, ja que tal com Wright va apuntar, per a enfocar la TB s'hauria de 1) augmentar la quantitat de substàncies protectores de la sang per a frenar la disseminació dels bacils i 2) inhibir el creixement bacil·lar al nidus local de la infecció [91]. Tot plegat aboca a pensar que potser s'hauria de reinterpretar aquestes paraules i sumar esforços: si el tractament quimioteràpic curt podria reduir ostensiblement la càrrega bacil·lar, la vacunació terapèutica posterior podria ajudar a fer el *boosting* necessari de la immunitat prèviament adquirida per a acabar de curar la infecció.

1.3 DESENVOLUPAMENT ACTUAL DE NOVES VACUNES

El control de la TB doncs, avui en dia es basa en el diagnòstic de la infecció/malaltia, en la prevenció de la mateixa (mitjançant la BCG,

"The physician of the future will, I foresee, take upon himself the rôle of an immunizator". A.E.Wright [4]

desenvolupada al 1921) i en el seu tractament amb fàrmacs (el descobriment dels quals es remonta a mitjans del segle passat). Però d'una banda la BCG si bé dóna bons resultats en nens no preveu la malaltia en els adults, i de l'altra están augmentant les incidències de les tuberculosi MDR i de les altament multiresistents (XDR) [92].

Tot plegat esperona la lluita per al descobriment d'una vacuna que permetés abordar la malaltia d'una manera millor, amb la finalitat de 1) prevenir la infecció, 2) prevenir la malaltia primària, 3) prevenir la infecció latent, 4) prevenir la reactivació de la infecció latent o 5) escurçar el curs i millorar la resposta a la quimioteràpia. Les vacunes actualment en desenvolupament clínic es poden dividir en 3 grans grups (tot i que algunes caurien en més d'una de les categories) [93]:

- **Priming**: candidats a vacuna que servirien per a "*prime*" en un règim de *prime-boost*, és a dir que generarien una resposta immune suficient i que tindrien com a objectiu prevenir la TB. Substituirien la BCG, i en aquest grup encaixen les BCG recombinants millorades (rBCG30ΔureC:Hly (VPM1002), rBCG-30)
- **Boosting**: candidats que servirien per a *boostejar* la resposta immune adquirida en un règim de *prime-boost*, també tenint com a objectiu prevenir la TB. Es tractaria en la major part dels casos de mantenir la vacunació amb BCG i d'incrementar-ne la resposta amb una vacuna de nova generació (*M.vaccae* inactivat (MV), MVA85A, SSI Hybrid-1, SSI Hyvac 4/AERAS 404, Mtb72F)
- **Immunoteràpia**: serien aquells candidats a vacuna que s'administrarien als individus exposats a *M.tuberculosis* per a prevenir la reactivació o la progressió a malaltia

activa i/o per a escurçar o millorar la resposta a la quimioteràpia. La vacuna RUTI®, juntament amb la MV, serien les úniques a dia d'avui que es trobarien pròpiament en aquest grup.

Les vacunes antituberculosos que a mes d'agost de 2009 estan en desenvolupament clínic es detallen a continuació:

rBCG30

BCG recombinant que superexpressa l'antigen 85B de *M.tuberculosis* (de 30kDa, d'aquí el seu nom), aquesta fou la primera BCG recombinant que va demostrar induir en models animals una protecció major que la BCG original. Desenvolupada al laboratori de Marcus Horwitz a la University of California, Los Angeles (UCLA) la seva població objectiu serien els nou nats, en un intent de substituir la vacunació amb BCG. Després de ser assajada en models animals, la vacuna va ser testada en un assaig clínic (CT per *Clinical Trial*) de Fase 1 als Estat Units amb la col·laboració d'AERAS Global TB Foundation, demostrant una seguretat acceptable. En quant a la immunogenicitat, l'avaluació es va centrar en les respostes enfront pèptids de l'antigen 85 (no a PPD) i es van avaluar mitjançant ELISPOT, Citometria de Flux i assajos limfoproliferatius, demostrant-ne la superioritat quan comparats amb els placebo-vacunats [94]. El seu desenvolupament clínic des de llavors, i malgrat l'èxit dels resultats de l'assaig de Fase 1, sembla aturat.

rBCG30 Δ ureC:Hly (VPM1002)

Candidat a vacuna profilàctica de l'empresa Vakzine Projekt Management GmbH en col·laboració amb el Max Planck de Berlin, basada en una soca viva recombinant de *M. bovis* BCG (rBCG Δ ureC-Hly) productora de lysteriolysin ureasa-C-deficient per a millorar-ne la presentació antigènica, i a la que se li suposa que indueix una resposta T-CD8[95]. És un candidat a vacuna per a la prevenció de TB en individus residents àrees endèmiques i persones de risc a les àrees no endèmiques. Les dades d'experimentació animal en ratolins del desenvolupament preclínic en va demostrar més eficàcia i seguretat que la BCG. Actualment es troba en CT de tipus Fase 1 a Alemanya, amb la finalitat d'avaluar-ne la seguretat i la immunogenicitat de 3 dosis *versus* (vs) la BCG. Aquest estudi, inicialitzat al setembre de l'any 2008 s'estima que finalitzarà aproximadament a finals del 2009 [96].

Ja que l'efecte més important que se li ha descrit ha estat sobre les cèl·lules CD8, actualment també s'està desenvolupant com a adjuvant per a promoure la generació de cèl·lules citotòxiques tipus CD8+ antigen-específiques en vacunes terapèutiques pel càncer [97].

M.vaccae inactivated (MV)

Vacuna investigacional preparada a partir d'una micobactèria ambiental (*M.vaccae*) que comparteix nombrosos antígens amb *M.tuberculosis* i inactivada per calor. Existeixen dades epidemiològiques i experimentals que indiquen que les micobactèries atípiques o no-tuberculosos (NTM per *Non-tuberculous mycobacteria*) podrien donar una protecció creuada contra TB. A partir d'aquesta idea va néixer la teoria de que la vacunació amb *M.vaccae* podria generar una immunització contra la TB. Donat que la vacunació amb BCG no és segura en individus amb infecció coneguda per HIV i especialment amb SIDA degut que existeix risc de malaltia disseminada, la MV, per ser a partir de *M.vaccae* (amb baixa patogeneïtat per als humans) però també per ser inactivada per calor es perfilaria com una vacuna segura en aquesta població, que esdevindria la població diana de la vacunació profilàctica.

En els experiments animals durant el seu desenvolupament preclínic, MV va demostrar una protecció contra la infecció amb *M.tuberculosis* en induir cèl·lules T citotòxiques tipus CD8 i en augmentar la producció d'IFN- γ i IL-12 en macròfags infectats i limfòcits T. La immunogenicitat tanmateix no era suficient amb una sola dosi, i la protecció contra *M.tuberculosis* es va veure incrementada en animals que havien rebut BCG prèviament, respecte els qui només havien rebut BCG. Aquestes dades van encaminar l'ús de la MV com a vacuna *boosting* en individus HIV positius. Els estudis de Fase 1 i 2 en van demostrar la seguretat així com la immunogenicitat contra els antígens micobacterians de diferents règims d'administració de la mateixa vacuna en individus HIV-negatius i HIV-infectats en països amb diferent incidència de *M.tuberculosis*. Altres estudis també en recolzaven la capacitat d'augmentar la taxa de curació de les TB quan s'associava com a adjuvant al tractament quimioteràpic [98-101]. La vacuna a dia d'avui ha estat essent assajada en un estudi tipus Fase 2-3 a Tanzània. Aquest estudi (estudi DarDar) que es va començar a l'any 2001 i s'ha extès durant 9 anys tenia com a objectiu avaluar la seguretat i l'eficàcia de 5 dosis de la vacuna en prevenir TB disseminada en individus HIV+ prèviament vacunats amb BCG i en que s'ha administrat INH durant 6 mesos [93, 96]. Els resultats preliminars es van presentar al World Lung Health a Paris l'octubre del 2008 i varen mostrar una reducció del 37% en la taxa de cultius positius per *M.tuberculosis* en els individus vacunats, suggerint que les vacunacions podrien ser útils en el tractament de la malaltia [102].

MVA85A

Al Centre for Clinical Vaccinology and Tropical Medicine de la Universitat d'Oxford es va desenvolupar el primer candidat subunitat a vacuna, l'MVA85A, una soca viva però tan atenuada que és no-replicant de virus (virus Ankara) i que expressa l'antigen 85A de *M.tuberculosis*. El virus Ankara modificat ja s'ha fet servir com a vacuna contra la verola i es

considera un vector vacunal segur, capaç d'induir en humans un *boosting* de cèl·lules T CD4+ i CD8+. La MVA85A és una vacuna de *boosting*, dissenyada amb la finalitat d'ampliar la resposta T-cel·lular preexistent i actualment és una de les vacunes de nova generació més avançada en el seu desenvolupament clínic. Després de l'experimentació animal, l'any 2002 es va començar el desenvolupament clínic amb assajos de petit abast de tipus Fase 1 per a determinar-ne la seguretat i la immunogenicitat en individus BCG-naïve, BCG-vacunats i infectats per *M.tuberculosis*. La MVA85A va resultar segura en tots els casos. Immunogènica en sans, encara ho resultava més en individus prèviament vacunats amb BCG. Com a resultat de l'èxit dels assajos a Anglaterra, l'any 2003 es varen començar els estudis a Gàmbia, i posteriorment a altres punts d'Àfrica. L'objectiu es centra en avaluar la vacuna com a part d'un règim que inclouria la BCG seguida de MVA85A, usant diferents intervals entre les dues; en molts dels assajos incloent la BCG i la MVA85A soles, per tal d'aportar més dades sobre les respostes induïdes. El fet d'avaluar la vacuna en diferents poblacions (Àfricanes i europees) aporta més fiabilitat al desenvolupament clínic, ja que és sabut que diferents *backgrounds* donen respostes diferents a la infecció per *M.tuberculosis*. L'avaluació de la immunogenicitat de la vacuna s'ha centrat bàsicament en l'assaig ex vivo d'IFN- γ mitjançant ELISPOT, en un intent de buscar cèl·lules específicament secretores d'IFN- γ en resposta a PPD i a pèptids de la vacuna. Des de l'any 2005, la vacuna va entrar en avaluació mitjançant assajos de Fase 1, a Gàmbia i a Sud-Àfrica. En un resum dels resultats de tots els estudis conduïts entre 2002 fins a abril del 2008 i un cop administrada a 258 persones, les conclusions que es poden extreure són que la vacuna augmenta els nivells d'IFN- γ específicament secretat contra pèptids de l'antigen 85 i de cèl·lules polifuncionals. La resposta augmenta en individus sans vacunats però disminueix, i en canvi en individus prèviament vacunats amb BCG augmenta per a mantenir-se alta fins a 24 setmanes després. En quant a la seva seguretat, és ben tolerada i no dona efectes adversos (EA) seriosos en cap de les poblacions estudiades, si bé en més del 90% dels casos existeixen EA locals moderats i que els EA sistèmics moderats arriben a ocórrer fins a un 30%[103, 104]. Està planejat que als anys 2011-12 es tinguin els primers resultats de l'estudi de *proof-of-concept* tipus Fase 2 d'eficàcia que es duu a terme en infants a la Sud-Àfrica en col·laboració amb la South African TB Vaccine Initiative (SATVI) i l'AERAS Global TB Foundation, i que va començar a l'abril del 2009 [95, 105-113].

SSI Hybrid-1 (85B-ESAT6)

Vacuna desenvolupada per l'Statens Serum Institut (SSI) de Dinamarca, aquest candidat comprèn dos antigens immunodominants: l'Ag85B i l'ESAT-6. L'Hybrid 1 ha provat la seva immunogenicitat en totes les espècies animals en que ha sigut testada experimentalment (ratolins, conills porquins, vedells i macacs) i sembla prolongar la supervivència després de

la infecció quan usada en règims de *boosting* de la BCG. La vacuna va entrar en desenvolupament clínic a l'any 2006 i a dia d'avui porta acabats assajos de Fase 1 a Europa i a Etiòpia. L'últim estudi conduït amb l'Hybrid 1 es va fer fa relativament poc temps. Després de provar-ne diverses rutes d'administració en models animals (oral, nasal i per injecció subcutània) es va plantejar avaluar-ne la seguretat en ser administrada via intranasal en un assaig de Fase 1 en humans. Aquest estudi va començar a finals de l'any 2007 i es va haver d'interrompre per motius de seguretat que no han estat revelats [114].

SSI Hyvac 4/ AERAS-404

Aquest és l'altre candidat a vacuna produït per l'SSI, combinat amb un adjuvant d'Intercell i en desenvolupament clínic amb la col·laboració d'AERAS Global TB Foundation i Sanofi Pasteur. Proteïna de fusió de 85B amb TB10.4 combinada amb l'adjuvant IC31, aquest candidat també serviria com a *boosting* en un règim de BCG *prime-boost* i tindria l'avantatge de no incloure ESAT-6 i per tant no interferint en els mètodes diagnòstics que es basen en les respostes a aquest antigen. En assajos en ratolins i conills porquins han demostrat l'augment de cèl·lules polifuncionals IFN- γ /TNF- α /IL-2 que correlaciona amb protecció quan s'infecta els animals en un segon temps (després de la vacunació), tot i que la resposta aconseguida és depenent i d'una manera molt sensible de la dosi de vacuna administrada [115]. El desenvolupament clínic ha començat recentment en forma d'assajos de Fase 1 que s'han de dur a terme a Finlàndia, Suècia i Sud-Àfrica.

Mtb72F/Mt72

Candidat a vacuna de l'empresa GlaxoSmithKline (GSK). El candidat Mtb72 està format a partir de la fusió de 2 proteïnes (Mtb32A i Mtb39A) que tenen com a característiques estar específicament expressades tant a *M.tuberculosis* com a BCG i que activen específicament les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC per Peripheral Blood Mononuclear Cells) dels donants PPD+. Els objectius marcats per GSK per les seves vacunes antituberculosos són prevenir la TB primària, protegir enfront la malaltia induïda per la reactivació de la ITBL i *boostejar* la immunitat preexistent induïda per BCG i/o *M.tuberculosis* [116]. Amb aquests objectius, la Mtb72F s'ha provat en diferents règims i adjuvants amb èxit en diversos models experimentals animals (ratolins, conills porquins, conills i macacs), demostrant-ne la generació de protecció i la seguretat [117-119]. La vacuna va entrar en desenvolupament clínic a l'any 2005 i des de llavors s'han acabat en total 3 assajos clínics per a avaluar-ne la seva seguretat i immunogenicitat: una Fase 1 en individus PPD- a Bèlgica, una Fase 1-2 en PPD+ a Suïssa i una Fase 1-2 en PPD- a Bèlgica (també per a comparar el sistema d'adjuvant que permetria l'evolució de Mtb72F a M72, la que inclouria un adjuvant d'última generació de GSK). D'aquests tres estudis només un s'ha publicat, la

Fase 1 en que s'avaluaven 3 dosis de la Mtb72F amb AS02A com a adjuvant i que aconseguia augmentar les respostes d'immunitat cel·lular de forma mantinguda demostrant una tolerabilitat acceptable [120]. De l'estudi de comparació dels sistemes d'adjuvant se'n tenen dades presentades per Leroux-Roels et al al Congrés d'Atlanta del 2008 demostrant una seguretat similar independentment del sistema adjuvant usat però una inducció de resposta M72 específica millor usant l'AS01B [116]. Un assaig de Fase 2 va començar a Sud-Àfrica al març del 2008 amb el suport d'AERAS Global TB Foundation i la SATVI per a avaluar la vacuna de GSK en 45 adults sans prèviament vacunats amb BCG [121].

AERAS-402/Crucell Ad35

Vacuna esponsoritzada per AERAS Global TB Foundation que inclou un adenovirus deficient en replicació com a sistema de vehiculització dels antígens de *M.tuberculosis* 85A, 85B i TB10.4. Com en el cas de la MVA85A, aquesta vacuna intenta treure avantatge de la capacitat de les vacunes vectoritzades per adenovirus d'induir alts nivells de resposta tipus T CD8+. Un primer assaig de Fase 1 es va començar a l'octubre de 2006 als EUA demostrant la seguretat del candidat en adults sans americans. Els resultats del segon estudi, realitzat a Sud-Àfrica, van demostrar un increment de les respostes cel·lulars tipus T CD4 i CD8. Un tercer estudi de Fase 1 es va començar a finals del 2007 per a demostrar la seguretat i immunogenicitat de la vacuna quan administrada com a *boosting* de BCG en adults sans, i encara es va conduir un quart estudi a Kenia amb la mateixa finalitat. A la roda de premsa donada per la companyia biofarmacèutica Crucell NV i AERAS Global TB Foundation a la 39th Union World Conference on Tuberculosis and Lung Disease a Paris (França) l'octubre de 2008 es va anunciar el començament d'un assaig tipus Fase 2 en adults exposats també es duria a terme a Sud-Àfrica [121] en col·laboració amb SATVI, en que el candidat a vacuna es provaria en 82 adults infectats amb TB.

1.4 DESENVOLUPAMENT PRECLÍNIC DE LA RUTI®

Bases científiques de la vacuna RUTI® : el «Rational»

El desenvolupament de la vacuna RUTI® té el seu origen en els estudis sobre la fisiopatologia de la ITBL portats a terme a la Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE) mitjançant models experimentals animals. L'ús del model murí va permetre la visualització de bacils no replicatius a l'interior de macròfags escumosos (ME) que estaven a la perifèria dels granulomes, sabent que originàriament provenien del el seu interior, ja que la seva funció és netejar les zones lesionades de debris i restes cel·lulars per a poder donar pas a la regeneració del teixit. Durant anys, el granuloma s'ha considerat una estructura estanca, on suposadament es produïa un ambient d'anaerobiosi, i on els bacils quedaven continguts en estat latent, podent ser ressuscitats fins anys després. El primer ME visualitzat amb bacils al

seu interior va donar pas a la pregunta següent: i si fos d'aquesta manera que els bacils latents poguessin escapar, i més endavant, en trobar-se en condicions millors recreïxer? La Hipòtesi Dinàmica, les bases de la qual han estat descrites anteriorment, contempla aquesta via natural d'eliminació de residus generats a partir de la destrucció cel·lular i del parènquima a la zona lesionada (en aquest cas el granuloma) com a la clau en l'escapament bacil·lar. En el seu camí fisiològic, i un cop la resposta immune hagi aconseguit controlar el creixement bacil·lar, els ME s'endurien del granuloma les restes cel·lulars fagocitades cap a les vies respiratòries superiors, per passar a l'estòmac per deglució i ésser destruïts amb els seus continguts. D'alguna manera però, es poden endur bacils no replicatius al seu interior, bacils que no es multipliquen, però que tampoc poden ser destruïts perquè d'alguna manera són invisibles a la resposta immune.

D'una banda, els ME i els macròfags activats secreten Òxid Nítric (NO), suprimint les cèl·lules T efectores [122]; i de l'altra, la resposta immune es centra en els antígens més abundants, que són els secretats pels bacils en creixement, bacils potencialment molt més perillosos, per la gran destrucció tissular que poden comportar [123, 124]. L'atzar i la fisiologia respiratòria contribuirien en el retorn d'aquests bacils al parènquima, donant-los l'oportunitat de reactivar. Així d'alguna manera, naixia la idea d'una vacuna poliantigènica, que hauria d' « ajudar » a la Immunitat a veure aquests bacils latents, i amb aquesta finalitat la RUTI® es produeix a partir de bacils d'una soca clínica (soca #511) de *M.tuberculosis* cultivada en condicions d'estrès (amb davallada de la pressió parcial d'oxigen i del pH)[125]. Però podria servir com a tractament substitutiu de la quimioprofilaxis amb INH? El tractament de la ITBL amb INH, si complet, és altament efectiu, però els seus desavantatges ja han estat explicats anteriorment. Un tractament curt no assegura la curació, i en el model murí acaba en una reactivació del creixement bacil·lar que la resposta immune tarda en tornar a controlar [126], però per una banda aconsegueix reduir el nombre de ME d'al voltant del granuloma i per tant el nínxol dels bacils latents, i per l'altra redueix la població bacil·lar a la mínima expressió en tenir només efecte sobre els bacils en creixement (que en un inici són la majoria), el que comporta la disminució de la resposta inflamatòria local i la contribució a evitar el fenomen de Koch. Aquests dos fets permetrien l'entrada de nous macròfags no activats, que podrien activar-se per a generar una resposta immune contra nous antígens si fossin capaços d'identificar-los [126, 127]. Aquesta idea va lligada al que Sir A.E. Wright ja va apuntar en parlar dels fracassos al tractament amb tuberculina, en dir que en aquests casos el que caldria seria « to try to inhibit the growht and if possible, to bring about the destruction of the tubercle bacilli in the local nidus of infection by leading through that nidus in a continuous stream a lymph rich in protective substances » [91]. Així, es plantejava un règim que inclogués els avantatges d'una pauta curta d'INH (un mes) que ajudés a netejar l'organisme de bacils en creixement i unifiqués malalts, seguida d'una

vacuna que fes un *boosting* de la immunitat generada espontàniament i generés una immunitat contra els bacils latents, en un intent d'evitar la reactivació del creixement bacil·lar (figura 9).

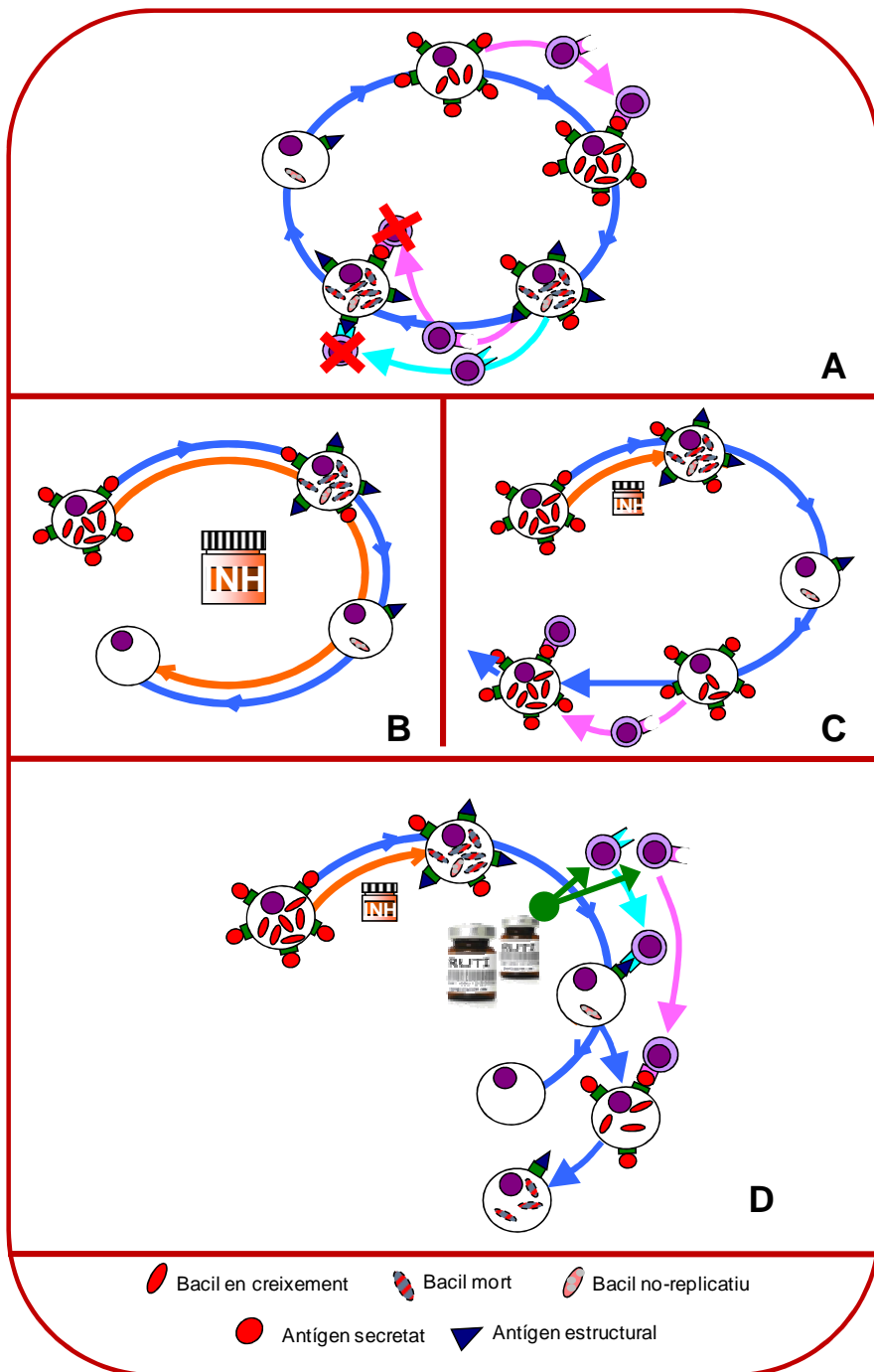


FIG. 9.A: Cicle de la ITBL. Després de la infecció per bacils no-replicatius (habitualment), aquests es multipliquen a l'interior dels macròfags, fins que un cert nombre de cèl·lules dendrítiques és drenat al gangli limfàtic regional i es desencadena la proliferació de limfòcits T efectors de tipus Th1, que activaran els macròfags infectats. Aquests destrueixen els bacils a l'interior, excepte si són bacils no-replicatius (que podran resistir els mecanismes de destrucció). FIG. 9. B reflecteix la situació a la que s'arriba amb un tractament amb INH de llarga duració (9 mesos). La INH destrueix els bacils en creixement actiu. Els bacils no-replicatius es drenen i poden reinfectar el parènquima, però no es poden multiplicar, ja que en fer-ho seran eliminats amb la INH. Amb el tractament llarg s'aconsegueix drenar tots aquests bacils, desapareixent la possibilitat de reinfecció endògena. La figura 9.C reflectiria el que passaria amb un tractament de curta durada (p.e. 1 mes). En aturar el tractament, d'existir algun bacil no-replicatiu que hagi pogut tornar al parènquima aquest aconseguirà reactivar el seu creixement fàcilment (per desaparició dels limfòcits efectors a nivell local) i recomençar el cicle infectiu. La figura 9.D representaria l'estratègia basada en el tractament amb INH durant 1 mes seguit de la inoculació de la vacuna RUTI®. En aquest cas, després del tractament antibiòtic, quan hauran desaparegut els limfòcits efectors, la vacunació amb RUTI® (per la seva natura poliantigènica i generada a partir de cultius estressats de micobactèria) induirà la producció de limfòcits efectors tant contra antígens secretats com estructurals. (Imatges cedides per P.J. Cardona).

En consistir en fragments bacil·lars, la vacuna no necessita d'adjuvant addicional, ja que els components de la paret micobacteriana ja en tenen propietats. Tanmateix, en un intent d'optimitzar la presentació dels antígens de paret de *M.tuberculosis* es va optar per introduir

la fragmentació dels bacils mitjançant disgregació mecànica i la seva inclusió en liposomes de fosfatidil-colina i colat sòdic.

Però encara quedava un escull per salvar: des de l'època de la tuberculina, a principis del segle passat, les vacunes terapèutiques per a tractar la TB s'havien desestimat per por de la reacció de Koch, atribuïda pel nostre grup a reaccions immunes inespecífiques tipus Shwartzman generades contra un agent provocador, com podria ser la presència d'alguns glicolípid de la paret cel·lular que podrien actuar com a endotoxines [128-131]. Precisament per a evitar aquest fenomen, doncs, es varen incloure al procés de producció de la vacuna els rentats amb un tampó de PBS amb detergent suau Tritó X-114 al 4%, que eliminarien bona part dels lípids superficials dels fragments de *M.tuberculosis* mentre que minimitzarien la desnaturalització de proteïnes antigèniques [125, 132].

Així, la RUTI® és una vacuna a partir bacils de la soca clínica #511 cultivats en agar Middlebrook 7H11 a 37°C sota condicions d'estrès (davallada progressiva de la pressió parcial d'oxígen i del pH), als que es sotmet a una fragmentació mecànica. Posteriorment, els fragments es deslipiditzen (mitjançant el Tritó X-114), es liposomitzen (per a optimitzar la presentació antigènica), i es pasteuritzen (per assegurar-ne la seguretat). Avui en dia, la seva producció corre enterament a càrrec de l'empresa *biotech* Archivel Farma S.L. de Badalona, que la condueix en condicions de *Good Manufacturing Practice* (GMP) assegurant-ne els *standards* de qualitat del producte exigits per les entitats regulatòries tan europees com americanes. La Fundació Institut Germans Trias i Pujol té un contracte de col·laboració amb aquesta empresa per col·laborar en el desenvolupament de la RUTI®.

De l'idea a la clínica : el desenvolupament.

El desenvolupament d'un nou fàrmac -des del moment del seu descobriment fins a la seva comercialització- és un procés que dura de 10 a 15 anys i l'objectiu del qual es disminuir tant com sigui possible la incertesa sobre el seu efecte, sigui quin sigui. La durada i les exigències dels organismes reguladors (la finalitat dels quals es assegurar tant la seguretat com l'eficàcia del nou producte) fan que els costos d'aquest procés esdevinguin altíssims, ja que d'una banda existeixen els costos del propi desenvolupament del producte, i de l'altra els que li calen a l'empresa que el duu a terme per a romandre financerament solvent [133-135].

El descobriment és el primer pas d'aquest llarg camí, i implica trobar un nou component amb el potencial de ser clínicament útil, és a dir, de produir un efecte que sigui útil a nivell de la clínica. Per a això, cal entrar en l'avaluació preclínica, amb la finalitat d'estudiar el perfil del mecanisme d'acció que farà que aquell producte sigui mes avantatjós que els tractaments usats fins al moment, o que el convertirà en un totalment nou i original enfoc del tractament

d'una malaltia. Un cop haver superat aquesta fase, el producte caldrà que sigui testat per a demostrar d'una banda la seva seguretat (mitjançant estudis de toxicitat i tolerabilitat) i de l'altra la seva eficàcia en models experimentals animals, per a poder passar, si exitòs, al desenvolupament pròpiament clínic [136]. A la figura 10 es detallen les diferents fases del desenvolupament d'una nova droga.

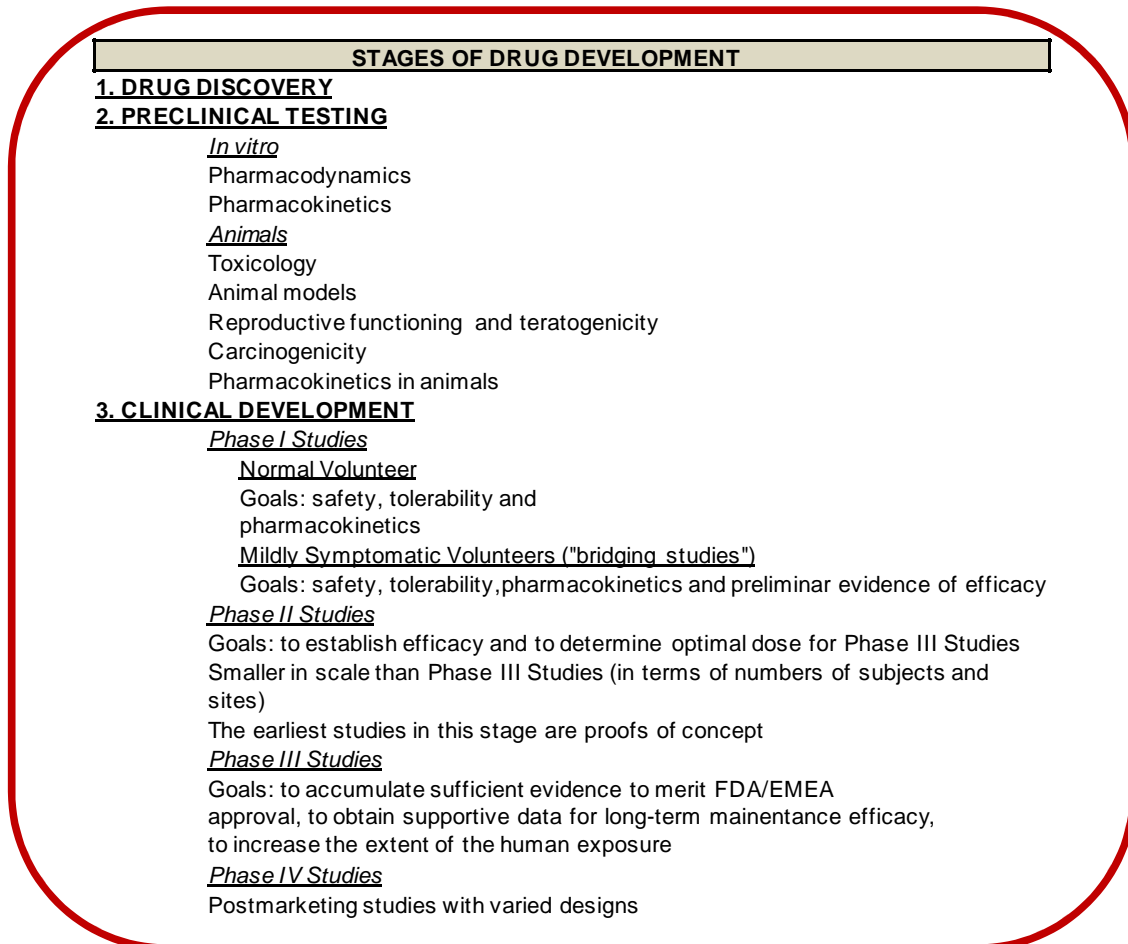


FIG. 10. Fases del desenvolupament d'una nova droga

A banda dels problemes logístics que el desenvolupament de qualsevol nova droga/fàrmac/vacuna pugui representar, en TB n'existeixen d'intrínseques a la pròpia malaltia i al desconeixement de la seva patogènia. A dia d'avui encara no es coneix cap factor que correlacioni amb protecció. En principi, en l'avaluació de noves vacunes profilàctiques, s'exigeix que la seva eficàcia sigui com a mínim igual que la que de la BCG, és a dir: 1) una disminució de com a mínim un logaritme de CFU als pulmons dels ratolins vacunats respecte els no vacunats, a la setmana 3 postinfecció; i 2) una supervivència de 30 setmanes en ves de les 14 dels animals no vacunats, en el cas dels conills porquins.

El testatge de RUTI® va significar desenvolupar les eines d'avaluació preclínica, donat que no existien. Per això es va passar a valorar la capacitat de la combinació INH+RUTI® en la fase crònica de la infecció (on hi ha més proporció de bacils latents [137, 138]) en diferents

animals. En un primer estudi, s'aconseguí demostrar la generació d'una resposta poliantigènica de tipus Th1, Th2 i Th3 que s'associava a un efecte bactericida reduint les unitats formadores de colònies (CFU, per Colony Forming Units) si s'associava a una pauta curta de quimioteràpia. A més, la generació d'una resposta humoral enfront els pèptids del FCMtb (el principi actiu de la vacuna, çó és els fragments de *M.tuberculosis*) va encoratjar a portar a terme un altre projecte que va demostrar l'efecte protector que tenia el sèrum dels animals vacunats, quan injectat a ratolins severament immunodeprimits (SCID) infectats [139]. L'eficàcia de RUTI® fou posteriorment avaluada més extensivament en el model murí i de conill porquí, infectats via aerosol i via intraperitoneal. En el model d'aerosol es va establir la comparació dels efectes causats per la vacunació amb RUTI® vs els obtinguts amb BCG. Els resultats demostraren la major disminució de CFU en els animals tractats amb RUTI, associada a una menor infiltració granulomatosa del pulmó. En quant a l'avaluació de la immunogenicitat de les vacunes, si bé totes dues generaven una resposta cel·lular contra antigens estructurals, la RUTI® aportava un major número de cèl·lules T específiques (CD4 i CD8) secretores d'IFN- γ enfront dels antigens ESAT-6 i 85B, essent en general una resposta més ràpida i més forta que seria la causa de la menor càrrega bacil·lar i patologia pulmonar trobades en aquests animals [140]. El model d'infecció via intraperitoneal va aportar més dades sobre aquest efecte, mostrant més clarament la natura poliantigènica de la resposta [123].

Però els models experimentals animals usats comunment per a l'estudi de la malaltia (bàsicament ratolins) dubtosament reflexen amb fiabilitat el que passa en humans, el que a la UTE clàssicament s'ha atribuït al tamany dels animals usats. Així, tot s'ha encaminat a desenvolupar models en animals mes grans, amb la creença que com més gran sigui l'hostatger més important sera la reacció inflamatòria que desenvolupi contra la TB, reflectint una major similitud amb la resposta humana [127]. Aquest enfoc permetia doncs assajar les vacunes en un context mes humanitzat, esperant poder identificar patrons esperables en humans, tant en magnituds i tendències de la resposta immune com en les reaccions que podrien comprometre la seguretat [141]. L'experiència tant en cabres (en el context d'un estudi de camp) com en minipigs ha demostrat la seva alta tolerabilitat i l'absència de reaccions tòxiques serioses de la vacuna en animals infectats, si bé en cabres es donava la generació d'un nòdul subcutani al punt d'inoculació que es resolia en un mes, fenomen local que ja s'havia observat en animals més petits i que no succeï en el cas dels minipigs. En quant a l'eficàcia en aquests models s'ha observat que en animals grans el tractament amb INH aconsegueix reduir l'afectació tant pulmonar com extrapulmonar i que en afegir RUTI® després d'aquest tractament aquest decreixement encara és mes gran a nivell extrapulmonar, el que vindria a significar que la vacuna ajuda a prevenir la disseminació.

D'altra banda, la generació de la resposta immune específica observada em sang perifèrica era considerable, reforçant els resultats obtinguts en animals més petits [141, 142]

Tots aquests resultats varen recolzar el pas al desenvolupament clínic de la vacuna per part d'Archivel Farma, empresa farmacèutica que es va crear com una *spin-off* d'Archivel Technologies. Aquesta, creada per l'empresari José Martínez, va establir un contracte amb la Fundació Institut Germans Trias i Pujol per tal de donar suport al desenvolupament de la RUTI®, creada a partir de la tesi del Dr. Cardona. Archivel Farma es va crear juntament amb el fons de capital risc FonsInnocat, gestionat per BCN HighGrowth, que va entrar com a soci inversor; i comptant amb la col·laboració de diversos organismes públics (el Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial-CIDEM, el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial- CDTI , l'Empresa Nacional de Inversiones S.A. o ENISA, i l'Institut Català de Finances o ICF) [143]. Actualment Archivel Farma és el responsable de la producció de la vacuna RUTI®, sota GMP. RUTI® és el nom del producte final compost pel principi actiu l'anomenat FCMtb (per *Fragmented Cells of M.tuberculosis*) més excipients; i el procés de la seva producció s'ha publicat a la literatura científica [125-127].

2. ESTUDIS

El projecte principal d'aquesta tesi és la valoració de la resposta immune induïda per la vacuna RUTI® en el context d'un estudi de Fase 1. En la seva planificació varen sorgir dubtes conceptuals que es varen haver de resoldre i varen generar dos estudis menors, que també s'han inclòs.

A continuació es presenten doncs els tres estudis següents:

- Estudi #1: Avaluació de la producció d'autoanticossos en sèrum de ratolins vacunats amb RUTI®
- Estudi #2: Detecció d' ITBL durant l'*screening*: avaluació de la influència del TST sobre les respostes immunològiques mesurades per TIGRA.
- Estudi #3: Avaluació de la Immunogenicitat de RUTI® en el context d'un CT de Fase 1.

La discussió dels resultats dels 3 estudis s'inclouen en l'apartat de discussió general.

3. ESTUDI #1: ESTUDI DE LA PRODUCCIÓ D'AUTOANTICOSSOS EN SÈRUM DE RATOLINS VACUNATS AMB RUTI®

3.1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ

Durant la dècada prèvia a la redacció del protocol de l'assaig de Fase 1 havien aparegut noves evidències sobre diferents efectes secundaris que relacionaven fenòmens autoimmunes amb la vacunació [144, 145]. Provar aquesta associació és difícil, i a més no hi ha gaire experimentació animal al respecte que pugués aportar una mica de llum. En un estudi amb gossos que es van monitoritzar després de la vacunació, es va observar un augment significatiu d'alguns autoanticossos en els animals vacunats però sense associar-se a clínica manifesta [146]. Aquest fenomen també s'ha pogut veure en ratolins vacunats amb la vacuna antipneumocòccica R36a o amb el polisacàrid capsular del grup B de *Neisseria meningitidis* conjugat amb toxoide tetànic [147, 148]. Tanmateix, en humans vacunats amb les vacunes antipneumococ o antimeningococ del grup B ni tant sols s'ha vist un increment dels autoanticossos [149-151]. Si bé és veritat que és difícil interpretar resultats positius sense simptomatologia clínica, la TB s'ha relacionat amb la presència de diferents autoanticossos, i a més s'ha demostrat que els autoanticossos aïllats en pacients tuberculosos poden reaccionar contra les micobactèries [152-154]. En un model de ratolí obès no-diabètic s'ha demostrat que les micobactèries poden produir una reacció lupus sistèmic-like. De la mateixa manera, ratolins NZB/NZW tractats amb BCG han patit una acceleració de la seva malaltia autoimmuna, i tot i poc freqüents, existeixen evidències que estableixen una relació entre l'aparició de fenòmens autoimmunes i l'ús local de BCG pel tractament de carcinoma superficial de bufeta. De totes maneres però, existeixen altres tractaments que inclouen l'ús amb micobactèries que no s'han relacionat amb efectes autoimmunes, com s'ha provat als estudis que usen *M.vaccae* com a agent terapèutic [155-157].

3.2. HIPÒTESI I OBJECTIU

Ja que tant les micobactèries com la vacunació s'ha relacionat controversialment amb fenòmens autoimmunes, ens va semblar raonable demostrar (com a part de la preparació de l'assaig de Fase 1) que la vacuna RUTI® no generava producció d'autoanticossos. Amb aquesta finalitat es va dissenyar un petit estudi en col·laboració amb el servei d'Immunologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (que vaig dur a terme amb l'ajut de la Dra. Herrero i el Dr. Carrillo).

L'objectiu era establir una possible relació entre la vacunació amb RUTI® i la presència d'anticossos antinuclears (ANA) en el sèrum de ratolins vacunats. El fet d'escollir aquest tipus d'anticossos es va basar en considerar-los suficients per a establir un *screening* d'alteracions autoimmunes possiblement lligades a la vacunació.

Aquest estudi -els resultats del quals es varen presentar al 16th European Congress of Immunology [158]- es detalla a continuació.

3.3. MATERIALS I MÈTODES

Es varen incloure un total de 40 ratolins femella C57BL/6 de 6 setmanes d'edat *spf* (per *specific pathogen-free*). Tots els procediments es varen aprovar i foren supervisats pel Comitè de Benestar Animal de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Els animals es varen dividir en dos grups experimentals: al grup I es varen incloure 12 ratolins sans inoculats dues vegades amb RUTI® (lot B04, amb 28 dies entre les dues inoculacions) i al grup II un total de 28 ratolins infectats via aerosol (amb de 20 a 50 bacils als pulmons de cadascun, mitjançant un aparell de Middlebrook) amb la soca H37Rv Pasteur de *M.tuberculosis*. Els animals infectats es varen dividir posteriorment en diferents grups segons el tractament que varen rebre: no tractats, tractats amb quimioteràpia, tractats amb quimioteràpia més RUTI® o BCG Danish. Els grups experimentals s'exemplifiquen a la figura nº 11.

Els animals es varen sacrificar a la setmana 21, obtenint-ne els sèrums. La detecció d'ANA es va fer mitjançant immunofluorescència indirecta (IFI) sobre cèl·lules HEp-2 fixades

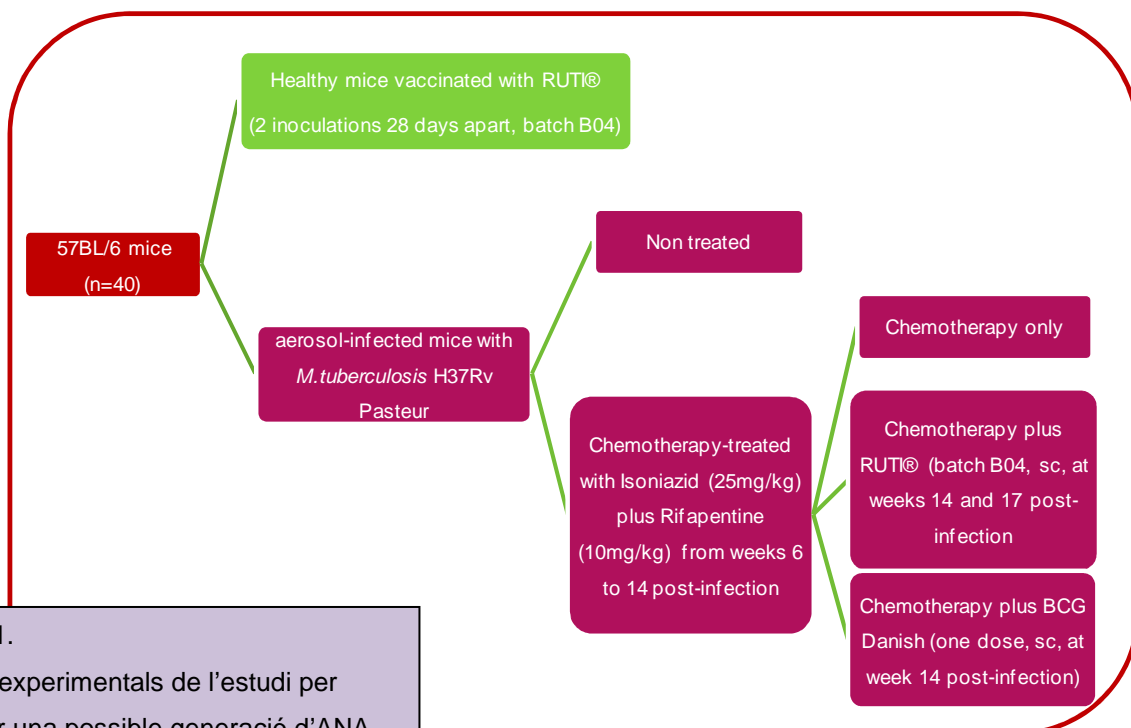


FIG. 11.
Grups experimentals de l'estudi per avaluar una possible generació d'ANA per part de la vacunació amb RUTI®

(KallestadTM *SUBS-HEp-2*, BioRad 30470; USA) així com sobre triple teixit de rata *homemade* usant un anticòs anti-Ig policlonal conjugat amb FITC (goat α -mouse Ig G+M+A FITC, Southernbiotech, USA). El triple teixit de rata s'ha usat àmpliament arreu per testar tant sèrum humà com de ratolí per autoanticossos degut a la cross-reactivitat interespecies. Tanmateix, la línia cel·lular

	ANA presence by IIF on:	
	Rodent tissues	HEP2
Group I: healthy animals inoculated with 2 RUTI doses (n=12)	0/12	0/12
Group II: <i>M.tuberculosis</i> infected mice:		
Ila: not treated (n=7)	0/7	2/7
Ilb: treated with Ch (n=7)	1/7	1/7
Ilc: Ch plus RUTI (n=7)	0/7	1/7
Ild: Ch plus BCG Danish (n=7)	2/7	2/7

d'Hep-2 fixada en portes l'ha acabat reemplaçant perquè els seus nuclis cel·lulars són més grans i les

TAULA 2. Resultats de l'estudi de generació d'ANA per la vacunació amb RUTI®

cèl·lules es distribueixen en una sola capa, el que facilita tant la detecció com la interpretació dels resultats [159]. La decisió d'incloure ambdós suports es va basar en l'avantatge que oferia el triple teixit de rata de poder detectar altres patrons possibles d'autoimmunitat. Els sèrums positius es varen tornar a testar amb anti-IgG (goat α -mouse IgG FITC Southernbiotech, USA) i anti-IgM (goat α -mouse IgM FITC Southernbiotech, USA) per tal d'identificar-ne el seu isotip, així com per anticossos antiDNA sobre portes de *Critidia luciliae* (KallestadTM *SUBS-CL*, BioRad 30402; USA).

3.4. RESULTATS

Els resultats varen demostrar que tots els sèrums d'animals sans vacunats amb RUTI® foren negatius per ANA. En quant als animals infectats amb *M.tuberculosis*, es varen detectar més resultats positius en l'assaig d'IFI quan s'usava cèl·lules HEP-2 que sobre triple teixit de rata (21,42% versus un 10,7% de resultats positius sobre el total de mostres testades). No es va trobar relació significativa amb cap tipus de pauta de tractament, ja que els sèrums positius foren: 2/7 dels no-tractats; 1/7 dels tractats amb quimioteràpia sola; 1/7 del grup tractat i vacunat amb RUTI® i 3/7 del grup tractat i vacunat amb BCG. Els resultats complets es presenten com a Taula 2. L'isotip dels sèrums positius foren IgG (n=6) i IgM (n=1); 3 d'ells a més foren positius per anti-DNA.

3.5. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts, la conclusions que vàrem extreure foren les següents:

- 1) la vacunació amb RUTI® no indueix ANA detectables en sèrum però que
- 2) la infecció per *M.tuberculosis* sí, i de forma independent del tractament administrat.

4. ESTUDI #2: DETECCIÓ D' INFECCIÓ TUBERCULOSA DURANT L'SCREENING: AVALUACIÓ DE LA INFLUÈNCIA DEL TST SOBRE LES RESPOSTES IMMUNOLÒGIQUES MESURADES PER TIGRA.

4.1. ESTAT DE LA QÜESTIÓ

Durant el procés de validació de la monitorització de la immunogenicitat del CT de Fase 1 una qüestió principal ens va preocupar amb importància: la de si el fet de fer l'*screening* de la infecció tuberculosa mitjançant el TST podria influir en els resultats de l'avaluació de les respostes immunològiques per TIGRA que planejàvem dur a terme durant el seguiment. En aquell moment se sabia molt poc de la interacció entre el TST i l'ús posterior d'un assaig TIGRA, malgrat que se li suposava un efecte neutre ja que algunes de les *guidelines* havien proposat aquesta combinació seriada (primer el TST i després un TIGRA) per a confirmar casos positius en el detecció d'infecció tuberculosa [21, 23, 160].

Tanmateix, i malgrat alguns dubtes sobre la matèria [161], la realitat es que fins aquell moment hi havia escassos estudis que avaluessin com el TST podia influir els TIGRA [162, 163].

Coneixent el treball de la Universitat d'Oxford amb la seva vacuna MVA85A, vaig contactar amb la Dra. Helen McShane, que va confirmar que en el seu assaig "Early Clinical Trials with a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in TB-endemic countries: issues in study design" [108] havien fet servir ambdós tests (TST i un ELISPOT *homemade* per a valorar les respostes a PPD) a la vegada per a l'*screening*, i que després entre l'*screening* i la vacunació passaven de 2 a 3 setmanes. A la pregunta de si el TST podria influir en les respostes immunològiques subseqüents, la Dra. McShane va respondre que en teoria sí, però que es van decidir per a incloure el TST a l'estudi en base d'uns experiments que varen fer a Oxford, en que no varen detectar diferències en termes de la resposta *ex vivo* mesurada per ELISPOT (usant la mateixa prova que pensaven incloure al seu assaig), tot i que ella mateixa va confirmar que no es podien descartar variacions que podrien ser detectables mitjançant altres tècniques.

4.2. HIPÒTESI I OBJECTIU

La hipòtesi del treball era que que el TST realitzat per fer el depistatge de la ITBL pot afectar la monitorització posterior de la resposta immune a sang perifèrica.

Amb l'objectiu doncs de determinar l'efecte del TST en les subseqüents respostes mesurades mitjançant els TIGRA *homemade* en les mateixes condicions que nosaltres els pensàvem usar durant l'assaig clínic, vàrem dissenyar l'estudi els resultats del qual foren publicats [164] al paper que s'inclou com a annex (10.2). A continuació es descriu breument en què consistia l'experiment, i quines varen ser les conclusions a les que vàrem arribar.

4.3. MATERIALS I MÈTODES

Vàrem aprofitar el control d'ITBL al que sotmetem a tots els integrants del grup cada 6 mesos, reclutant 9 persones per a aquest assaig: 5 d'elles eren infectades ja conegudes en diferents fases d'evolució segons els *standards* de l'Estat espanyol mentre que les altres 4, no. Les característiques clíniques dels individus es presenten a la taula nº3.

Volunteer	Age	BCG status	LTBI	TST (mm) at week 0	Clinical Features and prophylactic therapy
Group I					
V1	28	-	-	0	
V2	29	-	-	0	
V3	29	-	-	0	NTM infected
V4	24	-	-	0	
Group II					
V5	40	-	+	0	9-month prophylactic treatment finished 9 years ago
V6	35	-	+	0	6 month prophylactic treatment finished 6 years ago
Group III					
V7	32	-	+	20	6-month prophylactic treatment finished 11 months before the study began.
V8	37	+	+	30	Accidentally exposed. Not prophylactically treated (because the volunteer had >35 years old and was pregnant at the time of diagnosis)
V9	29	-	+	60	Accidentally exposed. At the 8 th of 9-month prophylactic treatment when the study began.

TAULA 3. Característiques clíniques dels voluntaris inclosos en l'estudi d'avaluació de la influència del TST sobre les respostes immunològiques mesurades pels TIGRA.

A tots els voluntaris se'ls va practicar un TST (per inoculació intradèrmica de 2 TU de PPD RT-23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) a l'avantbraç). Els resultats els vaig llegir a les 72 hores segons el procediment habitual, considerant un resultat positiu si el diàmetre de la induració era de més de 5mm (10mm en els prèviament BCG-vacunats). El seguiment dels voluntaris es va fer mitjançant ELISPOT i QTF-CMI, usant els antígens a les mateixes concentracions i condicions a les que es planejava treballar durant l'assaig de Fase 1 (veure article a l'annex 10.2 i materials i mètodes de l'estudi #3, més endavant). Les respostes enfront l'antigen CFP-10 de *M.tuberculosis* només es varen poder mesurar mitjançant ELISPOT, ja que en aquell moment no en teníem prou quantitat per a poder-ho fer per QTF-CMI.

El seguiment es va fer a dia 0 (setmana 0 -w0-, abans de fer el TST), i a setmanes 1 (w1), 2 (w2) i 4 (w4) post-TST. Els resultats obtinguts no es varen poder analitzar estadísticament degut a que la població que es va incloure tenia una n molt petita, limitant la presentació dels

resultats a una avaluació únicament descriptiva. La relació lineal entre les dues tècniques sí que es va avaluar estadísticament, usant un test de regressió lineal.

4.4. RESULTATS

Els resultats varen evidenciar que una concentració petita d'antigen (0.04 µg de PPD intradèrmic) pot influir en la resposta immunològica, augmentant-ne els nivells de forma específica per la majoria d'antígens i evidenciable per les dues tècniques (veure figures 12 i 13), tot i que existia molta variabilitat interindividual en quant a la magnitud de l'increment de resposta. A més, amb aquestes quantitats potser era esperable trobar augment de les respostes en individus prèviament infectats amb *M.tuberculosis*, però sorprenentment aquest efecte també es va evidenciar en individus no-infectats. Tot i que l'increment es va veure independentment de la tècnica, hi ha algunes diferències entre els assajos que cal esmentar. Fixant-nos en el seguiment dels individus, la resposta incrementada disminuïa a partir de setmana 3 i a setmana 4 ja havia assolit els nivells pre-TST en la majoria dels casos, mentre que en el cas del QTF-CMI seguia elevada a setmana 4 o disminuïa més lentament. A més, de vegades les respostes més incrementades per un dels 2 assajos no es corresponien amb les de l'altre assaig. Això ens va esperonar a determinar la correlació entre les dues tècniques mitjançant un test de regressió lineal, el que va evidenciar que només existia en 5 dels 8 antígens que es varen fer servir, i encara només en 3 d'ells la R era de >0,7. Això podria tenir l'explicació en el fet que si bé totes dues mesuren la secreció d'IFN-γ, l'ELISPOT avalua el nº de cèl·lules secretores d'IFN-γ d'un total determinat de PBMC, mentre que en el QTF-CMI el que es mesura és la quantitat total d'aquesta molècula en un determinat volum de sang total estimulada.

L'estudi tenia moltes limitacions. Els dos assajos eren casolans, i per tant no validats comercialment, i amb unes concentracions i origen d'antígens que no són els dels kits comercials per a la detecció d'infecció tuberculosa (T-SPOT TB i QTF-TBGGold). A més, la n de l'estudi era baixa, pel que només es varen poder extreure conclusions en base a la descripció dels resultats, i no pas a la comparació estadística entre ells. És cert que a partir de la nostra troballa calia el disseny de nous estudis que avaluessin el mateix en una població molt més gran i usant els kits comercials, i això ens va empènyer a publicar-ho i a suggerir-ho a l'article que es presenta com a annex (10.2) [164].

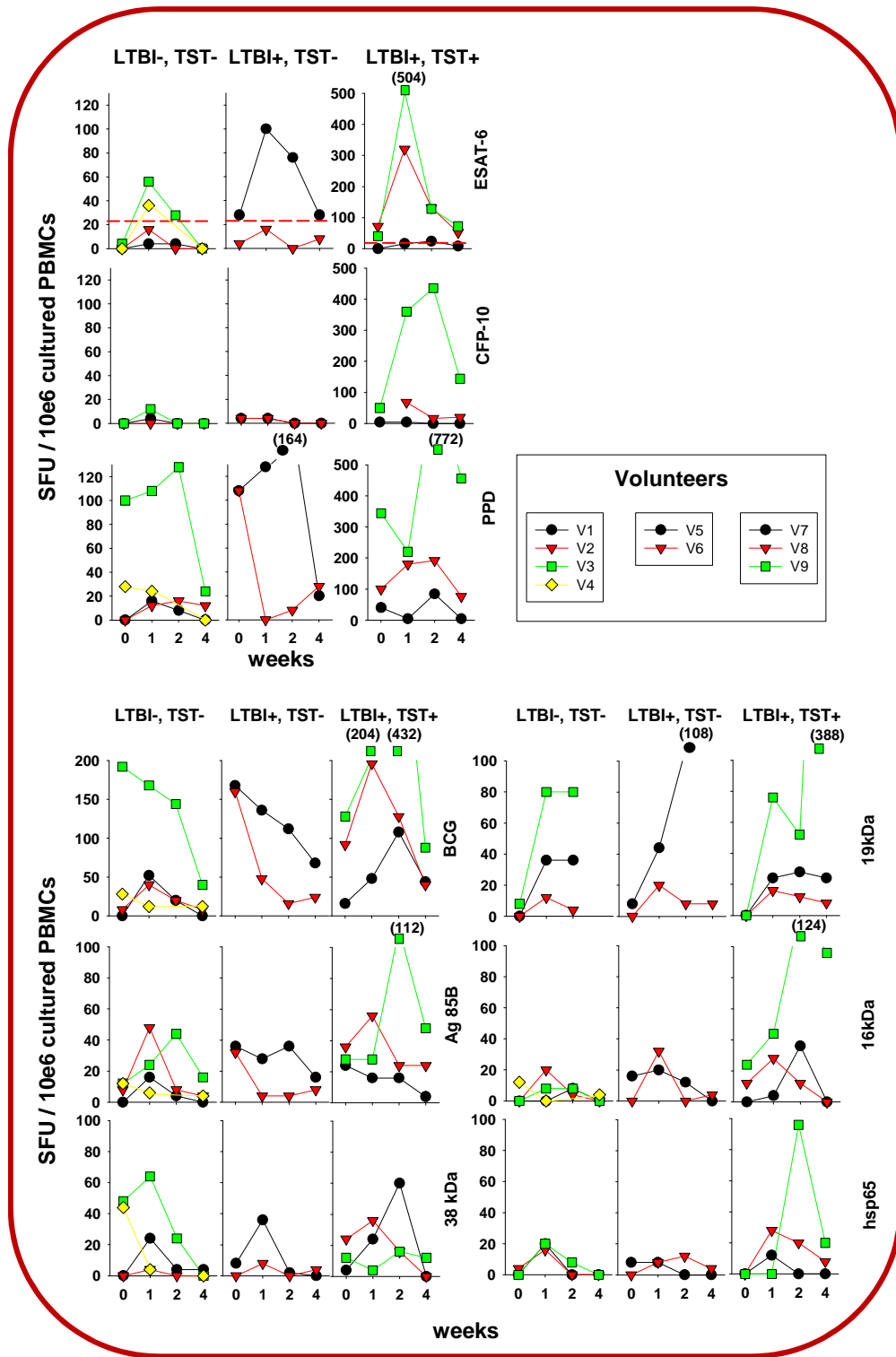


FIG 12. Resultats de l'assaig d'ELISPOT presentats com a Spot Forming Units (SFU) per $1 \cdot 10^6$ PBMC estimulats de 16 a 20 hores amb diferents antígens de *M.tuberculosis* i PPD. La línia vermella puntejada als plots d'ESAT-6 i CFP-10 representa el *cut-off* recomanat per la casa comercial (tot i treballar amb diferent concentració i origen dels antígens).

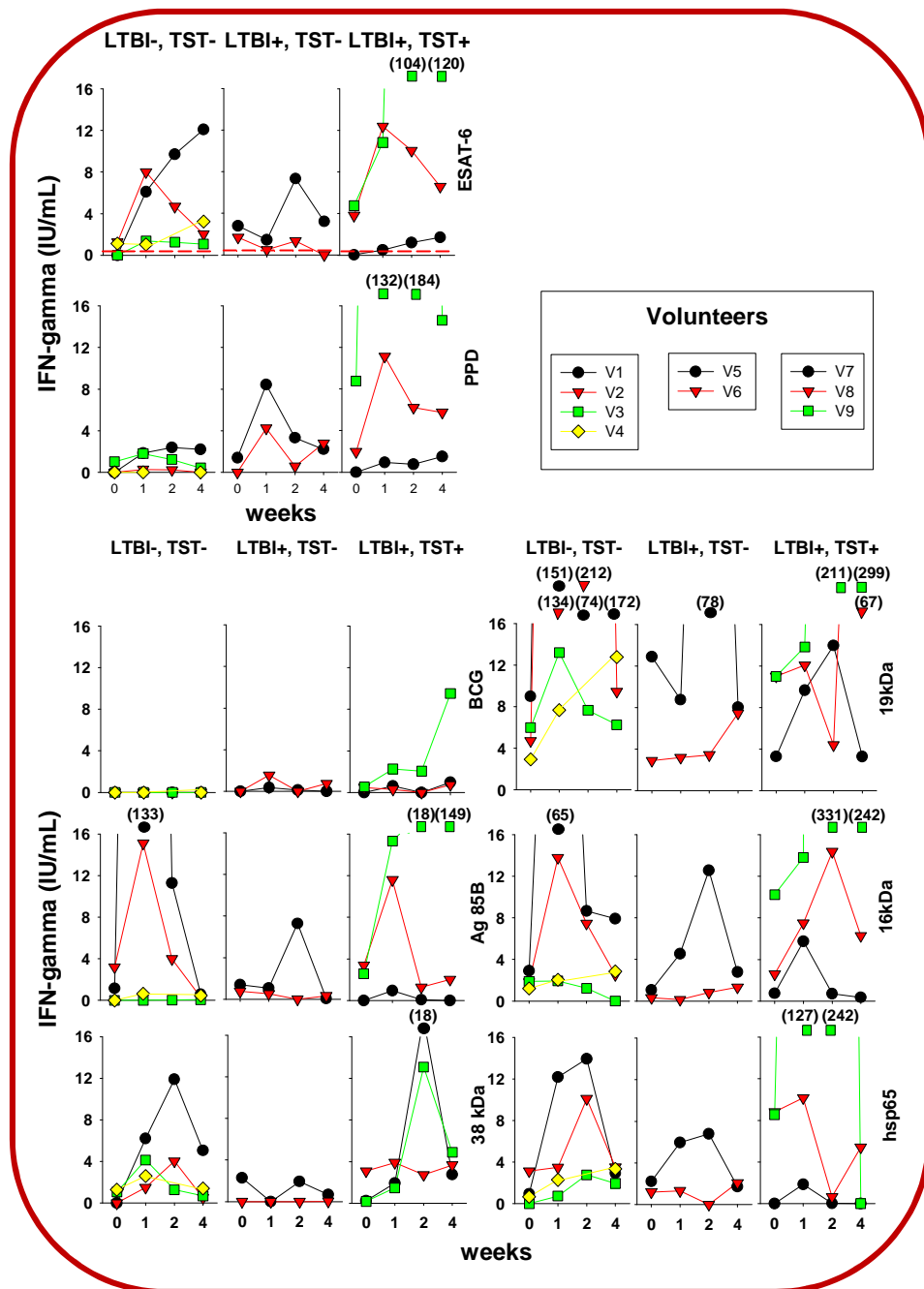


FIG 13. Resultats de l'assaig de QTF-CMI expressats en IU/mL d'IFN- γ i obtinguts a partir de l'estimulació de la sang total de cada voluntari amb els antígens de *M.tuberculosis* i PPD. La línia vermella puntejada al plot d'ESAT-6 representa el *cut-off* recomanat per la casa comercial (tot i treballar amb diferent concentració i origen dels antígens).

4.5. CONCLUSIONS

La conclusió del treball fou que en realitzar el TST quinze dies abans de començar el seguiment dels voluntaris, no es podia excloure en absolut detectar mitjançant TIGRA unes respostes immunològiques alterades fictíciament, fins i tot tractant-se d'individus sans.

Així, i malgrat les limitacions, l'experiment va respondre a les nostres necessitats donat que els resultats varen ser suficientment alarmants com per a decidir no incloure el TST a l'*screening* de l'assaig de Fase 1.

5. ESTUDI #3: AVALUACIÓ DE LA IMMUNOGENICITAT DE RUTI® EN EL CONTEXT D'UN ASSAIG CLÍNIC DE FASE 1.

5.1. HIPÒTESI I OBJECTIU

La hipòtesi que vàrem formular fou que la RUTI®, per ser una vacuna generada a partir dels fragments de *M.tuberculosis* cultivats en estrès, pot generar una resposta poliantigènica segura en pacients no infectats. Per això, l'objectiu fou dissenyar i dur a terme l'avaluació de la immunogenicitat de la vacuna RUTI per primera vegada en humans.

El desenvolupament clínic de la vacuna havia de començar amb un assaig clínic de Fase 1 que es duria a terme a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, amb el Dr. Pere-Joan Cardona i el Dr Joan Costa com a investigadors principals, i com a col·laboració entre el servei de Farmacologia Clínica de l'Hospital i la Unitat de Tuberculosi Experimental de la Fundació Institut Germans Trias i Pujol. Així, Archivel Farma ens va oferir la possibilitat de participar en l'assaig, que em va permetre ser la responsable de l'avaluació de la immunogenicitat de la vacuna. El treball es va fer en dos fases, d'aproximadament un any de durada cadascuna: la preparació i l'execució, que foren seguides d'un altre any per a analitzar les dades obtingudes i la conseqüent redacció dels documents pertinents. La preparació va incloure el treball conceptual de disseny de l'estudi; l'elecció i l'establiment de tècniques que serien utilitzades en l'execució; l'organització logística de l'execució i el redactat dels procediments específics referents a les tècniques (el que serien pròpiament els materials i mètodes del projecte) en format Standard Operating Procedures (SOP).

De totes les tasques, vaig participar directament en el disseny de l'estudi i en l'elecció de les tècniques d'avaluació de la immunogenicitat, així com en l'execució (per a la que vaig comptar amb l'ajut d'un tècnic de laboratori, en Sergio Pinto). L'establiment de les tècniques (incloent els experiments durant el disseny i els estudis #1 i #2, inclosos prèviament i duts a terme durant la preparació de l'assaig clínic), l'organització logística, el redactat dels documents i l'anàlisi dels resultats varen córrer enterament a càrrec meu, sota la supervisió del Dr. Cardona. El manuscrit de l'assaig de Fase 1 ha estat acceptat en forma d'article a la revista Vaccine, i s'adjunta com a annex (10.3).

5.2. MATERIALS I MÈTODES

5.2.1. Disseny

Població objectiu

L'assaig de Fase 1 es va dissenyar doble-cec, randomitzat i control·lat amb placebo, amb l'objectiu d'avaluar per una banda la seguretat i la tolerabilitat de la vacuna RUTI® i per l'altra la seva immunogenicitat en la primera aproximació als possibles efectes que podria tenir en

humans. En el desenvolupament clínic d'un nou fàrmac, els assajos de Fase 1 són aquells que es fan en individus sans per a tenir una primera idea bàsicament de la seguretat del producte. Però tot i que cap avaluació d'eficàcia s'exigeix a un estudi de Fase 1, per al promotor era important saber si la vacuna era o no capaç de generar algun tipus de resposta contra els antígens de *M.tuberculosis* en una població sana, i amb aquesta finalitat va ser avaluada la seva immunogenicitat. En incloure placebo es pretenia eliminar els possibles efectes inespecífics atribuïbles erròniament a la vacuna, i precisament per incloure'l va esdevenir important establir la randomització dels tractaments i el doble-cec de l'assaig, per tal de que ningú dels implicats (ni voluntaris ni personal) poguessin aplicar un esbiaix en l'anàlisi dels resultats.

Ja que es tractava d'un primer estudi exploratori, la n de l'assaig no es va basar en criteris numèrics o estadístics formals, sinó que es va optar per incloure 24 individus (16 vacunats amb RUTI® i 8 placebo-vacunats), un número corrent en aquest tipus d'estudis.

Es va decidir incloure molts criteris d'inclusió/exclusió, per tal de que la selecció de la població a estudi fos el més estricte i acurada possible. Ja que un assaig de Fase 1 exigeix provar la droga en individus sans (no en població diana) els criteris bàsicament es cenyien en determinar un estat de salut acceptable per a acomplir aquests requisits: cap malaltia, alteració o predisposició clínica significativa. La totalitat d'aquests criteris d'inclusió i exclusió es detallen a la taula nº 4. Un cop signat el consentiment informat, cadascun dels individus que volia participar a l'assaig es sotmetia a un *screening* en els 14 dies previs a la seva inclusió en un dels grups. Aquest *screening* pretenia observar l'acompliment dels criteris d'inclusió i detectar els criteris que podrien impedir la participació dels voluntaris, i incloïa les següents proves:

- Anamnesis
- Examen físic complert
- Electrocardiograma (ECG)
- Placa Rx de tòrax
- Paràmetres de laboratori: paràmetres hemato-bioquímics, T-SPOT TB, Anticossos antinuclears, urianàlisi i serologia contra HIV i els virus de l'hepatitis B i C (VHB i VHC).
- Qüestionari sobre tractaments concomitants, hàbit alcohòlic o de drogues, altres factors importants segons els criteris d'inclusió/exclusió.

INCLUSION CRITERIA

1. Caucasian men
2. To be from 18 to 40 years old.
3. Signature of the consent form to participate in the trial before any study procedure.
4. Body Mass Index at the screening visit, calculated as weight in kg/(height in m)² between 17 and 29.9 kg/m².
5. Systolic blood pressure between 100 & 140 mmHg, diastolic blood pressure between 50 & 90 mmHg and cardiac frequency between 50 & 90 beats per minute, at the screening visit, measured in supinus decubitus after 3 minutes of resting in this position.
6. Axilar corporal temperature <37°C at the screening visit.
7. ECG without clinically relevant signs.
8. To be able to communicate fluently with the investigators, and to accomplish all the trial requirements.

EXCLUSION CRITERIA

1. Antecedents or actual evidence of the following diseases: haematological, hepatic, gastrointestinal, genitourinary, cardiac, vascular, respiratory, metabolic, endocrin, rheumatic, immune, visual, neurological, psychiatric or cutaneous that could be relevant to the study.
2. Antecedents or actual evidence of severe allergy (anaphylaxis, angioneurotic oedema) or any chronic or seasonal allergy (asthma, urticaria, rhinitis allergica)
3. Antecedents or actual evidence of severe adverse event or hypersensitivity to any drug or vaccine, or contraindication to the excipients used in the vaccine to be tested.
4. Acute disease with body T^a >37° C 72 hours before the inoculation of the vaccine to be tested.
5. T-SPOT TB positive result.
6. ANA positive result.
7. Previous vaccination with BCG.
8. Image compatible with pulmonary tuberculosis infection in the chest radiological exam.
9. Personal or family antecedents of autoimmunity.
10. Antecedents or evidence of drugs abuse or addiction, or mental handicap.
11. Alcohol intake >50g per day.
12. To have had any investigational drug during the previous month to the first inoculation of the experimental drug to be tested in this study.
13. Loss of >400 mL of blood in the previous 12 weeks or >250mL in the previous 4 weeks before the screening.
14. Any deviation of normality detected in the screening being clinically relevant for the study.
15. Any laboratory parameter abnormality detected in the screening being clinically relevant for the study.
16. Positive results for antigen HBsAg or antibody Ig M Anti HBc of Hepatitis B virus (VHB), antibodies against Hepatitis C virus (VHC) or antibodies against HIV, detected in the screening.

TAULA 4. Criteris d'inclusió i exclusió de l'assaig de Fase 1 de la vacuna RUTI®

Hi va haver una sèrie de criteris que ens van implicar un repte conceptual i que van estimular la discussió científica a l'hora d'escriure el protocol de l'estudi.

L'elecció d'incloure només homes obeïa a una estratègia purament empresarial, ja que de voler incloure dones en un estudi de Fase 1 hauria implicat l'exigència per part dels òrgans regulatoris corresponents d'incloure estudis sobre la teratogeneicitat i toxicitat fetal en animals més ampliats dels que es disposaven en aquell moment.

La decisió d'acceptar voluntaris exclusivament de raça caucàsica en un principi es basava en l'assumpció que el background genètic i cultural-econòmic-social dels individus pot influir en les respostes tant a una malaltia com a una droga determinades, però també es va fer tenint en compte l'ampla distribució de la vacunació amb BCG. Al nostre medi aquesta ha desaparegut completament, a excepció del País Basc, mentre que a Sud-Amèrica i a França (entre d'altres zones) encara és una pràctica extesa. Donada la influència que una vacunació prèvia amb BCG podria tenir sobre les respostes immunològiques i que podria emascarar l'efecte real de la RUTI®, es va procurar acotar la població a la zona més propera possible.

La inclusió de detecció d'ANA durant la monitorització i l'exclusió del TST a l'*screening* es van basar en els resultats dels dos estudis preliminars, #1 i #2, dissenyats *ad hoc* i presentats prèviament.

Medicacions i dosis administrades

Les medicacions administrades foren de dos tipus: d'una banda la vacuna RUTI® (lot B06-A) i de l'altra placebo de la vacuna RUTI®, de mateix contingut que la vacuna però sense principi actiu. Només es va fer servir un sol lot de vacuna i de placebo per a tot l'estudi. Tant RUTI® com el placebo els va subministrar Archivel Farma S.L i es van dipositar al departament de Farmàcia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, des d'on es va fer la distribució cadascun dels dies d'administració. Els vials es van manipular el dia de la inoculació de manera idèntica, amb la finalitat d'aconseguir la dilució prefixada que exigia cada nivell de dosi.

Durant l'estudi es varen arribar a testar 4 dosis de la vacuna RUTI®: 5, 25, 100 i 200µg de FCMtb (principi actiu de la vacuna). El fet d'introduir 4 dosis de la vacuna en l'avaluació obeïa al desconeixement de quina dosi seria necessària per a generar en humans una resposta suficient mantenint-se segura i tolerable, ja que únicament una extrapolació molt simple s'havia pogut fer a partir dels resultats de l'experimentació animal. Els animals petits (ratolins i conills porquins) tenen una tolerància tal a la infecció tuberculosa que necessiten una concentració antigènica important per tal de desenvolupar una resposta immune suficient [127]. Per a induir una resposta DTH, els conills porquins necessiten 0,5µg de PPD i els ratolins de l'ordre de 5µg, quan en humans la concentració necessària es de 0,04 µg [165, 166]. Tot plegat resta importància als estudis tipus dosi-resposta que es puguin fer en models animals de TB. Tanmateix, Archivel Farma, com a part del desenvolupament preclínic de la vacuna va dur-ne a terme uns quants per a valorar l'efecte de la dosi sobre les

respostes humoral i cel·lular. Els resultats mostraren que si bé més d'una inoculació era necessària, no hi havia canvis significatius entre donar-ne dues o tres. La separació entre les dues inoculacions es va establir en 28 dies. A més, en els models animals d'eficàcia la dosi òptima es va fixar en un total de 200µg de FCMtb (el principi actiu de la vacuna RUTI®) pel que es va suposar que en humans la dosi òptima per a generar resposta seria unes 10 vegades menor: 25µg. Les altres tres dosis es van seleccionar en un intent de poder establir un rang de dosi que pogués ser immunogènic essent suficientment segur [167].

Randomització

El primer dia de l'assaig, als voluntaris se'ls va assignar un número en funció del seu ordre d'arribada. Aquest número es va usar per a assignar-los RUTI® o placebo en funció d'una llista randomitzada secreta (escollida entre 10 seqüències d'assignació impredecibles generades pels estadístics usant el programa PRoc Plan SAS); de la que en no teníem coneixement cap de les parts implicades en l'estudi i que no es va donar a conèixer fins que es va poder obrir el doble cec, un cop l'assaig va estar completament finalitzat. A la taula nº5 es detalla la llista randomitzada que es va fer servir per empaquetar i administrar la medicació. Aquesta es va entregar al departament de Farmàcia juntament amb duplicats de tots els vials per si se'n trencava algun, i amb sobres individuals acompanyants per si s'exigia la retirada d'algun dels voluntaris (per no acompliment, per motius de seguretat, etc).

Inoculacions

L'estudi es va dissenyar per administrar una sola dosi de la vacuna o el placebo als voluntaris via subcutània dues vegades (separades per 28 dies, a dia 0 i a dia 28). Les inoculacions es feien a primera hora del matí i en dejú, i després els voluntaris s'havien de quedar 3 hores en observació per a descartar qualsevol tipus de problema al·lèrgic o de reaccions adverses immediates. A partir de la primera administració (dia 0) els individus varen ser seguits per tal d'avaluar la seguretat i la immunogenicitat seguint el protocol de l'assaig.

VOLUNTEER	1 st ADMINISTRATION	2 nd ADMINISTRATION	VOLUNTEER	1 st ADMINISTRATION	2 nd ADMINISTRATION
1	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	13	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
2	PLACEBO	PLACEBO	14	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
3	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	15	PLACEBO	PLACEBO
4	PLACEBO	PLACEBO	16	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
5	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	17	PLACEBO	PLACEBO
6	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	18	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
7	PLACEBO	PLACEBO	19	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
8	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	20	PLACEBO	PLACEBO
9	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	21	PLACEBO	PLACEBO
10	PLACEBO	PLACEBO	22	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
11	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	23	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI
12	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI	24	VACCINE RUTI	VACCINE RUTI

TAULA 5. Llista random usada per a l'assignació de tractaments

Ètica

El protocol de l'estudi va ser revisat i aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (juny 2006), així com per la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad amb el número EudraCT 2006-000690-29 (PEI06-075), al març del 2007. Per a totes les fases de l'assaig es varen observar rigurosament el codi deontològic de l'Estat espanyol, la declaració de Helsinki amb totes les seves esmenes i el Real Decreto 223/2004 (publicat el 6 de febrer de l'any 2004 al BOE nº 33), així com els *standards* de *Good Clinical Practice* (GCP) de la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Als individus que volien participar a l'assaig se'ls van explicar oralment i per escrit els objectius, la metodologia, els tractaments a administrar, com se'ls distribuïria en els grups, els seus drets i de l'existència d'una assegurança, així com els possibles inconvenients i riscos de l'estudi; i aquests varen haver de firmar voluntàriament el consentiment com a requisit per a ser inclosos.

Els individus es varen repartir en 4 grups, a cadascun dels quals corresponia una dosi de RUTI® a testar, el que es va fer en etapes diferents (la figura 14 pot ajudar a entendre el disseny de l'estudi en la seva totalitat). Cada grup implicava individus vacunats amb dos inoculacions d'una sola dosi de la vacuna RUTI® (n=4) o placebo (=2). La raó per testar les dosis de manera incremental i seqüencial fou preservar la seguretat dels individus. Cada període començava amb l'*screening* dels individus que volien participar a l'assaig, una vegada s'havia pres la decisió d'escalar al següent nivell de dosi a testar (a la setmana 9

d'haver començat a testar la dosi prèvia). Aquest lapse es va marcar a la 9ena setmana perquè vàrem considerar aquest temps suficient per observar els efectes adversos (EA) que podrien comprometre l'escalada a dosis superiors. Amb la finalitat de poder valorar objectivament la seguretat de cada dosi i de prendre la decisió de seguir amb l'assaig testant-ne una nova, es va establir un Comitè de Seguretat. Aquest comitè es reunia als intervals predeterminats per a revisar els resultats encara en cec dels voluntaris ja vacunats per tal de prendre la decisió de seguir avançant amb l'assaig.

Els voluntaris tenien el dret d'abandonar en qualsevol moment sense haver-ne de donar explicacions, tenint l'obligació, això sí, d'informar als investigadors. Aquests llavors podien reemplaçar-lo per un altre voluntari (que rebria la medicació corresponent) excepte en el cas de que l'assaig s'hagués hagut de suspendre per raons de seguretat.

Si un individu s'hagués hagut de retirar per un AE, els investigadors tenien el deure de seguir-lo fins a la resolució de l'episodi o l'assoliment d'una clínica estable. També amb la finalitat de preservar en tot moment la seguretat dels voluntaris, els investigadors tenien el dret d'aturar o suspendre l'assaig informant degudament tant el promotor com les autoritats reguladores.

Totes les dades així com els resultats obtinguts dels voluntaris durant la totalitat de l'estudi es varen considerar confidencials i es varen tractar com a tals.

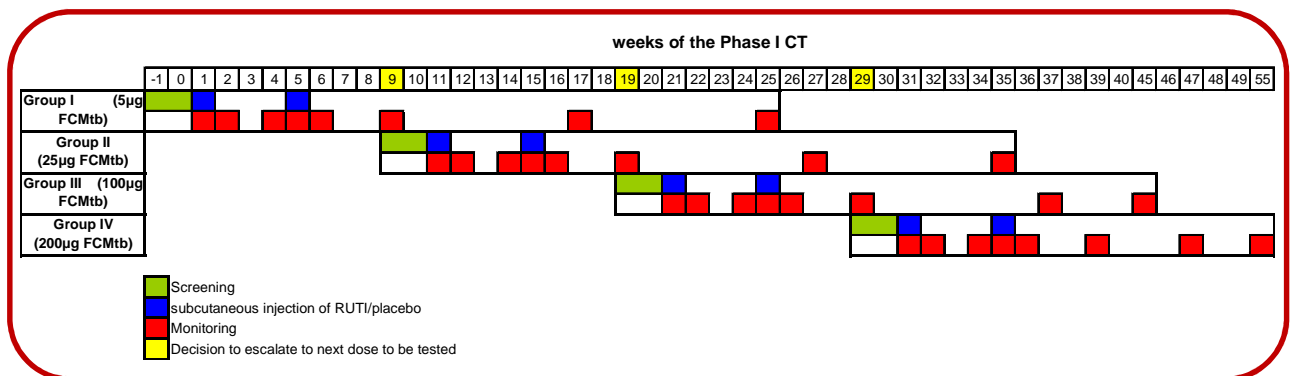


FIG 14. Vista general del disseny de l'assaig de Fase 1, on s'aprecia la seva seqüencialitat a l'hora de testar dosis incrementals de la vacuna.

5.2.2. ELECCIÓ I ESTABLIMENT DE TÈCNiques

Cap dels estudis d'immunogenicitat que es varen dur a terme a l'assaig de Fase 1 i que es presenten en aquest treball foren procediments *standards*, ja que a dia d'avui encara no existeix cap marcador per a poder determinar l'eficàcia d'una vacuna antituberculosa amb fiabilitat, sinó diferents intents per demostrar la superioritat de la droga en estudi sobre placebo. Amb aquesta finalitat i recolzats per la literatura vàrem decidir els diferents assajos que duríem a terme, el que ens va representar un repte tan intel·lectual com logístic, ja que

vàrem haver de tenir en compte el cost que representarien i que la càrrega de treball fos suportable suposant una organització estricta.

La majoria dels tests que es varen escollir es basaven en bibliografia prèvia que recolzaven que la detecció de la secreció d' Interferon- γ (IFN- γ) secretion era l'eina més comuna a l'hora de determinar l'eficàcia de qualsevol droga de nova generació contra la TB. L'IFN- γ està considerada com l'eina més important de la que l'home disposa per a lluitar contra la TB, pel que es el focus de la majoria d'assajos que es fan en recerca sobre aquesta malaltia. Tots els estudis preclínics de la vacuna RUTI® havien demostrat que aquesta es capaç de generar una resposta immune tipus cel·lular mesurable com a secreció d'IFN- γ [123, 126, 127, 140]. De la mateixa manera, s'havia usat en els pocs assajos clínics conduïts fins llavors amb vacunes antituberculosos [108-110]. En aquest sentit, a l'assaig de Fase 1 de RUTI® es varen fer servir assajos tant comercials (TSPOT TB i QuantiFeron-TB-Gold) com no comercials (TIGRA casolans) per dues tècniques: ELISPOT i ELISA, ja que avaluen dos conceptes diferents de la secreció d'IFN- γ [168-171]. Mentre que l'ELISPOT compta el nombre de cèl·lules secretores d'IFN- γ d'un total conegut de PBMC, l'ELISA valora el total d'IFN- γ en un volum específic de sang total. Incloent les dues tècniques intentàvem cobrir els dos aspectes a considerar de la secreció d'IFN- γ , ja que a dia d'avui encara no se sap quin es el millor mètode.

La raó per fer servir tant tests comercials com no comercials fou que els comercials, dissenyats per a diagnosticar la ITBL, estaven validats per a detectar les respostes a antígens de *M.tuberculosis* relacionats amb bacils en estat de creixement. De totes maneres, el *cut-off* per totes dues tècniques està posat per a diagnosticar la infecció, doncs no essent exactament vàlid per a avaluar les respostes cel·lulars ni a més antígens de *M.tuberculosis* ni per suposat en individus sans (no infectats) vacunats. Els tests no-comercials doncs varen ser inclosos per tal d'ampliar la caracterització de la resposta immune, buscant respostes a altres antígens tuberculosos (especialment aquells relacionats amb l'estat latent dels bacils), així com a PPD i a BCG, aquestes dues conegudes per ser estímuls potents de la resposta immune.

L'estudi de les poblacions de cèl·lules T per Citometria de Flux (FACS per Flow cytometry analysis software) es va dissenyar molt simple, únicament per a determinar si la vacuna era capaç d'augmentar les poblacions de cèl·lules T CD4 i CD8 o de CD4+CD25H, una subpoblació que en aquell moment s'havia relacionat amb l'activació i les funcions reguladores.

Dos dels tres estudis que es varen conduir a partir de la sang total es van basar en un article científic cadascun:

- L'estudi de la secreció d'IFN- γ per part dels limfòcits T $\gamma\delta$ es va basar en un paper publicat per Rojas et al a l'any 2005, anomenat "Vd2+ $\gamma\delta$ T Cell Function in

Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 Positive Patients in the United States and Uganda: Application of a Whole-Blood Assay” [172]. Aprofitant que els limfòcits T $\gamma\delta$ secreten IFN- γ en resposta a fosfoantígens com els de *M.tuberculosis*, es va decidir usar l’anàleg sintètic Bromohidrina pirofosfat (BrHPP, que ens va proveir gratuïtament l’empresa biofarmacèutica Innate Pharma de Marseille, França) per a reproduir l’experiment que aquest article descrivia. L’objectiu era avaluar si la vacunació amb RUTI® era capaç d’expandir aquesta subpoblació cel·lular i d’afavorir-ne la secreció d’IFN- γ en reconèixer aquest fosfoantigen.

- L’estudi de l’activitat micobactericida de la sang total es va basar en l’article “Bactericidal Activity in Whole Blood as a Potential Surrogate Marker of Immunity after Vaccination against Tuberculosis” publicat per Cheon et al [173]. Els autors hi suggerien que l’activitat de la sang total podia ser un marcador de la immunitat generada després de l’ús d’una vacuna antituberculosa, així que varem decidir reproduir-ne un dels experiments.
- Un tercer experiment a partir de la sang total, l’anomenat Memory Assay, també es va dissenyar usant la literatura, adaptant-ne els materials i mètodes. Aquest assaig pretenia testar els sobrenadants de la sang total per IFN- γ , després de cultivar-la amb PPD durant 7 dies, ja que aquesta resposta se suposa deguda únicament a les cèl·lules T de memòria [174].

Es va planificar l’obtenció de sèrum el mateix dia de cada extracció, i la seva congelació a -80°C per tal d’usar-lo en múltiples assajos amb la finalitat de detectar anticossos anti-*M.tuberculosis* i altres molècules:

- ELISA no comercials per a la detecció de la resposta humoral (anticossos tipus IgA, IgM i IgG anti-antígens de *M.tuberculosis*: ESAT-6, 16kDa, 38kDa i antigen 85B)
- PATHOZYME: test comercial per a avaluar la presència d’anticossos IgG contra els antígens 16kDa i 38kDa de *M.tuberculosis* a les mostres.
- Mycodot: *kit* comercial per a detectar anticossos IgG antiLAM de la micobactèria
- Procalcitonina (PCT): proteïna usada per a diferenciar infeccions bacterianes (amb valors de >0.5 ng/mL) i altres causes relacionades amb la resposta inflamatòria (valors <0.5 ng/mL).
- N α -Cbz-Lys-thiobenzylesteresterase (BLT-esterase): mol·lècula relacionada amb la defensa de l’hostatger contra les infeccions intracel·lulars i que determina l’activitat dels granzims [175]
- Granulisina: proteïna antimicrobiana secretada per les cèl·lules T, amb propietats antimicrobianes i antitumorals i que s’emmagatzema als granzims [176]

Alguns dels assajos varen implicar la col·laboració amb empreses i grups de recerca estrangers. Aquestes col·laboracions es detallen a continuació:

- Mostres de sang total de tots els voluntaris i alguns *timepoints* es varen enviar al Dr. Frédéric Altare (laboratori "Molecular Physiology of Mycobacterial Granulomas" del departament "Molecular Mechanisms of Mycobacterial Infections", de l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale de Toulouse, França) per tal de que n'avaluessin la cinètica de formació de granulomes. Això s'havia de fer comparant mida i velocitat de formació dels granulomes per cada individu, al llarg del temps, així com les diferències interindividuais, a partir de posar en contacte PBMCs aïllats de la sang total amb boles sintètiques recobertes d'extractes totals de *M.tuberculosis*. De la mateixa manera, a partir dels granulomes formats, s'esperava que es fessin una sèrie de tincions per estudiar els tipus cel·lulars i el seu nivell de diferenciació. Es va decidir enviar mostres dels dies 0 (per ser el basal), 7 (una setmana després de la primera inoculació), 28 i 35 (el dia de la segona inoculació i una setmana després) i a dia 168 (als 6 mesos, per ser el final de la participació dels voluntaris a l'assaig).
- Els assajos per a valorar la resposta humoral mitjançant ELISA no comercials es varen dur a terme amb la col·laboració de Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH (Braunschweig, Alemanya).
- El testatge dels sèrums per les BLT-esterase i Granulolysin, el van fer al laboratori del Pr. Francesco Dieli, from the Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche of the Palermo University (Italia).
- La PCT es va poder determinar gràcies a la col·laboració del Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

També es va decidir congelar a -80°C els romanents de mostres (PBMC, sobrenadants dels cultius i sèrum) i un tub PaxGene Blood RNA (Qiagen, referencia 762165) per cada *timepoint* i voluntari per tal de poder-los usar en un futur per a millor caracteritzar la resposta immune, el que després es va revelar important ja que durant l'assaig van aparèixer evidències de que altres marcadors podrien ser importants en la immunitat contra *M.tuberculosis* [177-179]. Totes les mostres es varen congelar etiquetades amb el codi de l'assaig (FA/MI/01), el número de voluntari i el *timepoint*, curosament desades en capsos també rotulades per assaig i dosi.

Durant el disseny i establiment de tècniques, es va donar el cas d'un assaig que es va considerar interessant i va ser inicialment inclòs i fins i tot realitzat durant la monitorització

dels voluntaris que varen participar al primer període, però desestimat en la resta de l'estudi per impossibilitat logística. Aquest assaig, anomenat ELISPOT CULTIVAT, va ser posat a punt amb un experiment molt senzill que es detalla a continuació, i tenia com a objectiu determinar la resposta immunològica de memòria enfront els antígens de *M.tuberculosis* mitjançant ELISPOT.

ELISPOT cultivat

Amb l'objectiu de comparar les cèl·lules T efectores de les de memòria secretores d'IFN- γ , es van reclutar 3 voluntaris infectats coneguts amb *M.tuberculosis*, per tal d'assegurar una resposta als estímuls.

Un total de 12 milions de PBMC frescos de cada voluntari (obtinguts a partir de tubs CPT (BD Vacutainer) es varen cultivar en plaques estèrils de 24 pous, a raó d'1 milió de cèl·lules per pou amb medi complet (MCC: L-glutamin-RPMI suplementada amb Sèrum Boví Fetal inactivat, Penicil·lina, Estreptomicina, Piruvat sòdic i 2-mercaptoetanol) sol (com a control negatiu) o amb estímuls (antígens de *M.tuberculosis*: ESAT-6, CFP-10, 16KDa, 19KDa, 38KDa i ag85B; PPD i BCG). Tots els estímuls es varen fer servir a les concentracions que s'havien decidit com a definitives per a l'assaig de Fase 1 (veure més endavant l'estudi per determinar concentració d'antígens): 10 μ L/mL de cada antigen i de PPD; 5 μ L/mL de PHA; i 2 \cdot 10⁶ bacils/mL de BCG. Les cèl·lules es varen incubar a 37°C en un ambient amb un 5% CO₂ durant 14 dies. La meitat del sobrenadant de cadascun dels cultius cel·lulars es va extreure als dies +4, +7 i +9 i reemplaçat amb MCC suplementat amb IL-2 (0,25ng/mL). Al 14^è dia, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb RPMI-L-Glutamina, i es van deixar en *resting* fins l'endemà. Al dia +15, els PBMCs viables es van tornar a rentar i es van comptar amb una cambra de Neubauer per tal de realitzar un ELISPOT, incubant les cèl·lules a 37° fins l'endemà amb medi complet sol (MCC), antígens de *M.tuberculosis*, PPD, BCG o PHA, segons l'estimulació inicial. L'endemà, la tècnica es va revelar segons protocol que ja s'havia posat a punt per a l'estudi de Fase 1, i que es detalla a l'apartat de materials i mètodes (veure més endavant).

A la figura n^o 15, es presenten els resultats obtinguts per als 3 voluntaris en quant a SFU/1 \cdot 10⁶ PBMC enfront de l'antigen de *M.tuberculosis* ESAT-6 i de PPD. Els resultats obtinguts enfront els altres estímuls usats foren molt similars a la resposta enfront ESAT-6. Els resultats evidenciaren una manera diferent de respondre de cada voluntari per tots els estímuls testats. En tots els casos, el voluntari 1 fou el qui obtingué una resposta de memòria més baixa, i era de qui se sabia que s'havia infectat més recentment (estava a l'últim mes del tractament profilàctic amb INH). Tanmateix i tot i les diferències entre els individus i la n tan petita, la resposta de memòria era evident i a més era quantificable mitjançant ELISPOT, el que ens va fer decidir a incloure aquest assaig a l'estudi de Fase 1.

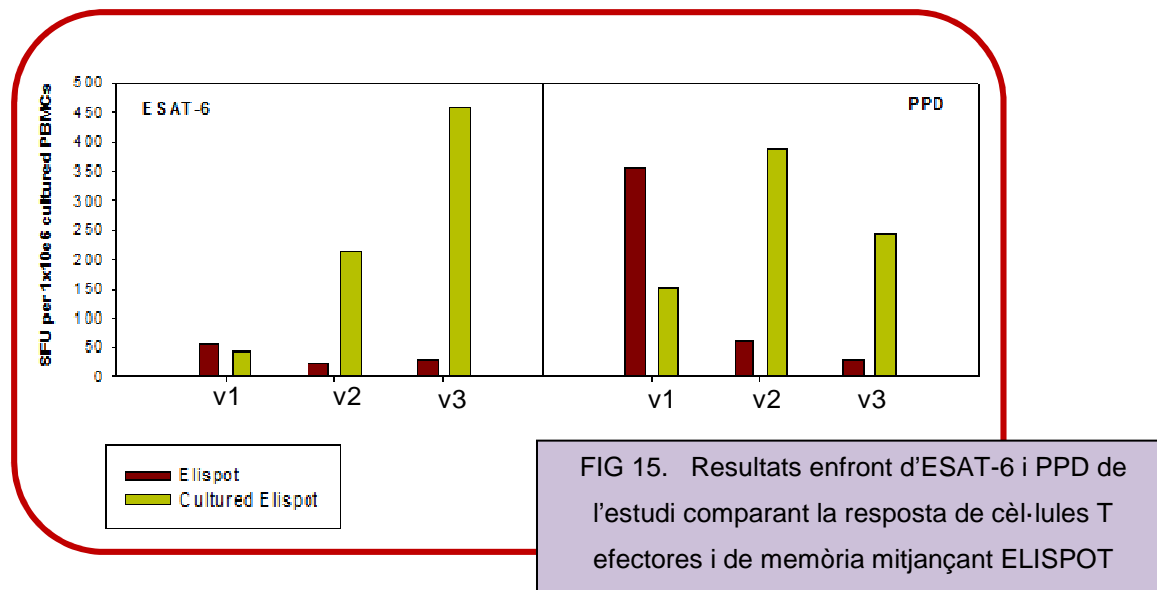


FIG 15. Resultats enfront d'ESAT-6 i PPD de l'estudi comparant la resposta de cèl·lules T efectores i de memòria mitjançant ELISPOT

Després, durant l'estudi, es va reproduir l'assaig amb l'objectiu determinar el número de limfòcits T de memòria secretors d'IFN- γ a partir d'un cultiu llarg (14 dies) d'un milió de PBMCs de cada voluntari amb o sense la presència de PPD, i la posterior restimulació amb PPD *overnight*. Un milió de PBMCs de cada voluntari es van incubar amb medi complet sol (control negatiu de la mostra), PPD (de l'SSI, Cf=10 μ g/mL), i PHA (Sigma-Aldrich, Cf=5 μ g/mL, com a control positiu de la tècnica); a 37° durant 14 dies. Al 14^e dia, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb RPMI-L-Glutamina, i es van deixar en *resting overnight*. Al dia +15, els PBMCs es van tornar a rentar i es van comptar amb una cambra de Neubauer per tal de separar 250.000 cèl·lules/mostra. Aquestes es van incubar a 37° *overnight*, amb medi complet sol (MCC), PPD (Cf=10 μ g/mL) o PHA (Cf=5 μ g/mL), segons l'estimulació inicial. L'endemà, la tècnica es va revelar segons el protocol d'ELISPOT explicat a l'apartat de Materials i Mètodes. La lectura i anàlisi de les taques o spots (SFU) es va fer mitjançant un lector d'ELISPOT (AID ELISPOT Reader ELR02) i el software T-SPOT analyzer (OxfordImmuntotec), i els resultats es varen interpretar i avaluar segons els protocols esmentats. Aquest assaig només es va realitzar en els primers 6 voluntaris que es van incloure a l'estudi de Fase 1, els corresponents al primer període. Del total de 36 mostres originals que calia treballar, només es va poder arribar a completar un 30% de les determinacions, ja que en la majoria de vegades, després d'un cultiu tan llarg no es va arribar a aconseguir les cèl·lules necessàries (250.000 PBMCs) que calien per a fer l'ELISPOT en búsqueda de les cèl·lules T memòria secretores d'IFN- γ . És per això que, tenint en compte la inversió de temps i recursos en aquest assaig i la poca rentabilitat que vàrem obtenir es va decidir, de cares als pròxims nivells de dosi, no fer-lo més. Per aprofitar el material adquirit, vam decidir substituir-lo pel T-SPOT TB (el *kit* comercial d'ELISPOT d'OxfordImmuntotec), tècnica robusta que detecta els limfòcits T efectors secretors d'IFN- γ

després de l'estimulació durant 24 hores de 250.000 PBMCs de cada voluntari amb els antígens ESAT-6 i CFP-10 de *M.tuberculosis*.

Per aquest motiu, l'ELISPOT cultivat ja no es menciona a l'apartat de Materials i Mètodes, i per a no induir a error no s'ha inclòs en el llistat final de tècniques per a avaluar la immunogenicitat que es varen dur a terme.

5.2.3. Organització de l'assaig

Study Day	baseline		days of follow-up					
	0	7	21	28	35	56	112	168
RUTI/placebo inoculation	x			x				
Sampling for Immunogenicity assays	x	x	x	x	x	x	x	x

FIG 16. Dies d'avaluació de la Immunogenicitat

Els dies d'avaluació de la immunogenicitat al llarg dels 6 mesos que cada voluntari participava a l'assaig que es varen planejar es presenten a la figura nº16, i es varen incloure al al protocol de l'estudi en forma de taula (representada aquí com a taula nº6) [167]. L'execució de tots els assajos implicaven l'extracció d'un total de 65mL de cada voluntari per dia d'avaluació d'immunogenicitat, que es recol·lectaven abans que cap procediment es realitzés (per tal de no influir-ne els resultats). La sang es recollia directament en els tubs destinats a aquesta fi i ja prèviament etiquetats amb el codi de l'assaig, el número de voluntari i el *timepoint*, per tal de mantenir el doble cec. Els tubs extrets (que es duïen al laboratori abans de que haguessin passat 30 minuts) foren les següents:

- 2 tubs CPT BD Vacutainer, de 8 ml cadascun, per a aïllar PBMC
- 3 tubs diferents del QuantiFeron TB-Gold Assay In-tube Method (tubs QuantiFeron Mitogen, nil i TBA tubes, d'1mL cadascun)
- 2 tubs secs (BD Vacutainer plain tubes, de 10 ml cadascun) per a separar el sèrum
- 4 tubs amb Heparina Sòdica (Sodium Heparin BD Vacutainer, de 6ml cadascun, per als assajos a partir de sang total
- 1 tub PAXgene tube (de 3 mL)

	Selección (días -14 a -1)	Período de estudio											
		Pre 1ª dosis	1ª d o s i s	Post 1ª dosis				Pre 2ª dosis	2ª d o s i s	Post 2ª dosis			
				2	3	4	5			6	7	8	9
Visita	S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Día	S	0	1	3	7	21	28	29	31	35	56	112	168
Semana	-2--1	1			2	4	5			6	9	17	25
Información al voluntario, Consentimiento informado	X												
Historia clínica	X												
Criterios inclusión/exclusión	X	X											
Constantes vitales	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Examen físico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Serología (HIV, VHB, VHC)	X												
Radiología tórax	X												
ECG	X						X				X		X
Medicación concomitante	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Pruebas de laboratorio	X	X			X	X	X			X	X	X	X
Extracción muestra inmunogenicidad		X			X	X	X			X	X	X	X
Extracción muestras seguridad laboratorio		X			X	X	X			X	X	X	X
Administración RUTI o placebo			X					X					
Valoración punto punción			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AA	Esponánea / por observador												
	Después de pregunta	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

TAULA 6. Monitoring Plan presentat al protocol de l'assaig i exemplificant totes les accions a dur a terme.

Les variables d'immunogenicitat que es varen decidir d'avaluar están representades a la taula nº7, així com les tècniques que finalment es varen decidir incloure (taula nº8). Les extraccions per a l'avaluació de la immunogenicitat es varen planificar sempre en dilluns, perquè la feina s'allargava durant tota la setmana, tal com es mostra a la figura 17. Un cop decidides les tècniques, la majoria de les que es pretenia fer servir per a valorar la immunitat cel·lular (ELISPOT, QTF-CM) implicaven l'ús de diferents estímuls. Si bé utilitzats prèviament a la literatura, no existia una unificació ni en l'origen ni en les concentracions a fer servir dels mateixos. Això ens va empènyer a dissenyar uns experiments senzills per a avaluar quines concentracions s'haurien de fer servir durant l'assaig dels estímuls que ja havíem decidit usar. Aquests experiments es detallen a continuació.

List of Immunogenicity variables

1.-Assessment of Cellular Immune response

ELISPOT assay: number of specific-IFN-g secreting cells among the stimulated PBMC for each stimulus used

ELISA assay: IU/mL of IFN-g secreted by the stimulated Whole Blood for each stimulus used

measurement of Cell populations, by Flow Citometry Analysis: % CD4+CD3+; % CD3+CD8+; %CD3-CD8+; %CD4+CD25High

2.1 - Study of T gd lymphocytes

IU/mL of IFN-g secreted by by gd T cells

2.2 - Study of the Mycobactericidal ability of the whole blood

Δ log CFU at 72h; Δ log CFU at 96h

2.3 -Memory Assay

IU/mL of IFN-g secreted by memory T cells

3.- Assessment of Humoral response & Studies from sera.

PATHOZYME assay:U/mL of IgG antibodies against 16kDa and 38kDa antigens of M.tuberculosis

Mycodot assay:presence of IgG antiLAM of mycobacteria

PCT assay:ng/mL of PCT in serum

BLT-esterase assay: activity of granzymes in terms of mOD

Granulolysin assay: ng/mL of granulolysin

TAULA 7. Llistat de variables de l'avaluació de la immunogenicitat

Immunogenicity Assessments

List of Immunogenicity Assays performed	Units used to report results
<u>1.-Assessment of Cellular Immune response</u>	
<p>by ELISPOT assay (measurement of the number of IFN-g secreting cells among the the stimulated PBMC)</p> <p style="text-align: center;"><u>commercial ELISPOT: TSPOT TB</u> Cellular response against to: ESAT-6 CFP-10</p> <p style="text-align: center;"><u>non-commercial ELISPOT:</u> <u>Cellular response against to:</u> PPD BCG vaccine <i>M.tuberculosis</i> antigens: ESAT-6, CFP-10, 16kDa, 38kDa, 85B, hsp65, MPT64, 19kDa</p>	SFU/1·10e6 PBMC
<p>by ELISA assay (measurement of the total amount of IFN-g secreted by the stimulated Whole Blood)</p> <p style="text-align: center;"><u>commercial ELISA: QuantiFeron TB Gold Assay</u> Cellular response against to a mixture of: ESAT-6 CFP-10 TB 7.7</p> <p style="text-align: center;"><u>non-commercial ELISA:</u> <u>Cellular response against to:</u> PPD BCG vaccine <i>M.tuberculosis</i> antigens: ESAT-6, CFP-10, 16kDa, 38kDa, 85B, hsp65, MPT64, 19kDa</p>	IU/mL
<p>measurement of Cell populations, by Flow Citometry Analysis</p> <p>by determining: CD4+; CD3+CD8+; CD3-CD8+;CD4+CD24High</p>	% of the specific population among the total of PBMC
<hr/>	
<u>2.1.- Study of T gd lymphocytes by detection of IFN-g secretion by gd T cells</u>	
	IU/mL
<u>2.- Whole Blood studies</u>	<u>2.2.- Study of the Mycobactericidal ability of the whole blood</u>
	Δlog CFU at 72h; Δlog CFU at 96h
	<u>2.3.-Long-term whole blood assay</u>
	IU/mL
<hr/>	
<u>3.- Assessment of Humoral response & Studies from sera.</u>	Evaluation of the production of different kind of antibodies against <i>M.tuberculosis</i> antigens or measurement of different molecules in sera
	U/mL; ng/mL; mOD

TAULA 8. Llistat de tècniques finalment incloses a l'avaluació de la immunogenicitat

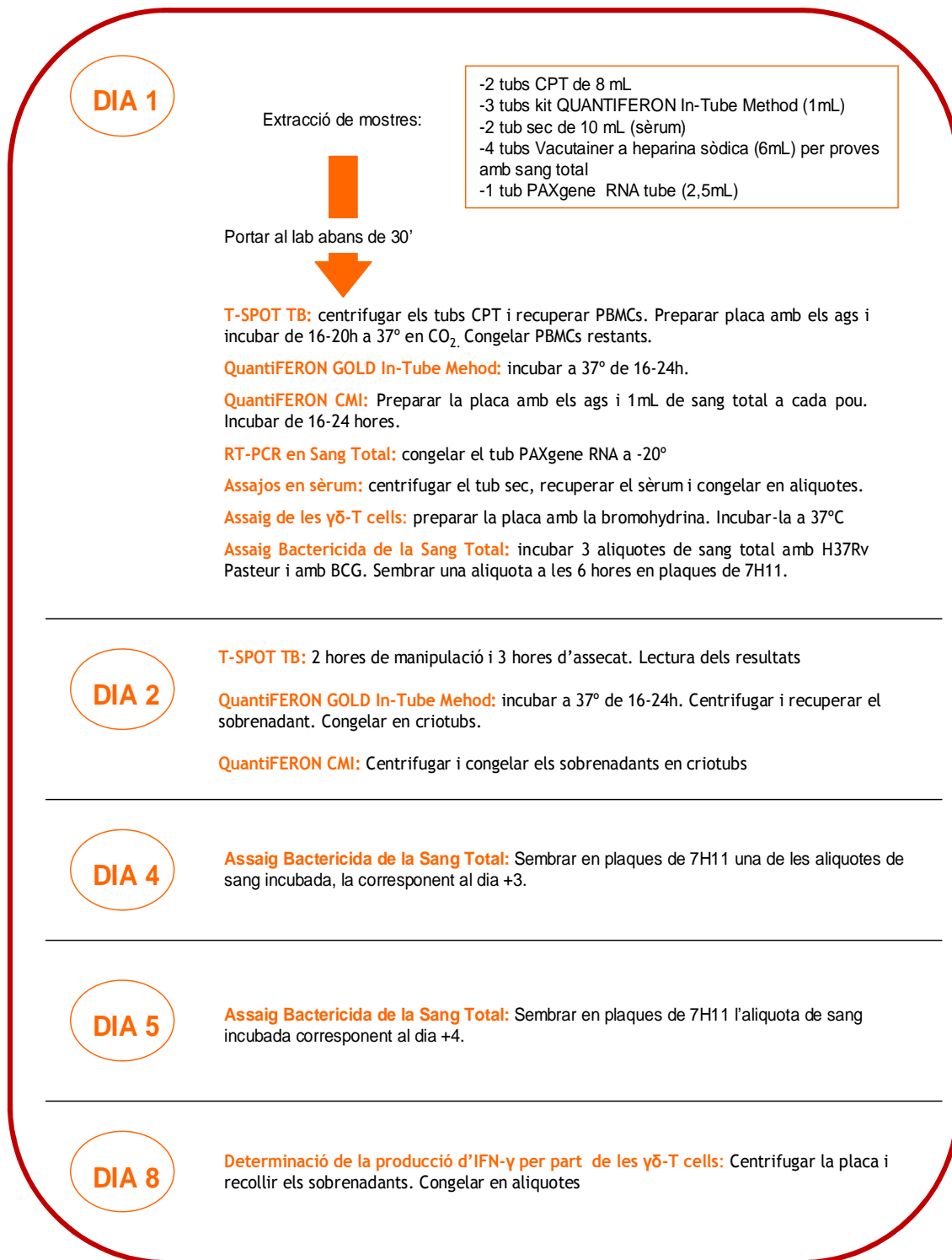


FIG 17. Organització de la feina una setmana tipus en què el dilluns s'extreien mostres per a l'avaluació de la immunogenicitat durant el seguiment de l'assaig.

5.2.4. Materials i mètodes del projecte

Un cop decidides les tècniques que es durien a terme, i després de posar-les a punt, es varen redactar els materials i mètodes de cadascuna en format de procediments específics

d'acord amb les SOP (*Standard Operating Procedures*) a la manera determinada per la ICH, per tal de complir tots els requisits que Archivel Farma S.L. ens poguessin exigir per a certificar l'excel·lència del treball de cares als requeriments regulatoris. Un d'aquests procediments es presenta d'exemple com a annex (10.4). Amb la mateixa finalitat, es varen dissenyar fulls de treball tant per l'*screening* com per cada dia de l'assaig, on s'anotaven totes les accions que es feien sobre les mostres de cadascun dels voluntaris per cada un dels dies de seguiment (que es presenten com a annex 10.5); així com un resum de protocols de treball que hauria de servir de manual de laboratori (annex 10.6), on figuren tots els materials i mètodes esquemàticament. Totes les mostres que es varen manipular al llarg de tot l'assaig es varen rotular amb unes etiquetes que es varen dissenyar amb l'objectiu de mantenir el doble cec i tenir-les control·lades, on amb el codi de l'assaig es marcaven el número de voluntari, el *timepoint* i la tècnica a la que estaven destinades.

A continuació es detallen els materials i mètodes que es varen fer servir per les diferents tècniques incloses.

Posada a punt de les tècniques. Optimització de les concentracions d'estímuls

Aquest estudi tenia objectiu determinar la concentració d'estímuls més correcta a usar bàsicament en les proves casolans d'ELISPOT i QTF-CMI durant l'assaig. Es varen reclutar 4 voluntaris infectats coneguts amb *M.tuberculosis*, per tal d'assegurar una resposta als estímuls. Els protocols que es van fer servir de cadascuna de les tècniques foren els que ja s'havien posat a punt per a l'estudi de Fase 1, i que es detallen més endavant. Breument, 3 milions de PBMC de cada voluntari es varen plaquejar a raó de 250.000 cèl·lules per pou en plaques de T-SPOT TB, i en el cas del QTF-CMI la sang total heparinitzada es va disposar en plaques estèrils de 24 pous a

TAULA 9. Llistat i característiques dels estímuls que es varen usar a l'assaig de Fase 1 així com a tots els experiments

raó d'1mL/pou. Les mostres es varen estimular segons el disseny de l'estudi, incubant-les durant unes 20 hores a 37°C i un 5% de CO₂. L'endemà es va procedir a realitzar l'ELISPOT segons el protocol i després de centrifugar les plaques del QTF-CMI, se'n varen recollir els sobrenadants. Després d'un mínim de 24 hores congelades a -20°C, les mostres de plasma es varen

Antigen	Recombinant/ Natural	Manufacturer
PPD	Natural	SSI
ESAT-6 (Rv3875)	Recombinant	Lionex
CFP-10 (Rv3874)	Recombinant	Lionex
16 kDa (Rv2031c)	Recombinant	Lionex
19 kDa (Rv3763)	Recombinant	Lionex
MPT64 (Rv1980c)	Recombinant	Lionex
Ag85B (Rv1886c)	Recombinant	Lionex
38 kDa (Rv0934)	Recombinant	Lionex
Hsp65 (Rv 0440)	Recombinant	Lionex
BCG	Natural	Pfizer

testar per la secreció d'IFN- γ mitjançant un ELISA.

Els estímuls que es varen assajar foren tots els que s'havien planejat per a ser usats a l'estudi de Fase 1 (també mateixa casa comercial i mateix lot): antígens de *M.tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, 16KDa, 19KDa, 38KDa, ag85B, HSP65 i MPT64), tots comprats a Lionex Diagnostics & Therapeutics GmbH); BCG Danish (Pfizer) i PPD (Statens Serum Institut SSI). Ja que es pensava usar com a control positiu, també es va incloure la Fitohemaglutinina PHA-L (PHA) (Sigma-Aldrich,). La taula n^o 9 mostra les característiques dels estímuls usats (amb els noms Rv dels diversos antígens de *M.tuberculosis*).

Tots els estímuls es varen testar a 3 concentracions finals diferents: els antígens de *M.tuberculosis*, la PPD i la PHA-L a 5, 10 i 20 μ g/mL; la vacuna BCG (reconstituïda amb medi AIM-V) a: 2x10⁵, 2x10⁶ i 2x10⁷ UFC/mL. Independentment de la tècnica utilitzada, els resultats varen revelar una resposta immunològica mesurada amb la secreció d'IFN- γ enfront als estímuls incrementada en el voluntari del que es coneixia haver-se infectat més recentment en el temps, el que era esperable. Si comparades les respostes per antígens, en totes les situacions excepte en el cas de la PHA-L, no hi havia dosi-resposta: la resposta no era sempre proporcional a un increment en la concentració final de l'estímul. Malgrat això, la conclusió final que es podia extreure dels resultats era que la concentració final de 10 μ g/mL semblava la més estable independentment de l'estímul usat. En el cas de la PHA, les tres concentracions que es varen provar donaven una resposta similar, el que ens va empènyer a escollir la dosi més baixa testada (5 μ g/mL) per considerar-la suficient i més cost-efectiva.

Maneig de mostres

Amb l'objectiu de distribuir les mostres sanguínies dels voluntaris arribades procedents de la Unitat de Fase 1 per tal de processar-les, tant durant l'*screening* com durant l'assaig, es va acordar:

-A l'*screening*

extreure un sol tub CPT, destinat a obtenir PBMCs per a fer un T-SPOT TB

-durant la monitorització d'immunogenicitat durant l'assaig clínic a dies 0, 7, 21, 28, 35, 56, 112 i 168 de cada dosi a assajar, de la següent manera:

- 2 tubs Cell Preparation Tube (CPT) per a obtenir PBMCs, destinats a FACS, ELISPOT, T-SPOT TB, i en cas de sobrar, que serien congelats.
- 2 tubs SST II Advance, destinats a aconseguir sèrum segons el procediment.
- 3 tubs del *kit* QUANTIFERON In-Tube Method, per a la prova del QUANTIFERON In-Tube Method.
- 4 tubs Vacutainer amb heparina sòdica per a obtenir sang total heparinitzada, destinada a QUANTIFERON-CMI, WB BACTERICIDA, l'assaig de les $\gamma\delta$ TCELLS, i la prova de memòria.

- 1 tub PAXgene, per a ser congelat immediatament a -20°C i destinat a possibles futures proves de biologia molecular.

Amb la finalitat de que els tubs per a immunogenicitat arribessin en les millors condicions possibles a la UTE, les recomanacions per a la seva extracció i mantenció es varen subministrar a infermeria de la Unitat de Fase 1 (Figura 18).

TUBS	PROCEDIMENT
tubs CPT	Invertir suaument de 8 a 10 vegades (Mesclar-los vigorosament pot causar hemòlisis). Mantenir els tubs en posició vertical i a T^{a} ambient.
tubs SST II Advance	Invertir els tubs unes 5 vegades, després deixarlos cap per munt a T^{a} ambient
tubs kit QUANTIFERON In-Tube Method	Mantenir els tubs a T^{a} ambient
tubs Vacutainer amb heparina sòdica	Invertir suaument els tubs de 5-10 vegades. Mantenir els tubs a T^{a} ambient, invertint-los de tant en tant.
tub PAXgene	Aquest hauria de ser l'últim tub a extreure. Cal aguantar-lo vertical per sota del braç del voluntari mentre duri l'extracció. Invertir-lo de 8 a 10 vegades. Deixar-lo cap per amunt a a T^{a} ambient.

FIG 18. Recomanacions d'extracció i mantenció dels tubs destinats a les proves d'immunogenicitat fins a arribar a a la UTE.

Tècniques a partir de PBMC aïllats de sang perifèrica

L'obtenció de cèl·lules mononuclears es va fer mitjançant l'extracció de 16mL de sang total perifèrica directament en un total de 2 tubs BD Vacutainer CPT de 8mL (BD Vacutainer; Ref. 362782). Els tubs es varen processar seguint les recomanacions de la casa comercial. Breument, es varen centrifugar a $1600g$ durant 30' a temperatura (T^{a}) ambient i posteriorment es va recollir el núvol de limfòcits que quedava en un pla just sota del plasma (veure figura 19). Els PBMC es varen

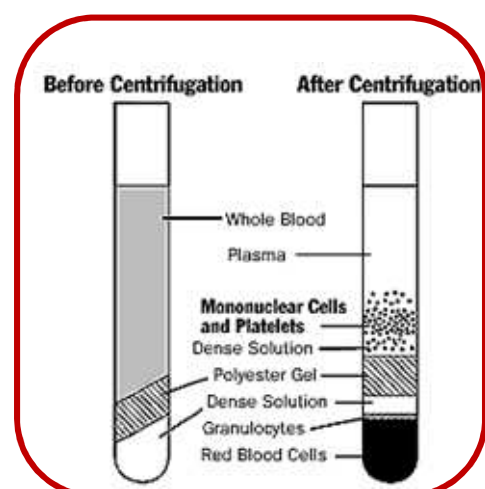


FIG 19. Continguts dels tubs CPT abans i després de la seva centrifugació

rentar dues vegades amb medi RPMI-L-Glutamina (Gibco) i varen ser finalment resuspesos en medi AIM-V (Gibco). Les cèl·lules vives es varen recomptar amb l'ajut d'una cambra de Neubauer un cop tenyida una mostra diluïda a un mig amb una solució de Blau Tripà al 0,4% (Sigma). El número de cèl·lules viables totals de la mostra, així com el volum a destinar a les diferents tècniques en funció de les cèl·lules necessàries per a la seva execució, es varen calcular mitjançant un document excel·lent específicament dissenyat per a aquest ús.

Citometria de flux (FACS)

Aquesta tècnica tenia per objectiu determinar el percentatge dels limfòcits T CD4+ i CD8+ sobre el total de PBMCs de les mostres, per tal de valorar el possible tipus de resposta immune generada enfront de la vacuna RUTI® al llarg del temps; així com determinar-ne el percentatge dels limfòcits T CD4+ CD25H, considerant el CD25H un marcador de cèl·lules T reguladores. Un total d'1 milió de PBMC es varen tenyir amb una mescla de suspensió de FACS buffer amb els anticossos següents: CD8 PE (BD Pharmigen. Ref. 555635), CD4 FITC (BD Pharmigen. Ref. 555346), CD25 APC (BD Pharmigen. Ref 555434), i CD3 PerCP (Biosciences. Ref 345766). El FACS buffer es va preparar suplementant PBS (BioMérieux. Ref 75511) amb Sèrum Boví Fetal a l'1%, estèril i filtrat. Els anticossos es varen fer servir tots a l'1% excepte el CD25 APC, que es va usar al 20%. Després dels rentats necessaris, els resultats es varen adquirir en un citòmetre FACScalibur (BD) i varen ser analitzats amb el software CellQuest-Pro (BD), i representats com a % sobre el total de PBMCs. Es varen considerar invàlids tots els resultats -a criteri meu- en que els plots no corresponien, si les poblacions no estaven ben definides o si el control negatiu fallava.

ELISPOT i T-SPOTTB

L'objectiu d'aquestes tècniques era determinar el número de limfòcits T secretors d'IFN- γ després de l'estimulació de 250.000 PBMC de cada voluntari amb diversos antígens de *M.tuberculosis*, PPD o BCG, com a valoració de la Resposta Immune Cel·lular enfront de *M.tuberculosis*; així com determinar si aquesta resposta es veu influenciada per la inoculació de la vacuna RUTI®.

Amb l'objectiu de realitzar l'ELISPOT *homemade*, un total de 3 milions de PBMC de cada voluntari es varen dispensar en plaques estèrils de 96 pous de fons en U (Nunclon Surface), a raó de 250.000 cèl·lules per pou. Després d'un rentat es varen ressuspendre amb medi amb els estímuls corresponents i es varen traspasar en el mateix ordre a una placa de T-SPOT TB (OxfordImmunitec, UK). A la figura nº 20 es presenta com es distribuïen les mostres a les plaques de T-sPOT TB.

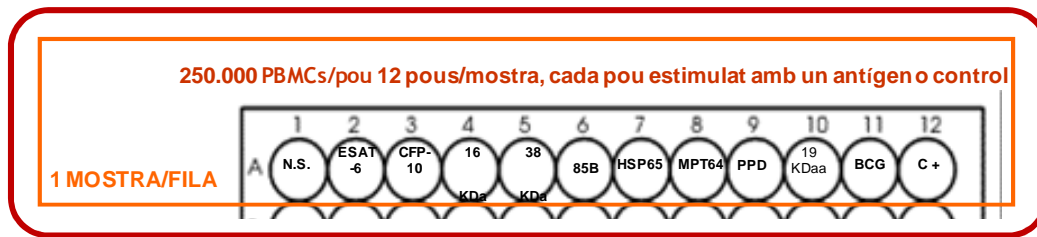


FIG 20. Distribució de les mostres de cada voluntari a les plaques de T-SPOT TB per a l'assaig d'ELISPOT *homemade*

El medi AIM-V amb estímul es preparava amb unes hores d'antelació en criotubs o ependorfs -degudament rotulats- que es guardaven a la nevera fins al seu ús.

Els estímuls que es varen fer servir foren: antígens de *M.tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, 16 kDa, 38 kDa, 85B, hsp65, MPT64 i 19KDa, tots comprats a Lionex Diagnostics & Therapeutics GmbH); BCG Danish (Pfizer) i PPD (Statens Serum Institut SSI). Com a control positiu, les cèl·lules es varen estimular amb PHA-L (Sigma), com a control negatiu es varen deixar cèl·lules sense estimular. Les concentracions finals d'ús dels estímuls foren les següents: de cada antígen i de PPD: 10µL/mL; de PHA: 5µL/mL; BCG: 2·10⁶ bacils (reconstituïnt el vial amb 500 µL de medi AIM-V).

Per al T-SPOT TB (tècnica comercial i validada), 1 milió de PBMC es va dispensar a la placa de T-SPOT TB, a raó de 250.000 cèl·lules/100µL/pou, i es varen estimular segons les indicacions de la casa comercial, amb els antígens i controls positiu i negatius subministrats en el *kit* (antígens ESAT-6 i CFP-10 de *M.tuberculosis*, i PHA) .

Les plaques de T-SPOTTB (amb pous recoberts amb un anticòs monoclonal murí contra la citocina IFN- γ humana) es cultivaven de 16 a 20 hores amb les mostres en una estufa a 37°C i amb un 5% de CO₂, després de les quals l'assaig d'ELISPOT es feia seguint les recomanacions de la casa comercial (OxfordImmunitec, UK). Breument, després de quatre rentats amb PBS estèril, la placa es tenyia amb una solució de reactiu conjugat amb un anticòs secundari (anticòs monoclonal murí contra la citocina IFN- γ conjugada amb fosfatasa alcalina) i es deixava una hora en fred. Després de 4 rentats més, la solució substrat BCIP/NBT^{plus} s'afegia i es deixava revelar un màxim de 7 minuts, després dels quals la reacció es parava amb aigua destil·lada i la placa es deixava assecar a la foscor i a T^a ambient.

La lectura i anàlisi de les taques o spots (SFU) es va fer mitjançant un lector d'ELISPOT (AID ELISPOT Reader ELR02) i el software T-SPOT analyzer (OxfordImmunitec). Si un pou de control positiu tenia menys de 20 SFU, es varen considerar tots els resultats per aquell individu i dia com a invàlids. Si el control negatiu tenia més de 20 SFU, també es varen invalidar els resultats. Els resultats finals es varen obtenir de restar els valors obtinguts amb els pous no-estimulats dels obtinguts amb els pous estimulats amb els antígens. En el cas

de la prova comercial (T-SPOT TB) els resultats es varen registrar com a positiu/negatiu en funció de les instruccions de la casa comercial (Positiu>6 SFU en com a mínim un dels pous estimulats amb els antígens), així com de forma quantitativa.

Congelació de PBMC sobrrs

Els PBMC sobrrs es varen congelar en nitrògen líquid per tal de disposar de cèl·lules dels voluntaris per si calguessin per a experiments futurs. Per a això els PBMC es resuspenien en medi de congelació preparat amb sèrum boví fetal i dimetilsulfòxid (DMSO) (Merck, a una proporció de 10:1) ajustant la concentració a un màxim de $10 \cdot 10^6$ PBMCs/mL. Després de mantenir-los en un *stratacooler* (Cryo preservation module, 32 standard cryovials, Stratagene; nº catalog: 400005) durant 24 hores, els criotubs es congelaven definitivament en nitrogen líquid. En cas de necessitar-los, estava previst de descongelar-los en un bany a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per a posteriorment rentar-los amb RPMI-L-glutamina, per tal d'eliminar el DMSO, i comptar-ne les cèl·lules viables mitjançant una cambra de Neubauer.

Tècniques a partir sang total

QuantIFeron TB-Gold In Tube Method (QTF-G)

La quantitat d'IFN- γ secretat després de l'estimulació de la sang total dels voluntaris amb una mescla de 3 antígens de *M.tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7) mitjançant aquesta tècnica es va fer servir per tal de valorar la Resposta Immune Cel·lular enfront de *M.tuberculosis*, i determinar si aquesta resposta es veia influenciada per la inoculació de la vacuna RUTI®. Amb aquesta finalitat, a cada *timepoint* es varen extreure 3mL de sang de cada voluntari en 3 tubs diferents del QTF-G (Cellestis): el de control positiu, el de control negatiu (tub Nil) i el que porta els antígens de tuberculosi (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7). Els tubs es varen incubar així que va ser possible de 16 a 20 hores en una estufa a 37°C . L'endemà, els tubs es centrifugaven a 1600g durant 10 minuts per tal d'aconseguir el plasma, que era congelat a -80°C fins a la realització de l'ELISA per a la detecció d'IFN- γ mitjançant el *kit* d'ELISA del *kit* de QTF-G (Cellestis). Totes les mostres de tots els voluntaris d'un mateix període estimulades per un mateix antigen es varen testar a la vegada, per tal de tenir el menor error possible.

Les mostres i les dilucions de l'*standard* d'IFN- γ humà recombinant subministrat en el *kit* es dispensaven diluïdes $\frac{1}{2}$ amb una solució d'anticòs anti-IFN- γ humà conjugat amb HRP i sèrum de ratolí normal en una placa amb pous recoberts amb anticòs monoclonal murí anti-IFN- γ humà. Després de 2 hores d'incubació la placa es rentava amb una solució de rentat, s'afegia als pouets la solució d'enzim substrat també subministrada amb el *kit* i es deixava 30 minuts més per tal de revelar la reacció, la que es parava amb una solució que contenia

H₂SO₄ 0,5M. La Densitat Òptica (DO) de cada pou de la placa es llegia en els 5 minuts següents, utilitzant el filtre de 450nm amb un filtre de referència de 620nm.

A partir d'una recta patró construïda amb els valors de la corba *standard*, es varen obtenir els valors d'IFN- γ (en IU/mL) de totes les mostres. Per a validar-los, es varen seguir les recomanacions de la casa comercial, que venien descrites al *kit*.

Els resultats finals de l'assaig es varen calcular restant el valor d'IFN- γ obtingut en el plasma dels tubs de sang no estimulada (tubs Nil) del valor obtingut al plasma de les mostres estimulades amb els antígens de *M.tuberculosis* (tubs TBA). En usar un *kit* comercial, els resultats es varen registrar com a positiu/negatiu en funció de les instruccions de la casa comercial ($\geq 0,35$ IU/mL), així com de forma quantitativa.

QuantiFeron CMI

A banda de l'ús d'una tècnica comercial, l'IFN- γ secretat després de l'estimulació de la sang total dels voluntaris amb diversos estímuls (antígens de *M.tuberculosis*, PPD i BCG) també es va valorar mitjançant aquesta tècnica. Un total de 12mL de sang total heparinitzada de cada voluntari es va dispensar a raó d'1mL/pou en plaques estèrils de 24 pous (Nunclon Surface for cell culture, Ref. 142475). Els estímuls que es varen fer servir foren els mateixos que a l'assaig de l'ELISPOT *homemade* i en les mateixes concentracions, i es varen afegir als pous corresponents. Les plaques es varen incubar de 16 a 20 hores a 37°C, després de les quals es varen centrifugar a 1600g durant 10' i se'n varen recollir els sobrenadants, que es varen congelar a -80°C fins a la realització de l'ELISA per a la detecció d'IFN- γ mitjançant el *kit* d'ELISA QTF-CMI (Cellestis). El protocol d'ús del *kit* és exactament igual que el del *kit* d'ELISA QTF-G, excepte per a les dilucions del *standard* que es fan servir.

A partir d'una recta patró construïda amb els valors de la corba *standard*, es varen obtenir els valors d'IFN- γ (en IU/mL) de totes les mostres. Per a validar-los, es varen seguir les recomanacions de la casa comercial, que venien descrites al *kit*.

Els resultats finals de l'assaig es varen calcular restant el valor d'IFN- γ obtingut en el plasma dels pous no-estimulats del valor obtingut al plasma de les mostres estimulades amb els diferents antígens de *M.tuberculosis*, PPD o BCG. Si el valor obtingut amb el mitògen menys el del no-estimulat era de < 0.1 IU/mL, i en el cas de no haver obtingut resposta amb aquella mostra estimulant-la amb els antígens, s'invalidava el resultat.

Prova de memòria

L'objectiu d'aquest assaig era determinar l' IFN- γ secretat després de l'estimulació llarga (7 dies) de la sang total dels voluntaris amb PPD, considerant que serà deguda a les cèl·lules T de Memòria, valorant la possible influència de la inoculació de la vacuna RUTI®.

Amb aquesta finalitat, a cada extracció la sang de cada voluntari es va diluir 1:4 amb RPMI 1640 suplementat amb 20 mmol/L HEPES, 100 U/mL de penicil·lina i 100 mg/mL d'estreptomicina; i es va posar a incubar -durant 7 dies a 37°C- sola (com a control negatiu), estimulada amb PPD (Cf=10µg/mL), i amb PHA (Cf=5µg/mL, com a control positiu de la tècnica). El plasma es va recollir al vuitè dia després de centrifugar les plaques, i es va congelar a -80° fins que se'n va fer la determinació d'IFN- γ mitjançant ELISA -el que es va fer usant el *kit* d'ELISA de QTF-CMI (Cellestis) i el protocol descrit al QTF-CMI. Les mostres obtingudes a totes les extraccions es varen treballar juntes per cada període, per tal d'anul·lar qualsevol variació interdia possible.

A partir d'una recta patró construïda amb els valors de la corba *standard*, es varen obtenir els valors d'IFN- γ (en IU/mL) de totes les mostres. Els resultats finals de l'assaig es van calcular restant el valor d'IFN- γ obtingut en el plasma dels pous no-estimulats del valor obtingut al plasma de les mostres estimulades amb PPD, i es varen interpretar segons les recomanacions descrites al protocol del QTF-CMI.

Assaig de les cèl·lules T $\gamma\delta$

La finalitat d'aquesta tècnica consistia en valorar l'activació de les cèl·lules T $\gamma\delta$ determinant-ne l'IFN- γ secretat per elles després de l'estimulació llarga (7 dies) de la sang total dels voluntaris amb BrHPP. Aprofitant la capacitat d'aquestes cèl·lules per reconèixer petits fosfoantígens microbians –com alguns antígens de *M.tuberculosis*- s'ha utilitzat un anàleg sintètic (BrHPP) per a valorar la seva activació, i comparar les possibles diferències entre els voluntaris i interdia de cada voluntari.

Per això, a cada dia d'extracció, la sang total heparinitzada de cada voluntari es va diluir 1:10 amb RPMI 1640 suplementat amb 20 mmol/L HEPES, 100 U/mL de penicil·lina i 100 mg/mL d'estreptomicina; i es va posar a incubar -durant 7 dies a 37°C- amb IL-2 (Cf=0,25ng/mL) sola (com a control negatiu), i amb IL-2 més BrHPP (proveïda amablement per Jean-Luc Barnoux, de l'empresa marsellesa Innate Pharma, a una concentració final de 50 µM).

El plasma es va recollir al vuitè dia després de centrifugar les plaques i es va congelar a -80° fins que se'n va fer la determinació d'IFN- γ mitjançant ELISA (QTF-CMI, Cellestis).

Les mostres obtingudes a totes les extraccions de cada període es varen treballar juntes, per tal d'anul·lar qualsevol variació interdia possible. A partir d'una recta patró construïda amb els valors de la corba *standard*, es varen obtenir els valors d'IFN- γ (en IU/mL) de totes les mostres. Els resultats finals de l'assaig es van calcular restant el valor d'IFN- γ obtingut en el plasma dels pous estimulats només amb IL-2 del valor obtingut al plasma de les mostres estimulades amb IL-2 i BrHPP. D'aquesta manera, es considerava que el valor obtingut era la resposta específica de la funció de les cèl·lules $\gamma\delta$, ja que s'eliminava la

resposta deguda a les cèl·lules T CD4+(estimulada per l'IL-2, present a tots 2 pous de cada mostra). Els resultats finals es varen interpretar segons les recomanacions descrites al protocol del QTF-CMI.

Valoració de la capacitat micobactericida de la sang total

Aquesta tècnica es va fer servir per a determinar la capacitat micobactericida de la sang total de cada voluntari, posant-la en cultius de diferent durada amb la soca de *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur i amb BCG Danish (Pfizer).

A cada dia planejat d'extracció es va recollir sang heparinitzada de cada voluntari i un total de 6mL es va posar a cultivar a 37° (diluida 1:2 en RPMI-L-glutamina) juntament amb $2 \cdot 10^4$ bacils de soca H37Rv o BCG, durant 6 (*timepoint* 0), 72 (dia+3) o 96 hores (dia+4). A cada *timepoint*, es va afegir aigua destil·lada a cada pou, per tal de trencar els hematies, i després de 10 minuts, el contingut es va sembrar en plaques d'agar 7H11 (BD), a raó de 2 plaques per cada dilució, fent 3 dilucions (0, -1 i -2). Les Unitats Formadores de Colònies o UFC/mL es varen comptar al cap d'un mes i mig de la sembra.

Els resultats es calculaven segons la fórmula:

$$\Delta \log_{10} \text{CFU} = \log_{10} (\text{UFC } \textit{timepoint} \text{ final}) - \log_{10} (\text{UFC a } \textit{timepoint} \text{ 0})$$

obtenint 2 valors per cada mostra: la capacitat bactericida a les 72 i a les 96 hores.

Tècniques a partir del sèrum

A partir de sang total perifèrica el sèrum es va recuperar amb la finalitat de millorar la caracterització de la possible influència de la vacuna RUTI® sobre la resposta immune.

A cada dia d'extracció, les mostres de sang total de cada voluntari recollides en 2 tubs Vacutainer secs (BD) es varen centrifugar i el sèrum obtingut es va al·licuar en 5 criotubs (criotubs Nunc. Ref 347627) a raó d'1mL/criotub i la resta de volum es va repartir en 2 criotubs més. Totes les mostres es varen congelar (degudament etiquetades) a -80°C, fins al seu processament o el seu enviament.

Els assajos per a valorar la resposta humoral mitjançant ELISA no comercials a partir de sèrum es varen dur a terme amb la col·laboració de Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH (Braunschweig, Alemanya), i amb aquesta finalitat se'ls va enviar una mostra de cada voluntari i *timepoint* al final de l'estudi.

Una altra de les al·licotes de cada voluntari i *timepoint* es va enviar al final de l'assaig de Fase 1 al laboratori del Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche of the Palermo University (Italia) per a que en determinessin la BLT-esterase (com a mesura de l'activitat dels granzims) i els nivells de granulisina en sèrum.

Els resultats tant dels ELISA que es varen fer a Alemanya com de les determinacions fetes a Itàlia se'ns van enviar en forma de dades crues, que vaig analitzar a la UTE i van ser tractades estadísticament.

A la UTE mateixa es varen fer diverses determinacions mitjançant el sèrum dels voluntaris, totes al finalitzar l'assaig, les quals es detallen a continuació.

Procalcitonina (PCT)

La PCT es va poder determinar gràcies a la col·laboració del Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Es va usar el *kit* comercial PCT sensitive de BRAHMS (Alemanya) segons les recomanacions de la casa comercial. Basat en un sistema d'assaig immunofluorescents automàtics, les mostres de sèrum humà es varen testar per procalcitonina amb l'aparell KRYPTOR (BRAHMS) i els resultats obtinguts es varen analitzar segons les especificacions del Servei de Microbiologia de l'Hospital.

Mycodot

Aquesta tècnica tenia per objectiu la detecció d'anticossos IgG anti- lipoarabinomannà de la micobactèria (LAM) en mostres de sèrum per a l'avaluació d'una possible malaltia tuberculosa i es va fer amb el *kit* comercial Mycodot (Mossman Associates), seguint les instruccions de la casa comercial. Breument, el test Mycodot usa antigen LAM lligat a una mena de pintes de plàstic. En incubar les pintes en el sèrum diluït durant un total de 6 minuts, si en aquest hi havia presència d'anticossos anti-LAM s'esperava que s'uníssin a l'antigen. Després les pintes es rentaven per a eliminar els anticossos no específics i s'incubaven 10 minuts en una suspensió de partícules colorants que s'uneixen als anticossos anti-LAM prèviament units a l'antigen. La quantitat d'anticossos anti-LAM circulants presents en el sèrum determinarien la intensitat del color que apareixeria en forma de botó a la punta corresponent de la pinta. Per determinar el resultat de cada mostra es va posar la pinta en una superfície amb fons blanc per comparar millor les intensitats de color de cada reacció amb la pinta de referència que es proveïa amb el *kit*. Un spot colorejat més intensament que el spot menys positiu de la pinta de referència es considerava una reacció positiva, seguint les recomanacions de la casa comercial. A la figura 21 es mostren un dels passos a seguir durant la tècnica (A) i la pinta de referència proveïda amb el *kit* per a la interpretació dels resultats (B).

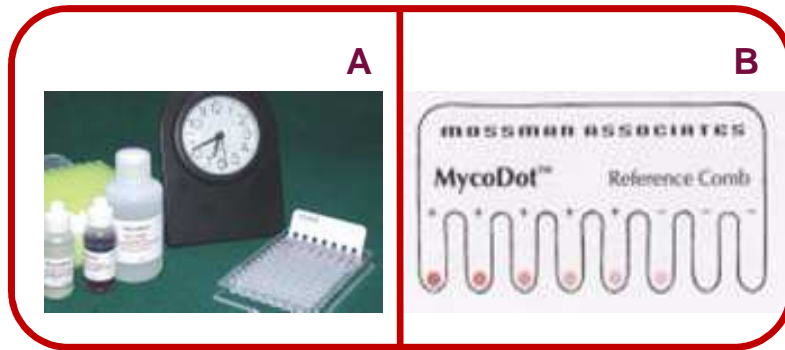


FIG 21. A representa una de les fases durant el protocol de l'assaig del Mycodot, i a B es presenta la imatge de la pinta de referència per a poder interpretar els resultats

Pathozyme

L'objectiu d'aquest assaig fou determinar els anticossos IgG contra els antígens de 16 i 38 kDa de *M.tuberculosis* complex en el sèrum dels voluntaris mitjançant un *kit* comercial d'immunoassaig enzimàtic (EIA per *Enzyme-Immunoassay*) anomenat Pathozyme. El protocol que es va seguir fou el recomanat per la casa comercial. Les mostres es varen distribuir en plaques microtitrades amb pouets a la superfície dels quals prèviament s'havien fixat proteïnes de 16 i 38 kDa recombinants. D'existir anticossos específics, aquests s'unirien als antígens dels pous, tot el material inespecífic essent posteriorment eliminat en els rentats. Després de la incubació amb un anticòs conjugat que s'unia a la unió antigen-anticòs, les mostres es varen tractar amb un substrat (Tetramethyl Benzidine o TMB), el que generava color si hi havia presència d'anticossos anti-antígens 16 i 38 de *M.tuberculosis* complex. Després de parar la reacció amb àcid sulfúric diluït, l'absorbància es mesurava a 450nm. Per a donar resultats qualitius es varen considerar els *cut-offs* proveïts pel *kit*, considerant una mostra negativa si <200 U/mL, positiva dèbil amb valors d'entre 200 i 450 U/mL, i positiva si >450 U/m. Per a donar els resultats de forma quantitativa (en U/mL, ja que no hi ha unitats internacionals per a aquest test), aquests es varen calcular a partir d'una recta patró construïda amb els valors de la corba *standard*. Els resultats es varen validar i interpretar segons les recomanacions del *kit* comercial.

Mètodes estadístics

Ja que no existeix cap *cut-off* per a aquestes tècniques no-validades i únicament de recerca, es va considerar suficient una diferència estadísticament significativa ($p < 0.05$) entre els diferents grups de tractament per a demostrar la superioritat de RUTI® sobre placebo o d'una de les dosis de la vacuna sobre les altres. Considerant 5 grups de tractament (5, 25, 100 i 200µg de FCMtb, i placebo), s'han comparat entre ells tant en termes de variabilitat

respecte els resultats basals (obtinguts el dia 0); el seu canvi entre *timepoints* i la seva evolució al llarg de tot el període de seguiment. L'anàlisi estadístic es va encarregar al Laboratori de Bioestadística i Epidemiologia (LBE) de la Universitat Autònoma de Barcelona /Alternative Hypothesis Association (H1), liderat pel Dr. Ferran Torres. Els resultats es varen expressar com a mitges i desviacions standard (SD), freqüències i percentatges (%). Tots els anàlisis corresponents a les variables per a avaluar la immunogenicitat es varen fer amb la població anomenada "per protocol", que són tots els individus randomitzats que complien els criteris de selecció, varen rebre la medicació en estudi corresponent i no varen presentar desviacions majors del protocol. Els criteris per a la definició de la població en estudi es varen establir abans de començar l'assaig. Les variables d'immunogenicitat es varen avaluar usant el que s'anomena Mixed Models for Repeated Measurement (MMRM) approach [180], incloent la dada del baseline com una covariant i establint la matriu variança covariança en no-estructurada. El test exacte de Fisher es va fer servir per a comparar variables categòriques. Donada la natura exploratòria d'aquest estudi de Fase 1, no es varen fer ajustos de multiplicitats. Totes les anàlisis (excepte el del testatge dels sèrums per anticossos anti-antígens de *M.tuberculosis* per part de Lionex) es varen fer usant el software SAS versió 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) i el nivell de significació es va establir en 0,05 per totes dues bandes. Els resultats dels ELISA *homemade* que varen fer a Alemanya (Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH) per a detectar anticossos anti-antígens de *M.tuberculosis* ens els varen entregar un cop l'anàlisi estadístic ja estava tancat, pel que vàrem decidir aplicar-los un test T-Student mitjançant el software Graphpad Prism 5 (de GraphPad Software, USA).

5.3. EXECUCIÓ I RESULTATS OBTINGUTS

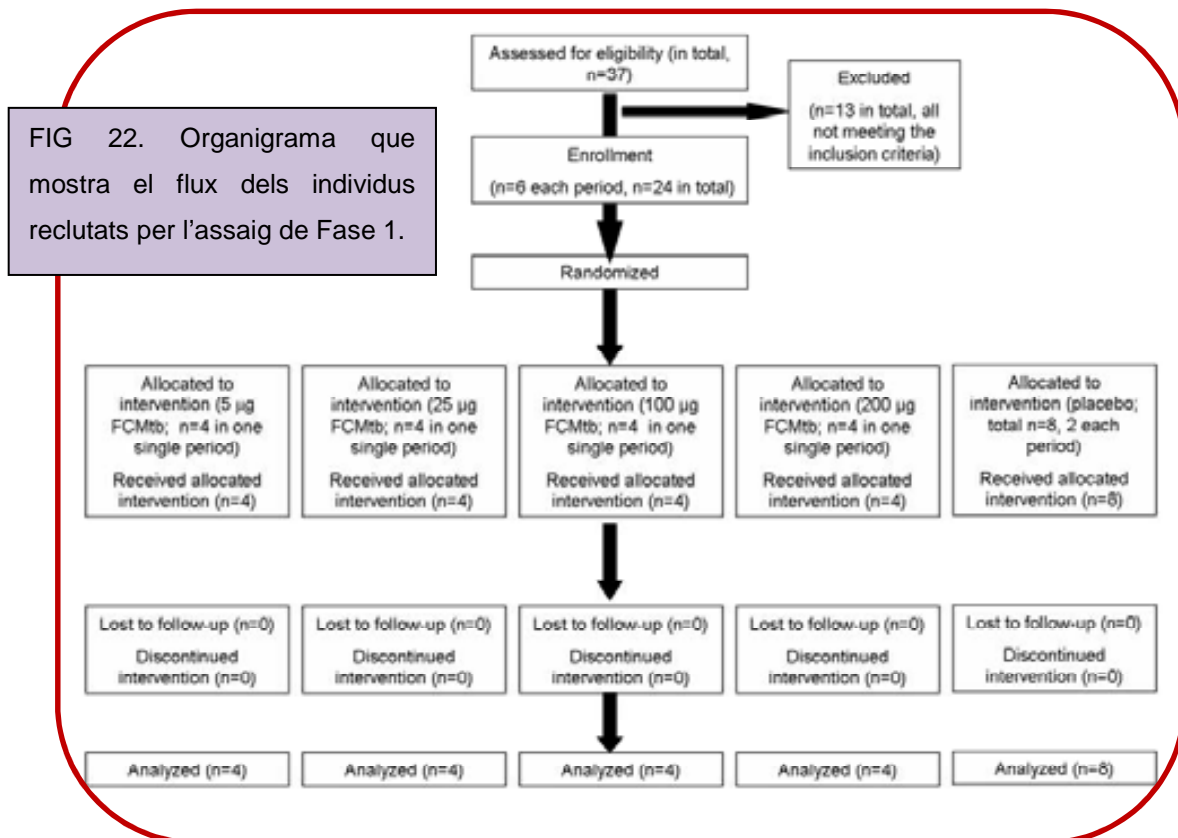
5.3.1. Reclutament i seguiment de participants

L'assaig clínic va durar 14 mesos (431 dies en total), des del dia que el primer voluntari es va reclutar fins que l'últim va acabar. Després

"An ounce of practice is better than a ton of theory" [3]

d'entrevistar un total de 65 nois durant tot l'estudi, només de 37 se'n va poder avaluar l'elegibilitat, fet degut majoritàriament a historials previs d'al·lèrgies. L'*screening* es va fer en 4 fases en els 15 dies abans de començar cadascun del període de l'assaig, ja que d'aquesta manera es preveia assegurar que els voluntaris finalment inclosos acomplien els criteris. Precisament, durant l'*screening* encara es varen excloure 13 individus per no complir-los: en 1 es va detectar *sinechia pleuralis* a la placa Rx de tòrax, 1 tenia un índex de massa corporal superior als valors acceptats, a 1 se li va detectar bradicàrdia al ECG, 1 mostrava trombocitopènia, 1 era consumidor habitual de cannabis, 1 havia sigut vacunat prèviament amb BCG, 2 tenien antecedents d'al·lèrgia, 2 presentaven respostes positives al

T-SPOT TB, i 3 foren exclosos per raons personals. Cadascun dels 24 voluntaris finalment inclosos es va enrolar en un sol període de l'assaig, el grup de cada període compost de 4 voluntaris vacunats amb una determinada dosi de RUTI® i 2 amb placebo (l'assignació essent randomitzada). Tal com s'ha esmentat abans, els 4 períodes es varen començar de manera seqüencial, de manera d'augmentar la dosi de FCMtb assajada sense comprometre la seguretat dels participants. Tal com s'indica a la figura 22 tots els voluntaris (24/24) varen rebre la intervenció assignada, es varen poder seguir i varen acabar l'estudi, els seus resultats podent ésser subseqüentment analitzats. No es va registrar cap desviació del protocol de l'assaig.



Cada voluntari va ser vacunat dues vegades amb la medicació que li havia estat assignada (RUTI® o placebo) i es va seguir durant 6 mesos. No hi va haver cap pèrdua en el seguiment ni en cap moment es va descontinuar el tractament, cap voluntari es va haver de retirar de l'estudi ni cap va decidir de fer-ho voluntàriament. El resultat va ser que les dades de tots 24 (24/24) es varen poder analitzar al final de l'assaig, sense la necessitat de trencar el doble cec abans de temps (figura 20).

5.3.2 Característiques clíniques i demogràfiques basals

Les característiques demogràfiques i clíniques basals dels 24 individus que finalment es varen incloure a l'assaig estan representades a la taula 10. Ni l'anamnesi ni les exploracions

físiques a les que es varen sotmetre els voluntaris durant l'*screening* varen mostrar cap anormalitat clínicament significativa. Els registres electrocardiogràfics i les anàlisis de sang varen ser considerats normals. Tot valor que s'escapava del rang considerat normal pel laboratori va ser avaluat pels investigadors i considerat com a clínicament no significatiu per a l'assaig.

Parameter	Mean	SD	95% CI	Units
Age	24.08	3.46	22.62-25.55	years
Weight	72.60	10.56	68.14-77.06	kg
Height	1.78	0.06	1.76-1.81	m
Body Mass Index	22.57	2.45	21.54-23.61	kg/m ²
Systolic blood pressure	115.50	8.73	111.81-119.19	mmHg
Dyastolic blood pressure	64.83	6.79	61.97-67.7	mmHg
Cardiac frequency	64.25	10.66	59.75-68.75	bpm
Corporal temperature	36.23	0.45	36.04-36.41	grades centigrades

TAULA 10. Característiques demogràfiques i clíniques dels voluntaris de l'assaig, amb les seves corresponents SD, Intervals de Confiança (IC) del 95% i Unitats.

5.3.3. Assajos per a l'avaluació de la immunogenicitat

Tots els voluntaris que complien requisits per participar a l'estudi i es varen enrolar es varen poder incloure en l'avaluació de la immunogenicitat. Alguns dels resultats obtinguts varen ser invalidats i conseqüentment no inclosos en l'anàlisi final que varen dur a terme els estadístics. A mesura que es generaven resultats, eren validats per mi mateixa, que els excloïa si existien incongruències en el desenvolupament de la tècnica o no complien les recomanacions dels fabricants (en cas de ser *kits* comercials), tot recollint-ho als fulls de treball que es varen crear específicament per a l'assaig de Fase 1.

Aquests valors perduts no es varen imputar a l'anàlisi estadístic, i el corresponent el mètode usat per a dur-lo a terme (el *Mixed Models for Repeated Measurement approach*) assegurava que no interferíssin. Per a cadascuna de les variables, el valor del dia 0 va ser considerat com a valor basal. Les variables que s'especificaven com a "canvis respecte el valor basal" es varen calcular tant com a diferències absolutes com relatives. Les diferències absolutes es varen computar com a diferències entre el valor basal i els valors posteriors a cada *timepoint*. Els canvis relatius respecte el valor basal es definien com a: (valor a cada *timepoint* - el valor basal)*100/ valor basal.

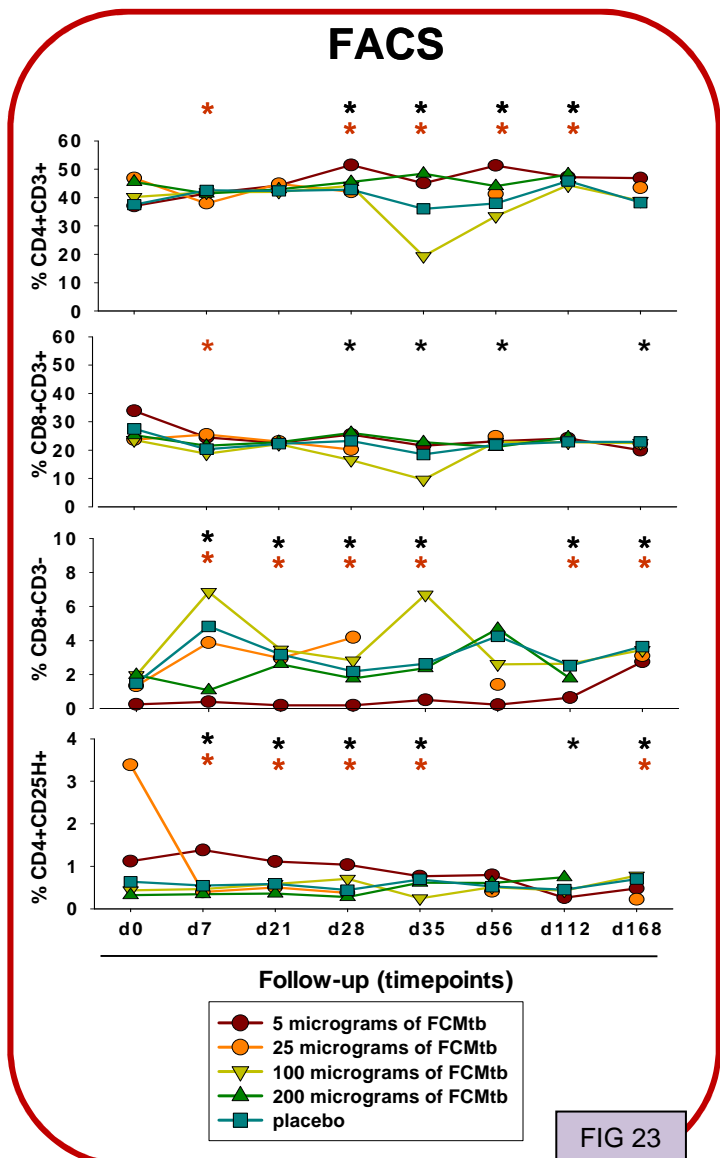
A final de cada dosi, vaig entregar els resultats generats i validats per al seu anàlisi estadístic, el que no es va fer fins al final de l'assaig i que va comportar un document de més de 1000 pàgines on figuraven la descripció de tots els resultats en forma de llistats. Amb la finalitat de simplificar la comprensió dels mateixos, es presenten a continuació un resum dels resultats obtinguts per tècniques (amb la dada de si es varen trobar diferències estadísticament significatives), així com la seva representació gràfica. A les figures, l'anàlisi estadístic que es mostra es limita a mostrar les diferències entre els grups: l'asterisc marca quan es varen trobar diferències estadísticament significatives entre els grups de dosi (en negre) o entre algun dels grups de RUTI® i placebo (en vermell).

Tècniques a partir de PBMC aïllats en sang perifèrica

FACS

En termes de % de sub poblacions de cèl·lules T, la vacunació amb RUTI® va augmentar-les, tal com s'esperava arrel dels estudis conduïts en animals durant el desenvolupament preclínic. Si bé discret en la majoria de casos, en alguns es fàcilment recognoscible com aquest increment està directament relacionat amb les dues inoculacions, especialment per la població CD4+CD3+ (dosis de 5 i 200µg de FCMtb) i per la de CD8+CD3- (dosi de 100µg de FCMtb). A la figura 23 es mostren les mitges dels voluntaris de cada grup i la seva evolució al llarg del temps.

Es varen trobar diferències estadísticament significatives dels grups respecte els seus valors basals (CD4+CD3+, CD8+CD3+, CD8+CD3-), interdia (CD8+CD3+), entre els diferents grups de tractament per se (CD4+CD3+, CD8+CD3-, CD8+CD3-) i segons la seva evolució en el temps (CD4+CD3+, CD8+CD3-, CD4+CD25H).

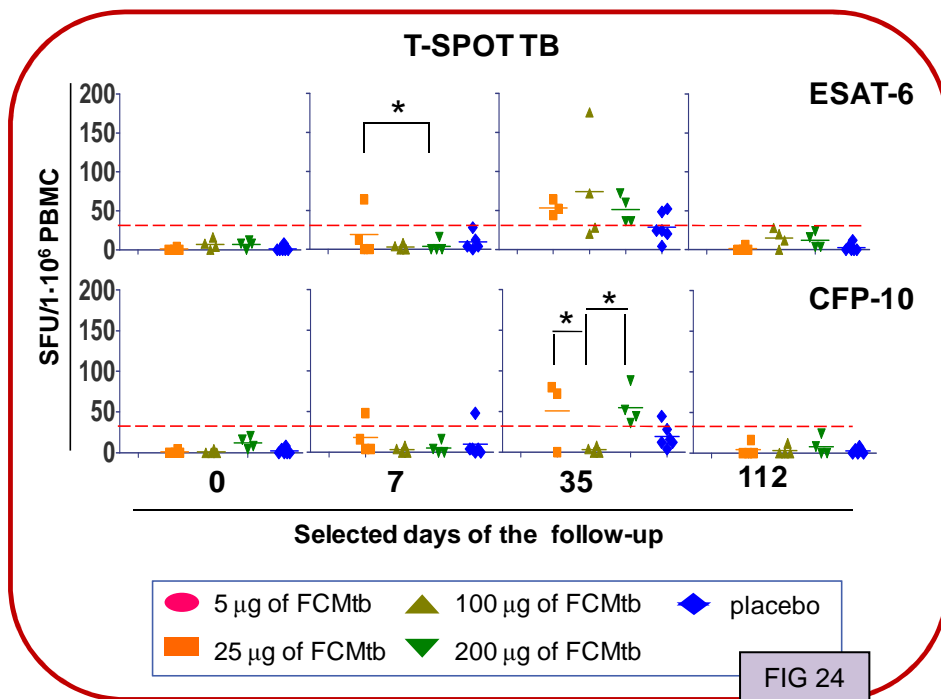


T-SPOT TB

Recordem que aquesta tècnica no es va fer servir en l'avaluació de la immunogenicitat generada per la primera dosi de RUTI® que es va testar (5µg de FCMtb) ja que va ser inclosa en el segon període i següents per a substituir la prova de l'ELISPOT cultivat.

Totes les dosis de la vacuna testades varen demostrar ser capaces de generar una resposta enfront els antigens de *M.tuberculosis* quan mesurada amb el *kit* comercial T-SPOT TB (figura 24). La resposta enfront ESAT-6 fou evident per les tres dosis després de la segona inoculació i va ser major per la dosi de 100µg de FCMtb. La tendència fou a disminuir a partir dels nivells assolits a dia 35, una setmana després de la segona vacunació, tot i que per les dues dosis superiors (de 100 i 200µg de FCMtb) encara varen tornar a repuntar a la mesura que es va fer durant l'últim *timepoint* del seguiment (dia 168).

La resposta enfront CFP-10 va ser en general menor, només evidenciable després de la segona inoculació i ràpidament va revertir.



A la gràfica s'ha marcat en línia discontinua vermella el *cut-off* que la casa comercial estableix per a determinar la positivitat de la tècnica (24 SFU/1·10⁶ PBMC). Si bé hi va haver 2 individus vacunats amb placebo que varen generar nivells de cèl·lules secretores d'IFN- γ enfront ESAT-6 (i 1 d'ells també per CFP-10) superiors al *cut-off* marcat per la casa comercial, aquest fet només va passar en un dels *timepoints* (d35), i tal com mostra la gràfica la mitja del grup es va mantenir sempre en aquest punt o per sota. Es varen trobar diferències estadísticament significatives dels grups respecte els seus valors basals i interdia. En quant a les diferències entre els grups se'n varen detectar diverses en quant a la

seva evolució en el temps, i a dia 21 i 28 (dades no mostrades) la dosi de 100µg de FCMtb va ser diferent respecte el placebo en quant a la seva resposta a ESAT-6.

ELISPOT

La resposta a PPD i BCG va ser clarament dosi-relacionada, amb la dosi de 25µg de FCMtb assolint uns nivells discretament augmentats sobretot a partir de la segona inoculació, i els millors resultats obtinguts amb les dosis més altes (100 i 200µg de FCMtb), arribant a valors d'entre 300 i 500 SFU/1·10⁶ PBMC. La resposta als antígens individuals de *M.tuberculosis* evidentment va ser més baixa, realment poca per les dosis de 5 i 100µg de FCMtb i remarcable per les de 25 i 200µg (arribant a nivells de més de 150 SFU/1·10⁶ PBMC), que a més varen ser les que varen aconseguir una resposta més poliantigènica. Gairebé no es varen arribar a detectar respostes a CFP-10 i MPT64, i l'antigen contra el que es varen registrar més cèl·lules secretores d'IFN-γ fou l'antigen 85B.

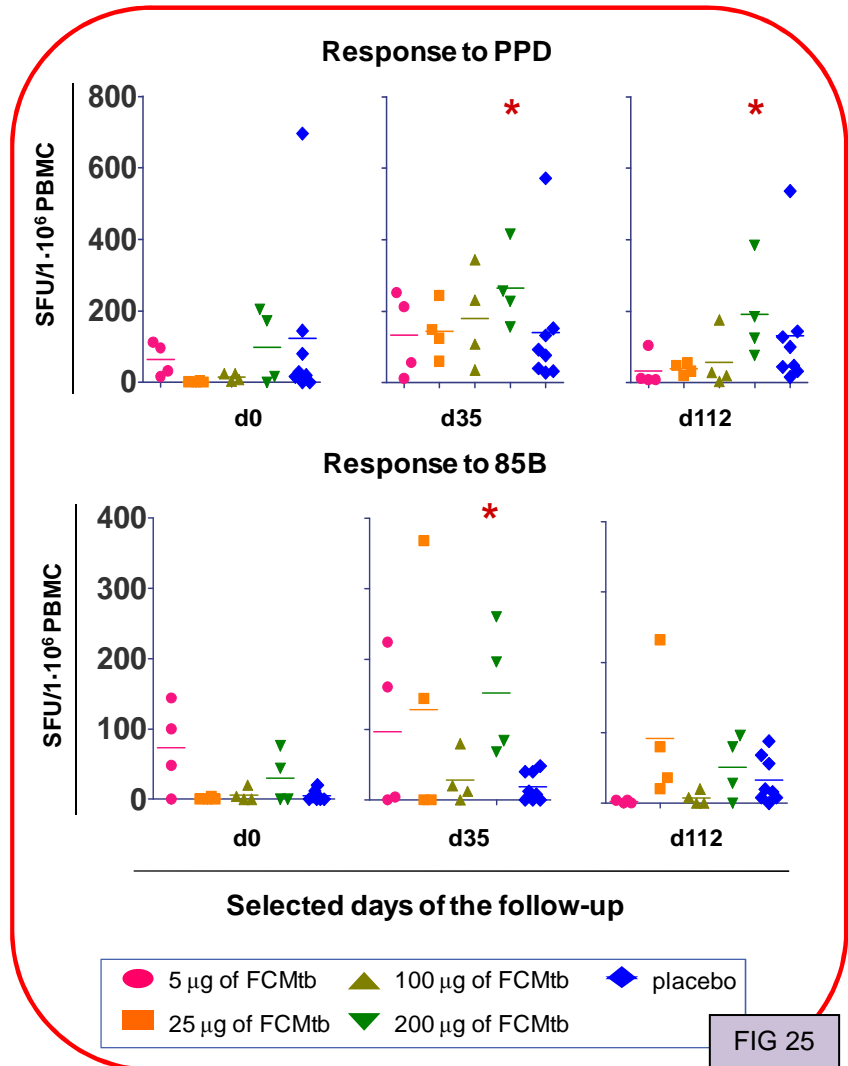
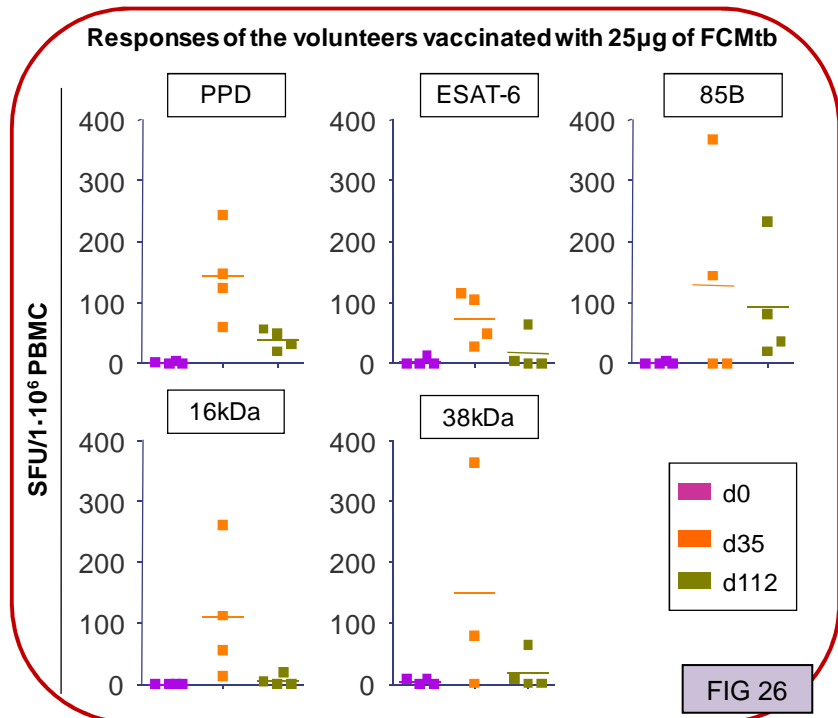


FIG 25

En quant a la seva evolució, aquestes respostes varen generar-se escassament a dia 7 (una setmana després de la primera inoculació), es varen incrementar substancialment una setmana després de la segona (dia 35) i van decréixer lleugerament fins a desaparèixer en alguns casos (respostes enfront 16kDa i hsp65) però sovint mantenint-se fins a l'últim *timepoint* del seguiment (resta d'estímuls).

A la figura 25 es mostren les respostes de tots els grups de tractament obtingudes enfront a PPD i a antigen 85B a dies seleccionats, i a la figura 26 els resultats només de la dosi de 25µg de FCMtb a diversos estímuls, per tal de demostrar-ne la seva poliantigenicitat.

L'anàlisi estadístic va revelar moltes diferències: dels grups respecte els seus valors basals en pràcticament tots els estímuls (PPD, BCG, CFP-10, 16kDa, 38kDa, 19kDa & hsp65), interdia (BCG, ESAT-6, 85B & 19kDa) i entre els grups de tractament respecte la seva evolució en el temps (BCG, 16kDa, 38kDa, 19kDa, hsp65 & 85B). Cal destacar les diferències estadísticament significatives que es varen trobar entre alguns dels grups i



el placebo, que en molts casos es varen mantenir en el temps: la dosi de 200µg de FCMtb enfront PPD (dies 28, 35 i 112) i enfront BCG (de dia 21 en endavant, durant la resta de l'assaig); i especialment el cas de les respostes enfront 85B, que a dia 35 varen mostrar totes els grups de voluntaris vacunats amb RUTI® excepte amb la dosi de 100µg de FCMtb, i que pels grups de dosi de 25 i 200 µg de FCMtb també es varen mantenir fins a l'últim *timepoint*.

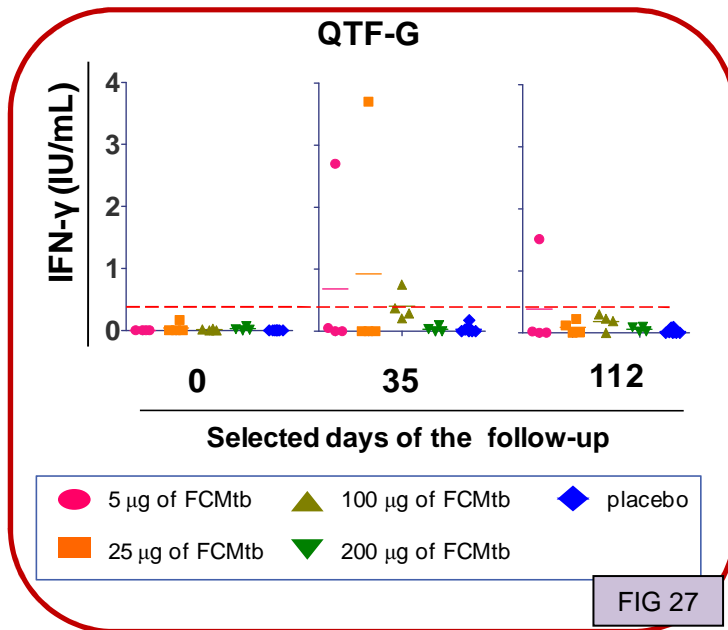
Estudi de formació de granulomes

Les mostres de sang dels voluntaris varen ser enviades als dies corresponents del seguiment a l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse. Malauradament els resultats encara no han estat analitzats i a dia d'avui encara no se'ns han entregat, raó per la qual no es poden presentar. De totes maneres, no s'exclou publicar-los en un futur.

Tècniques a partir sang total

QuantiFeron TB-Gold In Tube Method (QTF-G)

Totes les dosis de RUTI® testades varen aconseguir augmentar la secreció d'IFN-γ enfront els antígens de *M.tuberculosis* inclosos en el *kit* (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7) en diferent grau, mentre que el placebo no. És remarcable que les dosis de 5 i 200µg de FCMtb foren les que van obtenir respostes més altes, les mitges dels voluntaris dels seus grups superant en 3 casos el *cut-off* recomanat per la casa comercial (0,35 IU/mL, representat a la gràfica n° 27



amb la línia discontinua en vermell). No es varen trobar diferències significatives de cap tipus entre els grups en l'anàlisi estadístic.

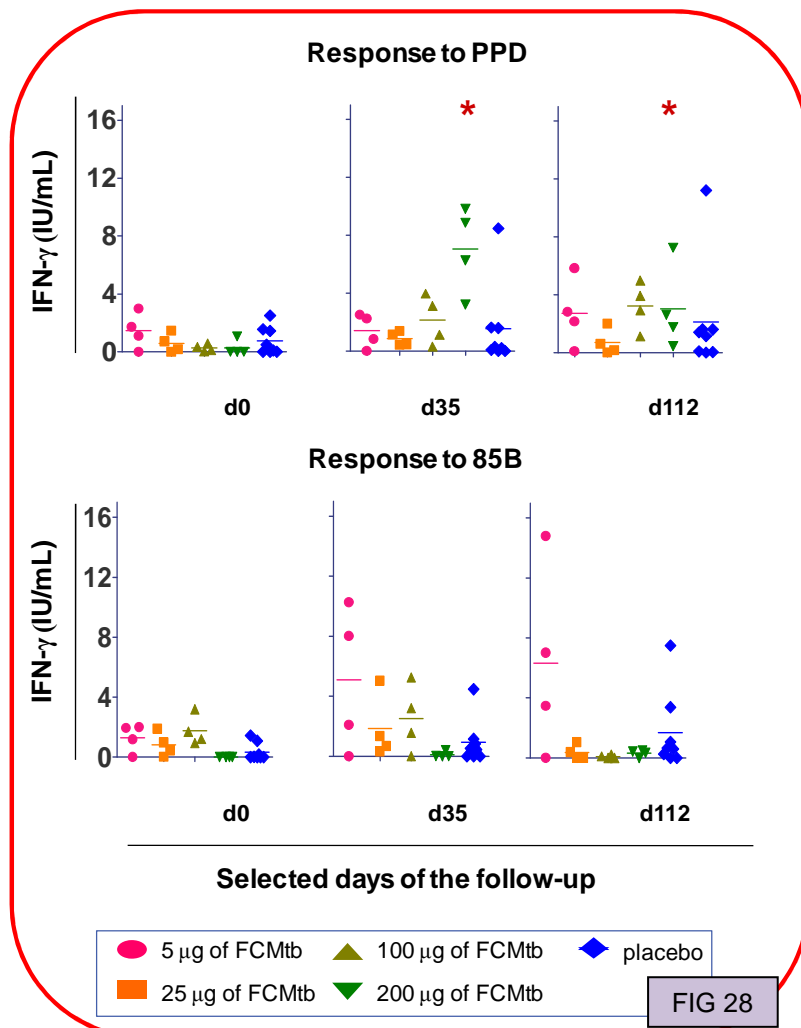
QTF-CMI

En general totes les dosis de RUTI® varen demostrar ser capaces de generar respostes enfront els estímuls usats -sobretot després de la segona

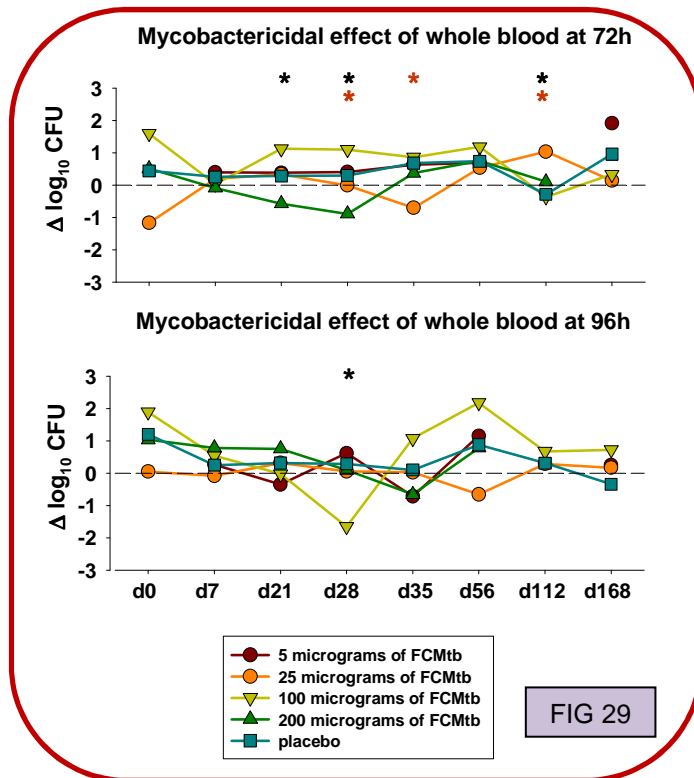
inoculació- i en alguns casos per alguns individus varen ser fins i tot espectaculars, desviant les mitges (dosi de 200μg de FCMtb enfront PPD, BCG i ESAT-6). Però el grup vacunat amb placebo també va aconseguir augmentar els seus nivells de secreció específica d'IFN-γ respecte als seus valors basals, el que s'evidencia a la figura 28.

Tal com va ocórrer a l'ELISPOT, pràcticament no es varen detectar respostes enfront CFP-10 i MPT64. En quant a la seva evolució en el temps, els resultats d'aquesta tècnica van ser molt variables i difícilment interpretables en quant a trobar patrons, el que la fa poc fiable a l'hora de refiar-se dels obtinguts en temps aïllats del seguiment.

L'anàlisi estadístic va revelar poques diferències: dels grups respecte els seus valors basals en pràcticament tots els



estímuls (PPD, BCG, ESAT-6, CFP-10, 16kDa, 19kDa & MPT64), interdia (BCG, CFP-10, 38kDa & 19kDa) i entre els grups de tractament *per se* (només PPD) i respecte la seva evolució en el temps (ESAT-6, 38kDa & 19kD). L'única dosi que va aconseguir generar respostes que fossin diferents i estadísticament significatives vs el grup placebo vacunat fou la de 200µg de FCMtb, i només enfront de PPD. La resposta generada, tanmateix es va aconseguir mantenir des de dia 21 fins al final del seguiment.



Valoració de la capacitat micobactericida de la sang total

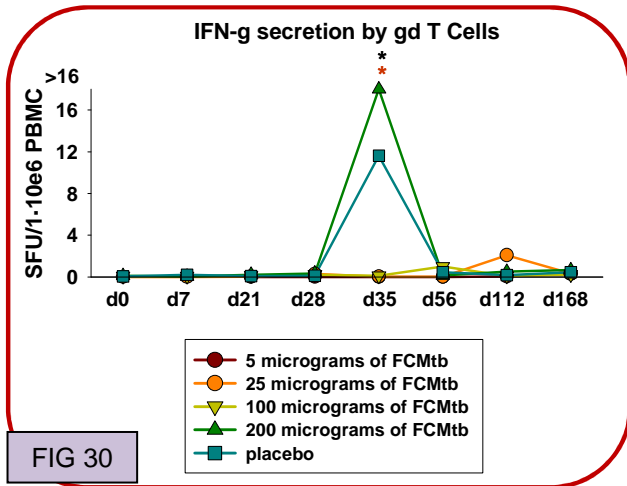
Aquesta prova es va revelar difícil des del primer moment, no tant en quant a tècnica sinó a logística: la densitat de la sang exigia més volum del que originalment s'havia calculat, i l'acumulació de tantes plaques amb sang durant tants de dies era brut i ocupava espai. La necessitat, a més, de fer dilucions els *timepoints* convinguts (hores 72 i 96), afegia un grau d'error degut a la viscositat de la sang, que feia que la mostra a sembrar fos rarament homogènia.

Dels resultats obtinguts fins a dia 28 del seguiment del primer grup de voluntaris (primer període, dosi de 5µg de FCMtb) només es va poder obtenir la lectura en 5 de les 432 plaques sembrades (1,1%) a partir de les mostres cultivades amb BCG, fins i tot deixant-les incubar durant 2 i 3 setmanes més del que pertocava. Degut a la gran inversió de recursos que es necessitava (plaques, espai i temps) i a la mala rentabilitat de l'assaig, es va decidir en aquell moment anul·lar l'ús de la BCG en la valoració de la capacitat bactericida, que, a partir del segon nivell de dosi es va passar a fer únicament amb la soca de *M.tuberculosis* H37Rv. Donat que foren els resultats obtinguts amb l'estimulació de la sang amb la soca H37Rv els que es varen obtenir al llarg de l'assaig i avaluar estadísticament, aquests són els que s'inclouen en aquest apartat (i els que es mostren a la figura 29).

Després de 72 hores de cultiu de la sang total amb *M.tuberculosis*, els voluntaris vacunats amb alguna de només dues dosis (5 i 200µg de FCMtb) varen mostrar activitat micobactericida, però -tot i que en el cas de la dosi de 200µg es va mantenir fins a 3 *timepoints*- aquest efecte va revertir al llarg de l'assaig. Després de la incubació de 96

hores, totes les dosis de RUTI® varen tenir activitat micobactericida com a mínim en un *timepoint*, malgrat que l'efecte en aquest cas també va revertir. La sang dels individus vacunats amb placebo no va tenir cap efecte sobre els cultius en cap dels casos ni en cap *timepoint*. L'anàlisi estadístic va mostrar diferències significatives dels grups respecte els seus valors basals i interdia, així com entre els grups en quant a la seva evolució al llarg del temps.

Assaig de les cèl·lules T $\gamma\delta$

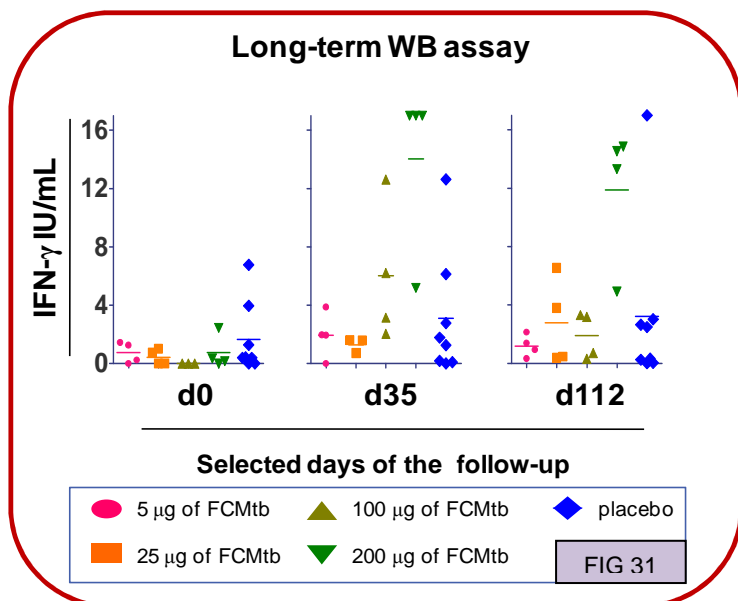


Malgrat que l'anàlisi estadístic va trobar diferències estadísticament significatives dels grups respecte als seus valors basals i interdia, només cal una mirada ràpida a la figura 30 per adonar-se que els resultats d'aquesta tècnica van ser molt pobres i de valor dubtós. Només la dosi de 200µg de FCMtb va aconseguir un augment clar de secreció d'IFN- γ per part de les

cèl·lules T $\gamma\delta$ en resposta a la BrHPP una setmana després de la segona inoculació, però va ser en aquest únic *timepoint*, i el grup vacunat amb placebo també va respondre. Un augment de secreció discret es va detectar en el grup vacunat amb 25µg de FCMtb a dia 112.

Prova de memòria

Ometent les respostes elevades aïllades de màxim dos individus del grup vacunat amb placebo, i si bé l'anàlisi estadístic no va demostrar l'existència de cap diferència, mirant el curs de les mitges dels resultats d'aquesta tècnica pels diferents grups sembla existir una tendència dosi-depenent (veure figura 31). Les dosis de RUTI® més baixes (5 i 25µg de FCMtb) varen mostrar respostes molt similars en quant a valors i tendència al llarg de l'assaig



(amb lleugers increments a dia 35 i 112). La dosi de 100µg de FCMtb generà un increment constant de secreció d'IFN-γ mesurat després de 7 dies d'incubació que es va començar a detectar a partir del dia 21 del seguiment fins a arribar a un pic màxim a dia 56 i revertir fins a pràcticament els nivells basals a dia 168. Els voluntaris vacunats amb la dosi de 200µg de FCMtb, en canvi, varen mostrar una resposta de memòria espectacular a partir de la primera inoculació (detectada a dia 7) fins a dia 56, on assolí nivells molt alts (però menys) i que es van mantenir fins al final de l'assaig.

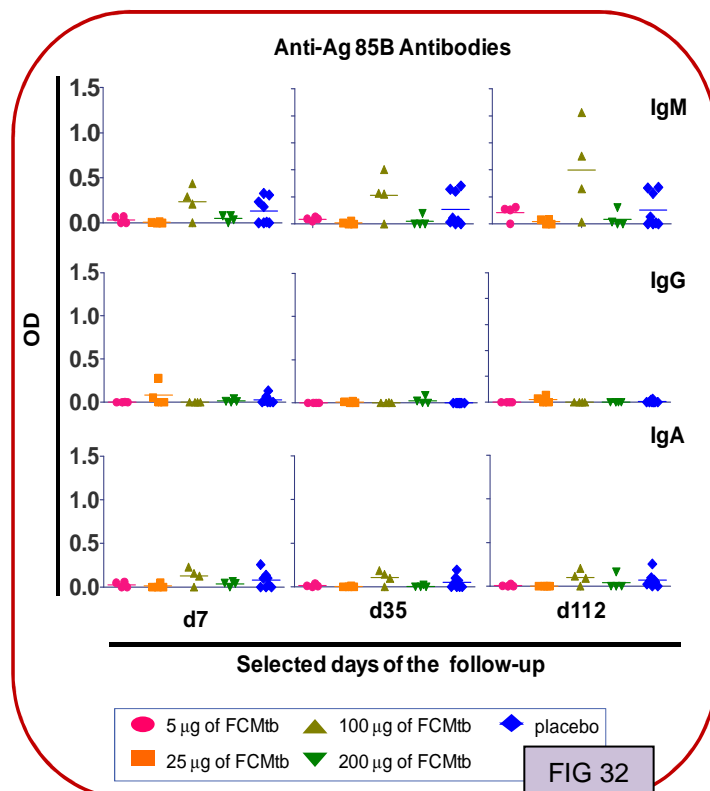
Tècniques a partir del sèrum

Detecció de la resposta humoral mitjançant ELISA *homemade*

Una mostra de sèrum de cadascun dels voluntaris que varen participar a l'assaig es va enviar a Alemanya (al laboratori de Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH) per a que fossin testades per a anticossos de tipus IgA, IgM i IgG contra els diferents antígens de *M.tuberculosis* mitjançant una tècnica no comercial d'ELISA.

Les dades dels assajos per detectar anticossos enfront els antígens de *M.tuberculosis* que es varen fer a Alemanya, però, no varen arribar a temps a ser tractats estadísticament pel servei estadístic contractat. Donat que no es podia aplicar una correcció per tal de determinar-ne el grau de variació respecte als valors basals, es varen calcular els resultats restant el valor 0 de l'obtingut a cada *timepoint*, en un intent de poder-ne valorar el grau de variació, i vaig analitzar-les estadísticament amb el programa GraphPad Prism 5, tal com ha estat explicat a l'apartat corresponent a l'anàlisi estadístic. Els resultats varen evidenciar una

manca de resposta de tipus IgA, escassos nivells d'anticossos IgG i –si bé no es varen trobar diferències estadísticament significatives- franca resposta en quant a anticossos IgM. La figura 32 intenta mostrar aquest fet ensenyant els nivells d'anticossos detectats enfront l'antigen 85B com a exemple, ja que aquest cas es repetia en enfrontar els sèrums a tots els antígens testats. A la figura 33 es mostren els resultats d'haver testat els sèrums per anticossos tipus IgM enfront els diferents



antígens de *M.tuberculosis*. En quant a grau de resposta, interessantment sembla que únicament la dosi de 100µg de FCMtb aconseguís generar anticossos detectables de manera clara, essent la que mostrà un increment discret de la resposta cel·lular. També, fixant-nos en la seva evolució en el temps, és observable un increment a partir d'una setmana després de la primera inoculació (d7) que segueix a dia 35 i arriba a ser màxim a dia 112. Els nivells d'anticossos de la resta de grups es varen mantenir iguals al llarg del temps (també els del grup placebo).

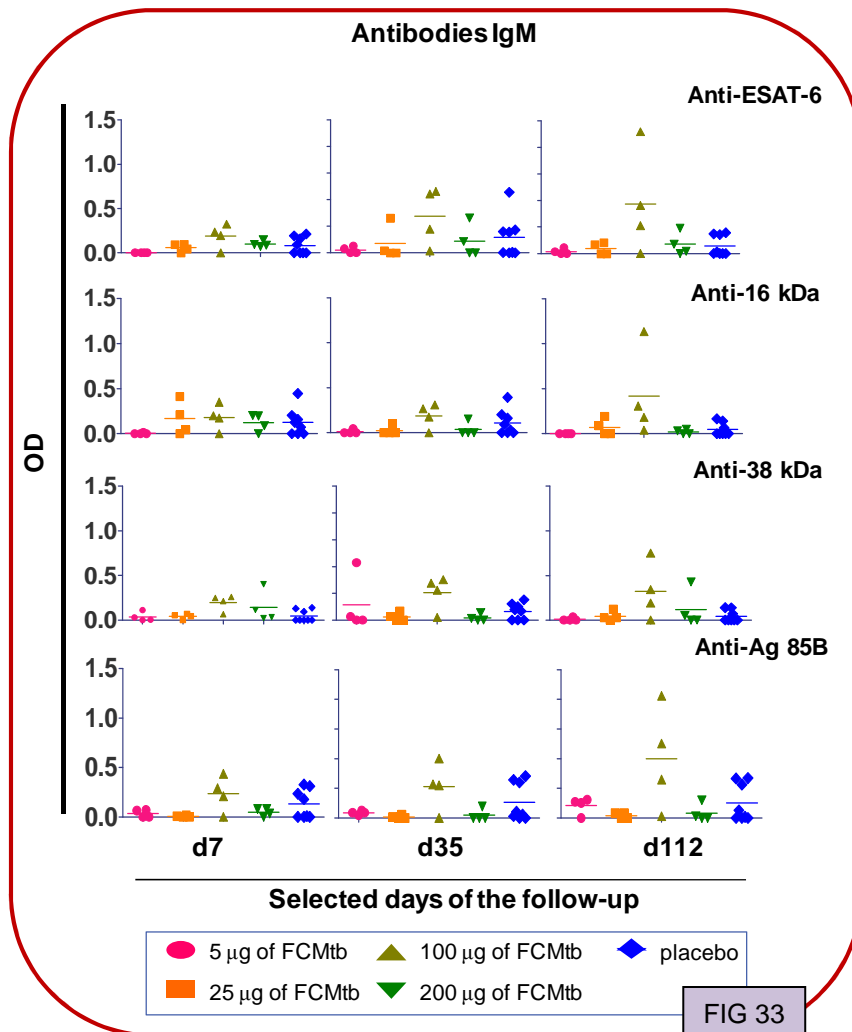
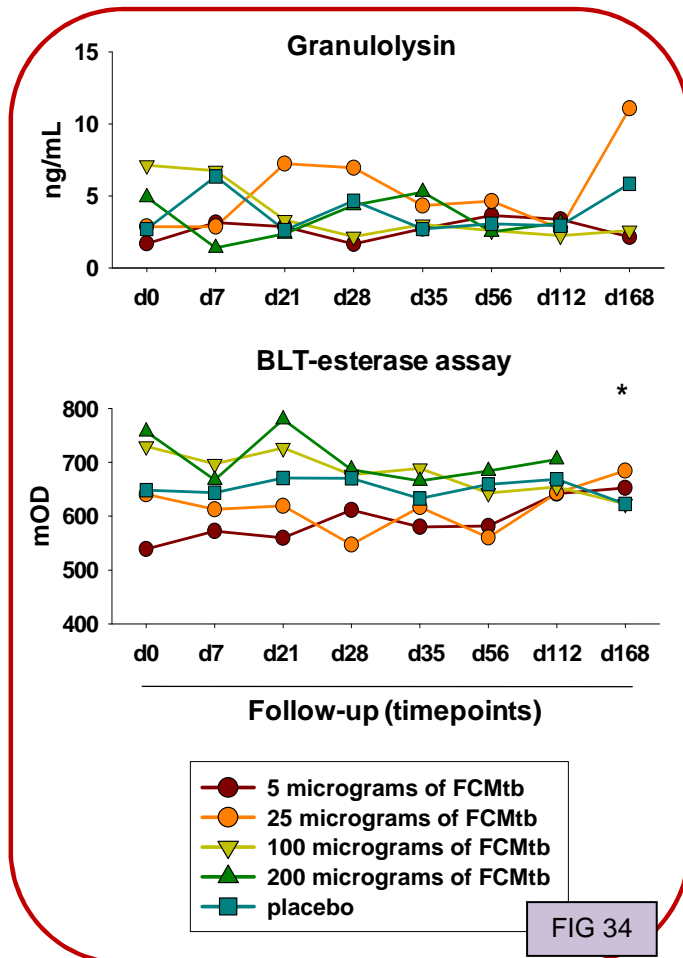


FIG 33

Granulisina i BLT-esterasa

Els resultats d'aquests assajos també ens van ser entregats pel laboratori del Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche de la Universitat de Palermo en forma de dades crues, que vàrem avaluar i transferir al departament d'estadística per a que les analitzessin amb la resta de dades de l'estudi de Fase 1.

Cap de les dues tècniques va mostrar resultats gaire prometedors (figura 34). En quant a la granulisin, únicament sembla digne de menció la resposta dels voluntaris vacunats amb la dosis de 25µg de FCMtb, que a partir del dia 21 va augmentar i més o menys es va mantenir per sobre dels nivells obtinguts pels individus del grup placebo. De totes maneres no es va detectar cap diferència estadísticament significativa. En quant a l'assaig de la BLT-esterasa, cap dels grups va demostrar un canvi en els seus nivells que fos remarcable, ja que si bé les dues dosis més altes de RUTI® es mantingueren per sobre del grup placebo, els seus valors basals ja



eren més alts. L'estadística va trobar tanmateix diferències dels grups respecte els seus valors basals i entre els tractaments en quant a la seva evolució en el temps, si bé aquestes diferències semblen ser de poca transcendència si es tenen en compte els resultats mostrats.

PCT

Cap dels grups testats va mostrar un increment marcat ni rellevant en els nivells de PCT durant la totalitat de l'estudi. Tots els valors es varen mantenir per sota del *cut-off* que la casa comercial ha establert com a suggeriment d'infeccions bacterianes agudes (0,5ng/mL). I tanmateix a a figura número 35 s'aprecien lleugeres variacions en l'evolució dels diferents grups al llarg del temps, que l'anàlisi estadística va posar de manifest, així com diferències respecte els seus valors basals i interdia.

Mycodot

Cap dels grups va donar cap resultat positiu segons les recomanacions de la casa comercial (figura 35), i no es varen evidenciar cap tipus de diferència estadísticament significativa durant l'anàlisi estadístic. Aquesta prova va resultar ser ràpida i fàcil però amb una

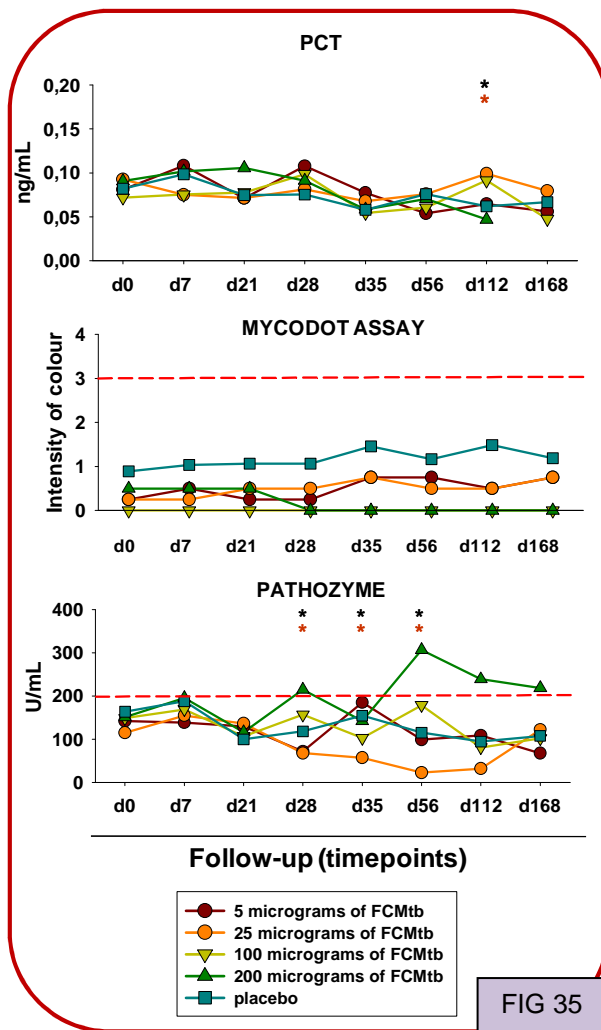


FIG 35

interpretació exageradament subjectiva i difícil, pel que em permeto jutjar-la de molt poc valor independentment de quins fossin els seus resultats.

Pathozyme

Només la dosi de 200µg de FCMtb de RUTI® d'entre tots els grups de l'assaig de Fase 1 va ser capaç de generar nivells d'anticossos tipus IgG contra els antígens 16 i 38kDa positius mesurables amb el kit comercial Pathozyme (figura 35), tot i que segons les recomanacions de la casa fabricant s'haurien de considerar positius dèbils. L'anàlisi estadístic va demostrar diferències entre els grups i dels grups respecte als seus nivells basals.

5.3.4. Estudi del TST en els voluntaris al final de l'assaig

Un cop finalitzat el tercer període de l'assaig clínic a la setmana 45, i quan el doble cec encara no s'havia obert, ens vàrem trobar amb un problema degut a la població que s'havia inclòs a l'estudi i a les circumstàncies laborals que l'envoltaven.

volunteers from period	weeks from the first vaccination
1	43
2	34
3	25
4	25

TAULA 11. Calendari de la realització del TST.

La major part dels nois inclosos eren estudiants de medicina, per la facilitat que suposava: coneixien la vacuna, estan ben predisposats a la recerca i geogràficament ho tenien més a mà (la facultat és al costat de l'hospital on es duien a terme les proves). Alguns d'ells estaven en el darrer any de la carrera o estudiant el MIR, i es varen trobar amb que en començar la residència era obligat que es sotmetessin a un TST per tal de valorar el seu estat respecte la infecció tuberculosa. Amb aquest problema ens van venir a trobar i nosaltres vàrem haver d'admetre que desconexíem quin efecte podria haver tingut la vacunació sobre els resultats del TST i

que a més era difícilment esbrinable, ja que no disposàvem d'un TST previ que ens pogués servir de valor basal, ja que havíem optat per no incloure aquesta prova a la fase de *screening* (veure l'apartat "Detecció d' infecció tuberculosa durant l'*screening*: estudi d'avaluació de la influència del TST sobre les respostes immunològiques mesurades pels TIGRA."). Així, a les 45 setmanes d'haver començat l'assaig vàrem recontactar amb els voluntaris i els vàrem oferir la possibilitat de fer-los un TST (després d'haver rebut l'aprovació del CEIC de l'hospital amb tal fi). En 5 casos no va ser possible.

PERIOD	VOLUNTEER	VALUE (mm)	RESULT	RUTI/PLACEBO	TSPOTTB screening	TSPOTTB d168
I (5 µg of FCMtb)	V1		ND	RUTI	NEG	ND
	V2	10 x 11	POSITIVE	PLACEBO	NEG	ND
	V3		ND	RUTI	NEG	ND
	V4		ND	PLACEBO	NEG	ND
	V5		ND	RUTI	NEG	ND
	V6	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	ND
II (25 µg of FCMtb)	V7	0	NEGATIVE	PLACEBO	NEG	NEG
	V8	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	NEG
	V9	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	NEG
	V10	0	NEGATIVE	PLACEBO	NEG	NEG
	V11	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	NEG
	V12	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	POS
III (100 µg of FCMtb)	V13	10 x 11	POSITIVE	RUTI	NEG	POS
	V14	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	NEG
	V15	14 x 12	POSITIVE	PLACEBO	NEG	NEG
	V16	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	NEG
	V17	0	NEGATIVE	PLACEBO	NEG	NEG
	V18	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	POS
IV (200 µg of FCMtb)	V19	9 x 6	POSITIVE	RUTI	NEG	NEG
	V20		ND	PLACEBO	NEG	NEG
	V21	0	NEGATIVE	PLACEBO	NEG	NEG
	V22	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	POS
	V23	0	NEGATIVE	RUTI	NEG	NEG
	V24	16 x 25	POSITIVE	RUTI	NEG	POS

TAULA 12. Resultats del TST un cop finalitzat l'assaig. ND significa Not Done (no realitzat). En lletra vermella es marquen tots els resultats positius i els voluntaris als que se'ls va vacunar amb RUTI®.

El temps que havia passat entre la realització del TST i la primera inoculació es recull a la taula nº11. El TST es va fer per inoculació intradèrmica de 2 TU de PPD RT-23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) a l'avantbraç. Els resultats es van llegir a les 72 hores segons el procediment habitual, considerant un resultat positiu si el diàmetre de la induració era de més de 5mm. A la taula nº 12 es presenten els resultats individuals de cada

voluntari amb l'especificació de quin tractament va rebre cadascun, així de com era el resultat del T-SPOT TB a l'*screening* i al final de l'assaig.

Tal com és evident a la taula, els resultats varen ser curiosos. El primer que crida l'atenció és que hi ha 2 voluntaris vacunats amb placebo que tenien un TST positiu al final de l'assaig (sense poder discernir si eren o no conversions recents). L'altra és que no tots els vacunats amb RUTI® (només 3/12) van donar un resultat positiu al TST, i d'aquests, 2 eren voluntaris del 4art període, és a dir vacunats amb la dosi més alta de RUTI® assajada. El fet de no tenir manera de comparar els TST positius amb cap valor basal em va empènyer a fer un anàlisi dels resultats del T-SPOT TB, la tècnica que havíem decidit que substituís al TST durant l'*screening* d'infecció tuberculosa. Els resultats varen revelar: cap dels individus vacunats amb placebo (ni tant sols els que havien donat positiu al TST) i en canvi 5/12 dels *vero* vacunats tenien un T-SPOT TB positiu al final de l'assaig, i 2 dels individus tenien un resultat positiu per les 2 proves.

6. DISCUSSIÓ

6.1 SOBRE LA PREPARACIÓ I DISSENY DE L'ESTUDI

El primer problema que va sorgir a l'hora d'executar l'assaig i que ens va permetre començar a fer crítica del disseny que havíem fet de l'estudi fou la selecció dels voluntaris. Aproximadament uns 80 individus se'ns van oferir per participar a l'assaig, però de tots aquests únicament 65 es varen poder entrevistar completament i només 37 es varen arribar a *screenar* per a poder elegir-ne 24. El llistat de criteris d'inclusió i exclusió ràpidament es va revelar exageradament llarg, ja que era massa estricte i algunes de les qüestions que tractaven podien arribar a tenir poca o nul·la influència en els resultats. El criteri que més va representar un problema fou el relacionat amb historial d'al·lèrgies, ja que de la manera que estava formulat bastava un episodi que recordés a al·lèrgia estacional o als àcars per a rebutjar un individu, el que va limitar moltíssim la selecció. És evident que un estudi amb una *n* més alta hagués estat impracticable amb la severitat dels criteris inclosos en el protocol que vàrem escriure per aquesta Fase 1, ja que per complir-los s'haguessin hagut d'allargar molt més els períodes de reclutament. És cert però que si es buscava avaluar la vacuna en una població el més sana possible la inclosa complia requisits amb escreix, però un cop acabat l'estudi, l'experiència suggereix que hagués bastat restringir la llista a absència de malalties o característiques clíniques rellevants, historial de TB, vacunació prèvia amb BCG i al·lèrgies conegudes importants. La inclusió de la determinació d'ANA tant a l'*screening* com al llarg de l'assaig com a criteri de seguretat obeïa uns requisits de regulatòria i de moda, ja que l'autoimmunitat havia estat recentment relacionada amb vacunacions de diferent origen, el que aixecava les suspicàcies a l'hora d'avaluar els nous productes. La prova en animals que es va fer en la preparatòria de l'assaig clínic (estudi #1) ja ho havia suggerit, però els resultats finals de l'assaig varen demostrar que no hi sembla haver cap tipus de relació entre RUTI® i la generació d'autoanticossos ja que en cap cas es van detectar ANA als sèrums dels voluntaris, independentment de la dosi de vacuna al que s'haguessin sotmès.

L'exclusió del TST de l'*screening* va ser una decisió molt controvertida, i fins fa molt poc també molt discutida per la comunitat científica. L'objectiu del petit estudi (estudi #2) que vàrem dissenyar per a determinar si incloure o no el TST a l'*screening* fou determinar si aquest podia afectar el monitorització de la resposta immune en el nostre cas específic. En cap moment ens vàrem plantejar avaluar aquest possible efecte amb els tests comercials perquè això hagués augmentat molt els costos i en el seu moment ens va semblar que hagués aportat poca informació, ja que ja hi havia altres estudis publicats anteriorment sobre aquest punt [161-163] que avalaven algunes *guidelines* nacionals que els havien inclòs en una estratègia de doble pas per al diagnòstic de la ITBL. L'efecte *boosting* és de sobres conegut i usat algunes vegades en el diagnòstic de poblacions amb respostes

immunològiques baixes i/o en alt risc de ITBL (com gent gran o treballadors en l'àmbit de la salut). En aquests casos el que succeeix és que es *boosteja* la resposta immune pre-existent: amb la primera dosi s'incrementa el número de cèl·lules T de memòria, i aquest fet és percebut en forma de TST positiu en una segona inoculació, aproximadament una setmana després. En el nostre experiment, els voluntaris que eren TST negatius en un principi poden haver patit un *boosting* similar en restimular la seva sang perifèrica amb antígens específics després del TST, efecte prèviament observat en altres estudis que tampoc pretenien indagar sobre aquesta qüestió en concret. Mawa et al [174] varen descriure quelcom semblant en l'estimulació que feien de la sang diluïda amb l'antigen CFP-10 de *M.tuberculosis* durant 6 dies, igual que Thom et al quan mesuraven la secreció d'IFN- γ després d'estimular sang infectada amb *M.bovis* una setmana després del TST [181]. Els resultats obtinguts al nostre experiment ens varen alarmar bastant i per diferents raons. No únicament varen respondre els individus conegudament infectats per *M.tuberculosis*, sinó també els voluntaris TST i TIGRA negatius en anterioritat. L'augment de les respostes varen ser detectades pels dos mètodes diferents que vàrem usar (ELISA i ELISPOT), van ocórrer enfront la majoria d'estímuls usats malgrat que les quantitats d'antígens únics que porta el PPD és ínfima i en alguns casos es van mantenir fins a un mes després. A més, existia una gran variabilitat interindividual, el que ens podria representar un problema a l'hora d'avaluar les respostes durant l'assaig de Fase 1. És cert que coneixíem les limitacions de l'assaig que tenia poca n i conformada per una població heterogènia, que només era observacional i que en ser realitzat amb TIGRA *homemade* tenia poc valor en el sentit d'ús clínic més estricte (en quant a interferències amb el diagnòstic). I tanmateix ens vàrem decidir a publicar-ne els resultats igualment perquè vàrem considerar important donar la veu d'alarma per a que algun grup de recerca ens prengués el relleu i avalués el que realment tindria efecte en el diagnòstic: saber si usant els *kits* comercials podia arribar a passar una cosa semblant i si conseqüentment caldria reformular les estratègies de diagnòstic en dos passos. Si bé el dubte conceptual de si el TST podria arribar a tenir un efecte sobre les respostes immunològiques que havien de ser avaluades per uns TIGRA *homemade* (amb uns antígens d'origen, característiques i concentracions d'ús determinades) ens semblava prou vàlid, la presentació dels resultats obtinguts com a troballa ens va representar molts problemes d'acceptació. No ha estat fins a aquest any 2009 que Van Zyl et al [182] han presentat elegantment un estudi molt bonic conduït amb els dos *kits* TIGRA avui en dia disponibles (T-SPOT TB i QTF-G) més un ELISPOT *homemade* per a avaluar les respostes a PPD i a un antígen que s'hauria dit útil per a diferenciar infecció de malaltia tuberculosa, el Heparin Binding Hemagglutinin (HBHA) [183, 184]. Els resultats que presenten els autors demostren conversions i reversions en els grups de mig i alt risc d'exposició a *M.tuberculosis*, més detectables pel T-SPOT TB però més variables pel QTF-G. En el seu estudi existeix una alta

variabilitat interindividual, però en general la conclusió a la que es pot arribar és que existeix un efecte *boosting* del TST sobre els TIGRA comercial majorment a dia 7 post-TST i a dia +3 en el cas dels TIGRA *homemade*, que en alguns individus es manté fins a 3 mesos després, avalant els resultats publicats al nostre article. Definint *boosting* d'existir un augment de més de 3 SFU (al T-SPOT TB) o de més d'un 80% (al QTF-G) respecte els valors basals, la incidència que trobaven era d'un 62% en els casos TIGRA positius (pre-TST) i un 12,5% en els TIGRA negatius (pre-TST). Les conclusions que els autors presenten són que realment existeix un *boosting* sobre els TIGRA degut a la realització del TST, tot i que aquest apareix entre els 3 i els 7 dies (el que reforça les *guidelines* que recolzen realitzar la comprovació d'un TST positiu el dia de lectura del mateix, a les 72 hores); i que existeix una alta variabilitat interindividual, el que suggeriria la necessitat d'augmentar els *cut-offs* de les tècniques comercials fins a $\geq 0,7$ IU/mL en el cas del QTF-G i ≥ 9 SFU en el del T-SPOT TB. La recent aparició d'aquest article avala definitivament la difícil decisió d'excloure el TST de l'*screening* de l'assaig de Fase 1 de RUTI® que ha estat tan discutida i finalment deixa clar que la seva realització hagués emmascarat les respostes obtingudes mitjançant els TIGRA durant el seguiment.

Tanmateix, tots els autors que han descrit conversions en els resultats dels TIGRA després d'un TST les atribueixen a la possibilitat de que en realitat fossin persones que estaven sensibilitzades als antígens de *M.tuberculosis* i o bé no es detectessin per una immunitat alterada [174] o bé perquè la càrrega antigènica no hagués estat prou forta [182], en ambdós casos necessitant del *boosting* generat pel TST per a aconseguir respostes detectables. Nosaltres, a partir dels resultats obtinguts al nostre experiment i després d'avaluar les respostes descrites a la literatura, hipotetitzem que els antígens inoculats en forma de TST sempre són processats i presentats a nivell de gangli. A partir d'aquí, en el cas d'una persona infectada les cèl·lules T de memòria proliferarien generant cèl·lules efectores en un número suficient com per a detectar una resposta DTH en forma de TST+. En quant als resultats dels TIGRA (i donat que només mesuren cèl·lules efectores), en existir una activació constant de limfòcits per la presència d'antígens a la ITBL, en obtenir una mostra de sang i restimular-ne específicament els limfòcits presents, aquests secretarien IFN- γ .

En el cas de les persones *naïf*, els antígens continguts en el PPD serien processats i presentats igualment, si bé o no existiria una resposta posterior, o la resposta generada no seria suficient com per a ser detectada, depenent en gran mesura de la càrrega antigènica. La conseqüència seria un TST negatiu i en la majoria de casos els resultats dels TIGRA també negatius. En el petit percentatge d'individus que viren el resultat dels TIGRA després d'un TST s'hauria generat una resposta que a banda de la càrrega antigènica dependria de la susceptibilitat de cada individu, i que només seria detectable per TIGRA donat que que aquests són més sensibles (veure figura 36).

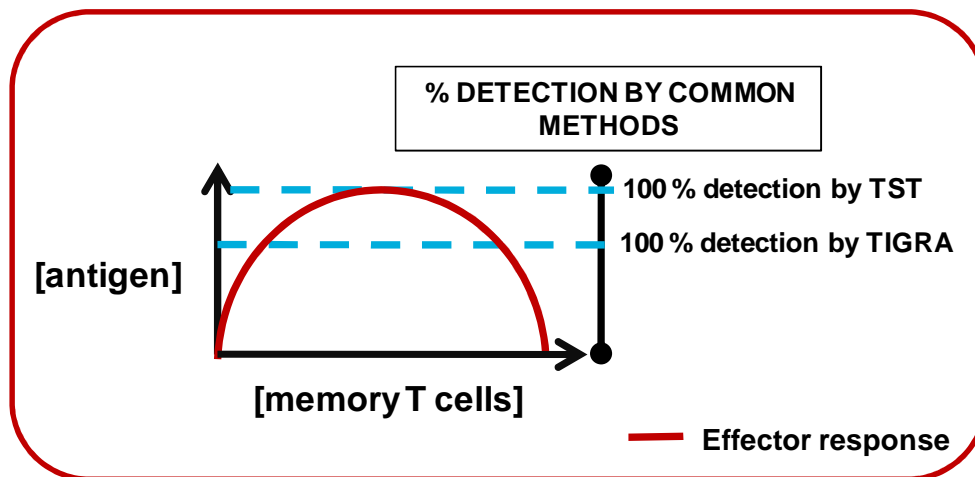


FIG 36. Hipòtesi plantejada per a explicar la detecció de cèl·lules efectores en individus *naïf* després d'un TST. La generació d'una resposta després de la inoculació d'antígens que són processats i presentats dependria de la càrrega antigènica i de la concentració de cèl·lules de memòria existents. En individus *naïf*, en un percentatge reduït de casos, de ser suficient la càrrega antigènica en funció de la susceptibilitat de cada individu existiria una resposta que inclouria la inducció de cèl·lules de memòria i efectores, que podria ser detectada per TIGRA i/o TST.

En aquesta línia, avaluar la resposta a *M.tuberculosis* mitjançant el TST no estava inclòs en el protocol de l'assaig i tanmateix es va decidir fer, per les raons exposades en apartats anteriors. Els resultats varen revelar: 1) la positivitats d'individus que havien estat vacunats amb placebo, i 2) la no positivitats d'alguns dels vacunats amb RUTI®. A l'apartat de resultats ja hem explicat que vàrem intentar buscar una correlació entre el resultat del TST final amb els resultats del TSPOT-TB a dies 0 i 168 del seguiment, en un intent de poder tenir més elements per a entendre els resultats. Al nostre assaig, 3/16 vacunats amb RUTI® (independentment de la dosi de vacuna testada) varen donar positiu al TST final, vs 2/8 dels vacunats amb placebo. Això representaria un 18% vs un 25%, el que aporta poca informació. Si desglossem els resultats focalitzant-nos en el número d'individus amb TST final segons grups de tractament, tenim el següent:

- Placebo: 2/7 (28%)
- 5 µg de FCMtb: 0/1 (0%)
- 25 µg de FCMtb: 0/4 (0%)
- 100 µg de FCMtb: 1/4 (25%)
- 200 µg de FCMtb: 2/4 (50%)

Semblaria doncs que la dosi de 200µg de FCMtb tindria un més alt percentatge de positivitat del TST, però és evident que el número de voluntaris inclosos a l'estudi és massa petit per a extreure conclusions.

Si ens fixem en el resultat final del TSPOT-TB en vés del TST, tenim que 5/12 (41% dels RUTI®-vacunats) vs 0/6 (0% dels placebo-vacunats) dels voluntaris als que se'ls va realitzar la prova, varen donar positiu a dia 168, quan tots tenien resultats negatius a dia 0. Això representaria que la seva conversió en el resultat del TIGRA estaria lligada amb la vacunació. La resposta generada depèn de l'antigen, de la velocitat de la seva degradació, de la via d'administració i del *background* genètic de l'individu. El fet de detectar cèl·lules efectores mitjançant els TIGRA en els voluntaris vacunats implicaria que aquestes han tingut contacte recent amb l'antigen, el que s'explicaria per un efecte de tipus *depot* de la vacuna.

Aquesta informació d'una banda vindria a reforçar la idea de que els TIGRA tindrien més sensibilitat per detectar respostes enfront *M.tuberculosis*, i de l'altra ens tranquil·litzaria en el sentit de que els TST positius trobats en dos voluntaris vacunats amb el placebo podrien estar lligades a altres factors a banda d'una infecció real per *M.tuberculosis*. De tota manera, el fet que els TST no es realitzessin en el mateix dia 168 del seguiment dels voluntaris, ens impedeix fer una comparació fiable entre els resultats obtinguts per una i altra tècnica.

De tots els assajos clínics que s'han fet a dia d'avui només n'existeix un que hagi valorat el TST al final de l'estudi, el de Hoft et al amb la vacuna rBCG30. Considerant un TST positiu si de valor >5mm (com nosaltres), varen trobar positivitat en 6/18 vero-vacunats (33%) vs 4/16 placebo-vacunats (25%), i tot i que no en fan cap comentari, considerem que estan en línia amb els nostres resultats.

Recuperant les idees esmentades anteriorment, hipotetitzem que podria existir algun tipus de relació amb la dosis antigènica necessària per a poder generar una resposta suficient per a ser detectable amb els TIGRA, més sensibles, i amb el TST.

6.2. SOBRE L'ELECCIÓ DE LES TÈCNIQUES EN FUNCIO DELS RESULTATS OBTINGUTS

Abans de començar l'assaig de Fase 1, els efectes de la vacuna RUTI® en humans ens eren totalment desconeguts, ja que és àmpliament sabut que si bé els models experimentals animals donen una idea aproximada del que pot arribar a passar en organismes més grans, res els és fiablement extrapolable. A més, el fet que la vacuna hagi estat dissenyada per al tractament de la ITBL i en canvi en el context de l'estudi de Fase 1 s'hagués de provar en individus totalment sans afegia la incògnita de si en aquesta població la RUTI® tindria la força suficient per a generar una resposta específica en contra de *M.tuberculosis* que fos

mesurable. És per tot això que en el planteig de l'estudi es va voler incloure un rang tan ampli de tècniques amb dues finalitats: 1) per a avaluar l'impacte de la vacunació sobre les respostes immunològiques, per tal de detectar qualsevol resposta deguda a la RUTI®, i 2) determinar quins assajos serien útils en els futurs estudis del desenvolupament clínic. La impressió general en observar els resultats que avaluaven la resposta cel·lular és que hi va haver una tendència dosi-resposta per la majoria d'assajos que es van dur a terme.

6.2.1. Estudi de poblacions cel·lulars

L'estudi mitjançant FACS va ser molt simple. N'érem conscients al moment del disseny, però estàvem condicionats a les limitacions logístiques: en aquell moment no existia al nostre centre cap citòmetre de prous canals que assegurés l'avaluació d'un número elevat de condicions en un mínim temps i a un preu raonable. I tanmateix, en termes de % de subpoblacions de cèl·lules T, la vacunació amb RUTI va augmentar les poblacions cel·lulars d'una manera esperable, confirmant el que els estudis en animals durant el desenvolupament preclínic ja havien apuntat [140]. Els resultats varen mostrar que RUTI® assolía un increment atribuïble a la vacunació que era especialment remarcable per les poblacions CD4+CD3+ (dosis de 5 i 200µg of FCMtb) i CD8+CD3- (dosis de 25 i 100µg of FCMtb). En realitat podíem haver limitat l'estudi a observar l'efecte de la vacuna sobre les poblacions T CD4+ i T CD8+, obviant la subpoblació CD25H, ja que si bé en un inici es va incloure perquè es considerava que podia aportar una idea de la població T reguladora, en realitat ens va aportar molt poca informació.

Els resultats de les poblacions cel·lulars post-inducció del granuloma duts a terme per l'*Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale* de Toulouse encara no ens han sigut entregats, estant encara en fase d'anàlisi. Per aquesta raó no es presenten ni es discuteixen aquí, però no es descarta de poder-los publicar en un futur.

6.2.2. Estudi de l'efecte de RUTI® sobre la immunitat cel·lular

En quant a la immunitat cel·lular, en general, les dosis més altes testades (sobretot la de 200µg de FCMtb) van donar les respostes més altes en quant a secreció específica d'IFN- γ quan mesurades per ELISPOT i ELISA, sobretot les específicament generades en contra de PPD i BCG. Tanmateix, la dosi de 25µg de FCMtb va assolir una resposta poliantigènica fins i tot més ampla que la de 100 i similar a l'aconseguida per la dosi de 200µg de FCMtb en l'ELISPOT (i enfront alguns antígens fins i tot més alta). A les proves d'ELISA (menys sensible i específic que l'ELISPOT) i si bé les dues dosis més altes de RUTI® també van mostrar els resultats més alts, la dosi de 25µg de FCMtb va demostrar un discret però clar augment poliantigènic de la secreció d'IFN- γ atribuïble a la vacunació.

De manera interessant, les respostes cel·lulars augmentades en els individus vacunats van poder ser detectades fins i tot amb els tests comercials dissenyats per a la detecció de la infecció tuberculosa i usats en la clínica (T-SPOT TB i QTF-G). Aquest fet evidentment podria generar alarma als metges de cara a l'hora de fer el diagnòstic. El desenvolupament d'aquests tests va venir a superar el problema (que ja Calmette va intuir i suggerir) de la interferència que la vacunació amb la BCG exercia sobre el TST quan usat com a test diagnòstic. En buscar respostes als antígens codificats per la regió RD-1 (absent en la vacuna BCG), tant el T-SPOT TB com el QTF-G ajuden al diagnòstic de la infecció tuberculosa disminuint els possibles falsos positius deguts a la vacunació. La certesa de que la RUTI® interferiria també en els seus resultats podria significar un problema pels clínics, un *revival* dels desavantatges del TST però amb els TIGRA com a protagonistes. I tanmateix en realitat si tornem a la idea primera de quina és la població subsidiària de vacunació amb RUTI® és fàcil adonar-se que aquest fet en principi no tindria més transcendència. En vacunar individus ja conegudament infectats per *M.tuberculosis* desapareix el possible problema, ja que el diagnòstic ja s'hauria fet *prèviament*.

En quant als estímuls usats per a determinar la resposta cel·lular mediada per IFN- γ específicament secretat, no tots els antígens varen demostrar la mateixa evolució després de la vacunació. Tant el PPD com la vacuna BCG es van incloure per la seva natura, ja que tots dos són extractes (de *M.tuberculosis* i *M.bovis* respectivament) i per tant ambdós contenen diversos antígens micobacterians. Això és el que explicaria que els valors enfront aquests dos estímuls fossin els més alts, així com la seva tendència dosi-resposta més clara. Però també tant per el PPD com per la BCG és evident que existia un alt background de respostes, que nosaltres explicaríem per l'alta incidència de NTM al nostre medi, un fet que evidentment ens hauria passat per alt a l'hora d'usar només el T-SPOT TB a l'*screening* (ja que aquest tampoc es veuria influenciat per la majoria de NTM). Les respostes basals d'alguns individus enfront alguns antígens (per exemple a 85B) també foren altes, el que també es podria explicar per la natura dels antígens usats (recombinant), ja que es reconeix una major especificitat si s'usen pèptids.

És precisament per aquests alts valors basals trobats amb algunes de les tècniques que nosaltres donaríem més valor als canvis respecte els valors basals que en el grau de respostes en sí mateix, quelcom que l'anàlisi estadístic ja va tenir en compte. En quant als antígens únics usats com a estímuls, crec que els resultats obtinguts es poden considerar bastant espectaculars i objectivament molt encoratjadors, ja que esperàvem que o no fossin capaços de generar respostes en els individus sans o bé aquestes fossin dèbils, ja que la vacuna RUTI® és un extracte de *M.tuberculosis* que inclou diversos antígens però en concentracions molt petites. Els antígens que van generar les respostes més altes en els individus vacunats amb RUTI® foren ESAT-6, 85B, 38kDa i 16 kDa (de forma més discreta),

mentre que les dels antígens 19kDa i hsp65 només es varen poder detectar per una de les dues tècniques (ELISA and ELISPOT, respectivament). El CFP-10 i MPT64 varen mostrar unes respostes molt dèbils comparades amb els altres antígens testats, i per alguns individus fins i tot van ser nul·les. En conclusió es podria dir que haver avaluat la resposta enfront un rang tan ampli d'estímuls ens va permetre detectar la naturalesa poliantigènica de l'efecte que la RUTI® exercia sobre la immunitat cel·lular, generat enfront antígens característics tant de bacils en fase de creixement (ESAT-6) com en estat latent (16kDa), a banda dels considerats estructurals (antigen 85B) i d'estímuls més generals (PPD) [185].

En avaluar la magnitud de les respostes obtingudes pels diferents estímuls un no pot sinó comparar-les amb els resultats dels assajos clínics d'altres vacunes antituberculosos que actualment estan en desenvolupament clínic, tot i que a hores d'ara no n'hi ha hagut cap que hagi testat tants estímuls a la vegada ni que hagi intentat fer una avaluació amb un rang tan ampli de tècniques. El més comparable seria la vacuna BCG recombinant anomenada rBCG30, que es va avaluar en individus realment naïfs (no infectats per *M.tuberculosis*, no vacunats amb BCG)[94]. Els resultats obtinguts en aquest assaig presenten respostes màximes de l'ordre de 60SFU/1·10⁶ PBMC 7 dies després de la vacunació i enfront d'un *pool* de pèptids de l'antigen 85B, que és l'antigen que superexpressa la vacuna. A l'apartat de resultats del nostre assaig presentem augments d'aproximadament entre 100 i 150 SFU de mitja enfront a l'antigen 85B una setmana després de la segona vacunació amb RUTI®. *M.vaccae* inactivat (MV) s'ha provat en una Fase 1 en una població HIV positiva [98] i a banda d'assajos limfoproliferatius, el que mesuraven era la secreció específica d'IFN- γ enfront *M.vaccae* sonicat o un lisat de cèl·lules senceres de *M.tuberculosis*. Respecte els valors basals i després de 3 dosis de la vacuna registraven augments màxims d'aproximadament un logaritme, i tot i que un any després s'havien normalitzat, seguien trobant-se diferències entre el grup *vero* vacunat i el vacunat amb placebo. Evidentment els estímuls que varen escollir no són els mateixos que els que nosaltres vàrem incloure en l'assaig de RUTI®, però el més semblant serien les respostes obtingudes amb la vacuna BCG i amb el PPD, ja que ambdós contenen diversos antígens tal com passaria amb els lisats/sonicats de micobactèries. A l'assaig de RUTI® els augments registrats arribaven a un logaritme de manera mantinguda durant un període d'entre 5 i 6 mesos (dosi de 200 μ g de FCMtb enfront PPD, i dosis de 100 i 200 μ g de FCMtb enfront BCG). Però la vacuna de la que es tenen més resultats disponibles és la MVA85A, que ha estat avaluada en diferents tipus d'assaig en funció de la pauta de dosificació usada i del país d'origen (i de les característiques que se'n deriven) de la població seleccionada. En ésser una vacuna de *boosting* és difícil comparar la magnitud de les respostes (ja que per concepte s'esperen més altes amb la MVA85A) però ens serveix una mica de referència ja que en tots els seus estudis s'ha utilitzat l'ELISPOT per valorar-ne la immunogenicitat.

Existeix un sol estudi (no publicat) els resultats dels quals estan inclosos en una presentació del Pr. A. Hill, en que la vacuna MVA85A es va donar (2 inoculacions) a individus sans no-BCG vacunats a Anglaterra (n=14). Les respostes una setmana després de la primera vacunació (mesurades per ELISPOT) varen arribar a 400 i 350 SFU/1·10⁶ PBMC enfront PPD i l'antigen 85A, respectivament, per a establir-se a partir d'una setmana de la segona inoculació en 75 SFU/10⁶ enfront ambdós estímuls [186].

L'altre estudi amb MVA85A que podria extrapolar-se a l'assaig que ens ocupa, descriu una fase 1 que es va dur a terme a Sud-Àfrica per a avaluar una sola dosi de MVA85A. Tot i no fer-ne cap referència explícita en el text, es va fer en individus als que se'ls suposava un priming degut a les infeccions per NTM, tan exteses en el seu àmbit, la meitat dels quals estaven vacunats prèviament amb BCG. La immunogenicitat s'avaluava mitjançant el número de cèl·lules T secretores d'IFN- γ i mitjançant ELISPOT. Les respostes obtingudes estaven al voltant d'una mitja de 200 SFU/1·10⁶ PBMC enfront de la proteïna recombinant 85A i de 400 SFU/1·10⁶ enfront un *pool* de pèptids de l'antigen 85A. Ja que evidentment aquestes respostes altes són esperables enfront l'antigen 85A i els seus pèptids degut a que la vacuna està basada en aquest antigen, les respostes (de les que hem obtingut nosaltres a l'assaig que ens ocupa) que podrien comparar-se millor amb les de l'assaig a Sud-Àfrica de la MVA85A serien les resultants enfront el PPD (el més semblant a la RUTI® en quant a natura de tots els estímuls que nosaltres varem fer servir), i que eren de l'ordre d'entre 200 i 400 SFU/1·10⁶ PBMC de mitja [107].

Dels assajos publicats entre 2004 i 2008 en individus prèviament vacunats amb BCG i posteriorment amb MVA85A (diferent número de dosis depenent de l'estudi), s'extreu la capacitat de la vacuna de generar respostes enfront PPD que de mitja van de 800 a 2000 SFU/1·10⁶ i de 2500-4000 SFU/1·10⁶ PBMC si s'avalua el sumatori de pools de pèptids d'antigen 85A usats. Creiem que els valors que es donen del sumatori de resultats obtinguts enfront dels diferents pools de pèptids de 85A és molt dubtós, i preferim centrar-nos en els resultats enfront PPD i l'antigen 85A. Els valors aconseguits per la vacunació amb BCG sola són d'al voltant de 100 SFU/1·10⁶ PBMC [103, 109, 110, 187]. L'estudi més bonic dels últims en ésser publicats compara el *priming* amb BCG seguit d'un *boosting* amb BCG o de MVA85A (una dosi)[113]. Ambdós grups aconseguixen respostes enfront a PPD de fins a 800 SFU/1·10⁶ PBMC al cap d'una setmana del *boosting*, que s'estabilitzen a setmana 12 aproximadament en 400 SFU en el cas de la pauta BCG-BCG i en 200-300 SFU/1·10⁶ PBMC en la de BCG-MVA85A. En quant a les respostes detectades enfront de l'antigen 85A, mentre que BCG-BCG arriba a generar fins a 350 SFU/1·10⁶ PBMC i a partir de setmana 8 es manté en 100-150, amb la pauta de BCG-MVA85A s'aconsegueixen fins a 700 SFU/1·10⁶ PBMC a la setmana del *boosting* per a assolir a les 8 setmanes els 100-150 SFU i mantenir-se.

En general doncs, podríem dir que tot i no existir cap estudi en fase clínica que sigui realment comparable al que es presenta aquí (per diferència de poblacions, de producte a testar, d'estímul usats en l'avaluació de la immunogenicitat) els resultats obtinguts estan molt en línia amb els treballs publicats a la literatura, i són fins i tot millors si tenim en compte que es tracta d'una vacuna que no és pròpiament de *boosting* (i que per tant, si ho fos, se li esperarien valors molt més alts).

D'altra banda, totes les respostes obtingudes o apareixien o s'incrementaven amb la segona inoculació de la vacuna, fos quina fos la dosi de la mateixa testada. Aquest fet va servir per recolzar totalment els estudis de dosi-resposta efectuats en animals durant la fase preclínica del desenvolupament de la RUTI®, que apuntaven que calia una segona inoculació per a generar una resposta suficient i en canvi no aportava res més afegir-hi una tercera.

L'evolució en el temps fou decreixer per a tornar a tenir un lleuger increment als últims *timepoints* de l'assaig, el que sembla que recolza la idea de que existiria una immunitat residual de la generada enfront de *M.tuberculosis* després de la vacunació. Les respostes altes i mantingudes de l'assaig aquí anomenat de memòria estarien en línia amb aquest punt, reforçant-ne la idea. Aquest assaig, dissenyat per avaluar la secreció d'IFN- γ per part de les cèl·lules T de memòria, seria el que ara s'anomena d'una manera global "Long term whole blood assay", ja que consisteix en estimular la sang total específicament i avaluar-ne la secreció d'IFN- γ 7 dies després. Avui en dia se li dóna molta importància ja que se li suposa la capacitat d'avaluar la immunogenicitat d'una vacuna (ja que està avalat per estudis clínics grans) i a la vegada l'àmplia implementarietat (fins i tot en àrees remotes), pel que ha sigut recentment recomanat pels experts de la WHO com a assaig "harmonitzat" per a ser conduït en qualsevol estudi d'avaluació d'una nova vacuna antituberculosa [188]. Els nostres resultats suggereixen la capacitat de la vacunació amb RUTI® de generar protecció de llarga durada, doncs, però encara faltaria seguir els voluntaris en el futur per determinar fins quan podria arribar a durar aquesta protecció.

6.2.3. Estudi de l'efecte de RUTI® sobre la immunitat humoral

Tal com expliquen Abebe i Bjune en un article molt bonic de recent aparició [189] clàssicament s'ha considerat que en TB és la resposta cel·lular la que tindria un paper fonamental, mentre que la resposta humoral no jugaria cap paper protector, basant-se en uns experiments clàssics que recolzaven el paradigma Th1/Th2 i que foren recollits i revisats per Glatmann-Freedman i Casadevall [190]. Aquest paradigma, aparegut a mitjans dels anys '80, establia que les cèl·lules Th1 protegeixen els hostatgers enfront els patògens intracel·lulars, mentre que les Th2 ho fan de les extracel·lulars. Des de llavors, i sempre segons els autors, aquesta idea no solament ha dominat la manera d'entendre la immunitat contra els patògens infecciosos, sinó que a més ha determinat l'abordatge del disseny de

vacunes antituberculoses. Els últims anys, però, han sorgit diversos estudis (la majoria duts a terme en models animals) que discrepen sobre aquesta teoria i recolzen la implicació mixta d'ambdues immunitats (cel·lular i humoral) en el context de la infecció tuberculosa. Si bé és evident que aquesta va associada a una activitat Th1, amb secreció d'IFN- γ , IL-2 i TNF, estudis com el conduït amb la RUTI® durant el seu desenvolupament preclínic recolzen la implicació (si bé encara poc definida) dels anticossos anti-antígens de *M.tuberculosis*. Aquest estudi va demostrar l'eficàcia del tractament amb sèrum d'animals vacunats amb RUTI® de ratolins SCID experimentalment infectats amb *M.tuberculosis* [191]. Estudis en humans avalen aquesta idea. Sanchez-Rodriguez *et al* varen apuntar que els anticossos tipus IgG contra l'antigen 85 complex podria tenir efectes beneficiosos [192]. De Valliere *et al* varen mirar si els anticossos generats per la vacunació amb BCG establien algun tipus de protecció contra la infecció micobacteriana. El que observaren fou que existien anticossos tipus IgG específics anti-LAM; una capacitat micobactericida augmentada dels neutròfils, monòcits i macròfags en presència d'anticossos; i que els anticossos incrementaven la secreció d'IFN- γ en les cèl·lules T CD4 i CD8 específiques contra *M.tuberculosis* [193].

En l'assaig de Fase 1 que es presenta aquí, la resposta immunològica de tipus humoral es va avaluar mitjançant kits comercials (Pathozyme i Mycodot) i de manera casolana (al laboratori de Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH, a Alemanya). Els resultats del Mycodot varen ser negatius per tots els voluntaris excepte per 2, un d'ells vacunat amb RUTI® i l'altre amb placebo, el que els resta valor i dona la sensació de ser una tècnica inespecífica. A més, les recomanacions per a la interpretació dels resultats implicaven un alt grau de subjectivitat, i l'única conclusió que se'n pot treure és que en general no es van arribar a detectar anticossos específics contra LAM. L'assaig anomenat Pathozyme és un kit comercial d'ELISA per a determinar les respostes específiques enfront 2 dels antígens de *M.tuberculosis*, el de 16 i el de 38kDa. Un clar increment de la resposta es va poder observar en els voluntaris vacunats amb totes les dosis testades de RUTI®, tot i que només la de 200 μ g de FCMtb va arribar a superar el *cut-off* marcat per la casa comercial per a definir una mostra com a positiva.

El sèrums es varen enviar al laboratori d'Alemanya per a que fossin testats (mitjançant ELISA casolans) per la presència d' anticossos (subtipus IgM, IgG i IgA) enfront els antígens recombinants de *M.tuberculosis* que vàrem fer servir com a estímuls durant tot l'assaig. Si bé no es varen trobar diferències estadísticament significatives, els resultats varen mostrar nivells pràcticament nuls d'anticossos IgA i nivells d'anticossos d'IgM i IgG incrementats (de forma clara o discreta, respectivament) en aquells individus vacunats amb RUTI® respecte els placebo-vacunats. Aquests nivells augmentats es mantenien i fins i tot augmentaven al llarg del període que va durar l'assaig. En un primer moment vàrem creure que el fet de trobar nivells molt més alts d'anticossos tipus IgM que de tipus IgG podria tenir diverses

explicacions. Teòricament i de forma general i obviant excepcions, els anticossos IgM apareixen abans que els de tipus IgG, que serien els que es mantindrien d'una manera molt més llarga. Segons aquesta idea creïem que potser la raó dels resultats explicats es podria deure al timing del mostreig, però per a comprovar-ho caldria repetir els assajos als voluntaris molt més temps després per a veure si aquest perfil hauria canviat en el temps, la resposta IgG augmentada o mantinguda i la resposta tipus IgM decreixent o desapareguda. També ens vàrem plantejar la possibilitat de que calgués restimular la immunitat de memòria per a poder detectar nivells més alts d'IgG, però això, que ens és inviable en els voluntaris per evidents raons regulatòries, només seria possible de comprovar en models experimentals animals vacunats amb RUTI® en que es fes un seguiment de la resposta humoral i la seva evolució en el temps en funció d'una pauta d'inoculacions repetides. L'anàlisi posterior ens ha revelat una altra explicació molt més plausible per a aquests resultats, recolzada en la revisió de diversos estudis observacionals portats a terme en humans i publicats a la literatura científica. A l'any 1995, Hussain *et al* varen testar el sèrum de 164 pacients diagnosticats de TB, 59 contactes de malalts tuberculosos i 51 individus sans control per la presència d'anticossos tipus IgM, IgE, IgG i subclasses d'IgG enfront filtrat de cultiu de *M.tuberculosis* mitjançant una tècnica d'ELISA. Els resultats són bastant aclaridors: trobaven diferències en els nivells d'IgG (sobretot IgG1, el que més tard va ser confirmat per Sousa *et al* [194]) en els malalts tuberculosos (independentment de si era TB pulmonar o no) respecte als altres dos grups. A més, els pacients amb TB pulmonar tenien més anticossos tipus IgM i IgE. La diferència més rellevant fou que els individus contactes tenien més nivells d'IgM que els donants sans del grup control, i de forma estadísticament significativa, pel que els autors concluien que la presència d'IgM podria indicar infecció recent per *M.tuberculosis* i que la importància entre infectat i malalt podria residir en el *switch* entre IgM-IgG, sense determinar quan es donaria aquesta transició [195]. Araujo *et al* [196], en un estudi on es valoraven els nivells de IgM, IgE, IgA i IgG de malalts tuberculosos de dues poblacions diferents, varen confirmar la presència majoritària d'anticossos tipus IgG. Ja a l'any 2002, Raja *et al* varen publicar l'anàlisi de la resposta humoral enfront l'antigen de 16kDa de *M.tuberculosis*, mesurant les IgG, A i M mitjançant ELISA i comparant 2 poblacions: una de malalts amb tuberculosos (confirmats per cultiu, n=175) i una d'individus sans (grup control, n=150). Els resultats varen evidenciar la presència següent (per ordre de magnitud de nivells): IgG majoritàriament, seguida per nivells d'IgA, i amb nivells molt més baixos IgM. Però en sans no trobaven en cap cas anticossos de tipus IgG i en canvi sí 4 individus amb IgA i 7 amb IgM de tipus específic [197]. Tot plegat suggereix que els anticossos tipus IgG podrien correlacionar-se amb malaltia, mentre que la presència d'IgM podria significar infecció o com a mínim contacte amb *M.tuberculosis*. Aquesta idea obliga a repensar els nostres resultats, en que l'absència d'anticossos tipus IgG seria fins i tot beneficiós i en que

els nivells alts d'IgM trobats en els individus vacunats podrien ser directament atribuïbles a la RUTI®, sense poder especificar si o en quin grau tindrien un rol protector.

6.2.4. Valoració dels altres estudis

Una de les limitacions de l'assaig de Fase 1 que vàrem dur a terme va ser el nombre tan gran de tècniques que es varen realitzar (que van requerir grans quantitats de sang i un calendari molt estricte a cada *timepoint* per tal de perdre les dades mínimes), alguns dels estudis sense arribar a aportar gaire informació útil.

Dues de les dosis de RUTI® en el cas de la incubació de 72 hores, i totes en el cas de la incubació durant 96 hores, varen mostrar activitat micobactericida com a mínim en un *timepoint* després d'incubar la sang total dels voluntaris amb *M.tuberculosis*, mentre que la sang dels voluntaris vacunats amb placebo, no. Aquest assaig reproduïa un experiment portat a terme per Cheon et al [173] que suggeria que podria ser útil com a potencial marcador de l'efecte d'una vacuna antituberculosa. Els nostres resultats no varen ser espectaculars i varen revertir en tots els casos. I tanmateix fan pensar que si aquest efecte s'ha trobat en gent sana resultats més esperançadors són esperables en els individus ja infectats per *M.tuberculosis*, i per tant la població diana de la vacunació amb RUTI®. De totes maneres el volum de sang que es necessita és major al teòric, degut a la densitat de la mateixa. Treballar amb sang, a més, fa la tècnica bruta, i existeix el perill addicional de manipular soques de *M.tuberculosis*. Per totes aquestes raons, doncs, la prova quedaria totalment descartada de cares a assajos futurs, per limitacions logístiques.

Sobre l'estudi per a avaluar els nivells de PCT la casa comercial considera les concentracions de PCT en individus sans d'un valor al voltant de 0,064 ng/mL per aquest sistema, tot i que per altres sistemes s'han considerat valors normals per sota de 0,05 ng/mL. Els nostres resultats varen demostrar valors basals similars o superiors a aquest *cut-off*. Tanmateix, si ens centrem en observar les variacions de resposta respecte els seus valors basals, l'únic que crida l'atenció és un lleuger increment en els individus vacunats amb RUTI® (dosis de 25 i 100µg de FCMtb), que en cap cas es va superar el *cut-off* que la casa comercial hauria establert per a determinar una infecció bacteriana com a causa d'inflamació. L'única conclusió a extreure seria que existeixen indicis per pensar que alguns dels voluntaris vacunats amb RUTI® van tenir una lleugera inflamació inespecífica respecte els individus placebo-vacunats.

Els resultats de l'assaig de les cèl·lules T $\gamma\delta$ varen ser tots negatius excepte per un individu del grup placebo, un de la dosi de 25µg de FCMtb, i dos de la dosi de 200µg de FCMtb (tots

únicament en un sol *timepoint*), que varen mostrar nivells d'IFN γ secretat després de l'estimulació de la sang total amb BrHPP. El fet de tenir tants pocs resultats positius es podria deure o bé a una real no influència de la RUTI® en la secreció d'IFN- γ per part de les cèl·lules T $\gamma\delta$ o a la poca presència de cèl·lules $\gamma\delta$ (que només representa un 1-5% del total de les cèl·lules T circulants). L'experiment que varem dur a terme va ser una reproducció exacta en quant a materials i mètodes del de Rojas et al [172]. Aquest estudi s'havia dut a terme en malalts tuberculosos i contactes, i els resultats es varen expressar en pg/mL. Donat que es considera que 1 IU/mL d'IFN- γ equival a 40 pg/mL, els resultats que van obtenir foren de l'ordre de 10,57 IU/mL en malalts tuberculosos i de 18,65 IU/mL en els individus contactes. Els valors crus que nosaltres vàrem obtenir positius foren els següents:

- Individu del grup placebo: 91,96 IU/mL
- Individu del grup vacunat amb 25 μ g de FCMtb: 1,15 IU/mL
- Individus del grup vacunat amb 200 μ g de FCMtb: 164,61 i 268,27 IU/mL

Tenint en compte que el nivell de detecció de la tècnica de l'ELISA usat (*kit* de QTF-CMI de Cellestis) té un rang de detecció que va fins a 16 IU/mL, si considerem els valors superiors a 16 IU/mL com a >16 IU/mL i obviem el resultat de l'individu del grup placebo (que l'únic que ens aporta és inespecificitat de la tècnica) ens trobem amb que 2 dels voluntaris vacunats amb la dosis màxima de RUTI® a una setmana després de la segona inoculació varen mostrar valors similars als dels contactes de malalts tuberculosos a l'estudi de Rojas. Existeix doncs la possibilitat de que la RUTI® generi secreció d'IFN- γ per part de les cèl·lules T $\gamma\delta$, però evidentment amb uns resultats tan poc sòlids és impossible fer aquesta afirmació. D'altra banda, repassant la literatura hem après que l'expansió de les cèl·lules T $\gamma\delta$ està relacionada amb la infecció i malaltia per *M.tuberculosis*. Al paper de Dieli *et al* publicat a l'any 2002 [198] els resultats evidenciaven una població de cèl·lules T $\gamma\delta$ (i específicament el subtipus V γ 9/V δ 2) augmentada en els individus infectats amb *M.tuberculosis* (TST+) respecte als donants sans TST negatius, però encara més augmentada en els malalts de TB. El mateix paper valorava l'expressió intracel·lular per part d'aquesta subpoblació cel·lular de granulisina (mitjançant citometria de flux), trobant diferències entre els grups d'infectats i malalts, i demostrant en els individus del primer grup nivells d'expressió alts (38% versus un 10% en els malalts). En analitzar mostres dels individus després de sotmetre'ls a tractament antituberculós, els malalts mostraven un decreixement de l'expansió de cèl·lules T V γ 9/V δ 2 respecte els seus basals i en canvi un augment de l'expressió intracel·lular de granulisina per part d'aquestes cèl·lules.

El que ens preguntem després de l'assaig és si a més de determinar la secreció d'IFN- γ per part de les cèl·lules T $\gamma\delta$ haguéssim hagut de valorar l'expansió d'aquesta subpoblació

cel·lular amb la BrHPP, per tal de poder oferir un anàlisi més ampli de l'efecte de la vacunació amb RUTI®.

La granulisina és una proteïna de les cèl·lules *natural killer* i dels limfòcits T citotòxics, que s'emmagatzema en granzims i està involucrada en l'activitat micobactericida atacant la paret de la micobactèria. A banda de les funcions antimicrobiana (sobre micobactèries, bacteries i els fongs) i antitumoral que se li atribueixen en base a experiments *in vitro*, és un biomarcador d'inflamació, ja que té activitat proinflamatòria.

La relació de la granulisina amb la TB ha motivat diferents estudis interessants, com el presentat en una xerrada a l'*Imperial College* de Londres pel Dr. Steffen Stenger en que es presentaven els resultats d'un treball conduït en pacients amb artritis reumatoide. Comparats els nivells basals amb els nivells de granulisina després d'una teràpia de 2 setmanes amb anti-TNF, els malalts presentaven caigudes espectaculars després del tractament. Donada la relació intensa entre aquest tipus de teràpia i l'eclosió de malaltia tuberculosa (que ha promogut l'*screening* de TB en malalts immunodeprimits subsidiaris d'estratègies terapèutiques amb anti-TNF), l'autor suggeria que els nivells de granulisina podrien jugar-hi un rol important [199].

Els nivells de granulisina en sèrum estan relacionats amb la immunitat cel·lular i es per això que Dieli *et al* varen posar a punt una tècnica d'ELISA per a mesurar nivells de granulisina en sèrum i el van usar en dos estudis duts a terme en malalts de TB. A l'article de Di Liberto *et al*, els autors varen valorar els nivells serològics de granulisina de 72 nens afectes de diferents formes de TB i de 150 donants sans (TST + i TST -). Comparant els resultats de tots els individus TST+, existeixen diferències estadísticament significatives ($p < 0,005$) entre els malalts i els donants sans, aquests últims presentant valors molt superiors. Els voluntaris malalts foren retestats post-tractament antituberculós, i els resultats van demostrar un increment dels nivells de granulisina equiparables als dels donants sans TST+. Sahiratmadja *et al* varen comprovar el mateix en adults a Indonèsia, país d'alta prevalença de la malaltia. Es comparaven els nivells de granulisina de pacients (abans, durant i després del tractament antituberculós; $n=177$) respecte un grup control amb donants considerats sans (però aquí no es va realitzar cap TST, pel que no tenim dades que suggereixin infecció o no). Els nivells de granulisina estaven disminuïts en els malalts abans del tractament, pujaven durant el mateix i al final ja s'havien equiparat amb els dels donants considerats sans [200].

En l'estudi que ens ocupa, els assajos per determinar la granulisina i la BLT-esterasa es varen dur a terme al laboratori del Pr. Dieli, i varen demostrar nivells incrementats de granulisina (dosi de 25µg de FCMtb) i d'activitat granzimàtica (dosis de 100 i 200µg de

FCMtb) en els individus vacunats, tot i que per les raons presentades a l'apartat de resultats creiem que no podem donar massa importància a aquestes troballes.

Dieli et al ja havien apuntat que d'existir una correlació entre els nivells serològics de granulicina i l'activitat de la malaltia tuberculosa o la seva evolució durant i després del tractament es podria usar aquesta tècnica com a marcador d'avaluació d'altres estratègies terapèutiques com la vacunació [201]. Els resultats dels dos estudis que presentem dels autors suggereixen que el que caldria esperar en individus vacunats amb RUTI® serien respostes similars a les obtingudes pels voluntaris sans TST+ (en aquest cas els T-SPOT TB+), i superiors a les dels sans TST-, donat que els dos primers casos implicarien un contacte amb els antigens de *M.tuberculosis* (per vacunació o per infecció, respectivament).

Al present assaig, el resultat més significatiu que varem obtenir fou l'augment de la granulicina en els individus vacunats amb la dosi de RUTI® de 25µg de FCMtb. Tanmateix, els resultats són tan poc clars que queden dubtes que la RUTI® sigui capaç de generar més granulicina com a mínim en individus sans. Seria interessant poder analitzar els paràmetres en individus infectats vacunats inclosos en experiments futurs (en que la resposta a la vacunació s'espera més intensa) per veure si aquest efecte observat és real o fou fruit de l'atzar.

6.3 SOBRE LA SEURETAT DEMOSTRADA PER LES DIFERENTS DOSIS TESTADES DE LA VACUNA I LA SEVA CORRELACIÓ AMB ELS RESULTATS D'IMMUNOGENICITAT

L'objectiu primer de l'assaig de Fase 1 de la vacuna RUTI® fou avaluar la seguretat de les diferents dosis testades en individus sans i intentar establir un rang dosi-resposta que fos acceptable a nivell de tolerabilitat. L'avaluació de la seguretat la va dur a terme el Servei de Farmacologia Clínica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol a la Unitat de Fase 1 del mateix hospital. Es considera un EA tot aquell episodi mèdic involuntari que apareix en un subjecte inclòs en un assaig clínic, i es varen recollir i llistar segons el System Organ Class of MedDRA. A més, tots els EA es varen classificar segons la seva severitat (lleuger, moderat i greu) i la seva relació amb la vacunació (impossible, improbable, possible, probable) segons un algoritme predefinit usat pel sistema de farmacovigilància espanyol i basat en la modificació de Karch i Lasagna [202, 203]. Els resultats varen evidenciar un número acceptable d'EA (175 episodis), dels quals el 98,9% eren lleus i un 1,1% moderats. L'EA més freqüent fou el mal de cap, reportat en 16/24 voluntaris (66,7%). Els EA sistèmics foren lleus i molt escassos, i només es van considerar com a possiblement relacionats amb la

vacunació. En cap cas es va detectar ANA positius, reforçant la idea de que la vacunació amb RUTI® *per se* no és capaç de generar-los.

Els EA locals foren més nombrosos i amb més seguretat relacionats amb la inoculació de RUTI® (veure taula 13), i la seva incidència fou superior en els individus *vero*-vacunats que en els placebo-vacunats i relacionada amb la dosi testada (a dosi més alta, més EA locals).

Preferred term	Placebo	RUTI doses (in µg of FCMtb)			
		5	25	100	200
Twitching	4/8 (50%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)	3/4 (75%)
Erithema	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	0/4 (0%)
Mild/Moderate Inflammation	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	3/4 (75%)
Mild/Moderate Induration	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	3/4 (75%)

TAULA 13. EA locals recollits durant l'assaig. Es mostra el número de subjectes en els que se'ls va objectivar en algú moment del seguiment els EA llistats com a preferred term. S'adjunta el % d'individus que representen del total de voluntaris per cada grup de

L'EA més freqüent fou l'aparició de fasciculacions (*twitching*) al punt d'inoculació, però ocorregué per igual en tots els grups (incloent el placebo) pel que creiem que es podria deure més a un dels excipients continguts en el producte final de la vacuna que no pas al principi actiu. Archivel Farma està treballant en la formulació final per tal de millorar-la i evitar aquest EA de cares a experiments futurs. El dolor en el punt d'inoculació (avaluat segons una escala visual analògica que va de 0 a 100) va estar proporcionalment relacionat amb la dosi de RUTI® testada, essent pràcticament nul en els individus vacunats amb placebo, i fou major després de la segona inoculació. Els voluntaris vacunats amb les dosis més altes també varen experimentar més incidència d'eritema/inflamació/induració al punt d'inoculació, i de forma estadísticament significativa.

En dos dels voluntaris als que se'ls va objectivar inflamació i induració caracteritzades com a moderades, el tamany ens va semblar prou important com per a sotmetre'ls a l'avaluació per part del departament de Dermatologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Un d'ells havia estat vacunat amb la dosi de RUTI® de 100µg i l'altre amb la de 200µg de FCMtb. El facultatiu del servei de Dermatologia les va classificar com a paniculitis en ambdós casos i va considerar oportú agafar biòpsies per al seus anàlisis, que es van dur a terme amb la col·laboració del Servei de Microbiologia i el Departament d'Anatomo-

Patologia del mateix hospital. L'informe d'anatomopatologia va descriure ambdues lesions com a una panniculitis granulomatosa inespecífica. Les mostres varen ser testades per la presència de bacteries, micobacteries i fongs, essent tots els cultius negatius. En un dels casos, la tinció amb auramina va evidenciar fragments de bacils de *M.tuberculosis*, alguns recognoscibles en la tinció de Ziehl-Nilsen. Aquest fet era esperable, donat que durant els estudis preclínics de la vacuna s'havien fet assajos per a determinar el número de bacils sencers o de fragments grans que quedaven en el producte final, evidenciant-hi la seva presència. Durant el seu procés de fabricació, les cèl·lules de *M.tuberculosis* se sotmeten a una fragmentació mecànica repetida, i el producte obtingut és posteriorment pasteuritzat. Un estudi es va conduir a la UTE l'any 2005 amb la finalitat de determinar la cinètica de la viabilitat de la soca usada per a la fabricació de la RUTI®. Les mostres es varen sotmetre a la pasteurització durant temps diferents (dins d'un rang que anava de 30 segons fins a una hora de durada) i es varen sembrar en medi sòlid agar 7H11 per a determinar-ne les Unitats Formadores de Colònies o CFU/mL, i en vialets de cultiu líquid 12 B per a analitzar-ne l'índex de creixement mitjançant el sistema Bactec 460. Els resultats varen determinar que 10 minuts eren suficients per a que no es reconegués positivitat per cap dels dos mètodes usats, tot i que es va mantenir la pasteurització durant una hora de durada en la fabricació de la vacuna. La negativitat dels cultius de les biòpsies dels dos individus afectats varen corroborar aquesta afirmació. Posteriorment a l'assaig de Fase 1, tanmateix, l'empresa responsable del desenvolupament de la RUTI® ha millorat el procés per tal de minimitzar el número de fragments grans en el principi actiu del producte final. Ambdós episodis varen ser únicament moderats, i es van recuperar totalment en menys d'un mes.

Les troballes en l'avaluació de la seguretat estan totalment en línia amb la dels estudis realitzats amb altres productes similars. Inflamació, induració i altres reaccions locals s'han descrit en altres estudis duts a terme en població sana [94, 107], i són molt comuns en assajos clínics que avaluen vacunes *boosting* [98, 107, 204]. Hoft *et al* varen demostrar inflamació en tots dos grups estudiats (el de voluntaris vacunats amb rBCG30 i els placebo-vacunats), però que era moderat en 6/18 vacunats vs un 1/17 dels placebos, i sever en 2/18 vs 0/17. A més, al final de l'assaig es descrivia ulceració moderada o severa en 2 dels 18 voluntaris vacunats vs cap del grup placebo [94]. A l'article de Vuola *et al*, els autors reconeixen un drenatge a nivel local en un 11% dels individus vacunats amb MV vs un 0,5% en els individus control; i en 1 de 19 voluntaris es va observar un abcès estèril al lloc de la inoculació [98]. La vacuna MVA85A registra taxes d'EA locals molt altes. Pathan *et al*, en avaluar l'administració de MVA85A en diferents règims/intervals, diuen que l'eritema és present en un 100%, el prurit en un 50%, el dolor entre 90 i 100% i induració en un 100% dels vacunats [204]. El Pr. A.Hill en avaluar el desenvolupament clínic de la vacuna després

d'haver sigut aplicada a 258 individus (en diferents estudis) va reconèixer que era ben tolerada tot i provocar EA sistèmics lleus en un 30% dels casos i de donar EA locals en més d'un 90% dels individus vacunats [186].

Si bé el treball que aquí ens ocupa és únicament l'avaluació de la immunogenicitat, considerem important donar les dades de l'estudi de seguretat i aprofundir en la relació que hi ha entre una i altra. Els individus que varen tenir reaccions locals en forma d'inflamació i induració foren el següents: V13 (vacunat amb la dosi de 100µg de FCMtb), i V19, V22 i V23 (tots tres vacunats amb la dosi de 200µg de FCMtb). El V13 va presentar respostes altíssimes en tots els assajos que es van dur a terme per a avaluar la Immunogenicitat, i en canvi V19 va mostrar respostes molt discretes. Els voluntaris V22 i V23 només van tenir respostes altes en dues tècniques: el QTF CMI i l'assaig de memòria. En aquest sentit, de totes les proves realitzades seria l'assaig de memòria el que presentaria més correlació amb els EA locals apareguts després de la vacunació amb RUTI® en les seves dosis més altes: 3 dels 4 individus amb reaccions locals presentarien nivells alts de secreció d'IFN-γ atribuïbles a les cèl·lules T de memòria.

Però el cert és que altres individus vacunats amb RUTI® varen presentar respostes altes en els diferents assajos sense demostrar cap correlació amb la incidència d'EA. Com a exemple: entre d'altres, el voluntari V24 va demostrar resultats molt incrementats tant en l'ELISPOT com en el T-SPOT TB; i V6 per l'ELISPOT, pel QTF-CMI i el QTF-G. La sensació global és que si bé els EA locals semblen mantenir certa correlació amb l'assaig de memòria únicament, una resposta immunològica específica deguda a la vacunació amb RUTI® no implica una més alta incidència d'EA.

6.4 VALORACIÓ GLOBAL DE LA IDONEÏTAT DE L'ESTUDI DE CARES A FUTURS ASSAJOS DEL DESENVOLUPAMENT CLÍNIC DE LA RUTI®

Cap dels voluntaris inclosos en l'assaig ni estava infectat per *M.tuberculosis* (segons el resultat del T-SPOT TB a l'*screening*) ni havia sigut vacunat amb BCG prèviament, pel que es considera que aquesta era la primera vegada que entraven en contacte amb els antígens de *M.tuberculosis* (si vacunats amb alguna de les dosis de RUTI®). Aquest fet no es tornarà a repetir en els assajos futurs que es conduiran durant el desenvolupament clínic de la vacuna, ja que la població diana del tractament seran els individus prèviament infectats. Per ésser un assaig conduït en voluntaris sans, les respostes immunològiques obtingudes es poden considerar notables, i tot i resultar impossible de fer una extrapolació fiable, respostes

superiors s'esperen en individus infectats per *M.tuberculosis* per haver estat "primed" per la infecció.

És cert que l'assaig fou llarg i inclouïa moltes tècniques, el que va representar una gran càrrega de treball. L'execució de totes però, a banda de demostrar una resposta immunològica deguda a la vacuna (l'objectiu primari de l'estudi que ens ocupa), ens ha servit per a poder tenir raons fiables per a determinar quins assajos podrien ser adients per als assajos futurs. És evident, per les raons exposades als apartats de resultats i de la discussió, que hi ha tècniques a les que no donaríem suport: algunes per esser logísticament difícils i algunes per haver aportat poca informació.

L'avaluació de la resposta humoral ha revelat resultats que si bé no han estat diferents d'una manera estadísticament significativa, són dignes de menció. L'anàlisi posterior d'aquests resultats suggereix una pauta d'increment d'IgM enfront els antígens de *M.tuberculosis* amb uns nivells d'IgG baixos similar a la que existeix en individus contactes de malalts tuberculosos i que podria respondre al contacte amb els antígens degut a la vacunació. És per aquesta raó que recomanaríem recollir sang dels futurs voluntaris i extreure'n el sèrum, amb la finalitat de disposar-ne si en el seu moment es decidís fer una avaluació de la resposta humoral deguda a la vacunació.

D'altra banda, la nostra experiència ens inclina a considerar l'avaluació de la resposta cel·lular com a imprescindible. Els resultats de l'ELISPOT suggereixen una millor sensibilitat i una millor correlació amb l'evolució de les respostes en el temps que el QTF-CMI. Tanmateix, consideraríem necessari limitar l'avaluació de les respostes enfront a estímuls seleccionats. El PPD ens ajuda a tenir una visió global, i és l'estímul més equiparable a una resposta a la vacuna RUTI®, donada la naturalesa d'ambdues. Afegeix a més la seguretat de ser un producte àmpliament utilitzat en recerca en el camp de la TB, i en el testatge de noves vacunes i estratègies terapèutiques en aquest àmbit. A més, considerem que caldria incloure alguns estímuls que poguessin revelar les respostes enfront antígens tant de bacils en creixement com en estat de latència que conceptualment la RUTI® hauria de generar (donat que es fabrica a partir de cultius estressats de *M.tuberculosis*). Així, suggeriríem l'antigen 85B per ser eminentment estructural i molt antigènic, l'ESAT-6 per ser secretat i característic de bacils en creixement, i els antígens de 16 i 38 kDa per haver-se relacionat amb l'estat de latència. A més, caldria usar un dels kits comercials de TIGRA perquè, si bé no han estat dissenyats per a avaluar l'efecte de cap estratègia terapèutica, han demostrat veure's influenciats per la vacunació i juguen amb l'avantatge de ser tècniques validades, el que afegeix reproductibilitat en la seva execució. Per a seguir una línia de treball, i recolzats pels resultats trobats en l'assaig que ens ocupa, usaríem el T-SPOT TB. Però tots aquests mètodes estan encaminats a avaluar respostes de les cèl·lules T efectores, ja que en realitat

el que interessa valorar és l'efecte terapèutic immediat produït per la RUTI®. De tota manera, també resulta interessant avaluar la memòria immune, donat que la RUTI® afegeix un efecte positiu addicional: la prevenció de reinfeccions, tal i com ja ha estat demostrat en assajos en models d'experimentació animal en ratolins i conills porquins (resultats presentats al Keystone Symposia del 2009 [205]). És per això que també recomanaríem la detecció d'IFN- γ secretat després del cultiu de la sang total amb PPD durant 7 dies, el que aquí hem anomenat assaig de memòria.

La recent publicació per part de Hanekom *et al* en nom de la *WHO Initiative for Vaccine Research* (WHO/IVR) exposa les conclusions de 3 meetings en els que experts de renom internacional es varen reunir per a discutir l'harmonització dels assajos a conduir durant els CT per al testatge de noves vacunes contra la TB [188]. L'objectiu seria poder arribar a comparar la immunogenicitat dels diferents candidats (avaluats en diferents CT), pel que s'estableix una taula dels assajos recomanables, que es resumiria en que la combinació d'assajos de curt i llarg terme per a mesurar la immunitat induïda per la vacunació, seria l'opció idònia. El fet de que fossin basats en PBMC o en sang total quedaria a l'elecció dels investigadors a nivel individual. A més, caldria que s'inclogués un assaig simple harmonitzat que recomanen que fos l'anàlisi de les respostes immunes enfront antígens micobacterians (usant PPD) mesurant la producció de citocines després de l'estimulació de la sang total diluïda (1:10) durant 7 dies. Tant el disseny del nostre assaig com les nostres conclusions de cares a assajos futurs s'adhereixen a les recomanacions de la WHO, ja que tal com hem dit, com a assaig de curt terme escolliríem l'ELISPOT, i com al de llarg terme utilitzaríem el seu assaig harmonitzat, ja que vindria a ser el que nosaltres hem usat a la Fase 1 i hem anomenat de memòria.

7. CONCLUSIONS

1. La vacuna RUTI® ha demostrat ser immunogènica en individus sans dintre el context d'un assaig de Fase 1.
2. Les respostes immunològiques de tipus cel·lulars aconseguides en general segueixen una tendència dosi-resposta, obtenint la resposta més poliantigènica amb la dosi de 25µg de FCMtb.
3. Com a experiència de l'estudi, recomanariem, en la realització en assajos futurs en el desenvolupament clínic de la vacuna: 1) l'avaluació de la immunitat cel·lular mitjançant ELISPOT enfront PPD i els antígens de *M.tuberculosis* ESAT-6, 85B, i 16 i 38kDa; 2) l'assaig de memòria; i 3) l'avaluació de la resposta humoral enfront els mateixos antígens.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] H. Sahli, Sahli's Tuberculin Treatment, John Bale, Sons & Danielsson, Ltd., London, 1912.
- [2] F.M. Pottenger, Tuberculin in Diagnosis and Treatment., C. V. Mosby company, St. Louis, 1913.
- [3] R.W. Allen, Vaccine Therapy and the Opsonic Method of Treatment, H. K. Lewis, London, 1908.
- [4] A.E. Wright, A lecture on therapeutic inoculations of bacterial vaccines and their practical exploitation in the treatment of disease, British Medical Journal, 1903, pp. 1069-1074.
- [5] G. Canetti, The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. Histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis, Springer Publishing Company, Inc., New York, 1955.
- [6] R. Dubos, Biochemical determinants of infection., Bull N Y Acad Med 31 (1955) 5-19.
- [7] J. Ferrán, Las Paradojas Científicas de la Tuberculosis y las consecuencias prácticas de su explicación, 1920.
- [8] A. Calmette, La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG", Masson et Cie, Paris, 1927.
- [9] WHO, Global tuberculosis control : epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009, Geneva, Switzerland, 2009.
- [10] G. Comstock, How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults?, Int J Tuberc Lung Dis 3 (1999) 847-850.
- [11] M. Pai, N. Dendukuri, L. Wang, R. Joshi, S. Kalantri, H. Rieder, Improving the estimation of tuberculosis infection prevalence using T-cell-based assay and mixture models., Int J Tuberc Lung Dis 12 (2008) 895-902.
- [12] S. Kaufmann, S. Cole, V. Mizrahi, E. Rubin, C. Nathan, Mycobacterium tuberculosis and the host response., J Exp Med 201 (2005) 1693-1697.
- [13] U. Mack, G. Migliori, M. Sester, H. Rieder, S. Ehlers, D. Goletti, A. Bossink, K. Magdorf, C. Hölscher, B. Kampmann, S. Arend, A. Detjen, G. Bothamley, J. Zellweger, H. Milburn, R. Diel, P. Ravn, F. Cobelens, P. Cardona, B. Kan, I. Solovic, R. Duarte, D. Cirillo, LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement., Eur Respir J 33 (2009) 956-973.
- [14] T. Lillebaek, A. Dirksen, I. Baess, B. Strunge, V. Thomsen, A. Andersen, Molecular evidence of endogenous reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 years of latent infection., J Infect Dis 185 (2002) 401-404.

- [15] T. Ulrichs, S. Kaufmann, New insights into the function of granulomas in human tuberculosis., *J Pathol* 208 (2006) 261-269.
- [16] P. Cardona, A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection., *Infection* 37 (2009) 80-86.
- [17] R. Pérez-Padilla, F. Franco-Marina, The impact of altitude on mortality from tuberculosis and pneumonia., *Int J Tuberc Lung Dis* 8 (2004) 1315-1320.
- [18] M. Vargas, M. Furuya, C. Pérez-Guzmán, Effect of altitude on the frequency of pulmonary tuberculosis., *Int J Tuberc Lung Dis* 8 (2004) 1321-1324.
- [19] S. Arend, J. van Dissel, Evidence of endogenous reactivation of tuberculosis after a long period of latency., *J Infect Dis* 186 (2002) 876-877.
- [20] Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement., *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) S221-247.
- [21] A. Lalvani, Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy., *Chest* 131 (2007) 1898-1906.
- [22] J. Beckford-Ball, NICE guidelines to improve TB management and prevention., *Nurs Times* 102 19-20.
- [23] C. Bell, NICE guidelines for tuberculosis. Will they help improve practice?, *Nurs Times* 102 42-43.
- [24] G. Mazurek, J. Jereb, P. Lobue, M. Iademarco, B. Metchock, A. Vernon, Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States., *MMWR Recomm Rep* 54 (2005) 49-55.
- [25] M. Pai, A. Zwerling, D. Menzies, Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update., *Ann Intern Med* 149 (2008) 177-184.
- [26] R. Diel, R. Loddenkemper, K. Meywald-Walter, S. Niemann, A. Nienhaus, Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis., *Am J Respir Crit Care Med* 177 (2008) 1164-1170.
- [27] A. Hesseling, R. Gie, A. Mandalakas, The predictive value of the ELISpot-based interferon-gamma-release assay for tuberculosis disease., *Ann Intern Med* 150 (2009) 428-429; author reply 429-430.

- [28] M. Bakir, K. Millington, A. Soysal, J. Deeks, S. Efee, Y. Aslan, D. Dosanjh, A. Lalvani, Prognostic value of a T-cell-based, interferon-gamma biomarker in children with tuberculosis contact., *Ann Intern Med* 149 (2008) 777-787.
- [29] P. Cardona, Should an immunosuppressed patient with a positive TIGRA test and a negative PPD test be treated?, *Med Clin (Barc)* 130 (2008) 776-777.
- [30] G. Comstock, Tuberculosis--a bridge to chronic disease epidemiology., *Am J Epidemiol* 124 (1986) 1-16.
- [31] H. Rieder, Of contagion and inherited susceptibility: an epidemiologic tribute to George W. Comstock., *Am J Respir Crit Care Med* 176 (2007) 1176-1177.
- [32] R. Dubos, Biological and Social Aspects of Tuberculosis . The Hermann M. Biggs Lecture, The New York Academy of Medicine, 1951.
- [33] E. Vynnycky, P. Fine, Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis., *Am J Epidemiol* 152 (2000) 247-263.
- [34] Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999., *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) 1376-1395.
- [35] N. Parrish, J. Dick, W. Bishai, Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*., *Trends Microbiol* 6 (1998) 107-112.
- [36] B. de Jong, P. Hill, A. Aiken, T. Awine, M. Antonio, I. Adetifa, D. Jackson-Sillah, A. Fox, K. Deriemer, S. Gagneux, M. Borgdorff, K. McAdam, T. Corrah, P. Small, R. Adegbola, Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia., *J Infect Dis* 198 (2008) 1037-1043.
- [37] L.C.A. Calmette, LA vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG", Masson et Cie, Paris, 1927.
- [38] T. Brewer, G. Colditz, Relationship between bacille Calmette-Guérin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis., *Clin Infect Dis* 20 (1995) 126-135.
- [39] N. Aronson, M. Santosham, G. Comstock, R. Howard, L. Moulton, E. Rhoades, L. Harrison, Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study., *JAMA* 291 (2004) 2086-2091.
- [40] R. Weir, P. Gorak-Stolinska, S. Floyd, M. Lalor, S. Stenson, K. Branson, R. Blitz, A. Ben-Smith, P. Fine, H. Dockrell, Persistence of the immune response induced by BCG vaccination., *BMC Infect Dis* 8 (2008) 9.

- [41] Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report-- Tuberculosis Prevention Trial., *Bull World Health Organ* 57 (1979) 819-827.
- [42] G. Colditz, C. Berkey, F. Mosteller, T. Brewer, M. Wilson, E. Burdick, H. Fineberg, The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature., *Pediatrics* 96 (1995) 29-35.
- [43] M. Lagranderie, A. Balazuc, E. Deriaud, C. Leclerc, M. Gheorghiu, Comparison of immune responses of mice immunized with five different Mycobacterium bovis BCG vaccine strains., *Infect Immun* 64 (1996) 1-9.
- [44] C. Palmer, M. Long, Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis., *Am Rev Respir Dis* 94 (1966) 553-568.
- [45] R. Weir, G. Black, B. Nazareth, S. Floyd, S. Stenson, C. Stanley, K. Branson, L. Sichali, S. Chaguluka, L. Donovan, A. Crampin, P. Fine, H. Dockrell, The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guérin vaccination in southern England and northern Malawi., *Clin Exp Immunol* 146 (2006) 390-399.
- [46] A. Hesselning, H. Rabie, B. Marais, M. Manders, M. Lips, H. Schaaf, R. Gie, M. Cotton, P. van Helden, R. Warren, N. Beyers, Bacille Calmette-Guérin vaccine-induced disease in HIV-infected and HIV-uninfected children., *Clin Infect Dis* 42 (2006) 548-558.
- [47] A. Hesselning, B. Marais, R. Gie, H. Schaaf, P. Fine, P. Godfrey-Faussett, N. Beyers, The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children., *Vaccine* 25 (2007) 14-18.
- [48] A. Hesselning, M. Cotton, C. Fordham von Reyn, S. Graham, R. Gie, G. Hussey, Consensus statement on the revised World Health Organization recommendations for BCG vaccination in HIV-infected infants., *Int J Tuberc Lung Dis* 12 (2008) 1376-1379.
- [49] A. Hesselning, L. Johnson, H. Jaspan, M. Cotton, A. Whitelaw, H. Schaaf, P. Fine, B. Eley, B. Marais, J. Nuttall, N. Beyers, P. Godfrey-Faussett, Disseminated bacille Calmette-Guérin disease in HIV-infected South African infants., *Bull World Health Organ* 87 (2009) 505-511.
- [50] Guia per a la prevenció i el control de la tuberculosi infantil, Quaderns de Salut Pública, Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya, Barcelona, 1995.
- [51] J. Ruiz-Manzano, R. Blanquer, J. Calpe, J. Caminero, J. Caylà, J. Domínguez, J. García, R. Vidal, [Diagnosis and treatment of tuberculosis], *Arch Bronconeumol* 44 (2008) 551-566.

- [52] From the Centers for Disease Control and Prevention. Update: Fatal and severe liver injuries associated with Rifampin and Pyrazinamide for latent tuberculosis infection, and revisions in American Thoracic Society/CDC recommendations--United States, 2001., *JAMA* 286 (2001) 1445-1446.
- [53] A. Fraser, M. Paul, A. Attamna, L. Leibovici, Drugs for preventing tuberculosis in people at risk of multiple-drug-resistant pulmonary tuberculosis., *Cochrane Database Syst Rev* (2006) CD005435.
- [54] *N.Y. Times*, Dr. Friedmann's own story of his tuberculosis cure. The address made by him before the Berlin Medical Society in which he made his now famous claims that he had discovered a cure for the disease., (1913).
- [55] P.G. Belmes, 1.500 casos de Tuberculosis tratados por la vacuna Friedmann, P.G. Belmes, Buenos Aires, 1937.
- [56] Anonymous, Dr. Friedmann's own story of his tuberculosis cure. The address made by him before the Berlin Medical Society in which he made his now famous claims that he had discovered a cure for the disease., *The New York Times*, 1913.
- [57] Anonymous, White plague cure found in Berlin?, *The New York Times*, 1912.
- [58] Soria, Benito, *Vacuna Anti-alfa de Ferrán*, 1927.
- [59] J.T. Montserrat, Presencia del Dr. Ferrán en Mallorca, *IV Congrés d'Història de la Medicina Catalana*, Poblet, 1985, pp. 321-324.
- [60] R. Dubos, *The Bacterial Cell*, 1945.
- [61] Moberg, C. L., René Dubos, friend of the Good Earth: microbiologist, medical scientist, environmentalist, *ASM Press*, 2005.
- [62] R. Dubos, Acquired immunity to tuberculosis, *Am Rev Respir Dis* 90 (1964) 505-515.
- [63] R. Koch, A further communication on a remedy for tuberculosis, *British Medical Journal*, 1890, pp. 1193-1199.
- [64] P. Cardona, [Robert Koch was right. Towards a new interpretation of tuberculin therapy], *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24 385-391.
- [65] T. Daniel, Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis., *Int J Tuberc Lung Dis* 9 (2005) 1181-1182.
- [66] C. Gradmann, Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin., *Med Hist* 45 (2001) 1-32.
- [67] Pottenger, F. Marion, *Tuberculin in Diagnosis and Treatment*, 1913.
- [68] M. Morris, The effects of Koch's tuberculin combined with surgical measures in the treatment of lupus, 1 (1893) 1154-1155.
- [69] The value of Koch's tuberculin, *Journal American Medicine Association*, 1891, pp. 672-673.

- [70] T.M. Daniel, *Captain of death : the story of tuberculosis*, University of Rochester Press, Rochester (New York), 1997.
- [71] C. Riviere, E. Morland, *Tuberculin Treatment*, Oxford Medical Publications, London, 1913.
- [72] E.L. Trudeau, *Tuberculin Immunization in the treatment of pulmonary tuberculosis*, American Journal of the medical sciences, New York, 1907.
- [73] F.E. Gunter, *Tuberculin in practice. Its value in the treatment of early tuberculosis and asthma*, The Gregg Publishing Company Ltd., London, 1928.
- [74] A.E. Wright, *Notes on the treatment of furunculosis, sycosis and acne by the inoculation of a staphylococcus vaccine*, *Lancet*, 1902, pp. 874-884.
- [75] Z. Cope, *Almroth Wright: Founder of modern vaccine-therapy*, Nelson, London, 1966.
- [76] A. Wright, *On spontaneous phagocytosis, and on the phagocytosis which is obtained with the heated serum of patients who have responded to tubercular infection, or, as the case may be, to the inoculation of a tubercle vaccine*, in: S. Reid (Ed.), *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1906, pp. 211-225.
- [77] A. Wright, *An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis*, in: S.R. Douglas (Ed.), *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London, 1903-1904*, pp. 357-370.
- [78] A. Wright, *On the action exerted upon the staphylococcus pyogenes by human blood fluids, and on the elaboration of protective elements in the human organism in response to inoculations of a staphylococcus vaccine*, in: S.R. Douglas (Ed.), *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London, 1904-1905*, pp. 147-159.
- [79] A. Wright, *On the possibility of determining the presence or absence of tubercular infection by the examination of a patient's blood and tissue fluids*, in: S. Reid (Ed.), *Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1906, pp. 194-211.
- [80] C. Ogilvy, *A contribution to the study of tuberculin in orthopedic practice: the Calmette Ophtalmo-tuberculin test*, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1908, pp. 35-47.
- [81] W.C. Wilkinson, *The tuberculin dispensary for the poor*, Nisbet & Co. Ltd, London, 1909.
- [82] C. Riviere, *The vaccine treatment of tuberculosis in children*, *British Medical Journal*, 1907, pp. 859-862.
- [83] H.W. Crowe, *The autoinoculation test in tuberculosis*, *British Medical Journal*, 1912, p. 1515.

- [84] J. Rentoul, The autoinoculation test in tuberculosis, *British Medical Journal*, 1912, p. 1396.
- [85] C. Riviere, *The early diagnosis of tubercle*, Oxford Medical Publications, London, 1914.
- [86] L. Bryder, *Below the magic mountain : a social history of tuberculosis in twentieth century Britain*, Clarendon, Oxford, 1988.
- [87] F.M. Pottenger, *Tuberculosis in the child and the adult*, The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1934.
- [88] C. Riviere, A lecture on the principles of treatment of pulmonary tuberculosis, *British Medical Journal*, 1926, pp. 771-775.
- [89] E. Bonime, *Tuberculin and vaccine in tubercular affections*, The Southworth company publishers, Troy, New York, 1917, p. 267.
- [90] P.J. Cardona, A Dynamic Reinfection Hypothesis of Latent Tuberculosis Infection, *Infection* (2009).
- [91] A.E. Wright, A lecture on the inoculation treatment of tuberculosis, 1904.
- [92] S.H. Kaufmann, *Tuberculosis: achievements and new horizons*, Oral communication at the International Conference on Poverty-related diseases, November 13-14th, Brussels, Belgium, 2008.
- [93] TB Vaccines Pipeline, Working Group on New TB Vaccines. StopTB PartnerShip, 2008.
- [94] D. Hoft, A. Blazevic, G. Abate, W. Hanekom, G. Kaplan, J. Soler, F. Weichold, L. Geiter, J. Sadoff, M. Horwitz, A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers., *J Infect Dis* 198 (2008) 1491-1501.
- [95] E. Tchilian, C. Desel, E. Forbes, S. Bandermann, C. Sander, A. Hill, H. McShane, S. Kaufmann, Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing *M. tuberculosis* antigen 85A against murine tuberculosis., *Infect Immun* 77 (2009) 622-631.
- [96] clinicaltrials.gov webpage: <http://www.clinicaltrials.gov/>, 2009.
- [97] Vakzine-manager, Vakzine-manager webpage: http://www.vakzine-manager.de/Tuberculosis_vaccine.169.0.html?&L=1, 2007.
- [98] J. Vuola, M. Ristola, B. Cole, A. Järviluoma, S. Tvaroha, T. Rönkkö, O. Rautio, R. Arbeit, C. von Reyn, Immunogenicity of an inactivated mycobacterial vaccine for the prevention of HIV-associated tuberculosis: a randomized, controlled trial., *AIDS* 17 (2003) 2351-2355.

- [99] R. Waddell, C. Chintu, A. Lein, A. Zumla, M. Karagas, K. Baboo, J. Habbema, A. Tosteson, P. Morin, S. Tvaroha, R. Arbeit, A. Mwinga, C. von Reyn, Safety and immunogenicity of a five-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae* vaccination for the prevention of HIV-associated tuberculosis., *Clin Infect Dis* 30 Suppl 3 (2000) S309-315.
- [100] J. Johnson, R. Kanya, A. Okwera, A. Loughlin, S. Nyole, D. Hom, R. Wallis, C. Hirsch, K. Wolski, J. Foulds, R. Mugerwa, J. Ellner, Randomized controlled trial of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy in non-human immunodeficiency virus-infected ugandan adults with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. The Uganda-Case Western Reserve University Research Collaboration., *J Infect Dis* 181 (2000) 1304-1312.
- [101] B. Marsh, C. Fordham von Reyn, R. Arbeit, P. Morin, Immunization of HIV-infected adults with a three-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae*., *Am J Med Sci* 313 (1997) 377-383.
- [102] H. Fletcher, T. Hawkrige, H. McShane, A New Vaccine for Tuberculosis: The Challenges of Development and Deployment., *J Bioeth Inq* 6 (2009) 219-228.
- [103] H. McShane, Boosting BCG with MVA85A: Results of clinical trials, Oral communication at the 37th Union World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), October 31-November 4, 2006.
- [104] H. McShane, Vaccine strategies against tuberculosis., *Swiss Med Wkly* 139 (2009) 156-160.
- [105] R. Brookes, P. Hill, P. Owiafe, H. Ibanga, D. Jeffries, S. Donkor, H. Fletcher, A. Hammond, C. Lienhardt, R. Adegbola, H. McShane, A. Hill, Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa., *PLoS One* 3 (2008) e2921.
- [106] I. Ceberé, L. Dorrell, H. McShane, A. Simmons, S. McCormack, C. Schmidt, C. Smith, M. Brooks, J. Roberts, S. Darwin, P. Fast, C. Conlon, S. Rowland-Jones, A. McMichael, T. Hanke, Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers., *Vaccine* 24 (2006) 417-425.
- [107] T. Hawkrige, T. Scriba, S. Gelderbloem, E. Smit, M. Tameris, S. Moyo, T. Lang, A. Veldsman, M. Hatherill, L. Merwe, H. Fletcher, H. Mahomed, A. Hill, W. Hanekom, G. Hussey, H. McShane, Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa., *J Infect Dis* 198 (2008) 544-552.

- [108] H. Ibanga, R. Brookes, P. Hill, P. Owiafe, H. Fletcher, C. Lienhardt, A. Hill, R. Adegbola, H. McShane, Early clinical trials with a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in tuberculosis-endemic countries: issues in study design., *Lancet Infect Dis* 6 (2006) 522-528.
- [109] H. McShane, A. Pathan, C. Sander, N. Goonetilleke, H. Fletcher, A. Hill, Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials., *Tuberculosis (Edinb)* 85 47-52.
- [110] H. McShane, A. Pathan, C. Sander, S. Keating, S. Gilbert, K. Huygen, H. Fletcher, A. Hill, Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans., *Nat Med* 10 (2004) 1240-1244.
- [111] C. Sander, A. Pathan, N. Beveridge, I. Poulton, A. Minassian, N. Alder, J. Van Wijgerden, A. Hill, F. Gleeson, R. Davies, G. Pasvol, H. McShane, Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals., *Am J Respir Crit Care Med* 179 (2009) 724-733.
- [112] F. Verreck, R. Vervenne, I. Kondova, K. van Kralingen, E. Remarque, G. Braskamp, N. van der Werff, A. Kersbergen, T. Ottenhoff, P. Heidt, S. Gilbert, B. Gicquel, A. Hill, C. Martin, H. McShane, A. Thomas, MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques., *PLoS One* 4 (2009) e5264.
- [113] K. Whelan, A. Pathan, C. Sander, H. Fletcher, I. Poulton, N. Alder, A. Hill, H. McShane, Safety and immunogenicity of boosting BCG vaccinated subjects with BCG: comparison with boosting with a new TB vaccine, MVA85A., *PLoS One* 4 (2009) e5934.
- [114] clinicaltrials.gov, in: 2009 (Ed.).
- [115] C. Aagaard, T. Hoang, A. Izzo, R. Billeskov, J. Troudt, K. Arnett, A. Keyser, T. Elvang, P. Andersen, J. Dietrich, Protection and polyfunctional T cells induced by Ag85B-TB10.4/IC31 against Mycobacterium tuberculosis is highly dependent on the antigen dose., *PLoS One* 4 (2009) e5930.
- [116] J. Cohen, Tuberculosis vaccine: a much needed intervention, Oral communication at the Joint International Tropical Medicine Meeting 2008, October 13th, Bangkok, Thailand, 2008.
- [117] L. Brandt, Y. Skeiky, M. Alderson, Y. Lobet, W. Dalemans, O. Turner, R. Basaraba, A. Izzo, T. Lasco, P. Chapman, S. Reed, I. Orme, The protective effect of the Mycobacterium bovis BCG vaccine is increased by coadministration with the Mycobacterium tuberculosis 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in M. tuberculosis-infected guinea pigs., *Infect Immun* 72 (2004) 6622-6632.

- [118] S. Reed, R. Coler, W. Dalemans, E. Tan, E. DeLa Cruz, R. Basaraba, I. Orme, Y. Skeiky, M. Alderson, K. Cowgill, J. Prieels, R. Abalos, M. Dubois, J. Cohen, P. Mettens, Y. Lobet, Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys., *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 2301-2306.
- [119] L. Tsenova, R. Harbacheuski, A. Moreira, E. Ellison, W. Dalemans, M. Alderson, B. Mathema, S. Reed, Y. Skeiky, G. Kaplan, Evaluation of the Mtb72F polyprotein vaccine in a rabbit model of tuberculous meningitis., *Infect Immun* 74 (2006) 2392-2401.
- [120] K. Von Eschen, R. Morrison, M. Braun, O. Ofori-Anyinam, E. De Kock, P. Pavithran, M. Koutsoukos, P. Moris, D. Cain, M. Dubois, J. Cohen, W. Ballou, The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: Tolerability and immunogenicity in humans., *Hum Vaccin* 5 (2009).
- [121] AERAS webpage: <http://www.aeras.org/home/home.php>, 2008.
- [122] P.J. Cardona, S. Gordillo, J. Diaz, G. Tapia, I. Amat, A. Pallares, C. Vilaplana, A. Ariza, V. Ausina, Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Immun* 71 (2003) 5845-5854.
- [123] O. Gil, C. Vilaplana, E. Guirado, J. Díaz, N. Cáceres, M. Singh, P. Cardona, Enhanced gamma interferon responses of mouse spleen cells following immunotherapy for tuberculosis relapse., *Clin Vaccine Immunol* 15 (2008) 1742-1744.
- [124] I. Orme, P. Andersen, W. Boom, T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*., *J Infect Dis* 167 (1993) 1481-1497.
- [125] P. Cardona, I. Amat, [Origin and development of RUTI, a new therapeutic vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection], *Arch Bronconeumol* 42 (2006) 25-32.
- [126] P. Cardona, I. Amat, S. Gordillo, V. Arcos, E. Guirado, J. Díaz, C. Vilaplana, G. Tapia, V. Ausina, Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis., *Vaccine* 23 (2005) 1393-1398.
- [127] P. Cardona, RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection., *Tuberculosis (Edinb)* 86 273-289.
- [128] P. Cardona, R. Llatjós, S. Gordillo, J. Díaz, B. Viñado, A. Ariza, V. Ausina, Towards a 'human-like' model of tuberculosis: intranasal inoculation of LPS induces intragranulomatous lung necrosis in mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*., *Scand J Immunol* 53 (2001) 65-71.
- [129] O. Gil, E. Guirado, S. Gordillo, J. Díaz, G. Tapia, C. Vilaplana, A. Ariza, V. Ausina, P. Cardona, Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol

with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type., *Microbes Infect* 8 (2006) 628-636.

[130] E. Guirado, S. Gordillo, O. Gil, J. Díaz, G. Tapia, C. Vilaplana, V. Ausina, P. Cardona, Intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol., *Int J Exp Pathol* 87 (2006) 139-149.

[131] T. Roach, C. Barton, D. Chatterjee, J. Blackwell, Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha., *J Immunol* 150 (1993) 1886-1896.

[132] P. Brennan, Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*., *Tuberculosis (Edinb)* 83 (2003) 91-97.

[133] J.A. DiMasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski, The price of innovation: new estimates of drug development costs, *Journal of Health Economics* 22 (2003) 151-181.

[134] O. Bjerrum, New safe medicines faster: A proposal for a key action within the European union's 6th framework programme., *Pharmacol Toxicol* 86 Suppl 1 (2000) 23-26.

[135] G. Ecker, EUFEPS 2002 - new safe medicines faster., *IDrugs* 5 (2002) 1134-1137.

[136] Innovative Drug Development Approaches. Final Report from the EMEA/CHMP-THINK-TANK Group on Innovative Drug Development, European Medicines Agency (EMA)-Evaluation of Medicines for Human Use (CHMP), 2007.

[137] J. Wallace, The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice., *Am Rev Respir Dis* 83 (1961) 866-871.

[138] E. Muñoz-Elías, J. Timm, T. Botha, W. Chan, J. Gomez, J. McKinney, Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice., *Infect Immun* 73 (2005) 546-551.

[139] E. Guirado, I. Amat, O. Gil, J. Diaz, V. Arcos, N. Cáceres, V. Ausina, P.J. Cardona, Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice, *Microbes Infect* 8 (2006) 1252-1259.

[140] E. Guirado, O. Gil, N. Cáceres, M. Singh, C. Vilaplana, P. Cardona, Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis., *Clin Vaccine Immunol* 15 (2008) 1229-1237.

[141] M. Domingo, O. Gil, E. Serrano, E. Guirado, M. Nofrarias, M. Grassa, N. Cáceres, B. Pérez, C. Vilaplana, P. Cardona, Effectiveness and safety of a treatment

regimen based on isoniazid plus vaccination with Mycobacterium tuberculosis cells' fragments: field-study with naturally Mycobacterium caprae-infected goats., *Scand J Immunol* 69 (2009) 500-507.

[142] O. Gil, I. Díaz, C. Vilaplana, G. Tapia, E. Guirado, M. Fort, N. Cáceres, M. Singh, M. Domingo, L. Corner, P.-J. Cardona, Development of an experimental model of latent tuberculosis infection in mini-pigs. In preparation, 2009.

[143] Archivel Farma S.L. webpage: <http://archivelfarma.com/index.html>, 2009.

[144] A. Aharon-Maor, Y. Shoenfeld, The good, the bad and the ugly of vaccination., *Isr Med Assoc J* 2 (2000) 225-227.

[145] Y. Shoenfeld, A. Aron-Maor, Vaccination and autoimmunity-'vaccinosis': a dangerous liaison?, *J Autoimmun* 14 (2000) 1-10.

[146] H. Hogenesch, J. Azcona-Olivera, C. Scott-Moncrieff, P. Snyder, L. Glickman, Vaccine-induced autoimmunity in the dog., *Adv Vet Med* 41 (1999) 733-747.

[147] C. Borghesi, C. Nicoletti, Increase of cross(auto)-reactive antibodies after immunization in aged mice: a cellular and molecular study., *Int J Exp Pathol* 75 (1994) 123-130.

[148] D. Coquillat, J. Bruge, B. Danve, M. Latour, C. Hurpin, D. Schulz, P. Durbec, G. Rougon, Activity and cross-reactivity of antibodies induced in mice by immunization with a group B meningococcal conjugate., *Infect Immun* 69 (2001) 7130-7139.

[149] J. Bruge, N. Bouveret-Le Cam, B. Danve, G. Rougon, D. Schulz, Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers., *Vaccine* 22 (2004) 1087-1096.

[150] A. Grayzel, A. Solomon, C. Aranow, B. Diamond, Antibodies elicited by pneumococcal antigens bear an anti-DNA-associated idiotype., *J Clin Invest* 87 (1991) 842-846.

[151] P. Tarján, S. Sipka, L. Maródi, E. Nemes, G. Lakos, E. Gyimesi, E. Kiss, G. Ujj, G. Szegedi, No short-term immunological effects of Pneumococcus vaccination in patients with systemic lupus erythematosus., *Scand J Rheumatol* 31 (2002) 211-215.

[152] K. Lindqvist, R. Coleman, C. Osterland, Autoantibodies in chronic pulmonary tuberculosis., *J Chronic Dis* 22 (1970) 717-725.

[153] Y. Shoenfeld, Y. Vilner, A. Coates, J. Rauch, G. Lavie, D. Shaul, J. Pinkhas, Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantibodies react with Mycobacterium tuberculosis., *Clin Exp Immunol* 66 (1986) 255-261.

[154] Y. Shoenfeld, A. Aron-Maor, A. Tanai, M. Ehrenfeld, Bcg and autoimmunity: another two-edged sword., *J Autoimmun* 16 (2001) 235-240.

- [155] A. Baxter, A. Horsfall, D. Healey, P. Ozegbe, S. Day, D. Williams, A. Cooke, Mycobacteria precipitate an SLE-like syndrome in diabetes-prone NOD mice., *Immunology* 83 (1994) 227-231.
- [156] E. Engleman, G. Sonnenfeld, M. Dauphinee, J. Greenspan, N. Talal, H. McDevitt, T. Merigan, Treatment of NZB/NZW F1 hybrid mice with Mycobacterium bovis strain BCG or type II interferon preparations accelerates autoimmune disease., *Arthritis Rheum* 24 (1981) 1396-1402.
- [157] J. Stanford, C. Stanford, J. Grange, Immunotherapy with Mycobacterium vaccae in the treatment of tuberculosis., *Front Biosci* 9 (2004) 1701-1719.
- [158] C. Vilaplana, J. Carrillo, M.J. Herrero, N. Cáceres, P.-J. Cardona, Immunotherapy with fragmented M.tuberculosis cells (RUTI) does not increase the antinuclear autoantibodies' production (but M.tuberculosis infection does), 16th European Congress of Immunology, Paris, 2006.
- [159] A. Bradwell, Immunofluorescent antinuclear antibody tests., in: H.R. Rose NR, Detrick B (Ed.), *Manual of clinical laboratory immunology*, ASM Press, Washington DC, 2002, pp. 922-932.
- [160] Documento sull'utilizzo dei nuovi test immunologici per la diagnosi di infezione tubercolare latente, Gruppi di Studio Infezioni e Tubercolosi dell'Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO) e della Società Italiana di Medicina Respiratoria (SIMeR). 2006.
- [161] K. Higuchi, N. Harada, T. Mori, Y. Sekiya, Use of QuantiFERON-TB Gold to investigate tuberculosis contacts in a high school., *Respirology* 12 (2007) 88-92.
- [162] E. Leyten, C. Prins, A. Bossink, S. Thijsen, T. Ottenhoff, J. van Dissel, S. Arend, Effect of tuberculin skin testing on a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma assay., *Eur Respir J* 29 (2007) 1212-1216.
- [163] L. Richeldi, K. Ewer, M. Losi, P. Roversi, L. Fabbri, A. Lalvani, Repeated tuberculin testing does not induce false positive ELISPOT results., *Thorax* 61 (2006) 180.
- [164] C. Vilaplana, J. Ruiz-Manzano, O. Gil, F. Cuchillo, E. Montané, M. Singh, R. Spallek, V. Ausina, P. Cardona, The tuberculin skin test increases the responses measured by T cell interferon-gamma release assays., *Scand J Immunol* 67 (2008) 610-617.
- [165] S. Baldwin, C. D'Souza, A. Roberts, B. Kelly, A. Frank, M. Lui, J. Ulmer, K. Huygen, D. McMurray, I. Orme, Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis., *Infect Immun* 66 (1998) 2951-2959.

- [166] G. Comstock, L. Edwards, R. Philip, W. Winn, A comparison in the United States of America of two tuberculins, PPD-S AND RT 23., *Bull World Health Organ* 31 (1964) 161-170.
- [167] Protocolo del ensayo clínico titulado "Estudio de fase I, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, para estudiar la tolerabilidad e inmunogenicidad de cuatro distintas dosis (5, 25, 100 y 200µg de FCMtb) de vacuna antituberculosa RUTI en voluntarios sanos., *Archivel Farma S.L.*, 2006, p. 95 pp.
- [168] S. Gooding, O. Chowdhury, T. Hinks, L. Richeldi, M. Losi, K. Ewer, K. Millington, R. Gunatheesan, S. Cerri, J. McNally, A. Lalvani, Impact of a T cell-based blood test for tuberculosis infection on clinical decision-making in routine practice., *J Infect* 54 (2007) e169-174.
- [169] S. Arend, S. Thijsen, E. Leyten, J. Bouwman, W. Franken, B. Koster, F. Cobelens, A. van Houte, A. Bossink, Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts., *Am J Respir Crit Care Med* 175 (2007) 618-627.
- [170] W. Franken, J. Timmermans, C. Prins, E. Sliotman, J. Dreverman, H. Bruins, J. van Dissel, S. Arend, Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in Army personnel., *Clin Vaccine Immunol* 14 (2007) 477-480.
- [171] M. Pai, R. O'Brien, New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects., *Semin Respir Crit Care Med* 29 (2008) 560-568.
- [172] R. Rojas, K. Chervenak, J. Thomas, J. Morrow, L. Nshuti, S. Zalwango, R. Mugerwa, B. Thiel, C. Whalen, W. Boom, Vdelta2+ gammadelta T cell function in Mycobacterium tuberculosis- and HIV-1-positive patients in the United States and Uganda: application of a whole-blood assay., *J Infect Dis* 192 (2005) 1806-1814.
- [173] S. Cheon, B. Kampmann, A. Hise, M. Phillips, H. Song, K. Landen, Q. Li, R. Larkin, J. Ellner, R. Silver, D. Hoft, R. Wallis, Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis., *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002) 901-907.
- [174] P. Mawa, J. Pickering, G. Miro, P. Namujju, C. Watera, G. Anyaegani, J. Whitworth, A. Elliott, The effect of tuberculin skin testing on viral load and anti-mycobacterial immune responses in HIV-1-infected Ugandan adults., *Int J Tuberc Lung Dis* 8 (2004) 586-592.
- [175] S. Stenger, D. Hanson, R. Teitelbaum, P. Dewan, K. Niazi, C. Froelich, T. Ganz, S. Thoma-Uszynski, A. Melián, C. Bogdan, S. Porcelli, B. Bloom, A. Krensky, R. Modlin, An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin., *Science* 282 (1998) 121-125.

- [176] B.H. Tan, C. Meinken, M. Bastian, H. Bruns, A. Legaspi, M.T. Ochoa, S.R. Krutzik, B.R. Bloom, T. Ganz, R.L. Modlin, S. Stenger, Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens, *J Immunol* 177 (2006) 1864-1871.
- [177] A. Soares, T. Scriba, S. Joseph, R. Harbacheuski, R. Murray, S. Gelderbloem, A. Hawkrige, G. Hussey, H. Maecker, G. Kaplan, W. Hanekom, Bacillus Calmette-Guérin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles., *J Immunol* 180 (2008) 3569-3577.
- [178] P. Darrah, D. Patel, P. De Luca, R. Lindsay, D. Davey, B. Flynn, S. Hoff, P. Andersen, S. Reed, S. Morris, M. Roederer, R. Seder, Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*., *Nat Med* 13 (2007) 843-850.
- [179] H. Mueller, A. Detjen, S. Schuck, A. Gutschmidt, U. Wahn, K. Magdorf, S. Kaufmann, M. Jacobsen, Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF., *Cytokine* 43 (2008) 143-148.
- [180] G. Verbeke, G. Molenberghs, *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*, Springer-Verlag, New York, 2000.
- [181] M. Thom, J. Hope, M. McAulay, B. Villarreal-Ramos, T. Coffey, S. Stephens, H. Vordermeier, C. Howard, The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection., *Vet Immunol Immunopathol* 114 (2006) 25-36.
- [182] R. van Zyl-Smit, M. Pai, K. Peprah, R. Meldau, J. Kieck, J. Juritz, M. Badri, A. Zumla, L. Sechi, E. Bateman, K. Dheda, Within-subject variability and boosting of T-cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing., *Am J Respir Crit Care Med* 180 (2009) 49-58.
- [183] J. Hougardy, K. Schepers, S. Place, A. Drowart, V. Lechevin, V. Verscheure, A. Debie, T. Doherty, J. Van Vooren, C. Locht, F. Mascarot, Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic tool for latent tuberculosis., *PLoS One* 2 (2007) e926.
- [184] C. Locht, J. Hougardy, C. Rouanet, S. Place, F. Mascarot, Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis., *Tuberculosis (Edinb)* 86 303-309.
- [185] P. Andersen, Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, *Scand J Immunol* 45 (1997) 115-131.
- [186] A. Hill, Viral vectoral TB Vaccines. *Clinical Development of MVA85A vaccine*., 2008.

- [187] N. Beveridge, H. Fletcher, J. Hughes, A. Pathan, T. Scriba, A. Minassian, C. Sander, K. Whelan, H. Dockrell, A. Hill, W. Hanekom, H. McShane, A comparison of IFN γ detection methods used in tuberculosis vaccine trials., *Tuberculosis (Edinb)* 88 (2008) 631-640.
- [188] W. Hanekom, H. Dockrell, T. Ottenhoff, T. Doherty, H. Fletcher, H. McShane, F. Weichold, D. Hoft, S. Parida, U. Fruth, Immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials: WHO panel recommendations., *PLoS Med* 5 (2008) e145.
- [189] F. Abebe, G. Bjune, The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection., *Clin Exp Immunol* 157 (2009) 235-243.
- [190] A. Glatman-Freedman, A. Casadevall, Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*., *Clin Microbiol Rev* 11 (1998) 514-532.
- [191] E. Guirado, I. Amat, O. Gil, J. Díaz, V. Arcos, N. Caceres, V. Ausina, P. Cardona, Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice., *Microbes Infect* 8 (2006) 1252-1259.
- [192] C. Sánchez-Rodríguez, C. Estrada-Chávez, J. García-Vigil, F. Laredo-Sánchez, J. Halabe-Cherem, A. Pereira-Suárez, R. Mancilla, An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis., *Int J Tuberc Lung Dis* 6 (2002) 706-712.
- [193] S. de Vallière, G. Abate, A. Blazevic, R. Heuertz, D. Hoft, Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies., *Infect Immun* 73 (2005) 6711-6720.
- [194] A. Sousa, S. Henry, F. Marója, F. Lee, L. Brum, M. Singh, P. Lagrange, P. Aucouturier, IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients., *Clin Exp Immunol* 111 (1998) 48-55.
- [195] R. Hussain, G. Dawood, N. Abrar, Z. Toossi, A. Minai, M. Dojki, J. Ellner, Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients., *Clin Diagn Lab Immunol* 2 (1995) 726-732.
- [196] Z. Araujo, F. Giampietro, L. Caçado, M. Singh, A. Wide, Comparison of serological responses in two different populations with pulmonary tuberculosis., *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103 (2008) 661-667.
- [197] A. Raja, K. Uma Devi, B. Ramalingam, P. Brennan, Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*., *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002) 308-312.

- [198] F. Dieli, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano, L. Titone, A. Romano, P. Di Carlo, A. Barera, A. Accardo-Palumbo, A. Krensky, A. Salerno, Selective depression of interferon-gamma and granulysin production with increase of proliferative response by Vgamma9/Vdelta2 T cells in children with tuberculosis., *J Infect Dis* 186 (2002) 1835-1839.
- [199] S. Stenger, Seminar, in: I.C.o. London (Ed.), London, October, 7th; 2008.
- [200] E. Sahiratmadja, B. Alisjahbana, S. Buccheri, D. Di Liberto, T. de Boer, I. Adnan, R. van Crevel, M. Klein, K. van Meijgaarden, R. Nelwan, E. van de Vosse, F. Dieli, T. Ottenhoff, Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults., *Tuberculosis (Edinb)* 87 (2007) 312-321.
- [201] D. Di Liberto, S. Buccheri, N. Caccamo, S. Meraviglia, A. Romano, P. Di Carlo, L. Titone, F. Dieli, A. Krensky, A. Salerno, Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy., *Tuberculosis (Edinb)* 87 (2007) 322-328.
- [202] R. Meyboom, R. Royer, Causality classification at pharmacovigilance centres in the European Community, *Pharmacoepidemiol Drug Safety*, 1992.
- [203] F. Karch, L. Lasagna, Toward the operational identification of adverse drug reactions., *Clin Pharmacol Ther* 21 (1977) 247-254.
- [204] A. Pathan, C. Sander, H. Fletcher, I. Poulton, N. Alder, N. Beveridge, K. Whelan, A. Hill, H. McShane, Boosting BCG with recombinant modified vaccinia ankara expressing antigen 85A: different boosting intervals and implications for efficacy trials., *PLoS One* 2 (2007) e1052.
- [205] N. Cáceres, O. Gil, J. Díaz, V. García, R. Spalleck, M. Singh, C. Vilaplana, P.-J. Cardona, RUTI® effectiveness as a BCG-boosting vaccine and as a fast-prophylactic vaccine in *M.tuberculosis* aerosolinfected mice models, *Keystone Symposia on Tuberculosis: Biology, Pathology and Therapy*. Keystone Resort, Keystone, Colorado, 2009.

9. AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat possible amb l'ajuda de moltes persones, pel que m'agradaria reconèixer-los públicament el meu agraïment. A tots els integrants dels serveis/departaments que van col·laborar a l'assaig clínic (equips del Drs. Joan Costa i Ferran Torres) i/o varen contribuir-hi en algun moment (entre altres: Dr. Ferrándiz, Dra. C.Prat, Dr. Gustavo Tapia, Dr. Joan Ruiz Manzano), així com a Archivel Farma S.L. A en Sergio Pinto, pel seu ajut a l'hora de l'execució, i a la resta dels meus companys de la UTE, pel seu sempre que l'he necessitat. Als voluntaris que varen participar als estudis i a tots aquells qui es varen interessar per fer-ho. En els tres estudis descrits hi va haver professionals que ens varen assessorar i ens varen ajudar a fer millor les coses (Dra. MJ Herrero, Dr. J.Carrillo). El Govern Espanyol va contribuir econòmicament al projecte, en contractar-me a través del Plan Nacional I+D+I FIS (exp CM06/00123). L'aproximació històrica al tractament amb tuberculina no hagués estat possible sense l'ajuda de la British Library of London i de l'equip humà de la biblioteca del St. Mary's Hospital, de l'Imperial College of London. A tot l'equip del servei de Microbiologia per haver-me format, i al Dr. V. Ausina per haver-me recolzat, especialment en la decisió de fer recerca. Amb afecte a pJ Cardona, per haver-me donat la oportunitat de divertir-me treballant. I finalment a tota la meva família, però sobretot als meus pares per saber-me transmetre la importància de l'esforç i l'amor pel treball ben fet, a la Míriam per recolzar-me, a l'Albert per respectar tant la meva feina, i al meu avi Salvador, per creure en mi.

10. ANNEXOS

- 10.1. Article “Origin of immunotherapy with tuberculin. A story of success”, enviat a la revista *Microbes and Infection*
- 10.2. Article “The Tuberculin Skin Test increases the responses measured by T cell Interferon-gamma Release Assays”
- 10.3. Article “Double-Blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI®”, acceptat a la revista *Vaccine*
- 10.4. Procediment tipus en format SOP
- 10.5. Fulls de treball per cada dia de seguiment de l’assaig de Fase 1
- 10.6. Resum dels protocols de treball

**10.1. Article “Origin of immunotherapy with tuberculin. A story of success”,
enviat a la revista Microbes and Infection**

Elsevier Editorial System(tm) for Microbes and Infection
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Origin of immunotherapy with tuberculin. A story of success?

Article Type: Review

Keywords: tuberculosis; tuberculin therapy; latent tuberculosis infection; Koch; Wright; history

Corresponding Author: Prof Pere-Joan Cardona, PhD, MD

Corresponding Author's Institution: Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Catalonia, Spain; and CIBER Enfermedades Respiratorias, Spain

First Author: Cristina Vilaplana, MD

Order of Authors: Cristina Vilaplana, MD; Pere-Joan Cardona, PhD, MD

Manuscript Region of Origin: SPAIN

Abstract: Tuberculin therapy has been always controversial. A deep review from the original sources reveals its great impact on economical/social aspects and a success that history has neglected, bringing new ideas that have been indirectly influencing the actual view of tuberculosis approaches and offering a new view for future insights.

Suggested Reviewers: Graham Rook
Royal Free and University College Medical School London
Royal Free and University College Medical School London
g.rook@ucl.ac.uk

Juraj Ivanyi
Guy's Campus of Kings College London
juraj.ivanyi@kcl.ac.uk

Larry S Schlesinger
Center for Microbial Interface Biology The Ohio State University
larry.schlesinger@osumc.edu

Opposed Reviewers:



Unitat de Tuberculosi Experimental
Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol
Crtra. de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n
08916, Badalona (Barcelona)
T: +34 93 497 86 81
F: +34 93 497 86 54
pjcardona.igtp.germanstrias@gencat.cat

September 10th, 2009

Dear Editor,

We would like to submit a manuscript entitled "ORIGIN OF IMMUNOTHERAPY WITH TUBERCULIN. A STORY OF SUCCESS?" for exclusive consideration of publication as a review in *Microbes and Infection*. We tried to review accurately the history of tuberculin treatment taking into account all its context.

Therapeutical treatment with tuberculin has been neglected since its discovery (on 1890) for the toxic effects encountered in previously infected subjects, most of them severely ill of tuberculosis. However, we tried to understand how, if considered so unuseful, could it be worldwidely used for nearly 50 years, a fact frequently not known. The study of manuscripts, books and reports from the original sources has revealed important discoveries. Tuberculin treatment was successful when accurately taking into account the population to be inoculated, it was safe if using the appropriate inoculation method, and had an enormous social and financial impact. Moreover, the treatment brought new ideas that have influenced actual tuberculosis approaches and still offers a new view to design new therapeutical strategies to cope the infection and disease. With the purpose of offering this knowledge to the public, we have reviewed all the original previous literature and structured the manuscript in several chapters, maintaining as possible the chronological order to explain the following subjects:

1-the discovery of tuberculin by Pr.Koch, emphasizing in the immediately success and posterior disgrace of the treatment

2-the consequent attempts to avoid reactions: the manufacture of new tuberculin and the different inoculation schedules firstly used

3-Sir AE Wright and his new view about the treatment, that lead to a new dosage method and to the first attempt to find a correlate of protection after vaccination (something that actual research groups on tuberculosis are still intending)

4-the autoinoculation, a new concept of understanding *M.tuberculosis* infection that has been recently recovered

5-the idea of using a therapeutical vaccine as a prophylactical one, a concept that could be used in the design of new vaccines

6-The social and financial aspects that surrounded tuberculin used as a therapeutical agent, a revision of the importance of dispensaries and their economical impact

And

7-how the tuberculin therapy and the ideas which it brought have influenced the modern knowledge of tuberculosis and how they could be used for future research.

We have intended to elaborate a manuscript as an historical review, so we do believe it could be interesting to a broad readership even just for this only; but moreover, we consider the observations described could help actual researchers on tuberculosis by providing them the whole story and encouraging them to be openminded and to include some of the old concepts to elaborate future strategies for tuberculosis treatment.

Thank you for your consideration of our work.

Please address all correspondence concerning this manuscript to me by email (pjcardona.igtp.germanstrias@gencat.cat).

Sincerely,

Pr. Pere-Joan Cardona, MD, PhD
Head of the Tuberculosis Experimental Unit

Origin of immunotherapy with tuberculin. A story of success?

C.Vilaplana¹, PJ Cardona^{1*}

1-Unitat de Tuberculosi Experimental, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Catalonia, Spain; and CIBER Enfermedades Respiratorias, Spain

Abstract

Tuberculin therapy has been always controversial. A deep review from the original sources reveals its great impact on economical/social aspects and a success that history has neglected, bringing new ideas that have been indirectly influencing the actual view of tuberculosis approaches and offering a new view for future insights.

1. Pr. Koch. Discovering tuberculin.

It is known from most of people working on tuberculosis (TB) that soon after discovering the tubercle bacillus, Koch studied how the inoculation of bacilli cultures affected to guinea pigs, both previously infected or healthy. His studies lead to the following observations:

- 1) The first infection established a degree of immunity/protection
- 2) The inoculation of dead tubercle cultures into healthy animals provoked no reaction, while in infected animals exerted a effect on tubercular lesions, which tended to heal. But this effect could also produce death, unless minute doses were used.

The brief announcement of the discovery of a possible remedy for TB on the 4th of July, 1890 in the International Medical Congress held in Berlin lead to the paper “A further report on a remedy for tuberculosis”, published on november 13th of the same year, in order to give explanations, as from Koch’s words: “in spite of all precautions, too many accounts have reached the public, and that in an exaggerated and distorted form, so that it seems imperative, in order to prevent all false impressions, to give at once a review of the position of the subject” [1]. In this report, a description of the reactions encountered in treated individuals was given, as well as recommendations for its use or not depending on the form and status of the illness. The mechanism of action was unknown and far from concepts of immunology, Koch believing the remedy didn’t kill the bacilli but destroyed the tuberculous tissue, as he observed the necrosis of the already tuberculous tissues once the animals were inoculated. Causing this, the propagation of the disease in the organism could be avoided, as the bacilli held in the nidus of the infection wouldn’t be fed and die, causing the improvement in the treated individuals.

Koch was by then a reputed researcher, admired by most of the scientific community, and tuberculosis was one of the most important health problems of the century, so the announcement created a general excitement -obviously exaggerated- as attracted amounts of physicians to Berlin to learn how to use it. Even if pushed by the personal, professional and political conjuncture [2-4], Koch didn't acted as hastily as from the very first moment pointed out the limitations and weaknesses of the remedy, being cautious. As stated in the paper "A further report..." he "earnestly warn people against a conventional and indiscriminate application of the remedy in all cases of tuberculosis" and "the most important point to be observed in the new treatment is its early application" [1]. A Dr. Delépin, in a letter published further on the same number of that journal already warned against a partial reading of Pr. Koch's studies: " I feel sure from what we all know about Dr. Koch that he wishes us to receive his discoveries, not with scepticism, but with a reasonable and scientific spirit. Any other course will certainly lead to disappointment and perhaps to a reaction still more unwise than the present excitement." Koch made another report on 1891 (A still further Report on a remedy for tb[5]) to comment the reactions observed by other physicians when using tuberculin as a therapeutical agent, just refering to his previous recommendations of its use.

Koch's remedy rapidly achieved lots of critics. Some of them were good, for being useful mainly on local tuberculosis (joints, bones, lupus) helping to improve patients' health if used in combination with surgery, something that Koch also had pointed out when suggesting that removal of the injured tuberculous tissue could help [6-8]. But lots of them were negative, as severe reactions were reported everywhere and successes were not as many as expected, so soon risks overwhelmed the possible benefits of the treatment.

The fact is that the massive and indiscriminate use of tuberculin for treating all forms of tuberculosis and the consequent deaths that followed it, plus all the economical matters involved in the manufacturing and distribution of the remedy, contributed to tarnish Koch's reputation and lead to the discredit of tuberculin [4, 8-10]. In the next years following 1891 the use of the remedy was confined to a few researchers (in Europe, but also in UK and USA) still believing in the ability of it to improve health in some of the patients (if Koch's recommendations followed) and worked in demonstrating its benefit if caring the methods of administration, in order to avoid the serious reactions[5, 10]. Lichtheim pointed out as soon as 1891 that reactionless tuberculin treatment could exist, but it was not until on 1901 that Goetsch published a report on a 10 years experience using tuberculin in a country hospital without alarming results of reactions. He didn't deny them, he just remarked that reactions could be avoided if the doses were properly adjusted [5].

Very soon the reactions encountered were felt as a problem, the extended use of tuberculin contributing both to their report and the research to avoid them.

Several theories were developed to explain them along all the years tuberculin was used. In summary, it was suggested: a) them being due to a summatory effect of the *M.tuberculosis* toxin inoculated to the already present toxin in the infected body; b) the difference theory believing the existence of antitoxin substances balancing the disease, considering that the inoculation of tuberculin disbalanced the system, thus in severe illness (for the system already being disbalanced) not obtaining any response; c) the existence of a specific lysin in the body able to lysinize the tuberculin in toxic smaller parts (Wolff-Eisner theory); d) Von Pirquet believing them due to the antibodies of tuberculin (Vaccinal allergy); and e) Hypersensitiveness [9].

The reactions were of 3 types: local, general and focal. Local reactions (basically redness, uneasiness, pain and swelling) were quite well tolerated, the general ones comprising unspecific symptoms and signs of general disturbance as fever, headache, malaise and lost of appetite. Haemoptysis, pleuritic pains, increase of the cough and swelling of tuberculous glands were considered focal reactions in the sites of infection. These were the most wanted but also the most feared, as the first goal of the treatment was to provoke changes in the focus of the infection. As no way was to know the effects (good or bad) on these sites, the general clinical status was checked carefully in order to get a clue for detecting if the dose used was the right one, and next doses were modified according to that.

2. The manufacture of new tuberculins.

The first attempt to avoid reactions was to generate a new product. Based on human tubercle cultures grown on nutrient broth with a 5% of glycerin, sterilised by steam, evaporated, filtered and adding a 0,5% of phenol to be further filtered, this first attempt of remedy was known as Old Tuberculin. Koch himself developed new versions of it: the New tuberculin, the steamed cultures ground and mixed with glycerin to obtain only the insoluble parts of bacillary bodies (1897) and the Koch's bacilli emulsion on 1901, the powdered tubercle suspended in a mixture of half part of glycerin and half of distilled water, in order to obtain an emulsion. Other tuberculins were designed: the Albumose-free tuberculin from cultures grown in albumose-free medium and Beraneck tuberculin, a mixture of filtered culture of tubercle bacilli grown in albumose-free medium plus an extract of bacillary bodies in 1% of phosphoric acid[11]. One of the main problems of the products was its preparation, as they required dilutions and these were performed by the physicians themselves, a fact that the manufacturer of the Beraneck tuberculin improved (as its dilutions could be

already provided) ensuring a better uniformity of concentration [9]. New tuberculins appeared all over the world: Hunter's modification B, von Ruck's Watery Extract, Behring's TC, and many others[12]. But the fact was that the reactions were the same independently of the tuberculin used, only varying on their intensity, proving that the principal active of all of them was the same: the protein of tubercle-bacilli [9].

3. First inoculation schedules

Another approach to ameliorate the therapy was the inoculation method, as most of the efforts were focused on establishing a safe method of administration. As the mechanism of action of the remedy was unknown and the historical moment couldn't help, along all the years tuberculin was used two schools of tuberculin therapists could be differentiated: those who believed that it exerted a real immunisation (which only could be achieved with large doses) and those who believed in not a real immunization but an immunizing healing action, thus tuberculin called out the previously established immunizing mechanism of the body. The latter could be then achieved with small doses, as larger doses could induce tissue damage and the effect of an stimulus was known not always to be proportional to the strength of the stimulus [5, 9]. Koch observed that large doses were needed to achieve the effect he wanted on tuberculous sites, even if this implied reactions. As following an inoculation a reaction happened, that was also followed by tolerance, a next higher dose was used to overcome the toleration obtained after the first dose. This first attempt of dosage consisted on small doses being gradually increased at short intervals, a method started by Ehrlich and coworkers on 1891 (Fig. 1). Goetsch on 1901 introduced another method in order not to obtain reactions that implied a huge length of the therapy, and later Petrushky intended interrupted treatment for slight cases for the same reason. But it was sir Almroth Wright who introduced a totally

new dosage method, implying small doses at spaced intervals to overcome what he called the negative phases [13].

4. Sir A.E. Wright and the new method of inoculation based on repeated doses at long intervals.

It was on 1896 that Wright, based on Widal's observation of the agglutination of typhoid bacilli when being in contact with the serum of someone infected but not with the serum of someone healthy, considered this reaction as a protective process and decided to use it to distinguish the typhoid fever from Malta's fever.

From more than 200 years before, it was known that humans are able to develop resistance to infections, what it was used as a preventive method by Jenner (using the vaccination with cowpox to prevent smallpox) and by Pasteur, using live attenuated anthrax bacilli to generate immunity. Wright feared that using alive bacteria could provoke acute disease, and consequently plead for using dead bacteria, defending that they could also generate immunity, or what he called protective substances of the blood. From this idea he developed the typhoid vaccine to prevent typhoid fever, and the demonstration of an increase of agglutinins in vaccinated people similar to the one found in people that had already passed an episode of the disease. From the idea of the inoculation of a vaccine generates protective substances, he started to work on the therapeutical vaccination, as if inoculated to an already ill individual, the vaccine should help to increase the protective substances already present, in this way helping to cure the disease. The vaccines then could be useful not only to prevent, but also to heal. On 1902 he observed that the agglutinin levels were decreased on people affected of a *staphylococcus* infection, but they increased if treated with dead cultures of the bacteria.

But the vaccination lead to the observation of what he called the Negative Phase. When a vaccine was injected to an already infected individual, it could be observed a further aggravation of that patient's condition [14]. Wright believed the cause was that the vaccine exhausted the protective substances already present in the organism, increasing the individual's vulnerability. Once passed, a Positive Phase occurred, when the protective substances increased and after decreasing a little bit left a certain residual amount [15]. He also thought the intensity of both phases could be related to a matter of the doses used and established a general basis to treat localised infections using the vaccination with bacterial vaccines. If the dose was not sufficient, the Negative Phase decreased, but the Positive Phase could not appear; if the dose was too high, the Negative Phase would be too long, and the Positive Phase arrive too late or not arrive [16]. Moreover, in two of the cases treated by him, he also saw a considerable inflammatory swelling in the infection site, what he considered the same reaction encountered when Koch's tuberculin was injected. The explanation he gave for this is that when inoculating the vaccine, the nidus where bacteria were held broke and they were spread by the lymph, being able to generate new infection foci if the patient was in a negative phase for the dose not being properly regulated. He established that before giving a therapeutic vaccine, one should take into account both the capacity of resistance possessed by the patient and the ability of resistance with which the particular species of invading microorganism is endowed[14]. His studies suddenly represented a challenge for him, wanting to explore more about the dosage of the vaccines, tuberculosis giving him a wide field of research as he believed that reactions could be avoided if the doses could be better controlled.

Thus the objective to avoid Koch's reaction was to know when and in which dose to repeat the tuberculin, as he believed the reactions were due to the accumulation of Negative Phases and the objective was to achieve successive Positive Phases to increase the Immunity. He established then the new method to inoculate tuberculin: repeating the same dose of tuberculin by inoculating it at long intervals (Fig. 2).

But the only way to estimate the effect on the inoculated individual was still limited to a carefully surveillance of his general condition, by indirect and subjective methods, thus Wright developed a method intending to measure the protective substances in the blood which would correlate to the real effect of the vaccine, before the appearance of the symptoms of intoxication.

5. The attempt to find a correlate of protection

On 1884, Metchnikoff, following Pfeiffer's studies, described the ability of leukocytes to phagocyte, considering this way the most efficient to destroy bacteria. Leishman developed on 1902 a simple numeric method to measure the phagocytosis. The observers that followed these studies, among them Wright, considered the existence of an incitor element in the immune serum that generated an opsonic action on the bacteria, preparing them for the phagocytosis. First Neufeld and Riempau, and later Ehrlich, as Wright and his collaborators, studied the nature of this incitor element in the immune serum[17].

From all those previous studies, Wright (with Douglas help) modified Leishman's method to evaluate the presence of protective substances against infections measuring what they called the opsonic power of the blood, in a first serious attempt of correlator of protection generated by a vaccine. This method, which demanded the counting the phagocytosed bacilli by the leukocytes when contacting the serum, the previously isolated leucocytes and a known number of bacilli, was performed in

parallel using a patient and a healthy individual as a control, with the aim to obtain a ratio for them called the Opsonic Index (OI) [18].

In tuberculosis, the approach to study the protective substances of the blood (or tuberculo-tropic substances, according to Ehrlich's nomenclature) were first done by Koch, based on previous studies from Arloing, with the aim to demonstrate the presence of agglutinins in tuberculous patients' serum.

Wright started to work calculating the OI in the patients he inoculated with the staphylococcus vaccine in the St. Mary's Hospital[19] in order to better predict the negative and positive phases, and later he decided to apply it to tuberculous patients. The OI was supposed to distinguish between tuberculous and healthy individuals[20], and to be useful to detect the negative and positive phases in advance by decreased and increased levels respectively, thus decreased in TB patients, it seemed to increase in good response to the tuberculin treatment [17, 21]. This method was widely used, by Wright himself and coworkers, but also for most of the physicians that worked with tuberculin therapy, with variable results[12, 22-25].

The first critics raise in 1910, complaining about its unspecificity and later by the statisticians about its subjectivity. Clive Riviere, who used to use the method himself, recognized on 1914 that it implied up to a 20% of error [26].

Wright, who himself admitted on 1912 that not always was useful and the vaccine therapy could be safely performed without its use, on 1923 recognized the leukocytes had a bactericidal effect by methods different to the phagocytosis, to finally make on 1944 a severe autocritic of the conclusions extracted from his experiments 20 years before[15]. The mirage of finding a good correlate of protection vanished and still continues to represent a challenge to tuberculosis researchers, but brought the idea of the Autoinoculation, something still modern for being so ground-breaking.

6. The Autoinoculation

Studying the OI, Wright observed a disturbance on it related to the treatment with tuberculin that remembered the spontaneous fluctuations of the index in feverish tuberculous cases. This observation lead Wright to suggest that the variation of the OI could be related to a disturbance of the site of the disease, what he called autoinoculation. According to him, the infection implied a continuously periodic escape of bacilli or bacillary toxins to the blood stream, what could be the cause of the episodes of symptoms [20]. This lead was followed by contemporaries. Evidences of autoinoculation were supplied by demonstrating fluctuations on symptomatology by Freeman (after a massage of a disease joint) and others (during exercise, operations and induced hyperaemia. Autoinoculation became the basis of diagnostic and therapeutical strategies. Davy had made some studies on 1843 demonstrating the strenuous exercice could induce fever on healthy people, and tuberculous patients were believed to be more sensibles to the method as according to the autoinoculation the toxins could be carried out from the tubercular focus into the blood stream. Penzoldt decided to use exercise with diagnostic purposes in early phtisis cases without fever, and to establish the activity of an already diagnosed TB. Later on, Patterson and Inman used the idea therapeutically, combining exercise with rest, something that became extended in most of english sanatoria [15, 26, 27]. Rest was already a common practice in the european continent brought by Dettweiler. According to Canetti, rest diminished the frequency and extent of respiratory movements, decreasing the respiratory trauma to which lesions were subjected; diminished the pulmonary circulation depriving the lesions of the factors which initiate their softening; promoted the circulatory stasis which lead to sclerosis and had an inhibitory effect on new bacillary colonization. The basis for collapse therapy (also in

vogue those days) was to increase the effect of rest by allowing the healthy pulmonar regions instead of the lesions to distend, decreasing even more the trauma and favouring the healing of the injured parenchima [28]. Pottenger also advocated for methods devised for producing relaxation or compression of the lung tissue for the same reasons. The good effects of rest were attributed both to the rest given to the body as a whole and to the diseased lung especifically, thus by methods focusing on relieving the lung of the respiratory movements the autoinoculations could be diminished and the tissues could contract and heal faster, and by decreasing the blood flow in the infected areas the inflammatory reaction could be better controlled and the symptoms reduced [29].

But suddenly it was believed that body's resisting power to chronic infections depended on a proper balance between them. Some amount of antigen was constantly needed to generate an immunizing response, but an excess of them could overcome this response with fatal results. Rest was necessary before anything, to control the autoinoculation and thus to recover the equilibrium, but some grade of autoinoculation would be further needed both to get tolerance to autotuberculin and to maintain the immune response activated. Exercice itself could provide this source of antigens from the infection site, but they could be externally provided by means of tuberculin[30].

7. Friedmann's remedy: the first attempt to use a therapeutical vaccine to prevent tuberculosis

Dr. Friedrich Franz Friedmann, interested in two turtles' death in Berlin's zoo, isolated in their lungs some bacilli so similar to human tuberculous bacilli that even Pr. Koch was unable to distiguish between them. At that precise moment, at the beginning of XX century, the reactions of Koch's remedy were widely famous. Friedmann, also

knowing about all the attempts to modify *M.tuberculosis* cultures by mechanical, chemical or by temperature methods obtaining similar adverse effects thought those non-human *M.tuberculosis* bacilli could be useful to product a new remedy generating less reactions. Turtle's bacillus (*M.chelonae*) or Friedmann's bacillus was considered avirulent for hot-blood animals, and a live vaccine was considered to be more probably useful in tuberculosis treatment. At that time, Calmette was already working on his live attenuated vaccine for tuberculosis) [31]. On the 6th of November of 1912, Friedmann made an announcement before the Medical Society of Berlin to explain the development of his vaccine and the results obtained when using it in a population of more than 1000 individuals. Administered subcutaneously, intramuscularly, intravenous, orally, via conjunctivalis and even locally directly applied to TB foci, the scientist considered it safe. The treatment consisted on the intramuscular administration of one, two or three inoculations separated by long intervals [32]. Pedro Guillermo Belmes in his review [33] remarked the most important factor to avoid reactions was the dose used, as after the inoculation local reactions frequently appeared, basically swelling that could arrive to an orange's size with other signs and symptoms (pain and redness). The next dose of the vaccine had to be inoculated once this reaction disappeared (usually 3-4 months after, but sometimes not before a year), as if not, this first lesion worsened. Friedmann tested his vaccine first on himself, afterwards in tuberculous adults and later on tuberculous children. The results obtained in a total of 1182 patients were presented on 1912 and shown the curation or improvement of tuberculous lesions in mostly all cases, even if Friedmann remarked the existence of a high interindividual variability which he attributed to the different TB phases. The population intended to be treated include those individuals able to respond and those who better responded where those

suffering from non-severe, local or surgical forms of TB. From those 250 physical tuberculous patients firstly treated, Friedmann reported up to 6 deaths, recognizing them suffering severe TB. One of the advantages of the treatment was that it permitted the patient to continue to attend his work. It is evident that its nature, the indications for its use and the results obtained with it, all reminds tuberculin therapy, and Friedmann's remedy could be considered another tuberculin. But Friedmann went a little bit further. It is true that tuberculin was used in exploratory way to treat prophylactically those individuals (mostly children) known to be contacts of tuberculosis patients [11] but this was not its primary use. The good results on therapy instead stimulated Friedmann to use his remedy as a prophylactical vaccine. In 1912 he had already vaccinated a total of 335 children from years between 1 and 3 years old, 305 of them being suckling infants. If twins, he vaccinated one of them, leaving the other one unvaccinated, something with a scientific value but undoubtedly reprehensible for unethical. All the children were tested with the von Pirquet method for TB diagnosis before their vaccination, a 2% being found positive and consequently being epidemiologically investigated. In a 90% of these cases, their parents resulted to be tuberculous patients. The preventive vaccination of suckling infants only generated an infiltration of a size between a pea and a cherry that disappeared in about weeks without leaving any trace. Human experiences were extended with elegant animal experiences using guinea pigs. After generating two groups (one vaccinated with a single intramuscular dose and another one with unvaccinated animals) all the guinea pigs were artificially infected, their survival being recorded. The unvaccinated animals didn't survive more than 110 days, while the vaccinated ones lived approximately a year (363 days). Moreover, if the animals which had been prophylactically vaccinated and infected afterwards were subjected to a therapeutic dose, they survived about

4 times more than those animals to which none therapeutic dose was applied. All these observations reinforced Friedmann to believe the same vaccine in being useful both in a preventive and therapeutic way, as well as made him to think that even if the continuous exposition of the individuals to tuberculosis could maintain the immunity generated by the vaccine, perhaps more than one dose should be needed to maintain this response [34].

It is true that Friedmann admitted his vaccine was useful both in treatment and prevention of TB but he was unable to guarantee which grade of protection was achieved. However, the Prussian Government recognized Friedmann's successes and created him the catedra of Research on Tuberculosis at Berlin's University, and even a capitalist from St. Louis offered him up to 1.000.000 \$ for the exclusive rights of his remedy in America [34].

8. Still using tuberculin: the dispensaries and the economical problem

In spite of the prompt discredit of tuberculin soon after its discovery, we have already said that tuberculin therapy continued, and even had revived after Wright's contribution. The fact is that regardless to the existence of reactions that could appear, a lot of physicians obtained a good result in many cases with an acceptable safety. The administration soon derived to only two ways to inoculate tuberculin (obviously with variations). As following an injection a grade of tolerance was achieved, only 2 things could be done: to increase the dose to overcome the tolerance reached or to wait the tolerance to pass. The first method implied increasing doses at short intervals and could be related to Koch's initial idea. It was widely used both in the European Continent and America and seemed to be more useful for phtisical forms (Fig. 1). The second one, developed by Wright, had as the main goal to avoid tolerance and implied small constant doses at long intervals and

seemed to work better for localised infections (Fig. 2) [11]. Regardless to the method preferred, the physicians who worked with tuberculin used tables for dosage which helped them to variate the doses and developed a skill to wisely administrate the remedy without having alarming fatal results, and their reports can count on these successes [5, 9, 11, 12, 22, 30, 35]. Of course it could not always be used, and the physician's experience helped on that. Besides, it was not the only measure to cope the infection, as it was combined with rest, open air, improving nutrition and other typical hygienic measures of those times.

A lead to show how tuberculin was used for many years are numbers. In 1912 they existed more than 200 institutions in United Kingdom (UK) using it as a treatment, and between 1910 and 1912 the percentage of sanatoria in Germany administrating tuberculin increased from 29% to a more than 70% [11]. But the fact was that TB mainly affected the poor, which were unable to attend sanatoria. An important reason for that was its price, but at least in UK both the effect on the economy of the country and the will to isolate the infectious sources pushed to the construction of sanatoria held by charity. But the poor neither couldn't permit themselves to loose their job. On 1887 the first dispensary was opened in Edimburgh by sir Robert Philip, the Victoria Dispensary for Consumption and diseases of the chest. Soon dispensaries flourished all over the world: from 1914 to 1917 from 4 raised up to 371 in UK; up to 600 dispensaries existed in Germany on 1912 and about 450 in America [27]. Dispensaries became important as they could ensure the therapeutical administration of tuberculin permitting the individuals to follow to attend their jobs, as emotionally explained by Wilkinson, who treated them in his Dispensary for the poors at Kennington Road in London. Screening and surveillance of contacts were done and they could follow-up the patients out of the hospitals and sanatoria, teaching them

important basic hygienic habits needed to improve their health; and all the cases were registered (providing lots of statistics of a an undoubtful epidemiological value). In 1912, tuberculin was a cheap remedy: it cost between 6,5 pences and 8 shillings depending the tuberculin used (before 1971, one pound was divided in 20 shillings, and each shilling into 12 pence)[11]. But dispensaries had a further advantage: the tuberculin treatment cost 2£/case, while in sanatoria costed up to 32£ only for the constantly medical supervision [22].

Wilkinson with some colleagues founded the Tuberculin Dispensary League and applied to the Medical Research Council (MRC) for funds to further testing on tuberculin. All their proposals were denied, presumably because the MRC itself had a new candidate of improved tuberculin, even if on 1924 they were forced to admit it hadn't achieved better results than any other tuberculin [27].

Tuberculin therapy continued to be used mostly everywhere until the appearance of chemotherapy, when it was slowly abandoned for its efficacy being variable depending to its complicate application, as requiring specifical skills from those using it, its failure was feared for the consequently reactions that it could carry on.

9. What we should learn about the past

We are aware that some of the facts explained in this manuscript will be known by the readers and that the historic moment that lived those great men devoted to TB didn't permit another evolution of their research, but we would like to recognize them all their open-mind and braveness that pushed them to start new theories and to try new remedies. Moreover, we do sincerely believe that nowadays some of their ideas can still useful. The widely use of tuberculin along more than 50 years has been forgotten and most of times non even mentioned. But the results achieved and properly reported demonstrated that even if important considerations about the

reactions encountered have to be done, the therapeutic vaccination of tuberculosis is possible. The will to find a correlate of protection that could be useful in vaccinations when used profilactically and therapeutically is still in vogue, as it is one of the main goal of TB research. The autoinoculation theory of Wright brought the idea that bacilli were not held in a closed nidus but able to pass into the blood stream from time to time, an idea recently recovered [36]. It was also Wright who pointed out that to deal with TB one should: 1) to increase the content of the blood in protective substances to frein the dissemination of the bacilli and 2) to inhibit the growth in the local nidus of infection [37]. Tuberculin therapy was vanished by the appearance of chemotherapy, but the treatment is still too long to achieve the waited results. These last years, many groups of TB research have been focusing on the development of vaccines, but revising all the documents those great men of TB left us, one can only wonder if the best solution would be (following Wright's suggestion) combining a short regimen of chemotherapy that could remove the biggest bacillary burden and a vaccination that could help to boost the immunity already achieved, avoiding further dissemination of the bacilli.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been included on PhD thesis of C.Vilaplana, and it was possible thanks to the British Library (London, UK), the St.Mary's Hospital library (London, UK) and the Spanish Ministry of Health (National Plan I+D+I FIS CM06/00123).

REFERENCES

[1] R. Koch, A further communication on a remedy for tuberculosis, British Medical Journal, 1890, pp. 1193-1199.

- [2] P. Cardona, [Robert Koch was right. Towards a new interpretation of tuberculin therapy], *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24 385-391.
- [3] T. Daniel, Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis., *Int J Tuberc Lung Dis* 9 (2005) 1181-1182.
- [4] C. Gradmann, Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin., *Med Hist* 45 (2001) 1-32.
- [5] Pottenger, F. Marion, *Tuberculin in Diagnosis and Treatment*, 1913.
- [6] Anonymous, The value of Koch's tuberculin, *Journal American Medicine Association*, 1891, pp. 672-673.
- [7] M. Morris, The effects of Koch's tuberculin combined with surgical measures in the treatment of lupus, *British Medical Journal*, 1893, pp. 1154-1155.
- [8] G.T. Ross, *Study of Koch's treatment in Berlin*, (19--).
- [9] H. Sahli, *Sahli's Tuberculin Treatment*, John Bale, Sons & Danielsson, Ltd., London, 1912.
- [10] T.M. Daniel, *Captain of death : the story of tuberculosis*, University of Rochester Press, Rochester, N.Y. ; Woodbridge, 1997.
- [11] C. Riviere, E. Morland, *Tuberculin Treatment*, Oxford Medical Publications, London, 1913.
- [12] E.L. Trudeau, *Tuberculin Immunization in the treatment of pulmonary tuberculosis*, *American Journal of the medical sciences*, New York, 1907.
- [13] F.E. Gunter, *Tuberculin in practice. Its value in the treatment of early tuberculosis and asthma*, The Gregg Publishing Company Ltd., London, 1928.
- [14] A.E. Wright, Notes on the treatment of furunculosis, sycosis and acne by the inoculation of a staphylococcus vaccine, *Lancet*, 1902, pp. 874-884.

- [15] Z. Cope, *Almroth Wright: Founder of modern vaccine-therapy*, Nelson, London, 1966.
- [16] A.E. Wright, A lecture on therapeutic inoculations of bacterial vaccines and their practical exploitation in the treatment of disease, *British Medical Journal*, 1903, pp. 1069-1074.
- [17] A. Wright, On spontaneous phagocytosis, and on the phagocytosis which is obtained with the heated serum of patients who have responded to tubercular infection, or, as the case may be, to the inoculation of a tubercle vaccine, in: S. Reid (Ed.), *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1906, pp. 211-225.
- [18] A. Wright, An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis, in: S.R. Douglas (Ed.), *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London*, 1903-1904, pp. 357-370.
- [19] A. Wright, On the action exerted upon the staphylococcus pyogenes by human blood fluids, and on the elaboration of protective elements in the human organism in response to inoculations of a staphylococcus vaccine, in: S.R. Douglas (Ed.), *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London*, 1904-1905, pp. 147-159.
- [20] A. Wright, On the possibility of determining the presence or absence of tubercular infection by the examination of a patient's blood and tissue fluids, in: S. Reid (Ed.), *Royal Society, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1906, pp. 194-211.
- [21] C. Ogilvy, A contribution to the study of tuberculin in orthopedic practice: the Calmette Ophthalmo-tuberculin test, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1908, pp. 35-47.

- [22] W.C. Wilkinson, The tuberculin dispensary for the poor, Nisbet & Co. Ltd, London, 1909.
- [23] C. Riviere, The vaccine treatment of tuberculosis in children, British Medical Journal, 1907, pp. 859-862.
- [24] H.W. Crowe, The autoinoculation test in tuberculosis, British Medical Journal, 1912, p. 1515.
- [25] J. Rentoul, The autoinoculation test in tuberculosis, British Medical Journal, 1912, p. 1396.
- [26] C. Riviere, The early diagnosis of tubercle, Oxford Medical Publications, London, 1914.
- [27] L. Bryder, Below the magic mountain : a social history of tuberculosis in twentieth century Britain, Clarendon, Oxford, 1988.
- [28] G. Canetti, The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. Histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis, Springer Publishing Company, Inc., New York, 1955.
- [29] F.M. Pottenger, Tuberculosis in the child and the adult, The C.V. Mosby Company, St. Louis, USA, 1934.
- [30] C. Riviere, A lecture on the principles of treatment of pulmonary tuberculosis, British Medical Journal, 1926, pp. 771-775.
- [31] A. Calmette, La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG", Masson et Cie, Paris, 1927.
- [32] Anonymous, Dr. Friedmann's own story of his tuberculosis cure. The address made by him before the Berlin Medical Society in which he made his now famous claims that he had discovered a cure for the disease., The New York Times (1913).

- [33] P.G. Belmes, 1.500 casos de Tuberculosis tratados por la vacuna Friedmann, 1937.
- [34] Anonymous, White plague cure found in Berlin?, The New York Times (1912).
- [35] E. Bonime, Tuberculin and vaccine in tubercular affections, The Southworth company publishers, Troy, New York, 1917, p. 267.
- [36] P.J. Cardona, A Dynamic Reinfection Hypothesis of Latent Tuberculosis Infection, Infection (2009).
- [37] A.E. Wright, A lecture on the inoculation treatment of tuberculosis, 1904.

Fig. 1. Inoculation method based on increased doses at short intervals. Tuberculin dose was ten-fold increased until reaching the reaction point, when general and local reactions were detected. From then, little increases of the dose were done in order to obtain an hypothetical focal effect while overcoming the tolerance appeared and avoiding more severe reactions.

Fig. 2. Inoculation method developed by Wright based on repeated doses administrated at long intervals. By surveilling general reactions, a fixed tuberculin dose considered sufficient to achieve focal reactions was inoculated, the intervals being spaced in order to wait for the tolerance to pass and not to sum negative phases.

Fig 1

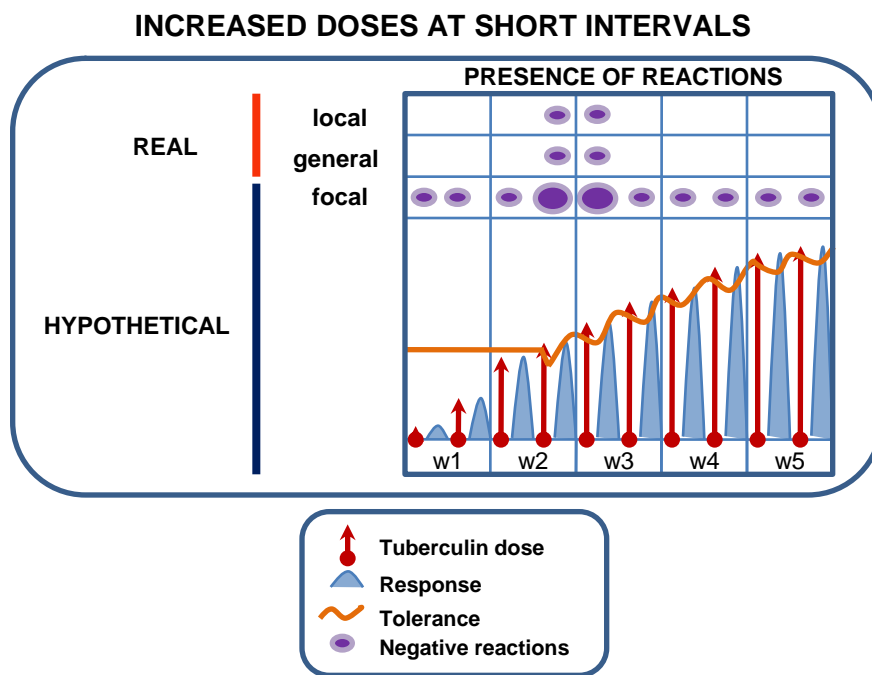


Fig. 1

Fig 2

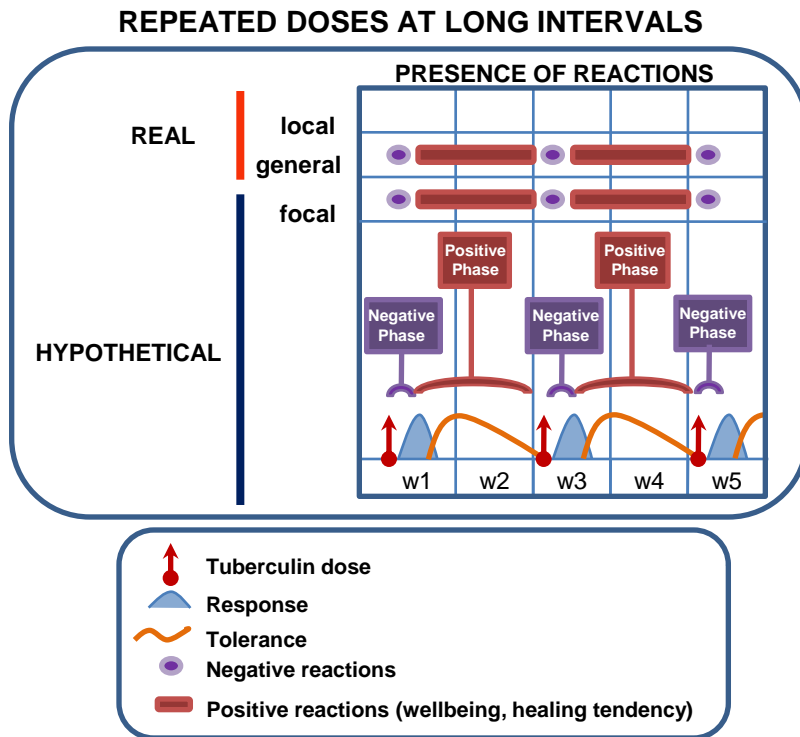


Fig. 2

10.2. Article “The Tuberculin Skin Test increases the responses measured by T cell Interferon-gamma Release Assays”

The Tuberculin Skin Test Increases the Responses Measured by T Cell Interferon-Gamma Release Assays

C. Vilaplana*,¶, J. Ruiz-Manzano†, O. Gil*,¶, F. Cuchillo*,¶, E. Montané‡, M. Singh§, R. Spallek§, V. Ausina*,¶ & P. J. Cardona*,¶

*Unitat de Tuberculosi Experimental, Fundacio Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Catalonia, Spain; †Department of Pneumology; ‡Department of Pharmacology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain; §Lionex Diagnostics & Therapeutics GMBH, Braunschweig, Germany; and ¶CIBERES, Spain

Received 13 December 2007; Accepted in revised form 20 February 2008

Correspondence to: Pere-Joan Cardona, MD, PhD, Unitat de Tuberculosi Experimental, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Crta del Canyet s/n, Edifici Recerca, 08916 Badalona, Catalonia, Spain. E-mail: pjcardona.igtp.germanstrias@gencat.net; www.ute.galenicom.com

Introduction

Over one-third of population already has latent tuberculosis infection (LTBI), which is a huge reservoir for maintaining tuberculosis (TB); as many as 10% of people latently infected will develop the disease [1]. One of the main difficulties in reducing this reservoir is that the current gold-standard treatment against LTBI requires the administration of isoniazid for 9 months [2]. However, this strategy is hardly used because it is associated with problems of logistics and compliance. Only the United States has a strong commitment to promoting this strategy, with a clear policy for elimination of TB [3].

Until recently, the tuberculin skin test (TST) has been the only test available to support LTBI diagnosis. However, this test has many known limitations: difficulties in administration and interpretation of results; need for a second-step visit; final results may be affected by prior BCG vaccination or by non-tuberculous mycobacteria (NTM) infection, and low sensitivity both in children

Abstract

RUTI is a vaccine consisting of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli grown in stress conditions that is fragmented, detoxified and liposomed. RUTI was designed to shorten the treatment of latent tuberculosis infection (LTBI) with isoniazid from 9 months to just 1 month, by additional treatment with two inoculations of RUTI 4 weeks apart. During the validation process for monitoring the immunogenicity of administration of RUTI in a Phase I clinical trial, the question arose whether to introduce the tuberculin skin test (TST) in the screening of non-LTBI volunteers. This study was designed to evaluate the effect of TST on subsequent different T-cell interferon-gamma release assay (TIGRA) responses, using a spectrum of *M. tuberculosis*-related antigens (ESAT-6, CFP-10, 16 kDa, 19 kDa, MP64, Ag 85B, 38 kDa, hsp65, PPD and BCG). The results showed an increase in post-TST response even in non-LTBI subjects for most antigens tested, as measured both by whole blood assay (WBA) and ELISPOT. Increased ELISPOT response decreased toward pre-TST levels within 1 month whereas the WBA response did not. Taking into account that there is no definitive correlation between TST and TIGRA tests to diagnose LTBI and the feasibility that TST might alter the immune monitoring included in clinical trials, these data suggest that TST determination should be carefully planned to avoid any interference with TIGRA.

and immunocompromised patients. However, despite not being an excellent gold standard, TST is widely used because of its low cost, its high accessibility, large amount of available historical data and, for a long time, the lack of a better method to detect LTBI.

Tuberculin skin test diagnosis is based on the intradermal inoculation of a protein extract, the purified protein derivative (PPD), also known as tuberculin, to trigger a local delayed-type hypersensitivity response. In people with LTBI, the presentation of this antigen by local macrophages to the regional lymph nodes is assumed to induce the proliferation of specific T lymphocytes, IFN-gamma (IFN- γ) producers that accumulate at the site of inoculation and cause local induration. The base of LTBI diagnosis consists of reading the diameter of this induration [4].

The value of this diameter should be correlated with a specific population; the diameter generally changes according to the BCG vaccination policy and the incidence of NTM infection [5]. A positive result is accepted

with a diameter of ≥ 5 mm (in BCG non-vaccinated subjects) and ≥ 10 mm (in BCG-vaccinated subjects) after the inoculation of 2 TU (0.04 μg) of PPD batch RT 23 (Statens Serum Institute), according to the Spanish guidelines [6]. However, slight differences should also be considered based on other criteria, such as the HIV status [7].

The correlation between TST and an 'in vitro' assay using peripheral blood is controversial. Originally, TST was well correlated with 'in vitro' lymphoproliferation after PPD stimulation [8]. Moreover, the finding of the ESAT-6 antigenic complex in *M. tuberculosis*, deleted in BCG, led to its use in LTBI diagnosis to avoid cross-reaction with BCG-vaccinated people, although this precaution may be unnecessary for subjects inoculated as infants tested 10 years after vaccination [9]. The possibility of cross-reactivity was the base for developing two marketed standardized methods, using both the detection of IFN- γ forming cells by ELISPOT from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the concentration of this cytokine in whole blood (WBA), after stimulation with different ESAT-6 complex antigens [10]. These methods are included in the tests known as TIGRA (T-cell interferon gamma release assays).

Interestingly, little is known about the interaction between TST and the subsequent use of TIGRA, although there seems to be a neutral effect since some national guidelines have proposed their combined use in a serial manner: first TST and then TIGRA to confirm positive cases [11, 12].

RUTI is a therapeutic vaccine designed to reduce the chemotherapy treatment of latent tuberculosis infection (LTBI) from 9 months to just 1 month [13–15]. During the validation process for monitoring the immunogenicity of administration of RUTI in a Phase I clinical trial the question arose whether to introduce

the tuberculin skin test (TST) in the screening of non-LTBI volunteers, as used in previous TB vaccine clinical trials [16, 17]. Our aim was to try to establish the effects of TST on the baseline immune response before the administration of RUTI. With this purpose, we assessed the effect of TST on subsequent TIGRA responses to different *M. tuberculosis* antigens and stimuli, monitoring the evolution of responses during a 4-week follow-up period.

The data provided demonstrate that TST effectively increases the TIGRA responses *in vitro*, thus highlighting that this test is not neutral. An important implication of this finding is that the use of TST must be carefully considered during the development of new immunotherapeutic assays against LTBI.

Material and methods

Subjects. Every year, a TST is performed on everyone working at our Unit as part of TB infection control. During this year's TB test control, a total of nine people from our investigation team were recruited as volunteers for this study. Five of them were known to be latently TB infected according to the Spanish guidelines [6], whereas the remaining volunteers were not. Table 1 shows the clinical characteristics of each volunteer. Oral and written informed consent was obtained from all study subjects.

TST. The TST was performed by inoculating intradermally 2 TU of PPD RT-23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) in the volar side of the forearm. Results were read at 72 h by a trained physician of the hospital, following standard procedures. A positive result was defined as a diameter greater than 5 mm, and 10 mm in volunteers previously vaccinated with BCG [5].

Table 1 Clinical characteristics of each volunteer regarding *Mycobacterium* infection.

Volunteer	Age	BCG status	Latent tuberculosis infection	Tuberculin skin test (mm) at week 0	Clinical features and prophylactic therapy
Group I					
V1	28	–	–	0	
V2	29	–	–	0	
V3	29	–	–	0	NTM infected
V4	24	–	–	0	
Group II					
V5	40	–	+	0	9-month prophylactic treatment finished 9 years ago
V6	35	–	+	0	6 month prophylactic treatment finished 6 years ago
Group III					
V7	32	–	+	20	6-month prophylactic treatment finished 11 months before the study began.
V8	37	+	+	30	Accidentally exposed. Not prophylactically treated (because the volunteer had >35 years old and was pregnant at the time of diagnosis)
V9	29	–	+	60	Accidentally exposed. At the 8th of 9-month prophylactic treatment when the study began.

Blood collection for TIGRA. A total of 20 ml of whole blood was collected in three tubes: one 8-ml Cell Preparation Tube with Sodium (Citrate BD Vacutainer® CPT™, Plymouth, UK) to obtain fresh Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), and two 6-ml sodium heparinized tubes (BD Vacutainer), on day 0 (w0), prior to TST, and at weeks one (w1), two (w2) and four (w4) post-test.

Stimuli. *Mycobacterium tuberculosis* antigens (ESAT-6, CFP-10, 16 kDa, 19 kDa, 38 kDa, Ag85B and hsp65), and PPD batch RT-50 (SSI, DK) were used as stimuli, at final concentration of 10 µg/ml for both TIGRA. PHA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used as positive control.

The antigens used were provided directly by Lionex Diagnostics & Therapeutics GmbH (Braunschweig, Germany). Purity was always >95%, as measured by SDS-Page/densitometry and western blotting. Endotoxin content was always below the manufacturer's specifications.

A limited amount of available CFP-10 restricted the assays with this antigen to ELISPOT (not WBA): as the antigen amount needed for ELISPOT assays is less than the required for the WB stimulation (because of the final volume to be stimulated), only the ELISPOT assay could be performed.

The characteristics of all the antigens used are detailed in Table 2.

ELISPOT assay. A total of 250,000 fresh PBMCs were cultured per well (in a T-SPOT TB plate, T-SPOT TB; Oxford Immunotech, Oxfordshire, UK) in 150 µl of medium alone or medium plus stimulus. Cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 16 h; the ELISPOT assay was performed the day after, following the recommendations of the T-SPOT manufacturer. The results are represented by Spot Forming Units per 1 × 10⁶ cultured PBMCs (Fig. 1) and calculated subtracting the mean number of spots in the medium and cells alone-control well from the mean counts of spots in wells-containing antigens, PPD or PHA. This method was used to obtain the specific responses and to avoid general immune activation.

Whole blood assay (WBA). The whole heparinized blood of each volunteer was cultured alone and with

stimuli (1 ml of whole blood per well). It was not possible to stimulate whole blood with CFP-10, due to unavailability of sufficient antigen. The plates were incubated at 37 °C overnight and centrifuged at 600 g for 15 min the day after, to harvest about 200–300 µl of plasma from each well. The plasma samples were frozen at –20 °C for 5 weeks, after which they were analysed all at once for human IFN-γ using the marketed WBA-CMI ELISA (Cellestis Ltd., Carnegie, Australia), following the manufacturer's instructions. IFN-γ produced in non-stimulated wells was subtracted from each corresponding antigen-stimulated well, to obtain the specific responses and to avoid general immune activation.

The results are expressed as absolute IFN-γ values (IU/ml) (Fig. 2), as determined from a standard curve run on each plate, taking into account the sample dilution used (if required).

Statistical analysis. To determine if there was a linear relationship between the results of the two assays (ELISPOT and WBA), a linear regression test was used. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant. Otherwise, the small sample size only allowed us to describe the results and no attempt at further statistical analysis was made.

Results

Non-LTBI, TST negative group (Group 1)

The results of the ELISPOT assay (Fig. 1) showed that no subjects responded to ESAT-6 or CFP-10 at w0. Response to ESAT-6 increased in all of them 1 week post-TST (up to 5–60-fold). A post-TST increase was also observed when stimulating with PPD and BCG (an increase of up to 20, and 5–50-fold for PPD and BCG, respectively), but not in Volunteer 3 (V3). When stimulating with the other *M. tuberculosis* antigens, the results showed a generalized increase at 1 week after TST, ranging from 5-fold to 80-fold, depending on the volunteer and the antigen used.

All volunteers experienced an increase in their IFN-γ response to most antigens, measured by the WBA

Table 2 Characteristics of the antigens used.

Antigen	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> origin	RD1/others	Recombinant/natural	Proteins/peptides	Manufacturer
PPD	Yes	Others	Natural	Proteins	SSI
ESAT-6 (Rv3875)	Yes	RD-1	Recombinant	Proteins	Lionex
CFP-10 (Rv3874)	Yes	RD-1	Recombinant	Proteins	Lionex
16 kDa (Rv 2031c)	Yes	Others	Recombinant	Proteins	Lionex
19 kDa (Rv3763)	Yes	Others	Recombinant	Proteins	Lionex
Ag85B (Rv1886c)	Yes	Others	Recombinant	Proteins	Lionex
38 kDa (Rv 0934)	Yes	Others	Recombinant	Proteins	Lionex
Hsp65 (Rv 0440)	Yes	Others	Recombinant	Proteins	Lionex
BCG	No	Others	Natural		SSI

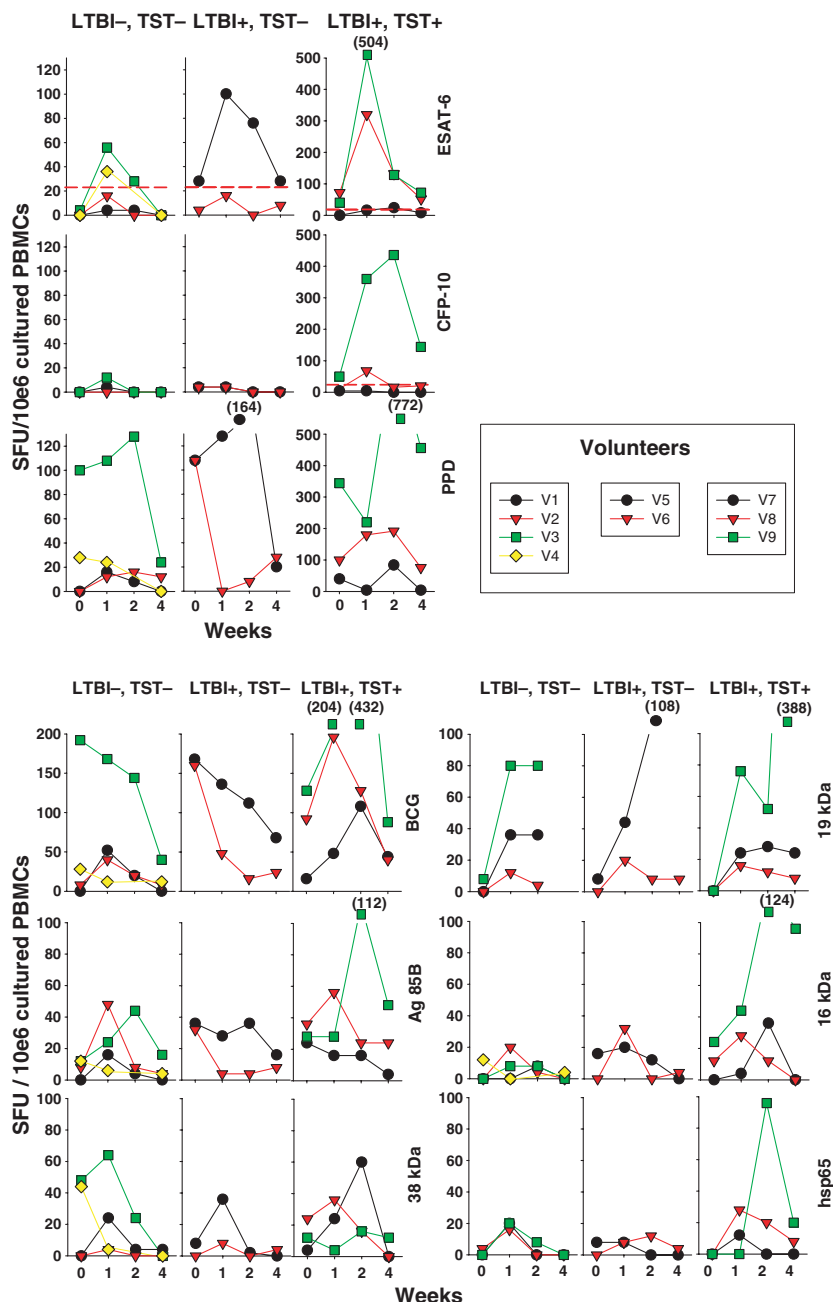


Figure 1 ELISPOT assay results from each volunteer represented by spot forming units per 10⁶ cultured PBMCs stimulated overnight with ESAT-6, CFP-10, PPD, BCG, Ag85B, 38, 19, 16 kDa, and hsp65 *Mycobacterium tuberculosis* antigens. The dotted line in ESAT-6 and CFP-10 is for guidance and represents the threshold recommended by the marketed kit.

(Fig. 2). This response varied: for example ESAT-6 had 3–12-fold increase and Ag85B had 1–100-fold increase. The increase in IFN- γ was lower when stimulating with PPD, and there was no increase with BCG.

Previous LTBI, TST negative group (Group 2)

Both volunteers showed a post-TST increase measured by ELISPOT (up to 5–80-fold) when stimulating with ESAT-6, 38 kDa, 19 kDa and 16 kDa, and V5 also with PPD (2-fold increase). Oddly, the response decreased when stimulating with BCG and Ag85B.

The WBA analysis showed an increased IFN- γ response (2- to 8-fold) in both volunteers, but a poor response with BCG. However, the response of Volunteer 5 (V5) was always higher than that of Volunteer 6 (V6) when assessed by both techniques.

LTBI, TST positive group (Group 3)

In this group, the volunteers showed an increase when stimulated with any of the antigens tested and assessed by both techniques at w1 and w2. This increase was up to 20-fold and 400-fold in ELISPOT (ESAT-6 and

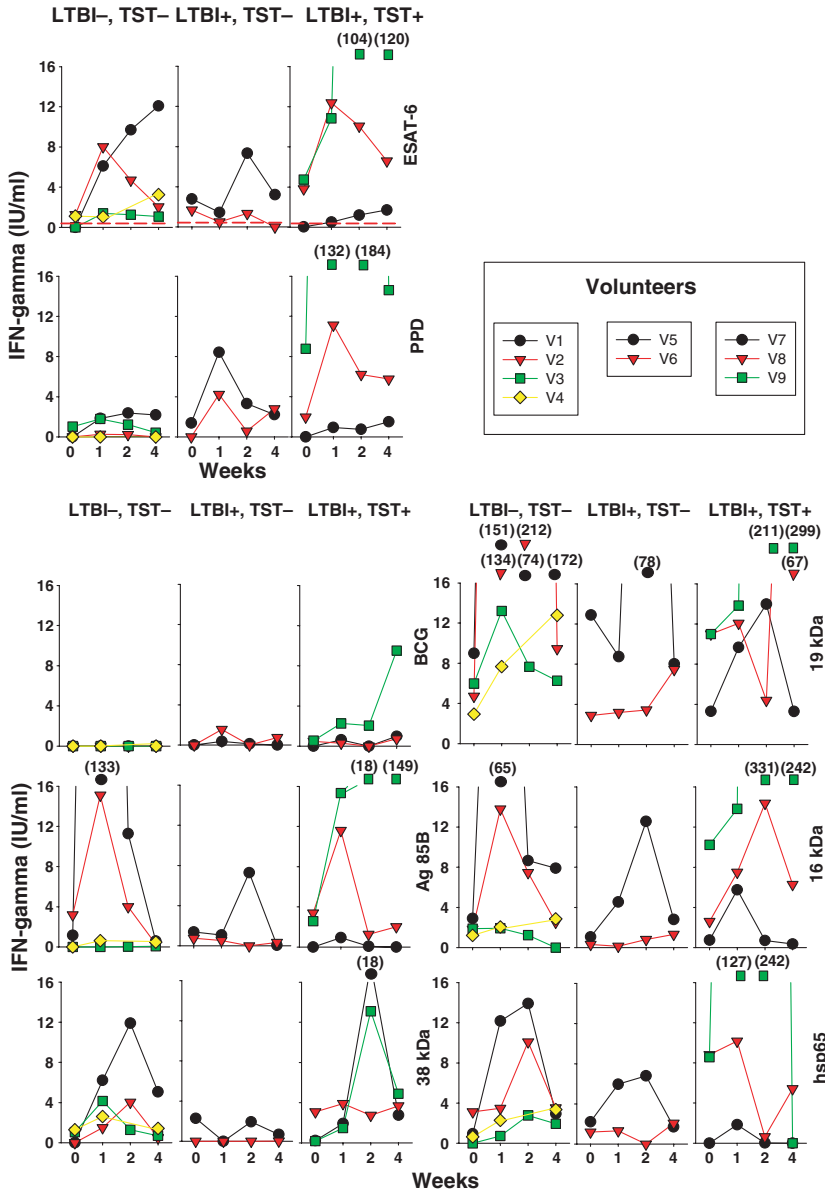


Figure 2 IFN- γ response in the Whole Blood Assay from each volunteer after overnight stimulation of whole blood with ESAT-6, PPD, BCG, Ag85B and 38, 19 and 16 kDa and hsp65 *Mycobacterium tuberculosis* antigens. The dotted line in ESAT-6 is for guidance and represents the threshold recommended by the marketed kit. The results are expressed as IFN- γ IU/ml.

19 kDa, respectively) and more than 25-fold in WBA (ESAT-6, Ag85B, 19 kDa and 16 kDa). Response in Volunteer 7 (V7) was small when compared with Volunteers 8 and 9 (V8, V9), who were infected more recently.

The CFP-10 response was only measured by ELISPOT. The results showed that response was generally really poor in both groups 1 and 2, but with individual exceptions: V8 increased from 0 to 70 SFU/10⁶, and V9 increased by up to 20-fold at w1.

Correlation between ELISPOT and WBA

The correlation (*R*) between the two assays was statistically significant (*P* < 0.001) when the samples were stimulated with 16 kDa antigen, PPD or hsp65

(*R* > 0.7), as well as when 19 kDa or 38 kDa antigens were used (*R* = 0.59 and 0.36, respectively). No significant correlation was found when the samples were stimulated with the other antigens. All the results are shown in Fig. 3.

Discussion

The aim of this study was to determine whether TST might affect the monitoring of the immune response triggered by a TB vaccine and, in this particular case, by the use of the therapeutic vaccine RUTI against LTBI. It is noteworthy that the verification of the influence of new marketed tests to confirm LTBI diagnosis was not an objective of this study: although the methodologies for

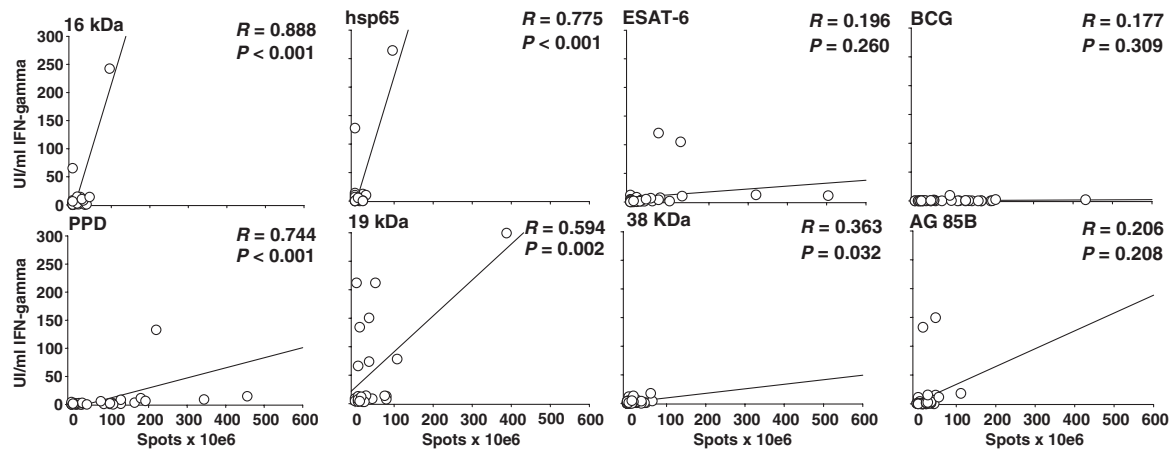


Figure 3 Correlation between the whole blood assay and the ELISPOT results. The results are expressed by each antigen, which was used to stimulate the samples. A linear regression test was used to perform the statistical analysis; the R and P of each analysis are shown.

both types of study may be very similar (e.g. some reagents and timings), the antigens were not the same. Therefore, we would like to clarify that the data we obtained from the TIGRA test must be interpreted carefully and within its own context, highlighting the need to specifically discern about this issue.

The data presented here show that a low antigenic concentration (particularly 0.04 μg of intradermal PPD) may enhance an immune response. At these amounts, an increased immune response in LTBI, TST-positive patients with expected specific T cell concentrations may be expected. Surprisingly, a slight increase in the immune response in non-LTBI, TST-negative patients was also observed. This observation may be related to the fact that TST positiveness is based on the assumption of determined population thresholds after the administration of a specific concentration of PPD [5], which cannot exclude the presence of specific T cells that remain undetected with this specific method.

The 'boosting effect' used in some populations with a low immune response and/or at high risk of LTBI (i.e. old people or health care providers, respectively) is well known. In these cases, the immune response is 'triggered' by repeating the TST 1 week after a negative TST recording. In our observation, those volunteers who were previously TST negative may have shown a similar 'boosting effect', when their peripheral blood was re-challenged with specific antigens at 1 week after the TST, a phenomenon that could be described as 'in vitro boosting' of TST.

Besides, this boosting effect was also observed in other population-based studies that were not aiming to address this particular issue. Specifically, Mawa *et al.* [18] described this effect in their 'in vitro' stimulation of diluted whole blood with CFP-10 *M. tuberculosis* antigen for 6 days. A similar effect was also described by Thom *et al.* [19] when measuring IFN- γ release after

stimulating the infected whole blood of *Mycobacterium bovis* 1 week after the tuberculin testing.

Despite observing an increase in the immune response to most *M. tuberculosis* antigens used in this trial, there seems to be some differences between the two assays employed (ELISPOT and WBA). First, although the increase was observed in all volunteers with most antigens and by both techniques, the magnitude of increase was different for each subject. The reasons for such differences are unknown and we cannot explain them, appearing unrelated to any clinical issue.

Regarding the follow-up monitoring, the increased response observed by ELISPOT usually dropped at week 3 and returned to pre-stimulation levels by week 4; in contrast, the response observed by WBA still remained high until week 4 in some cases, or decreased more slowly.

Indeed, sometimes volunteers showing a higher increase by ELISPOT were different from those with a higher increase by WBA (see for example Group I, ESAT-6). This observation encouraged us to determine the correlation between the two assays. Using a linear regression test on the results, only in five out of the eight antigens used in both techniques showed a significant linear relationship between them and only in three of them R was >0.7 . We attribute this apparent disparity to the fact that even though both techniques measure IFN- γ production, they are different: ELISPOT determines IFN- γ positive cells from a known number of PBMCs, whereas WBA shows IFN- γ release from a definite whole blood volume. In WBA, it is not known how many cells are secreting IFN- γ , whereas in ELISPOT, the number of cells is known, but their contribution to IFN- γ in whole blood is not.

Although the final concentration of the antigens used in the marketed kits (both T-SPOT TB and QTF-TB-Gold) is not disclosed, we decided to show in our figures the threshold recommended as a guidance. In half

of the healthy volunteers, the increase in response to ESAT-6 was high enough to surpass the T-SPOT TB threshold. The response to CFP-10 reached such threshold in no cases, but response was poor save in Group 3. When whole blood was stimulated with ESAT-6, WBA showed positive baseline values in V2 and V4 (1.25 and 1.12 IU/ml, respectively) with regard to the cut-off value recommended by the QTF-TB-Gold kit (the one used in the diagnosis of LTBI). However, the two volunteers were considered to be non-LTBI subjects according to their previous negative TST and their clinical history.

Volunteer 3 (Group 1) had high baseline values at w0 (ELISPOT: PPD, BCG, 38 kDa; WBA: PPD, 19 kDa and 16 kDa), but was negative for TST, and also had negative values for ESAT-6 (ELISPOT and WBA) and CFP-10 (ELISPOT, WBA was not done). According to the clinical history, the laboratory results and the physician's judgement, marketed T-SPOT and QuantiFERON-TB-Gold-In Tube Method tests were performed to this volunteer 3 months after the conclusion of the study. Both tests were negative, and thus the subject was considered to be NTM infected.

Our report has several limitations, such as the wide differences between the clinical issues of the volunteers, which were difficult to group; however, since volunteers were recruited at random, they may be quite representative of most of the characteristics that could be found in the population of health-care workers. Further, the foremost limitation of this study is its sample size. The small sample size only allowed us to describe the results but, even if no firm conclusion can be drawn because of it, with this paper we mean to raise attention to the need of more and better designed studies and clinical trials. Our results, although limited, suggest the need to explore in more detail the immunology of TB infection and its diagnosis, especially in light of new assays being developed and implemented in clinical practice together with TST, since previously unknown interactions with TST could influence diagnosis algorithms.

Although the data obtained from the studies carried out with TIGRAs to date have been promising – especially those comparing TIGRAs with TST– [20–26], several studies have highlighted the limitations of TIGRAs and have suggested that there is still a long way to go before these assays can be really useful in everyday clinical practice [23, 27–30].

Further studies should be conducted to establish the adequate strategy for diagnosing LTBI in high-risk populations and to determine the role of TIGRAs in that scenario; these studies should be done before making any adjustments to diagnostic practice. Consequently, several guidelines have recently been published in order to include TIGRAs in the diagnosis of LTBI for TB infection control. In December 2005, the US Centers

for Disease Control and Prevention (CDC) included in their guidelines that the QuantiFERON TB Gold Test (QFT) assay approved by Food and Drug Administration (FDA) could replace TST in all circumstances in which the TST is currently used [31, 32].

In addition, UK guidelines by The National Institute for Health and Clinical Excellence [11] and Italian Guidelines [12] recommend a two-stage strategy for TST testing followed by a TIGRA to confirm a positive TST result. However, despite doubts on the matter [33], few studies have assessed how TST might affect TIGRA results [34, 35].

Recently, Leyten *et al.* [34] did not find any significant raise in IFN- γ responses on the QuantiFERON TB Gold results, 3 days after performing the TST, but they could not exclude a boosting effect after a longer interval. Although we did not use the antigens included in the marketed kits in our study, we observed an objective effect on TIGRAs that should at least encourage the review of current guidelines suggesting a double-step strategy to diagnose LTBI (in order to determine exactly when to conduct the second step after TST); we would also encourage additional studies to confirm and determine this effect in order to avoid it, especially using the marketed kits. It would also be desirable to further study the 'in vitro boosting' phenomenon, due to its potential usefulness for detecting LTBI in immunodepressed people; further, whether a double-step strategy might be also used in TST-negative individuals, for confirmation in doubtful cases.

Finally, these data have convinced us to avoid the use of TST for the screening of healthy non-LTBI volunteers, at least in this initial RUTI Phase I clinical trial. The reason for our decision is that monitoring of RUTI responses requires measurement of IFN- γ production in peripheral blood; thus it seems reasonable to suppose that TST screening 1–2 weeks before RUTI inoculation could affect the immune response and hence render the interpretation of dose-response records to RUTI difficult.

Acknowledgments

The authors would like to thank the volunteers that agreed to participate in this study and also FIS 01/3104; Plan Nacional I+D+I FIS CM06/00123 and the company Archivel Farma, s.l. They are also indebted to Hazel Dockrell, Ajit Lalvani, Willem Hanekom, Robert J. Wilkinson and Tom Ottenhoff for their comments and suggestions.

References

- 1 World Health Organization *Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing*. Geneva: WHO report, 2006.

- 2 Comstock GW. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:847–50.
- 3 Institute of Medicine (U.S.). *Committee on the Elimination of Tuberculosis in the United States. Ending Neglect. The Elimination of Tuberculosis in the United States*. Washington DC: National Academy Press, 2000.
- 4 Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761–76.
- 5 Rieder HL *Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control*. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999.
- 6 Grupo de Trabajo de los Talleres de 2001 y 2002 de la Unidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona. Prevention and control of imported tuberculosis. *Med Clin (Barc)* 2003;121:549–57.
- 7 American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S221–47.
- 8 Haslov K, Closs O, Moller S, Bentzon MW. Studies on the development of tuberculin sensitivity in immunized guinea pigs with demonstration of a close relationship between results of skin tests and the lymphocyte transformation technique. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;73:114–22.
- 9 Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:1192–204.
- 10 Rothel JS, Andersen P. Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3:981–93.
- 11 National Institute for Health and Clinical Excellence. *Clinical Guideline 33. Tuberculosis: Clinical Diagnosis and Management of Tuberculosis, and Measures for its Prevention and Control*. URL: <http://www.nice.org.uk/page.aspx?o=CG033NICEguideline>. Volume 2006. London, NICE.
- 12 Gruppi di Studio Infezioni e Tubercolosi dell'Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO) e della Società Italiana di Medicina Respiratoria (SImeR). *Documento sull'utilizzo dei nuovi test immunologici per la diagnosi di infezione tubercolare latente*. 2006 http://www.simer.net/Download/LG_SImeR_AIPO_LTB19maggio2006.doc.
- 13 Cardona PJ. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2006;86:273–89.
- 14 Cardona PJ. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Inflammation & Allergy Drug Targets* 2007;6:27–39.
- 15 Cardona PJ, Amat I, Gordillo S *et al*. Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* 2005;23:1393–8.
- 16 Ibang HB, Brookes RH, Hill PC *et al*. Early clinical trials with a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in tuberculosis-endemic countries: issues in study design. *Lancet Infect Dis* 2006;6:522–8.
- 17 McShane H, Pathan AA, Sander CR, Goonetilleke NP, Fletcher HA, Hill AV. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:47–52.
- 18 Mawa PA, Pickering JM, Miiro G *et al*. The effect of tuberculin skin testing on viral load and anti-mycobacterial immune responses in HIV-1-infected Ugandan adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:586–92.
- 19 Thom ML, Hope JC, McAulay M *et al*. The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;114:25–36.
- 20 Arend S, Thijsen S, Leyten E *et al*. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:618–27.
- 21 Franken WP, Timmermans JF, Prins C *et al*. Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in Army personnel. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:477–80.
- 22 Gooding S, Chowdhury O, Hinks T *et al*. Impact of a T cell-based blood test for tuberculosis infection on clinical decision making in routine practice. *J Infect* 2006; doi:10.1016/j.jinf.2006.11.002
- 23 Kobashi Y, Obase Y, Fukuda M, Yoshida K, Miyashita N, Oka M. Clinical reevaluation of the QuantiFERON TB-2G test as a diagnostic method for differentiating active tuberculosis from nontuberculous mycobacteriosis. *Clin Infect Dis* 2006;43:1540–6.
- 24 Pai M, Gokhale K, Joshi R *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon- γ assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 2005;293:2746–55.
- 25 Richeldi L, Ewer K, Losi M *et al*. T-cell-based diagnosis of neonatal multidrug-resistant latent tuberculosis infection. *Pediatrics* 2007;119:e1–5.
- 26 Shams H, Weis SE, Klucar P *et al*. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1161–8.
- 27 Dewan PK, Grinsdale J, Kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007;44:69–73.
- 28 Dogra S, Narang P, Mendiratta DK *et al*. Comparison of a whole blood interferon- γ assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect* 2007;54:267–76.
- 29 Pai M, Dogra S, Narang PJ. Interferon-gamma release assays in children—no better than tuberculin skin testing: Response to Ranganathan S *et al*. *J Infect* 2007;54:414–5.
- 30 Pai M, Joshi R, Dogra S *et al*. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon-assay. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:349–55.
- 31 Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings. *MMWR* 2005; 54:1–141.
- 32 Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Division of tuberculosis elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. United States. *MMWR* 2005;54:49–55.
- 33 Higuchi K, Harada N, Mori T, Sekiya Y. Use of QuantiFERON[®]-TB Gold to investigate tuberculosis contacts in a high school. *Respirology* 2007;12:88–92.
- 34 Leyten EM, Prins C, Bossink AW *et al*. Effect of tuberculin skin testing on a *Mycobacterium tuberculosis*-specific IFN- γ assay. *Eur Respir J* 2007;29:1212–6.
- 35 Richeldi L, Ewer K, Losi M, Roversi P, Fabbri LM, Lalvani A. Repeated tuberculin testing does not induce false positive ELISPOT results. *Thorax* 2006;61:180.

10.3. Article “Double-Blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI®”, acceptat a la revista Vaccine

Manuscript Number: JVAC-D-09-00948R1

Title: Double-Blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI®.

Article Type: Regular Research Articles

Keywords: Latent Tuberculosis Infection (LTBI); Phase 1 Clinical Trial; RUTI® vaccine

Corresponding Author: Professor Pere Joan Cardona, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Unitat de Tuberculosi Experimental, Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol; Universitat Autònoma de Barcelona; CibeRES CRP-TB; Badalona, Spain

First Author: Cristina Vilaplana, MD

Order of Authors: Cristina Vilaplana, MD; Eva Montané, MD, PhD; Sergio Pinto, BSc; Ana M Barriocanal, MD; Gema Domenech, BSc; Ferran Torres, MD, PhD; Pere Joan Cardona, MD, PhD; Joan Costa, MD, PhD

Abstract: A Phase I interventional Clinical Trial was performed with a potential tuberculosis vaccine, based on detoxified cellular fragments of *M.tuberculosis*, named RUTI®. The objectives were to evaluate the safety profile and T cell immune responses over a six month period following subcutaneous inoculation. The double-blind, randomized and placebo-controlled trial was conducted in healthy volunteers, all recruited at one site. RUTI®, at each of the four tested doses, starting from 5 up to 200 µg and placebo were inoculated to groups of 4 and 2 volunteers respectively, consecutively. RUTI® appeared to be well-tolerated as judged by local and systemic clinical evaluation, though vaccine dose dependent local adverse reactions were recorded. T cell responses of blood lymphocytes to PPD and a number of antigen subunits was elevated, when compared with controls subjects. These results support the feasibility of future evaluation, to be targeted at subjects with latent tuberculosis infection (LTBI).

Double-Blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the
therapeutical antituberculous vaccine RUTI®.

Abstract

A Phase I interventional Clinical Trial was performed with a potential tuberculosis
5 vaccine, based on detoxified cellular fragments of *M.tuberculosis*, named RUTI®.
The objectives were to evaluate the safety profile and T cell immune responses
over a six month period following subcutaneous inoculation. The double-blind,
randomized and placebo-controlled trial was conducted in healthy volunteers, all
recruited at one site. RUTI®, at each of the four tested doses, starting from 5 up
10 to 200 µg and placebo were inoculated to groups of 4 and 2 volunteers
respectively, consecutively. RUTI® appeared to be well-tolerated as judged by
local and systemic clinical evaluation, though vaccine dose dependent local
adverse reactions were recorded. T cell responses of blood lymphocytes to PPD
and a number of antigen subunits was elevated, when compared with controls
15 subjects. These results support the feasibility of future evaluation, to be targeted
at subjects with latent tuberculosis infection (LTBI).

Keywords: Latent Tuberculosis Infection (LTBI), Phase 1 Clinical Trial, RUTI®

Abbreviated article title: RUTI® Phase I Clinical Trial

1
2
3
4 **Double-Blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the**
5
6 **therapeutical antituberculous vaccine RUTI®.**
7
8
9

10 **1-Introduction**
11

12
13 Tuberculosis is one of the most frequent infectious diseases in the world, in spite
14
15 of being a curable disease [1]. The latency state of the *M.tuberculosis* contributes
16
17 to that, as even without symptoms, latently infected individuals have the
18
19 possibility to develop active tuberculosis through their lives, with the spread of the
20
21 disease being implied. Unfortunately, only indirect immunological methods are
22
23 able to detect the presence of latent bacilli: the tuberculin skin test (TST) and T-
24
25 cell interferon-gamma release assays (TIGRA) used in LTBI diagnostic [2]. LTBI
26
27 is treated in order to prevent the progression to an active TB, achieving a 90%
28
29 decrease in the incidence of TB in TST converters if treated with isoniazid for 9
30
31 months [3]. But this treatment is too long, does not ensure the complete cure of
32
33 the patient and it is not exempt of adverse effects and its compliance becoming
34
35 difficult. Research on latent tuberculosis has focused on the development of
36
37 prophylactic vaccines and of new therapeutical regimens, but the 9-month
38
39 treatment with INH is still the best approach in terms of cost-efficiency[4]. After
40
41 being avoided since the mid 20th century, for the fear of its adverse effects
42
43 (Koch's reaction), the therapeutical vaccination to treat tuberculosis has been
44
45 reintroduced. More than 100 years later, a new vaccine named RUTI®, based on
46
47 detoxified and liposomed cellular fragments of *M.tuberculosis* bacilli (FCMtb) has
48
49 been developed under good manufacturing practices (GMP) in Badalona
50
51 (Catalonia, Spain), by Archivel Farma. Proposed as a part of a therapeutical
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 regimen in combination with short-term chemotherapy (one month with INH) and
5
6 its safety being proven in several animal models and based on all the nonclinical
7
8 development results, all the licences to start its clinical development were
9
10 obtained.
11
12

13
14 The study presented here is a double-blind, randomised, placebo controlled
15
16 Phase I clinical trial (CT), which objectives were to evaluate the tolerability and
17
18 the immunogenicity of 4 increasing doses of the vaccine RUTI[®] (5, 25, 100 and
19
20 200µg of FCMtb) administered to healthy volunteers twice (4 weeks apart) by the
21
22 subcutaneous route.
23
24
25

26 27 **2-Methods**

28 29 2.1-Ethics

30
31
32 The protocol of the study was reviewed and approved by the Independent Ethics
33
34 Committee (IEC) at the investigational centre (Hospital Universitari “Germans
35
36 Trias i Pujol”, Badalona, Catalonia, Spain), and the Member State Regulatory
37
38 Authority (AEMPS, Spain). All investigators and collaborators agreed to
39
40 rigorously observed Spanish deontological code, the Helsinki declaration with all
41
42 its amendments, and the national guidelines respect to Clinical trials conducted in
43
44 humans, summarized in law 29/2006 (July 26th 2006. BOE n^o 178) and the Royal
45
46 Decree 223/2004 (February 6th 2004. BOE n^o 33). The Good Clinical Practice
47
48 guidelines of the ICH (International Conference on Harmonisation of Technical
49
50 Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) were also
51
52 followed. All the objectives, methodology as well as possible inconveniences and
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 risks due to the study were explained to each subject, orally and in written way
5
6 (by a Consent Form) before to their inclusion. They were also informed of the
7
8 different treatments to be tested, the way they would be assigned to the groups,
9
10 the possible benefits of the study, their option to their own withdrawal at any time
11
12 and of the existence of an insurance contract. All the selected volunteers signed
13
14 the consent form before starting any procedure. The study protocol was reviewed
15
16 and approved, being registered as EudraCT number: 2006-000690-29; PEI
17
18 Code: 06-075 and ClinicalTrials.gov identifier: NCT00546273.
19
20
21
22
23

24 2.2-Participants

25
26
27 Subjects were interviewed, screened for enrolment in 4 sequential phases about
28
29 14 days before starting each period of the trial at the Phase I Unit of the Hospital
30
31 Germans Trias i Pujol (Badalona, Catalonia, Spain) by the physicians of the Unit.
32
33 A total of 65 men were interviewed during the whole 4 recruiting periods. After
34
35 signing the informed consent, 37 of them were screened in order to evaluate the
36
37 inclusion/exclusion criteria (Figure 1). All white men aged 18 - 40 complying with
38
39 all the requirements at the moment of screening: 1) normal physical exam; 2)
40
41 body mass index between 17 and 29.9 kg/m²; 3) systolic blood pressure between
42
43 100 and 140 mmHg; 4) diastolic blood pressure between 50 and 90 mmHg; 5)
44
45 heart rate between 50 and 90 beats/minute, measured in supinus decubitus after
46
47 3 minutes of resting in this position; 6) axillary corporal temperature <37°C; 7)
48
49 ECG without clinically relevant signs. All those able for communicate fluently with
50
51 the investigators and to fulfil all the trial conditions were candidates for inclusion
52
53 in the study. Subjects were not included in the study if any of the following criteria
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 were present: 1) antecedents or actual evidence of severe diseases that could be
5 relevant to the study, including autoimmunity disorders, severe allergy or any
6 chronic or seasonal allergy; any severe adverse event or hypersensitivity to any
7 drug or vaccine or contraindication to the excipients used in the vaccine to be
8 tested; 2) drug abuse or addiction (including an alcohol intake >50g per day), or
9 mental handicap; 3) acute disease with body temperature >37° C 72 hours before
10 the inoculation of the vaccine to be tested; 4) T-SPOT TB positive result; 5)
11 presence of Antinuclear Autoantibodies (ANA); 6) previous vaccination with BCG;
12 7) image compatible with pulmonary tuberculosis infection in the chest
13 radiological exam; 8) having had any investigational drug during the previous
14 month to the first inoculation of the experimental vaccine to be tested in this
15 study; 9) loss of >400 mL of blood in the previous 12 weeks or >250mL in the
16 previous 4 weeks before screening; 10) any clinically relevant deviation of
17 normality detected in the screening; 11) any relevant laboratory parameter
18 abnormality detected in the screening; 12) positive results for antigen HBsAg or
19 antibody Ig M Anti HBc of Hepatitis B virus (VHB), antibodies against Hepatitis C
20 virus (VHC) or antibodies against HIV, detected in the screening; 13) intake of
21 any drug that could not be eliminated from the organism before the first
22 inoculation of the experimental drug to be tested (especially NSAIDs and
23 corticosteroids); or 14) impossibility of obtaining biological samples.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
A total of 13 volunteers were excluded because they did not fulfil the study's requirements. The other 24 volunteers gave their written informed consent to participate and also to be included in a local government database to control the

1
2
3
4 participation of healthy volunteers in clinical trials. Before their inclusion in one of
5
6 the periods, an appointment for the screening visit was made for each volunteer
7
8 where a complete anamnesis, a complete physical exam, an ECG, a Radiological
9
10 chest exam and a laboratory parameters exam (hemato-biochemical parameters,
11
12 T-SPOT TB, Antinuclear Autoantibodies (ANA), urinalysis and serology against
13
14 HIV, VHB and VHC) were performed. All the results and data obtained from the
15
16 volunteers during the whole study are considered confidential. Furthermore, all
17
18 the investigators team certify that to their knowledge all subjects were healthy
19
20 and thus considered able to be included in the CT, in terms of fulfilling all the
21
22 study's requirements.
23
24
25
26
27
28

29 2.3-Interventions

30
31
32 A total of 4 periods (with 6 new volunteers each) were established sequentially in
33
34 the study, in order to study 4 increasing doses of the vaccine (Figure 2). Any
35
36 period was only initiated once the safety of the previous one was ensured 4
37
38 weeks after the last individual was inoculated with the previous dose, considering
39
40 this time lapse enough to observe any possible Adverse Event (AE). Before
41
42 starting any of the 4 periods, and once the informed consent was obtained and
43
44 the screening process finished, the 6 volunteers destined to enter this period
45
46 were randomized to receive either placebo (n=2) or the vaccine (n=4). RUTI[®]
47
48 was supplied by the sponsor and manufacturer (Archivel Farma S.L., Badalona,
49
50 Catalonia, Spain) as an injectable vial with lyophilised product to be administered
51
52 as a suspension by subcutaneous route. RUTI[®] is the name of the finished
53
54 product, composed of the active ingredient of the vaccine named FCMtb (for
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 detoxified cellular fragments of *M.tuberculosis*) plus excipients. The
5
6 manufacturing process of RUTI[®] (under Good Manufacturing Practice) has been
7
8 published elsewhere [5],[6],[7]. Placebo was identically supplied and formulated
9
10 except that it did not contain the active ingredient (FCMtb). Only a single batch of
11
12 both RUTI[®] and placebo were used in the whole study. The distribution of the
13
14 drug vials for the CT was carried out by the Pharmacy Department of Hospital
15
16 Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Catalonia, Spain) where the entire
17
18 study drug received was inventoried and accounted for throughout the study. All
19
20 the vials were manipulated on the day of administration in an identical way to
21
22 achieve the prefixed dilution for each dose level. Both RUTI[®] and placebo were
23
24 administered subcutaneously twice (28 days apart) by a qualified nurse of the
25
26 Phase I Unit of the Pharmacology Department, supervised by the Investigators
27
28 and following the random plan specified in the study protocol. The inoculations
29
30 were performed early in the morning, under fasting, and the exact time of
31
32 administration for each volunteer was registered on the correspondent Case
33
34 Report Form (CRF). The volunteers remained in the unit for a total of 3 hours,
35
36 and were evaluated for safety aspects at hour 3.
37
38
39
40
41
42
43
44

45 46 47 2.4-Objectives

48
49 The main objective of the present study was to evaluate the safety and tolerability
50
51 and to establish a safety dosage range, if possible of RUTI[®]. The secondary one
52
53 was to test the ability of the vaccine to trigger *M.tuberculosis* specific immune
54
55 response in healthy people, compared to placebo. For this last purpose, and due
56
57 to the lack of any correlation of protection for tuberculosis, several assays were
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 conducted in order to help determine the most cost-effective techniques to
5
6 evaluate RUTI[®]'s efficacy when designing a future Phase II CT.
7
8

9
10 Both objectives had the aim of demonstrating RUTI[®] to be safe and immunogenic
11
12 in its first use in humans.
13

14 15 2.5-Outcomes 16

17
18 After the administration of each inoculation, each volunteer was followed-up
19
20 during 25 weeks. The monitoring plan (Figure S1) shows every procedure of the
21
22 follow-up planned in the former study protocol and strictly followed during the
23
24 study.
25
26

27
28 The volunteers were monitored by the investigators team of the Phase I Unit in
29
30 order to perform the following safety evaluations: 1) record of both local and
31
32 systemic adverse events, these being reported by the subject for the duration of
33
34 the study both spontaneously and after questioning; 2) vital constants; 3) physical
35
36 examination; 4) ECG and 5) laboratory safety tests. The complete Safety
37
38 Assessments are listed as Table S1.
39
40
41

42
43 Adverse events detected by the investigator through interrogation or reported by
44
45 the subject during the defined period of collection of AE were recorded. They
46
47 were compiled and listed following the System Organ Class of MedDRA,
48
49 considering an AE as any unwanted medical event in a subject in a clinical trial,
50
51 regardless of its relationship with the intervention under evaluation; a Serious AE
52
53 defined as being cause of death, life threatening, requiring inpatient
54
55 hospitalization, producing disability or incapacity persistent or significant or
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 threatening the patient. The investigator determined the relationship between the
5
6 study medication and the AE as 'none', 'unlikely', possibly, 'probably', and 'not
7
8 evaluable' according to a predefined algorithm based on the modified Karch and
9
10 Lasagna algorithm used by the Spanish Pharmacovigilance System.[8, 9]
11
12

13
14 A VAS Pain score (visual analogical scale ranging from 0 to 100) was used to
15
16 evaluate each volunteer subjective pain intensity at the inoculation point.
17
18

19
20 A total of 81mL of blood was extracted from the volunteers by the nurse of the
21
22 Phase I Unit, under fasting conditions and before any other procedure was done,
23
24 at the timepoints indicated in the monitoring plan. The samples were properly
25
26 labelled and sent to the central laboratories for laboratory safety testing (15mL)
27
28 and to the Experimental Tuberculosis Unit (UTE) (66mL) for the immunogenicity
29
30 testing as soon as possible. The Departments involved in the safety laboratory
31
32 results (Haematology and Clinical Analysis, Immunology and Microbiology) as
33
34 well as the UTE, are accredited by ISO procedures. The Clinical Research
35
36 Organisation of the study monitored all the study in order to ensure the use of
37
38 standard terminology and the collection of accurate, consistent, complete and
39
40 reliable data.
41
42
43
44
45
46

47 The reliability of the Immunogenicity data was also ensured by the performance
48
49 of all the assays by always the same technician (previously trained during a 6
50
51 month period) under the supervision of the former responsible for the
52
53 Immunogenicity evaluation and analysis of all the results obtained. Accuracy of
54
55 the performance of the techniques as well as the values obtained were ensured
56
57 by following strict specific procedures (Standard Operating Procedures SOPs)
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 that were previously designed and set up specifically for this CT and always
5
6 under blinding premises. The sponsor also used an external auditing to review
7
8 the following issues: data management and statistics, both the UTE and the
9
10 Phase I Unit, source data / source documents and the Investigator File and the
11
12 Trial Master File.
13
14

15
16
17 As long as no efficacy measurements are expected from a Phase I CT,
18
19 nevertheless it was still important for the sponsor to determine whether the
20
21 vaccine was or not able to generate any immune response against
22
23 *M.tuberculosis* antigens in a healthy population and its Immunogenicity was
24
25 evaluated (Table S2 and Supporting information). Most of the assays performed
26
27 in this trial were based on previous bibliography that supported that the detection
28
29 of Interferon-gamma (IFN- γ) secretion was the most powerful tool to detect
30
31 efficacy of any new drug against tuberculosis. IFN- γ is considered as the main
32
33 tool that human beings have to fight tuberculosis [10],[11] so this is the target for
34
35 most of the assays performed in TB research. All the pre-clinical studies
36
37 conducted with the vaccine RUTI[®] showed (as has been published elsewhere)
38
39 that it is able to generate a strong cellular immune response measurable as IFN- γ
40
41 secretion. In the same way, it has been previously used in the few other CTs that
42
43 have been conducted with antituberculous vaccines [12-15] [16] and has been
44
45 included in the recently published panel of WHO recommendations for
46
47 immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials[17]. In that sense, the
48
49 IFN- γ secretion was measured by both commercial and non-commercial T-cell
50
51 IFN- γ release assays (TIGRA) by two different techniques: the ELISPOT and
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 ELISA, measuring two different concepts of the IFN- γ secretion, the number of
5
6 the IFN- γ -secreting cells among a total of Peripheral Blood Mononuclear Cells
7
8 (PBMC) and the total amount of IFN- γ secreted in a specific volume of whole
9
10 blood, respectively [18]. The commercial tests used were TSPOT TB
11
12 (OxfordImmunotec, Oxfordshire, UK) and- QuantiFeron-TB-Gold (Cellestis
13
14 GmbH, Germany), both following the manufacturer's recommendations. The
15
16 basis for using both commercial and non-commercial tests was that the
17
18 commercial tests have been developed for diagnosing LTBI (Latent Tuberculosis
19
20 Infection), already validated to detect the presence of T effector cells against
21
22 *M.tuberculosis* antigens secreted by growing bacilli [19, 20]. Even though, the cut
23
24 off of both commercial techniques used were setup to diagnose people already
25
26 infected, therefore not exactly valid to evaluate the cellular responses neither to a
27
28 wider range of stimuli related to *M.tuberculosis* nor of healthy vaccinated people.
29
30 The non-commercial tests where then used in order to improve the
31
32 characterization of the immune response, searching for responses to up to 8
33
34 *M.tuberculosis* recombinant antigens, as well as BCG vaccine and PPD, both
35
36 known as powerful stimuli for the Immune Response against *M.tuberculosis*
37
38 (Table S3 and Supporting Information). The measurement of T-Cellular
39
40 populations by Flow Citometry was only an overview to determine if the vaccine
41
42 was able to enhance CD4 or CD8 T cell populations. A total of 3 studies were
43
44 performed with whole blood, based on published literature:
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

- 55
56 • The study of the secretion of IFN- γ by the $\gamma\delta$ T lymphocytes was based on
57
58 a paper published by Rojas et al on 2005 in JID Rojas [21]. As $\gamma\delta$ T
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 lymphocytes secrete IFN- γ in response to phosphoantigens, as
5
6 *M.tuberculosis* antigens are a phosphoantigen, the synthetic analogue
7
8 bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, kindly provided by Innate Pharma,
9
10 France) was used to reproduce the experiment described in this paper.
11
12 The goal was to elucidate if the vaccination with RUTI[®] was able to
13
14 expand this cell subset when recognizing the synthetic phosphoantigen.
15
16

- 17
18
19 • The study of the Mycobactericidal activity of the whole blood was based
20
21 on “Bactericidal Activity in Whole Blood as a Potential Surrogate Marker of
22
23 Immunity after Vaccination against Tuberculosis” published by Cheon et al
24
25 [22]. As the authors suggested that the mycobactericidal activity of the
26
27 whole blood could be a surrogate marker of the immunity generated after
28
29 a antituberculous vaccination, we reproduced one of the experiments
30
31 described by Cheon et al.
32
33
34
35
36 • The third study using whole blood was a long-term Whole Blood assay, to
37
38 test the supernatants of whole blood 7-days-cultures (with and without
39
40 PPD) for IFN- γ by ELISA, and considering this response to be due to the
41
42 Memory T-cells. In order to set up this assay, also previous published
43
44 literature was used and material & methods adapted. [23]
45
46
47

48 Whole blood samples of all the volunteers were sent to the Dr. Frédéric Altare
49
50 (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France) to be
51
52 test for the study of the kinetic of granulomas formation around artificial beads
53
54 coated with mycobacterial envelop compounds and around live mycobacteria.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Sera were collected to be tested for anti-*M.tuberculosis* antibodies (using both
5 commercial tests and homemade ELISA assays, these in collaboration with
6 Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH, Braunschweig, Germany) as well
7 as for N alpha-Cbz-Lys-thiobenzylesteresterase (BLT-esterase) and Granulolysin
8 (both related to the host defense in human infectious disease)[24-26], in
9 collaboration with Pr. Francesco Dieli, from the Dipartimento di Biopatologia e
10 Metodologie Biomediche of the Palermo University (Italy).

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 None of the Immunogenicity assessments performed in the present CT were
23 standard procedures, as no marker exists to determine the reliable efficacy of an
24 antituberculous vaccine. Different approaches exist in order to demonstrate
25 superiority of the investigational drug to placebo. As no cut-off exists for those
26 non-validated and research-only techniques, a statistical difference ($p < 0.05$)
27 between the results of the different treatment groups has been considered
28 enough to prove the superiority of RUTI[®] vs. placebo, or to consider one dose of
29 FCMtb tested against to the others. Considering 5 treatment groups (5, 25, 100
30 and 200 µg of FCMtb, and placebo), they have been compared with each other,
31 as well as in terms of variability with respect the baseline results (those obtained
32 at timepoint 0); its change between the different timepoints and their evolution
33 through the whole follow-up period, by the statistical methods explained in the
34 statistics section.

35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 2.6-Sample size

55
56
57 Given that this clinical test was an exploratory study of first administration in
58 humans basically intending to demonstrate the safety of the vaccine, a formal
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 predetermination of sample size based on numeric or statistic criteria was not
5
6 made. In any case, the numbers shuffled in the test (24 subjects, 8 placebo and
7
8 16 of treatment) were within the standard for this type of studies. An independent
9
10 monitoring safety committee -Data and Safety Monitoring Committee (DSMC)-
11
12 was created to supervise the study and evaluate the safety of each dose by
13
14 discussing the AE encountered until then. This committee met at week 9 of each
15
16 period to decide whether to test a higher RUTI[®] dose or the need to stop the trial
17
18 or withdraw any subject, as stated in the protocol.
19
20
21
22
23

24 2.7-Randomization and Blinding

25
26
27 A person from Archivel Farma S.L., who was non-related to the CT, selected a
28
29 random list chosen among 10 unpredictable allocation sequences generated
30
31 using the Proc Plan of the SAS programme. These data was used to prepare the
32
33 medication and was kept locked secure place throughout the whole study until
34
35 the disclosure of the blinding. Blind emergency code envelopes were prepared in
36
37 three copies, one copy for the sponsor and two copies to be kept at site (at the
38
39 Pharmacy and the Clinical Pharmacology Department). The envelopes were
40
41 maintained in a locked secure place throughout the whole study while still
42
43 allowing access for emergency code breaking only. Medication was conserved in
44
45 the Pharmacy Department until its use.
46
47
48
49
50
51

52 2.8-Statistical methods

53
54
55 Results were expressed as mean and standard deviation (SD), frequencies and
56
57 percentages (%), or as otherwise specified. All the analyses corresponding to the
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 demographic variables, basal characteristic, as well as the variables to evaluate
5
6 the Immunogenicity were made with the population per protocol (all randomized
7
8 subjects who met the selection criteria, received the study medication, and did
9
10 not present major protocol deviations). All the analyses corresponding to the
11
12 security variables were carried out in the safety population (all patients who
13
14 received at least one dose of the medication). The criteria for the definition of the
15
16 study population were defined beforehand and the selection was performed
17
18 during a Data Blind Review.
19
20
21
22

23
24 The immune response variables were assessed using a Mixed Models for
25
26 Repeated Measurement (MMRM) approach[27], including baseline as a covariate
27
28 and setting the variance covariance matrix to unstructured. The Fisher's exact
29
30 test was used to compare categorical variables. Given the exploratory nature of
31
32 this study of phase I, no multiplicity adjustments were considered. The analysis
33
34 was performed using SAS version 9.1.3 software (SAS Institute Inc., Cary, NC,
35
36 USA) and the level of significance was established at the 0.05 level (two-sided).
37
38
39
40

41 42 **3-Results**

43 44 3.1-Participant flow and Recruitment

45
46 The CT lasted 14 months (431 days) from the data the first patient enrolled to the
47
48 time the last patient finished. After interviewing a total of 65 people during the
49
50 whole CT, only 37 could be assessed for eligibility. A total of 13 volunteers were
51
52 excluded at the screening because they didn't fulfill the study's requirements: 1
53
54 showed sinechia pleuralis in his chest X ray, 1 had a too higher corporal mass
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 index, 1 had bradycardia (seen by the ECG) 1 had thrombocytopenia, 1 was a
5
6 cannabis abuser, 1 was BCGvaccinated, 2 for antecedents of allergy, 2 of them
7
8 had T-SPOT TB positive results and 3 for personal reasons. The screening was
9
10 done in 4 phases, in the 14 days previous to starting each period of the CT. The
11
12 24 volunteers were enrolled to participate in one single period, each period
13
14 composed of 4 volunteers vaccinated with RUTI[®] and 2 with placebo (total n
15
16 allocated to intervention per period=6), the subjects being randomized. As
17
18 explained before, the 4 periods were started sequentially with the dose of FCMtb
19
20 in the vaccine being the difference between them. All the volunteers (24/24)
21
22 received the allocated intervention, were followed-up and ended the CT, with the
23
24 results of all subsequently analyzed (Figure 1).
25
26
27
28
29
30

31 No protocol deviations from the study as planned occurred.
32
33

34 Each volunteer was vaccinated with the allocated intervention (RUTI[®] or placebo)
35
36 twice and followed-up for a total of 6 months. Each period was started with the
37
38 screening of the subjects willing to participate after the decision to escalate to
39
40 next dose to be tested had been made (in week 9 after starting the previous
41
42 dose). Every subject included in the trial had the right to withdraw at any moment
43
44 by immediately contacting the investigators to inform them, without obligation to
45
46 provide reasons. This participant was supposed to be replaced by another except
47
48 in the case the trial had to be ended because of safety issues, and would have
49
50 received the corresponding medication that the one replaced would have
51
52 received.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 The DSMC was established to monitor strictly the study participants and to
5 assess the progress of the clinical trial and the safety data. The DMSC convened
6 at the predetermined intervals (week 9 of each period) to review the unblinded
7 results of the volunteers already vaccinated, and it was this Committee's duty to
8 decide whether to escalate to the next dose. No loss of follow-up or
9 discontinuation of the treatment occurred, with the 24/24 volunteers being
10 analyzed at the end of the CT in order to not break the blinding.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21
22 If a subject had withdrawn because an adverse event, he would have been
23 followed-up by the Investigators until resolution or reaching a clinically stable
24 endpoint. The investigators had the right to decide to terminate or suspend the
25 trial without prior agreement of the sponsor, by promptly informing the trial
26 subjects (assuring them appropriate therapy and follow-up) the sponsor and the
27 regulatory authority. None of the subjects included in the present CT decided to
28 withdraw from the study, and none of them was removed by the investigators.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 Figure 2 summarizes these details in order to make the study design more
40 comprehensible.
41
42
43
44

45 3.2-Baseline data

46
47 All demographic and clinical baseline characteristics for the 24 volunteers finally
48 included in the CT with the corresponding standard deviations are summarized in
49 Table 1. The anamnesis and physical exams performed by the volunteers during
50 screening did not show any clinical significant abnormality. The ECG registers, as
51 well as the results of the laboratory analysis of all the volunteers included in the
52 study performed during the screening, were considered normal. Those values out
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 of normal range by the laboratory were evaluated by the investigators considered
5
6
7 to be without clinical significance.
8
9

10 3.3-Outcomes and estimation

11
12 Regarding the safety aspect of the study, results explained are divided into
13
14 several subsections below.
15
16
17

18 3.3.1-Results of laboratory tests

19
20
21 In general, the volunteers showed values within the limits of normality in the
22
23 results of the clinical tests in the selection and visits throughout the study (blood
24
25 count, biochemistry and urine analysis). Those results that were beyond the limits
26
27 considered normal by the laboratory were evaluated by researchers as values
28
29 not clinically significant, ongoing checks on those who could translate some type
30
31 of pathology. The number of values that was outside the limits considered normal
32
33 by the Laboratory of Clinical Analysis was 63, 16 of them were from
34
35 haematology, 30 from biochemistry and 17 from urinalysis. A total of 60/63 had
36
37 not clinical relevance; the other 3/63 had clinical relevance but was found not
38
39 attributable to the investigational product.
40
41
42
43
44
45
46

47 3.3.2-Physical examination, ECG and vital signs

48
49 All the anomalies detected in the screening visit were not clinically significant.
50
51 With regard to vital signs, practically all the values were within the limits of
52
53 normality specified in the protocol, the deviations from normal values not being
54
55 considered clinically significant. No ECG changes during the study were
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 classified as clinically significant and in no case there were changes in the ECG
5
6 that could be attributed to medication.
7
8

9
10 3.3.3-Adverse Events
11

12 The overall AE reported were 175. No deaths or serious AE occurred. Almost all
13 (173/175: 98.9%) were mild (2 were moderate, 1.1%), and 172/175 (98%) were
14 recovered (2 of them still not recovered: normocytic-normochromic anemia and
15 salivary lithiasis; and one unknown: placement of an orthodontic element). The most
16 common adverse events were related to nervous system disorders (81
17 occurrences presented in 20 participants [83%]). Infections (27 occurrences in 17
18 participants, 71%) and gastrointestinal disorders (20 occurrences in 13
19 participants, 54%) were also frequent. Regarding the type of adverse event, the
20 most common was any kind of headache (54 occurrences [30.8%] reported in
21 16/24 participants [66.7%]). All the participants reported at least one AE, 7 on
22 average. Only two episodes have clinical significance in physical examination
23 during the study. One of them occurred in a placebo (exudative tonsillitis) and the
24 other (salivary lithiasis) occurred without relation with the vaccination.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Regarding the local AE, one of the most frequent was twitching at the injection
46 site, occurring in all the treatment groups. The intensity of pain in the inoculation
47 point was higher in the groups treated with RUTI[®] compared to the group treated
48 with placebo, and the pain intensity was also higher when treated with the higher
49 doses. In all the groups treated with RUTI[®], the pain intensity was higher after the
50 second inoculation, with the groups 100 µg and 200 µg of FCMtb being maximal
51 24 hours after each inoculation and almost resolved within 72 hours (Figure 3).
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 The presence of mild-moderate erythema and/or inflammation in the inoculation
5
6 point was statistically significant different ($p < 0.05$) in groups treated with 100 μg
7
8 and 200 of μg of FCMtb compared to placebo, 5 μg and 25 μg of FCMtb groups
9
10 (Table 4). The presence of induration in the inoculation point was statistically
11
12 significant different in the group treated with 200 μg of FCMtb compared to the
13
14 other 4 treatment groups. The most important reaction seen in the inoculation
15
16 point was swelling in two volunteers, one of them vaccinated with 100 μg of
17
18 FCMtb and the other with 200 μg of FCMtb. Both lesions were biopsied in order
19
20 to obtain samples, and both had negative microbiological cultures proving to be
21
22 sterile and with a pathology result of unspecific granulomatous panniculitis. Both
23
24 episodes were moderate AE, and were completely recovered in less than one
25
26 month.
27
28
29
30
31
32

33
34 The mean AE per participant was higher in groups treated with 5, 100 and 200
35
36 μg FCMtb compared to the placebo group. The complete list of systemic and
37
38 local AE (occurrences vs subjects) with possible or probably causality to the
39
40 treatment is summarized in Tables 2-4.
41
42
43

44 3.3.4-Immunogenicity Assays

45

46
47 A wide range of assays to assess the impact of the vaccination on the immune
48
49 response was planned (Table S2) in order to screen any immunological response
50
51 enhanced by the vaccination, as well as to determine which assays should be
52
53 performed in future CTs. A general overview of the results, evaluating the cellular
54
55 response, showed a dose-related tendency for most of the assays conducted.
56
57 Highest doses (especially dose of 200 μg of FCMtb) showed the highest results,
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 evidenced in terms of the ELISPOT and ELISA techniques determining the
5 specific IFN- γ secretion. Even though, dose of 25 achieved a polyantigenic
6 response, wider than dose of 100 μ g of FCMtb and similar to the one reached by
7 dose of 200 μ g of FCMtb, a fact easily recognizable in the ELISPOT assays
8 (Figure 4). Moreover, even if in the ELISA studies (less sensitive and specific
9 than ELISPOT), doses of 100 and 200 μ g of FCMtb showed the highest results,
10 dose of 25 μ g of FCMtb evidenced a discrete but clear increase of the IFN- γ
11 secretion attributable to the vaccination (data non shown). Interestingly, the
12 enhanced cellular responses of the vaccinated subjects to *M.tuberculosis*
13 antigens could also be detected by the commercial ELISPOT and ELISA assays
14 designed to diagnose latent tuberculosis infection. In terms of the stimuli used to
15 determine the specific-IFN- γ mediated cellular response, not all the antigens
16 showed the same evolution after the vaccination. PPD and BCG vaccine were
17 included in both tests because of their nature, as they are both extracts of *M.*
18 *tuberculosis* and *M.bovis* respectively, and both contain several mycobacterial
19 antigens. That explains the highest results obtained in both assays for these
20 stimuli, and a clearer RUTI[®] dose-response (Figure 5). The fact of high
21 background of responses to PPD and BCG could be explained due to the wide
22 incidence of atypical mycobacteria in Spain, a fact that could have been missed
23 for the decision of basing the screening only on the T-SPOT TB result and not
24 the TST result to not influence the immunogenicity data [28]. For that reason, we
25 do consider that the changes respect to baseline values is more important that
26 the degree of response in itself. Meanwhile, the single antigens were already
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 expected to trigger (if triggered) weaker responses after the vaccination, as
5
6 RUTI[®] is an extract of *M.tuberculosis* containing several antigens but all in low
7
8 concentrations, so the responses obtained were encouraging. The single
9
10 antigens that showed to trigger the highest responses when used as stimuli for
11
12 RUTI[®] groups, were: ESAT-6, 85B, 38kDa and 16 kDa (more discrete), while
13
14 antigens 19kDa and hsp65 only showed responses for one of the assays (ELISA
15
16 and ELISPOT, respectively). CFP-10 and MPT64 showed weak responses
17
18 compared to the other antigens tested. This clearly suggests that a polyantigenic
19
20 response is achieved with the RUTI[®] vaccination against *M.tuberculosis* antigens
21
22 secreted by active and latent bacilli, and will help in order to select the more
23
24 antigenic antigens to test the RUTI[®] vaccine in future CTs. On the other hand, all
25
26 the responses obtained tended to be increased after the second inoculation, and
27
28 then tended to decrease with a later increase at the latest timepoints of the study.
29
30 The high and maintained responses obtained in the long-term whole blood assay,
31
32 where the production of IFN- γ secretion by the Memory T cell subset is
33
34 evaluated, reinforced this idea (Figure 6). All this suggests the ability of the
35
36 vaccination to induce long-lasting protection, even if it should be necessary to
37
38 follow-up the volunteers in the future to exactly determine how long this
39
40 protection can last. In terms of % of subsets of T cells, the RUTI[®] vaccination
41
42 enhanced the T cell populations, as was expected from previous studies
43
44 conducted in animal models during the preclinical development [29]. Interestingly,
45
46 the results showed that RUTI[®] achieved an increase attributable to the
47
48 vaccination especially remarkable for CD4+CD3+ population (doses of 5 and 200
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 µg of FCMtb) and for CD8+CD3- (doses of 25 and 100 µg of FCMtb). All the
5
6 RUTI[®] doses had mycobactericidal activity after incubating the volunteers' whole
7
8 blood with *M.tuberculosis* for 72 or 96 hours) at least at one timepoint, while the
9
10 blood of placebo-vaccinated people did not. Even if this ability didn't last for long,
11
12 generally reverting, it is interesting to remark that this could be a useful (even if
13
14 quite logistically difficult) assay to perform in future CTs, with the
15
16 mycobactericidal activity a potential surrogate marker of immunity after RUTI[®]
17
18 vaccination of latently *M.tuberculosis* infected people.
19
20
21
22
23

24 The results of the test for the induction of granuloma conducted by the (Institut de
25
26 Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France) are still being
27
28 analyzed, thus non being reported in this paper, but we do not exclude publishing
29
30 them in a future.
31
32
33

34 Humoral immunological response was evaluated by the Pathozyme and the
35
36 Mycodot assays, as well as with detection of specific antibodies against
37
38 *M.tuberculosis* recombinant antigens. The Mycodot results were negative for all
39
40 the volunteers except for 2, one placebo and the other one RUTI[®]-vaccinated,
41
42 seeming to be an unspecific technique. The only conclusion that we could extract
43
44 is that no antibodies against LAM were in general encountered. The Pathozyme
45
46 assay is a commercial kit ELISA to determine the specific response to 2 of the
47
48 *M.tuberculosis* antigens, the 16 and 38kDa ones. A clear increase of the
49
50 response could be observed after RUTI[®] vaccination for all doses, even if only
51
52 the dose of 200 µg of FCMtb reached the positivity marked by the manufacturer's
53
54 recommendations. The response against *M.tuberculosis* has been classically
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 related to the cellular immunological response, even if the humoral response has
5
6 been proven to also be a powerful tool to fight *M.tuberculosis* infection as was
7
8 already shown to be triggered by RUTI[®] vaccination [30]. Results of the IgM, IgG
9
10 and IgA antibodies detection assays conducted showed (even if not statistically
11
12 significantly different) increased levels of IgM and IgG antibodies against
13
14 *M.tuberculosis* antigens in the RUTI[®] vaccinated volunteers when compared to
15
16 placebo, being clear for the IgM and more discrete for the IgG antibodies. IgG
17
18 antibodies have been related to disease, while presence of IgM could correlate to
19
20 infection with *M.tuberculosis* [31-34]. This idea suggests us that the absence of
21
22 IgG in our results together with higher levels of IgM antibodies in vaccinated
23
24 subjects could be directly attributed to RUTI[®], without being able to specify if or
25
26 in which grade they could have a protective role. For all this, it would be very
27
28 interesting to repeat the assays on these volunteers one year after the
29
30 vaccination in order to check if this profile has changed, the IgG response being
31
32 increased or maintained and the IgM response being decreased or cleared.
33
34 Another reason for mainly finding IgM could also be the need of restimulating the
35
36 Memory Immunity to produce specific IgG antibodies
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 One of the limitations of this study was the amount of techniques conducted, that
47
48 required a large amount of blood and a very strict schedule at every timepoint
49
50 and at the end, with some of the assays not providing much useful information.
51
52 The study to evaluate PCT levels showed a slight increase in RUTI[®] vaccinees
53
54 (doses of 25 and 100 µg of FCMtb), but in any case reached the cutoff that limits
55
56 with the bacterial infection as a cause of inflammation, only suggesting that
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 RUTI[®] vaccines have an unspecific inflammation with respect to the placebo-
5
6 vaccinated volunteers. Results from the $\gamma\delta$ assay showed no response by any
7
8 treatment group except for placebo and RUTI[®] dose of 200 μg of FCMtb at one
9
10 timepoint, and by RUTI[®] dose of 25 μg of FCMtb at another timepoint. All the
11
12 data presented here suggest that it is not worthwhile to perform these two assays
13
14 in future studies. The granulolysin and the BLT-esterase assays showed
15
16 increased granulolysin levels (dose of 25 μg of FCMtb) and granzyme activity
17
18 (doses of 100 and 200 μg of FCMtb) in the RUTI[®] vaccines, even if they weren't
19
20 high enough to be significantly different from the placebo. These measurements
21
22 were done because granzymes are molecules related to the inflammatory
23
24 responses involved in mycobactericidal activity. The results encountered suggest
25
26 that it would be interesting to test the RUTI[®] vaccinated subjects for both
27
28 parameters in future CTs, involving latently-*M.tuberculosis* infected population in
29
30 order to evaluate if the minor differences attributable to the vaccination in these
31
32 healthy volunteers are major in the infected ones.
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Regarding the immunogenicity assays, Table S4 summarize all results, where
42
43 statistically significant differences between the groups encountered in the
44
45 statistical analysis performed are stated. The results of the ELISPOT and of the
46
47 detected levels of IgM antibodies against *M.tuberculosis* antigens have been
48
49 added as figures 4-6 and S2, respectively.
50
51
52
53

54 **4-Discussion**

55
56
57 This CT was the first approach to evaluate the safety of the RUTI[®] vaccine in
58
59 humans, and the results showed a range of AE in line with other immunogenic
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 products. The incidence of local adverse events was higher in the volunteers
5
6 vaccinated with RUTI[®], and dose-related, the most frequent being twitching in the
7
8 injection site, with equal frequency in RUTI[®] and placebo groups, suggesting that
9
10 this could be related to one of the non-active compounds (excipients) of the final
11
12 product. The manufacturer of the vaccine is now working on that issue,
13
14 ameliorating the final product in order to avoid this AE. The more important local
15
16 reaction seen was swelling with sterile granulomatous panniculitis in 2 out of 24
17
18 volunteers. Even if its incidence was low (2/16), both being moderate and fully
19
20 recovered, by their nature and occurrence with the highest doses, these AE could
21
22 recall the Koch reaction obtained after the therapeutical use of tuberculin in
23
24 tuberculosis, a fact related to the dose and the dosage timing used, as stated in
25
26 the several classical studies of the beginning of the 20th century [35, 36]. One
27
28 could fear the incidence of this AE to be higher in infected, i.e. immunized people
29
30 and to appear after the first dose even if using lower doses. The safety results
31
32 are in line with those obtained in previous studies carried with similar products,
33
34 even if it is difficult to compare results when there are differences in vaccines'
35
36 origin, different regimens and target population. Inflammation, swelling and other
37
38 local reactions have been recorded in other CT involving healthy people [16], and
39
40 are very common in CT evaluating boosting vaccines [12] [37] [38]. We do
41
42 believe the AE due to RUTI[®] in future trials conducted in LTBI populations could
43
44 be similar to those encountered in trials involving vaccines in prime-boost
45
46 regimens. In this regard, the experiences with tuberculin showed that the dosage
47
48 range is crucial to achieve an improvement of the immunological response
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 without impairing the safety [36, 39]. All these aspects are currently evaluated
5
6 when deciding the doses to test in further studies, designing them with precision
7
8 to avoid any toxicity that could harm future volunteers, the results of the present
9
10 study being very useful to establish the appropriate dosage range.
11
12

13
14 This CT also constitutes the first approach to study the mechanisms of action of
15
16 the RUTI[®] vaccine in humans. The results obtained shown us that a cellular and
17
18 humoral specific immunological response was triggered by the vaccination, which
19
20 sometimes were statistically significantly different from the one obtained in the
21
22 volunteers vaccinated with placebo, and even when not, a tendency to increased
23
24 responses was noteworthy. The variability of responses to the vaccination among
25
26 the individuals included in the trial was random, and even if the sample size was
27
28 selected according to any other Phase I CT of this kind, we do believe that a
29
30 higher sample size could have obtained more statistically significant differences
31
32 between the treatment groups in spite of this intrinsically individual variability to
33
34 the interventions. Another pitfall when interpreting the results was also the high
35
36 background that sometimes was detected for some of the treatments: specific
37
38 responses against some of the antigens obtained at day 0, or for the placebo-
39
40 group at some timepoints. Those results being due to some of the individuals that
41
42 constituted each group, and even without interfering in the global analysis which
43
44 demonstrate the superiority of RUTI[®] compared to placebo in terms of
45
46 immunological responses, a deep analysis of each volunteer condition is being
47
48 conducted, in order to better understand the results obtained. Consequently a
49
50 new study is being planned in order to follow all these volunteers and their
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 evolution. As explained before, we believe that having a bigger population for the
5
6 CT could have minimized these interindividual differences, homogenizing the
7
8 whole population for each treatment and thus helping to better show the real
9
10 boosting effect that occurs after RUTI[®] immunisation.
11
12

13
14 None of the volunteers included were infected with *M.tuberculosis* nor BCG
15
16 vaccinated (thus this being their first time facing bacilli's antigens), a fact that will
17
18 not be repeated in further studies, where the target population will be previously
19
20 infected people. For this CT being conducted in totally healthy volunteers, the
21
22 immunological responses obtained can be considered noteworthy, and in line
23
24 with CT testing other vaccines in healthy people [12, 16], even if comparisons are
25
26 difficult due to different designs and outcomes. Higher responses are expected in
27
28 the already *M.tuberculosis* infected individuals, as they will be already primed.
29
30
31

32
33
34 None of the current vaccines against *M.tuberculosis* infection based on
35
36 *M.tuberculosis* presently under clinical development are tested as therapeutical
37
38 agents, thus no real comparison could be made with the results obtained in this
39
40 CT.
41
42

43
44 Until the present, it can be concluded that the safety of the vaccine has been
45
46 demonstrated in healthy volunteers, and RUTI[®] has also shown to trigger a
47
48 specific response against *M.tuberculosis*, ensuring the clinical development
49
50 through further studies.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Acknowledgments**
5

6
7
8 Participating Investigators
9

10 Nuria López, Sandra Anzola, Eva Portabella and Francisca García worked
11 collecting data and provided and cared for study patients. Jordi Lara and Sandra
12
13 Serrano worked in the statistical analysis of all the data collected during the trial.
14
15

16
17
18 Other contributions
19

20
21 We would like to give special thanks to the 24 participants of this CT, as well as
22
23 all the volunteers willing to participate that couldn't finally be included. We also
24
25 would like to thank the Pneumology, Dermatology, Pathology and Microbiology
26
27 Departments of the Hospital Germans Trias i Pujol, where this trial was
28
29 conducted, for helping in the follow-up and diagnosis of the AE, especially Dr.
30
31 J.Ruiz Manzano, Dr. J.Ferrándiz, Dr. Tapia and Dra. C.Prat.
32
33

34
35
36 Innate Pharma (Marseille, France) kindly provided the BrHPP to run the $\gamma\delta$ Tcells
37
38 assay.
39

40
41
42 The Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Centre National de la
43
44 Reserche Scientifique, Université Paris Descartes, Toulouse, France) tested the
45
46 whole blood samples for the induction of granuloma.
47
48

49
50 The homemade ELISA assays to test sera samples for antibodies against
51
52 *M.tuberculosis* recombinant antigens were carried out by Lionex Diagnostics and
53
54 Therapeutics GmbH (Braunschweig, Germany), thus Mahavir Singh, Ralf Spallek
55
56 & Susanne Kämpfer.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Pr. F. Dieli from the Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche of
5
6 the Palermo University (Italia) tested the sera samples for BLT-esterase and
7
8 Granulolysin.
9

10 11 **Funding:**

12
13
14 As the owner and manufacturer of the vaccine to be studied (RUTI®), Archivel
15
16 Farma s.l. (Badalona, Catalonia, Spain) was the sponsor of this trial and funded
17
18 it. The funders had no role in data collection and analysis or the preparation of
19
20 the manuscript. As stated in the protocol of the trial, the investigators and the
21
22 sponsor agreed on to disclosure of the results obtained.
23
24

25
26
27 The Spanish Government also financially contributed to this Project through
28
29 personnel contracts: C.Vilaplana is contracted by the National Plan I+D+I FIS
30
31 (exp CM06/00123) and Sergio Pinto is contracted by the Corporate Research
32
33 Program on Tuberculosis (CRP-TB) of the CIBER Enfermedades Respiratorias.
34
35
36
37
38

39 **Competing Interests:**

40
41 PJC is co-inventor of the patent claiming of RUTI® as therapeutic vaccine.
42
43 Regulatory approval and further clinical development is being undertaken by a
44
45 spin-out the biopharmaceutical company Archivel Farma, s.l. in collaboration with
46
47 the Institut Germans Trias i Pujol. PJC is the Scientific Director of this
48
49 development.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **References**
5
6

7 [1] Organization WH. Global tuberculosis control : surveillance, planning,
8 financing : WHO report 2008; 2008.
9

10
11
12 [2] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for
13 the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med 2008
14 Aug;149(3):177-84.
15
16
17
18
19
20

21 [3] Comstock G. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis
22 among immunocompetent adults? Int J Tuberc Lung Dis 1999 Oct;3(10):847-50.
23
24
25
26

27 [4] Woldehanna S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV
28 infected persons. Cochrane Database Syst Rev 2004(1):CD000171.
29
30
31

32
33 [5] Cardona P, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, et al.
34 Immunotherapy with fragmented Mycobacterium tuberculosis cells increases the
35 effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of
36 tuberculosis. Vaccine 2005 Feb;23(11):1393-8.
37
38
39
40
41
42

43
44 [6] Cardona P, Amat I. [Origin and development of RUTI, a new therapeutic
45 vaccine against Mycobacterium tuberculosis infection]. Arch Bronconeumol 2006
46 Jan;42(1):25-32.
47
48
49
50

51
52 [7] Cardona P. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent
53 tuberculosis infection. Tuberculosis (Edinb);86(3-4):273-89.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 [8] Meyboom R, Royer R. Causality classification at pharmacovigilance
5 centres in the European Community: Pharmacoepidemiol Drug Safety, 1992.
6
7
8
9
10 [9] Karch F, Lasagna L. Toward the operational identification of adverse drug
11 reactions. Clin Pharmacol Ther 1977 Mar;21(3):247-54.
12
13
14
15 [10] Flynn J, Chan J, Triebold K, Dalton D, Stewart T, Bloom B. An essential
16 role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. J
17 Exp Med 1993 Dec;178(6):2249-54.
18
19
20
21 [11] North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. Annu Rev Immunol
22 2004;22:599-623.
23
24 [12] Hawkridge T, Scriba T, Gelderbloem S, Smit E, Tameris M, Moyo S, et al.
25 Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy
26 adults in South Africa. J Infect Dis 2008 Aug;198(4):544-52.
27
28
29
30 [13] Ibanga H, Brookes R, Hill P, Owiafe P, Fletcher H, Lienhardt C, et al. Early
31 clinical trials with a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in tuberculosis-endemic
32 countries: issues in study design. Lancet Infect Dis 2006 Aug;6(8):522-8.
33
34
35
36
37
38 [14] McShane H, Pathan A, Sander C, Goonetilleke N, Fletcher H, Hill A.
39 Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis
40 in clinical trials. Tuberculosis (Edinb);85(1-2):47-52.
41
42
43
44
45
46 [15] McShane H, Pathan A, Sander C, Keating S, Gilbert S, Huygen K, et al.
47 Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat*
5
6
7 *Med* 2004 Nov;10(11):1240-4.

8
9
10 [16] Hoft D, Blazevic A, Abate G, Hanekom W, Kaplan G, Soler J, et al. A new
11
12 recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly
13
14 enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis* 2008
15
16
17 Nov;198(10):1491-501.

18
19
20 [17] Hanekom W, Dockrell H, Ottenhoff T, Doherty T, Fletcher H, McShane H,
21
22
23 et al. Immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials: WHO panel
24
25
26 recommendations. *PLoS Med* 2008 Jul;5(7):e145.

27
28
29 [18] Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. The prognosis of latent
30
31
32 tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med* 2007 May;13(5):175-82.

33
34
35 [19] Arend S, Thijsen S, Leyten E, Bouwman J, Franken W, Koster B, et al.
36
37
38 Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing
39
40
41 tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Mar;175(6):618-27.

42
43
44 [20] Franken W, Timmermans J, Prins C, Slootman E, Dreverman J, Bruins H,
45
46
47 et al. Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of
48
49
50 latent tuberculosis infection in Army personnel. *Clin Vaccine Immunol* 2007
51
52
53 Apr;14(4):477-80.

54
55 [21] Rojas R, Chervenak K, Thomas J, Morrow J, Nshuti L, Zalwango S, et al.
56
57
58 Vdelta2+ gammadelta T cell function in *Mycobacterium tuberculosis*- and HIV-1-

1
2
3
4 positive patients in the United States and Uganda: application of a whole-blood
5
6 assay. *J Infect Dis* 2005 Nov;192(10):1806-14.
7
8
9

10 [22] Cheon S, Kampmann B, Hise A, Phillips M, Song H, Landen K, et al.
11
12 Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity
13
14 after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Jul;9(4):901-
15
16
17 7.
18
19
20

21 [23] Mawa P, Pickering J, Miiro G, Namujju P, Watera C, Anyaegani G, et al.
22
23 The effect of tuberculin skin testing on viral load and anti-mycobacterial immune
24
25 responses in HIV-1-infected Ugandan adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004
26
27
28 May;8(5):586-92.
29
30
31

32 [24] Di Liberto D, Buccheri S, Caccamo N, Meraviglia S, Romano A, Di Carlo
33
34 P, et al. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which
35
36 reverse after therapy. *Tuberculosis (Edinb)* 2007 Jul;87(4):322-8.
37
38
39

40 [25] Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, de Boer T,
41
42 Adnan I, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production
43
44 correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-
45
46 gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis*
47
48
49 (Edinb) 2007 Jul;87(4):312-21.
50
51
52

53 [26] Stenger S, Hanson D, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi K, Froelich C, et al.
54
55 An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998
56
57
58 Oct;282(5386):121-5.
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 [27] Verbeke G, Molenberghs G. Linear Mixed Models for Longitudinal Data.
5
6 New York: Springer-Verlag, 2000.
7
8

9
10 [28] Vilaplana C, Ruiz-Manzano J, Gil O, Cuchillo F, Montané E, Singh M, et
11
12 al. The tuberculin skin test increases the responses measured by T cell
13
14 interferon-gamma release assays. Scand J Immunol 2008 Jun;67(6):610-7.
15
16

17
18 [29] Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona P. Induction
19
20 of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term
21
22 chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig
23
24 experimental models of tuberculosis. Clin Vaccine Immunol 2008
25
26 Aug;15(8):1229-37.
27
28

29
30 [30] Guirado E, Amat I, Gil O, Díaz J, Arcos V, Caceres N, et al. Passive
31
32 serum therapy with polyclonal antibodies against Mycobacterium tuberculosis
33
34 protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID
35
36 mice. Microbes Infect 2006 Apr;8(5):1252-9.
37
38

39
40 [31] Hussain R, Dawood G, Abrar N, Toossi Z, Minai A, Dojki M, et al.
41
42 Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass
43
44 responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household
45
46 contacts of the patients. Clin Diagn Lab Immunol 1995 Nov;2(6):726-32.
47
48

49
50 [32] Sousa A, Henry S, Marója F, Lee F, Brum L, Singh M, et al. IgG subclass
51
52 distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 antigens in leprosy and tuberculosis patients. Clin Exp Immunol 1998
5
6 Jan;111(1):48-55.
7
8

9
10 [33] Araujo Z, Giampietro F, Cançado L, Singh M, Wide A. Comparison of
11
12 serological responses in two different populations with pulmonary tuberculosis.
13
14 Mem Inst Oswaldo Cruz 2008 Nov;103(7):661-7.
15
16

17
18 [34] Raja A, Uma Devi K, Ramalingam B, Brennan P. Immunoglobulin G, A,
19
20 and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-
21
22 kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2002
23
24 Mar;9(2):308-12.
25
26

27
28 [35] Riviere C, Morland E. Tuberculin Treatment. second edition ed. London:
29
30 Oxford Medical Publications, 1913.
31
32

33
34 [36] Sahli H. Sahli's Tuberculin Treatment. London: John Bale, Sons &
35
36 Danielsson, Ltd., 1912.
37
38

39
40 [37] Vuola J, Ristola M, Cole B, Järviluoma A, Tvaroha S, Rönkkö T, et al.
41
42 Immunogenicity of an inactivated mycobacterial vaccine for the prevention of
43
44 HIV-associated tuberculosis: a randomized, controlled trial. AIDS 2003
45
46 Nov;17(16):2351-5.
47
48

49
50 [38] Pathan A, Sander C, Fletcher H, Poulton I, Alder N, Beveridge N, et al.
51
52 Boosting BCG with recombinant modified vaccinia ankara expressing antigen
53
54 85A: different boosting intervals and implications for efficacy trials. PLoS One
55
56 2007;2(10):e1052.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[39] Pottenger FM. Tuberculin in Diagnosis and Treatment. St. Louis: C. V. Mosby company, 1913.

1
2
3
4
5 **Figure Legends**
6

7
8 **Figure 1.** Chart representing the Participant Flow of the CT. From 65 people
9 interviewed, only 37 could be assessed for eligibility, enrolling 24 participants to
10 participate in 4 different periods (n=6 each period). All the 24/24 were
11 randomized and allocated to intervention, receiving it, being fully followed-up,
12 ending the trial and being analyzed.
13
14
15
16
17
18

19
20 **Figure 2.** Study design, with the screening phases, interventions, monitoring and
21 decision to escalate to next dose to be tested. This chart should be useful to
22 understand how the increasing doses of the vaccine were sequentially
23 enchainned, beginning once the previous dose safety ensured. It also helps to see
24 when the follow-up visits were made.
25
26
27
28
29
30
31

32
33 **Figure 3.** Subjective pain intensity at the inoculation point (measured with visual
34 analogical scale ranging from 0 to 100) represented for each visit and each
35 treatment group.
36
37
38
39
40

41 **Figure 4.** Cellular immune response (in terms of SFU/1·10⁶ PBMC) against
42 several *M.tuberculosis* antigens and PPD of volunteers vaccinated with 25µg of
43 FCMtb. Results of the ELISPOT assay are shown through time, from the baseline
44 value to at one week after the second inoculation (day 35) and at day 112, almost
45 5 months after day 0.
46
47
48
49
50
51
52

53
54 **Figure 5.** ELISPOT assay results in response to PPD stimulation of PBMC
55 through time. Each colour represents one treatment. The red asterisk means
56 statistically significant differences compared to placebo (p<0.05).
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 6. Long-term Whole Blood assay results of the volunteers of the 5 treatment groups through time.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

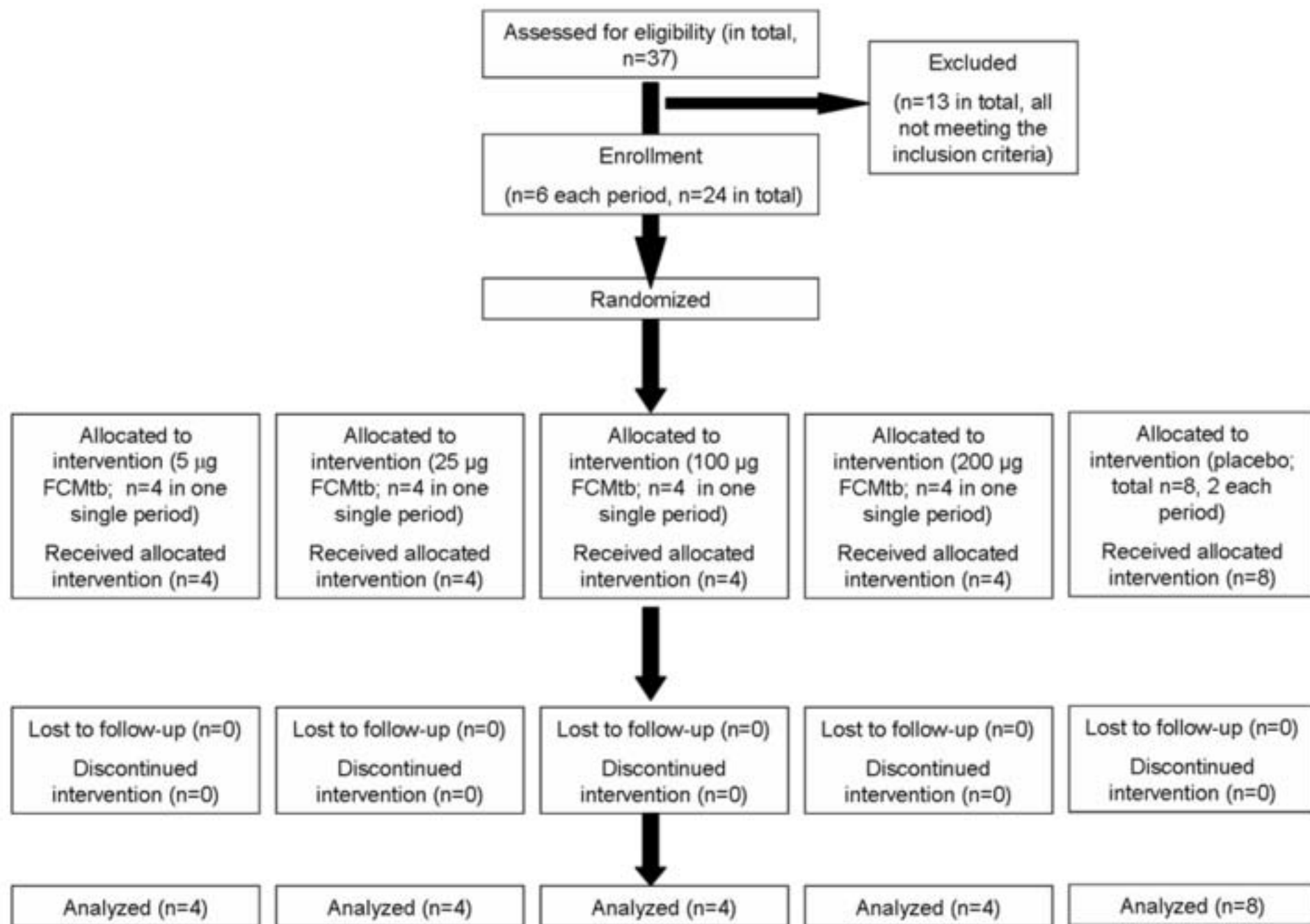


Figure 3

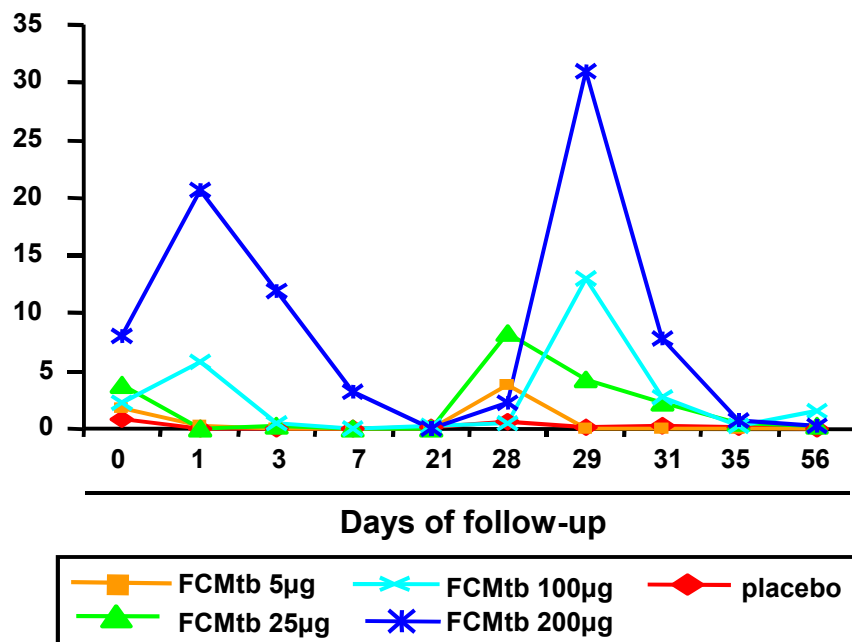


Figure 4

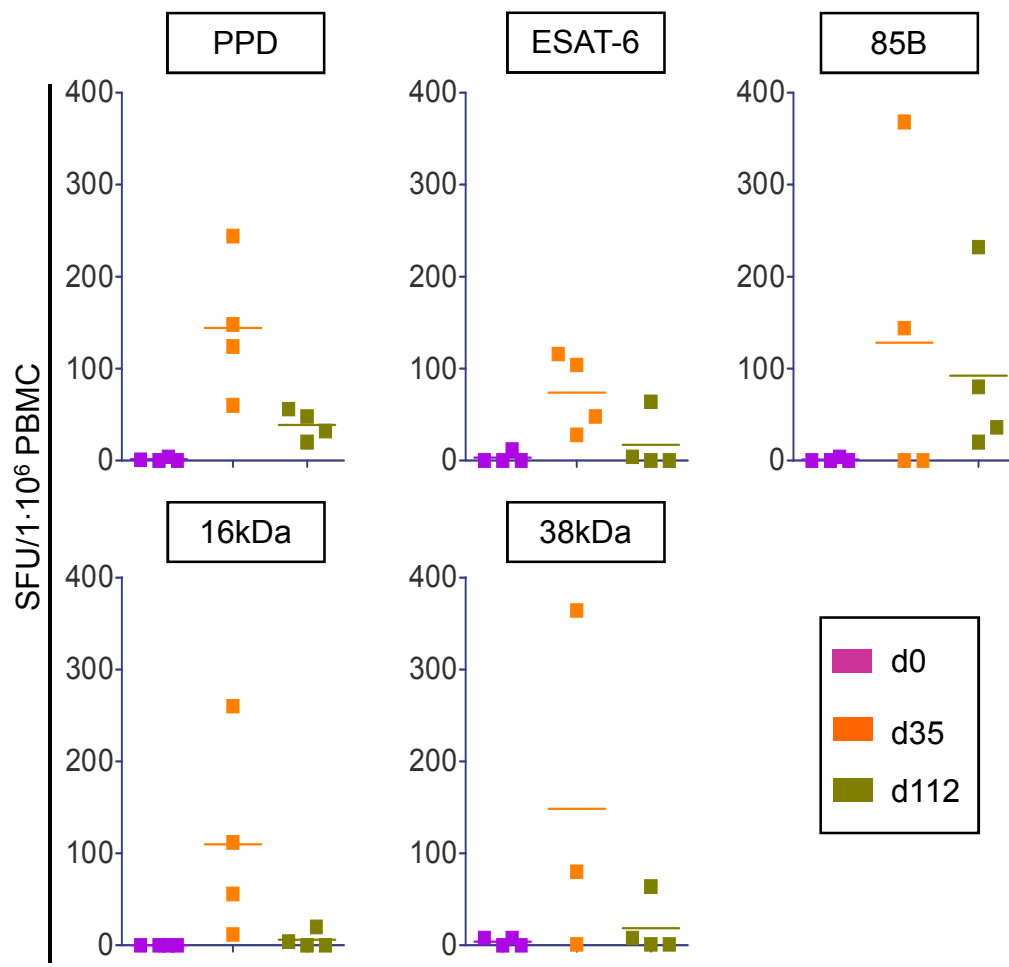


Figure 5

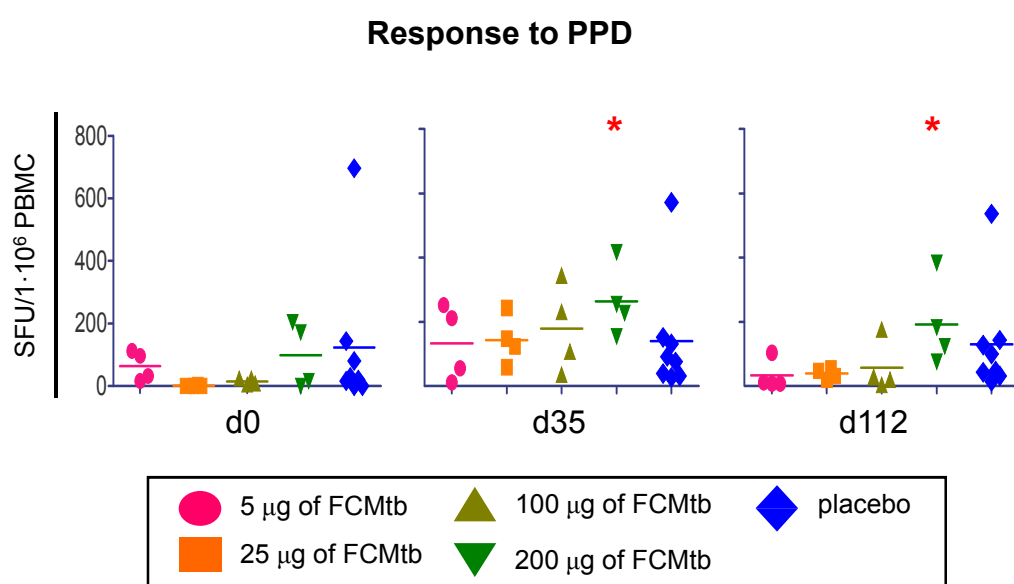
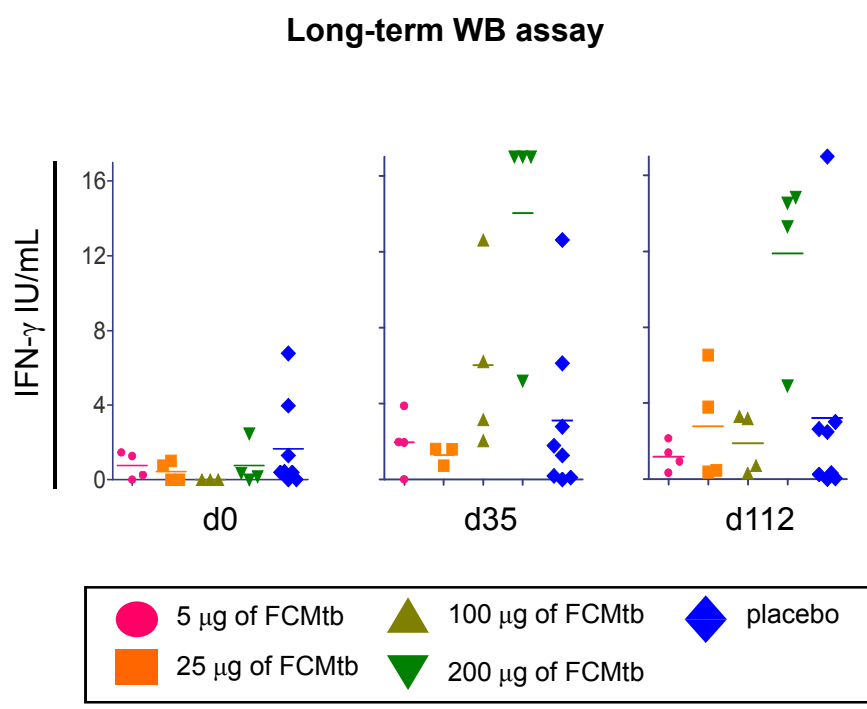


Figure 6



Parameter	Mean	SD	95% CI	Units
Age	24.08	3.46	22.62-25.55	years
Weight	72.60	10.56	68.14-77.06	kg
Height	1.78	0.06	1.76-1.81	m
Body Mass Index	22.57	2.45	21.54-23.61	kg/m ²
Systolic blood pressure	115.50	8.73	111.81-119.19	mmHg
Dyastolic blood pressure	64.83	6.79	61.97-67.7	mmHg
Cardiac frequency	64.25	10.66	59.75-68.75	bpm
Corporal temperature	36.23	0.45	36.04-36.41	grades centigrades

Table 1. Demographic and cardiovascular baseline characteristics.

The correspondent means, standard deviations, 95% CI and units are represented.

Preferred term	Causality	Intensity	Placebo (n=8) O/S (%)	RUTI doses (in µg of FCMtb)			
				5 (n=4) O/S (%)	25 (n=4) O/S (%)	100 (n=4) O/S (%)	200 (n=4) O/S (%)
Feeling of body T ^a change	Possibly	Mild	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Vasovagal Syncope	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	2/1 (25%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Rhinorrea	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)
Sneezing	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)
Lymphadenopathy	Possibly	Mild	1/1 (12.5%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Nasopharyngitis	Possibly	Mild	1/1 (12.5%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Skin rash	Possibly	Mild	2/2 (25%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)

Table 2. Systemic adverse events.

Number (%) of subjects reporting one or more treatment-emergent adverse events and number of AE occurrences by preferred term, possible or probable causality of the treatment and intensity. (O=occurrences; S=Subjects).

Preferred term	Causality	Intensity	Placebo (n=8) O/S (%)	RUTI doses (in µg of FCMtb)			
				5 (n=4) O/S (%)	25 (n=4) O/S (%)	100 (n=4) O/S (%)	200 (n=4) O/S (%)
Injection site pain	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	1/1 (25%)
Twitching	Possibly	Mild	7/4 (50%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	10/4 (100%)	4/3 (75%)
Panniculitis	Probably	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)
	Possibly	Moderate	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)

Table 3. Local adverse events.

Number (%) of subjects reporting one or more treatment emergent-adverse events and number of AE occurrences by preferred term, possible or probable causality of the treatment and intensity. (O=occurrences; S=Subjects).

Local reaction	Placebo	RUTI doses (in µg of FCMtb)			
		5µg FCMtb	25µg FCMtb	100µg FCMtb	200µg FCMtb
Erythema (mild or moderate)	0	0	0	2 [†]	3 [†]
Inflammation (mild or moderate)	0	0	0	2 [†]	5 [†]
Induration	0	0	0	0	8 [‡]
Abscessification	0	0	0	0	0
Ulcer	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0

Table 4. Number of total local adverse events.

Statistically significant differences between treatment groups are shown as: [†] meaning significant statistical differences ($p < 0.05$) compared to 5 µg, 25 µg and placebo groups; and [‡] as significant statistical differences ($p < 0.05$) compared to 5 µg, 25 µg, 100 µg and placebo groups.

10.4. Procediment tipus en format SOP

PE-UTE-09

REV.01

GENERADA PER: Dr. C. Vilaplana, responsable d'Immunogenicitat

APROVADA PER: Dr. Pere-Joan Cardona, cap de la Unitat

Badalona, 5 d'abril de 2007

OBJECTIU:

Determinar l' IFN- γ secretat després de l'estimulació llarga (7 dies) de la sang total dels voluntaris amb PPD, considerant que serà deguda a les cèl·lules T de Memòria, valorant la possible influència de la inoculació de la vacuna RUTI.

MATERIAL:

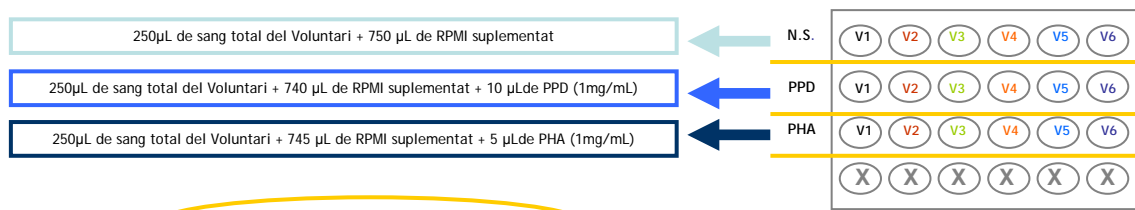
- penicil·lina 100 UI/mL
- streptomicina 100 μ g/MI
- Medi RPMI-L-Glutamina. Gibco. Ref. 21875-034
- HEPES 1M
- PPD, SSI, 2390
- PHA-L. Sigma L4144
- plaques estèrils de 24 pous. Nunclon Surface for cell culture. Ref. 142475. Labclinics
- Puntes estèrils de fins a 100 μ L i puntes de fins a 1000 μ L.
- Pipetes de fins a 100 μ L i de fins a 1000 μ L
- kit d'ELISA d'IFN- γ humà (QTF-TB-Gold, Cellestis)

PROTOCOL:

1- Cal diluir la sang total heparinitzada 1:4 amb RPMI suplementat per a obtenir 1mL de sang diluïda, cal treballar doncs amb 250 μ L de sang total de cada voluntari. El PPD (Ci=1mg/mL) es farà servir a una Cf= 10 μ L/mL; i la de PHA (Ci=1mg/mL) a una Cf: 5 μ L/mL.

2- Cal preparar l' RPMI 1640 suplementat amb 20 mmol/L HEPES, 2 mmol/L l-glutamina, 100 U/mL de penicil·lina i 100 mg/mL d'estreptomicina.

3- dispensar a cada pou de 24 el que correspongui, segons la figura següent:



2- Posar les plaques a cultivar 7 dies a 37° i un 5% de CO₂.

PE-UTE-09

REV.01

GENERADA PER: Dr. C. Vilaplana, responsable d'Immunogenicitat

APROVADA PER: Dr. Pere-Joan Cardona, cap de la Unitat

Badalona, 5 d'abril de 2007

3- Al 8è dia, centrifugar les plaques a 1600g durant 10', i recollir els sobrenedant en criotubs degudament rotulats (1 criotub per mostra). Congelar-los a -20° (si es preveu realitzar l'ELISA d'IFN- γ menys de 3 mesos després) o a -80°C.

4- Fer l'ELISA de detecció d'IFN- γ de les mostres segons el protocol detallat a l'apartat de l'ELISA del QTF-TB-Gold (PE-6).

RESULTATS:

A partir d'una recta patró construïda amb els valors de la corba estàndard, s'obtidran els valors d'IFN- γ (en IU/mL) de totes les mostres. Per a que l'ELISA sigui valid, cal tenir en compte les premises següents, que vénen descrites al kit (i en cas de no complir-se s'hauria de repetir la prova)

- The correlation coefficient (r) calculated from the OD values of the standards should be >0.98.
- Replicate OD values for Standard dilutions 6 and 7 and for the Zero Standard (Green Diluent) should not vary by more than 0.040 optical density units from their mean.
- The Kit Standard (Standard 1) and Standard dilutions 2 to 5 should be within 15% of mean OD values. (% coefficient of variation (CV) >15%)
- The mean OD value for the Kit Standard (Standard 1) must be > 1.20.
- The mean OD value for the Zero Standard (Green Diluent) should be < 0.1. If the OD value is > 0.1 the plate washing procedures should be investigated.

Si el valor obtingut amb el mitògen menys el del no-estimulat és <0.1 IU/mL, i en el cas de que no s'hagi obtingut resposta amb aquella mostra estimulant-la amb la PPD, caldrà invalidar el resultat, considerant que hi ha anèrgia.

Els resultats finals de l'assaig es calcularan restant el valor d'IFN- γ obtingut en el plasma dels pous no-estimulats del valor obtingut al plasma de les mostres estimulades amb PPD.

10.5. Fulls de treball per cada dia de seguiment de l'assaig de Fase 1

Visit	Day	Week	Date	FA/MI/01. 200µg	U†E
9	d35	6	14.1.08		

VOLUNTEERS LABELS

FA/MI/01
0019
d35 LJ
RUTI

FA/MI/01
0020
d35 SO6
RUTI

FA/MI/01
0021
d35 JAV
RUTI

FA/MI/01
0022
d35 SGR
RUTI

FA/MI/01
0023
d35 ENC
RUTI

FA/MI/01
0024
d35 VTR
RUTI

Visit	Day	Week	Date
9	D35	6	14-1-08

FA/MI/01. 200µg




CPT TUBES

PROCEEDING	START-FINAL TIME	PERSON/SIGNATURE
CELL OBTENTION	10:40 / 12:20	
CELL COUNTING	12:45 / 12:55	
FREEZING, CELLS STORED AT	NITROGEN → MI	

VOLUNTEER	CELLS COUNTED	TOTAL OF CELLS	500.000 PBMCs SUSPENSION VOLUME	250.000 PBMCs SUSPENSION VOLUME	FROZEN PBMCs
0019	102x4, 98x4	1,16 · 10 ⁷	62,5	31,25	1,1 · 10 ⁷
0020	78x4, 78x4	1,25 · 10 ⁷	80,1	40,5	7,5 · 10 ⁶
0021	84x4, 92x4	1,41 · 10 ⁷	71	35,5	9,1 · 10 ⁶
0022	86x4, 84x4	1,14 · 10 ⁷	71,4	35,7	9 · 10 ⁶
0023	71x4, 66x4	1,1 · 10 ⁷	91,2	45,6	6 · 10 ⁶
0024	86x4, 97x4	1,46 · 10 ⁷	68,3	34,1	9,6 · 10 ⁶

INCIDENCES	
------------	--

FACS


PROCEEDING	START-FINAL TIME (H/MIN-H/MIN)	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
CELLS STAINING	14:20 / 15:00	GP	
FACS ADQUISITION	15:08 / 15:15		

PAXGENE TUBES

PROCEEDING	START-FINAL TIME (H/MIN-H/MIN)	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
FREEZING SAMPLES	10:45	GP	
STORED AT	VF 1 - 20' Bot 2		

WHOLE BLOOD ASSAYS (FROM SODIUM HEPARINE TUBES).

GRANULOMA FORMATION

PROCEEDING	START-FINAL TIME (H/MIN-H/MIN)	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
SENDING SAMPLES TO TOULOUSE	13:00		
FEDEX TRACKING NUMBER	853595274577		

Visit	Day	Week	Date	FA/MI/01. 200µg	U†E
9	d35	6	14.9.08		

T-SPOT TB

PROCEEDING	START/FINAL TIME	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
DO. INCUBATION WITH STIMULI	13:08	SL	
D+1. ELISPOT ASSAY	10:11	SL	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	19 NS	19 A	19 B	19 +	20 NS	20 A	20 B	20 +	21 NS	21 A	21 B	21 +
H	22 NS	22 A	22 B	22 +	23 NS	23 A	23 B	23 +	24 NS	24 A	24 B	24 +

same plate as ELISPOT

d35



Plate name: d35.plt

Date: Monday, January 21, 2008

User: default

Column: 12 Row: 8

Spot counts:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	4	3	3	18	6	2	65	16	85	124
B	1	2	3	11	4	11	11	1	9	3	64	8
C	1	0	2	1	4	3	2	0	11	0	5	82
D	5	17	14	16	29	26	16	17	44	51	112	62
E	0	3	1	2	27	65	19	5	104	47	106	84
F	0	13	5	11	30	49	20	16	57	20	167	54
G	1	10	10	128	0	6	7	17	1	2	4	62
H	5	14	18	45	1	19	12	72	9	24	31	7

Overall surface of spots unit = square mm:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.217	0.247	0.223	0.250	0.231	0.587	0.414	0.300	1.126	0.835	1.709	2.468
B	0.771	1.215	1.107	1.290	1.438	1.252	1.749	1.217	1.404	1.513	1.722	2.290
C	1.527	0.000	1.440	1.722	1.932	1.815	1.980	0.000	1.648	0.000	1.913	2.306
D	0.647	0.963	0.881	0.803	1.102	0.910	0.836	0.954	1.301	1.343	2.114	2.465
E	0.000	0.744	0.603	1.034	1.409	1.643	1.294	0.891	2.102	1.739	2.338	2.442
F	0.000	0.650	0.579	0.697	0.920	1.068	0.755	0.773	1.373	0.952	2.522	2.538
G	0.170	0.568	0.650	2.537	0.000	0.735	0.738	2.239	1.355	0.902	0.833	2.249
H	0.427	0.593	0.842	2.317	0.480	1.106	1.092	2.362	0.806	1.020	1.070	2.369

Average surface of spots unit = square 0,01 mm:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2174	1236	557	833	770	300	534	793	175	521	201	199
B	7708	6076	3691	1172	2895	1137	1590	6120	1032	3800	323	2862
C	15274	0	7199	8702	4830	4562	3382	0	1834	0	2762	1445
D	839	600	629	502	373	349	522	561	305	257	199	397
E	0	2481	6030	5171	490	249	680	1781	202	370	220	999
F	0	577	1158	633	316	217	377	483	240	476	156	469
G	1704	623	649	198	0	950	1054	1317	3475	0	0	1222
H	505	423	467	514	4804	1059	1505	1537	692	399	345	3384

Average intensity of spots

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8	9	11	7	10	17	12	10	28	13	29	27
B	5	6	6	7	6	7	9	6	8	7	17	14
C	6	6	6	7	8	7	8	8	8	8	8	14
D	13	14	16	17	18	21	16	16	24	23	28	22
E	6	6	6	7	14	20	10	7	25	17	26	15
F	11	13	12	13	18	25	17	14	25	16	34	20
G	9	13	13	27	6	9	8	14	7	6	6	15
H	14	14	17	19	5	11	11	16	14	17	17	14

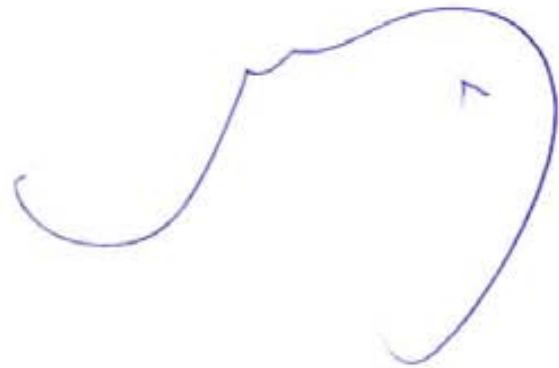
well's saturation values (%)


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	26	27	30	30	31	32	33	31	36	34	39	55
B	32	30	30	34	37	35	37	36	37	41	46	81
C	41	37	37	43	47	47	46	47	49	50	51	67
D	25	25	22	21	23	23	23	25	26	29	45	67
E	36	35	33	38	41	44	42	41	53	49	57	69
F	27	27	25	25	27	29	25	27	29	32	57	69
G	27	31	34	57	36	43	38	80	50	55	56	68

H 30 32 32 70 44 48 ^{d35} 50 69 36 36 34 80



	Levels of interpretation (in/out of) range											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
B	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	out
C	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
D	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
E	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
F	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
G	in	in	in	in	in	in	in	out	in	in	in	in
H	in	in	in	out	in	in	in	in	in	in	in	out

All Well Comments

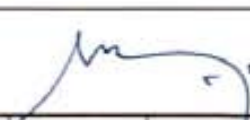



Visit	Day	Week	Date	FA/MI/01. 200µg	
9	835	6	14.1.88		

QTF IN-TUBE GOLD TUBES


PROCEEDING	START/FINAL TIME	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
DO. INCUBATION AT 37°C	10:50		
D+1. PLASMA OBTENTION	13:00		
D+1. FREEZING. SAMPLES STORED AT	UTE 4 -70° D+1.2 14.15		

SERUM (FROM PLAIN TUBES)

PROCEEDING	START/FINAL TIME		PERSON/SIGNATURE				SERUM BANK	SAMPLES STORED AT
	DIELI	UAB	MAHAVIR (LIONEX)	ELISA & WB				
SERUM OBTENTION and ALIQUOTATION	11:18 / 11:50							
N° ALIQUOTS / VOLUNTEER								
0019	1	1	1	2	2	UTE 4 -70° AS		
0020	1	1	1	2	2	UTE 4 -70° AS		
0021	1	1	1	2	2	UTE 4 -70° AS		
0022	1	1	1	2	2	UTE 4 -70° AS		
0023	1	1	1	2	2	UTE 4 -70° AS		
0024	1	1	1	2	2	UTE 4 -70° AS		
INCIDENCES								

Visit	Day	Week	Date	FA/MI/01. 200µg	
9	d35	6	14.1.08		

**WHOLE BLOOD ASSAYS (FROM SODIUM HEPARINE TUBES).
QUANTIFERON CMI.**

PROCEEDING	START/FINAL TIME	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
D0. INCUBATION WITH STIMULI	11:45	GP	
D+1. PLASMA OBTENTION	13:00		no plasma obtained from sample V21 hsp65 and V22 MP64. No plasma obtained from V23 16 d35.
D+1. FREEZING. SAMPLES STORED AT	UTE 4-70° Box 5 12.10		

γδ T CELLS ASSAY

PROCEEDING	START/FINAL TIME	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
D0. INCUBATION WITH BRHPP	17:30	GP	
D+8. SUPERNATANTS OBTENTION	10:50	GP	
D+8 FREEZING. SAMPLES STORED AT	UTE 4-70° Box 1 12.11		

MEMORY CELLS ASSAY

PROCEEDING	START/FINAL TIME	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
D0. INCUBATION WITH STIMULI	11:55	GP	
D+1. PLASMA OBTENTION	10:20	GP	
D+8. FREEZING. SAMPLES STORED AT	UTE 4-70° Box 2 12.18		

Visit	Day	Week	Date	FA/MI/01. 200µg	U†E
9	135	6	14-01-08		

WHOLE BLOOD ASSAYS (FROM SODIUM HEPARINE TUBES).

WHOLE BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY

PROCEEDING	START TIME	PERSON/SIGNATURE	INCIDENCES
DO. INCUBATION WITH H37Rv	10:45	SP	
6H (D0) PLATING SAMPLES DILUTIONS	17:10	SP	7H11 - lot 7296827 cod 2008-02-28
72H (D+3) PLATING SAMPLES DILUTIONS	11:20	SP	7H11 lot 7156927 cod 2007-02-28
96H (D+4) PLATING SAMPLES DILUTIONS	11:30	SP	7H11 lot 7296827 cod 28-02-08

UFC/mL COUNTING	DATE			PERSON/SIGNATURE			INCIDENCES		
	14-2-08			SP					
VOLUNTEER	6 H (D0)			72 H (D+3)			96 H (D+4)		
	Dil 0	Dil -1	Dil -2	Dil 0	Dil -1	Dil -2	Dil 0	Dil -1	Dil -2
0019	60,000	77,12	6.0	100,550	51,56	13,1	100,550	100,550	100,550
0020	137,127	18,0	1,0	566,350	87,08	78,13	117,73	18,12	7,0
0021	228,171	39,15	7,2	943,135	71,18	58,15	58,15	5,0	7,0
0022	778,520	70,45	10,2	577,515	166,63	10,5	71,15	5,1	0,0
0023	223,102	47,51	7,0	156,156	53,11	58,07	58,07	6,0	7,0
0024	258,715	51,0	17,11	159,105	50,26	570,07	258,715	258,715	27,5

10.6. Resum dels protocols de treball



ANNEX PROCEDIMENTS ESPECÍFICS FA/MI/01

Annexe PE
REV.03

GENERADA PER: Dr. C. Vilaplana, responsable d'Immunogenicitat

APROVADA PER: Dr. Pere-Joan Cardona, cap de la Unitat

Badalona, 13 de juliol de 2007

PREPARAR A CADA DIA D'EXTRACCIÓ:

DEL CONGELADOR

Penicilina (1·10e4 IU/mL)	241,4 µL
Streptomicina (2·10e4 µL/mL)	120,7 µL
BRHPP (50µM)	60 µL (1 vial)
H37Rv (2·10e4 bacils en RPMI)	5400 µL (3 vials)
FACS	40 mL
ESAT-6	140 µL
CFP-10	140 µL
16 kDa	70 µL
38 kDa	70 µL
Ag 85 B	37µL
HSP65	70 µL
MPT64	70 µL
19KDa	92,6 µL
PHA	65 µL
IL-2 (100ng/mL)	30 µL

RPMI SUPLEMENTAT

en un tub de 45mL, mesclar:

23295,1 µL de RPMI-L-glutamina

482,8 d'HEPES 1000mM

120,7 µL d'streptomicina 2·10e4 µL/mL

241,4 µL de penicilina 1·10e4 IU/mL

DE LA NEVERA

PPD	130 µL
BCG	350 µL (1 vial reconstituït amb 500 µL de medi AIM-V)
FACS 1%	40 mL
Medi AIM-V	
RPMI-L-glutamina	
Medi de congelació de cèl·lules (SFB amb DMSO)	

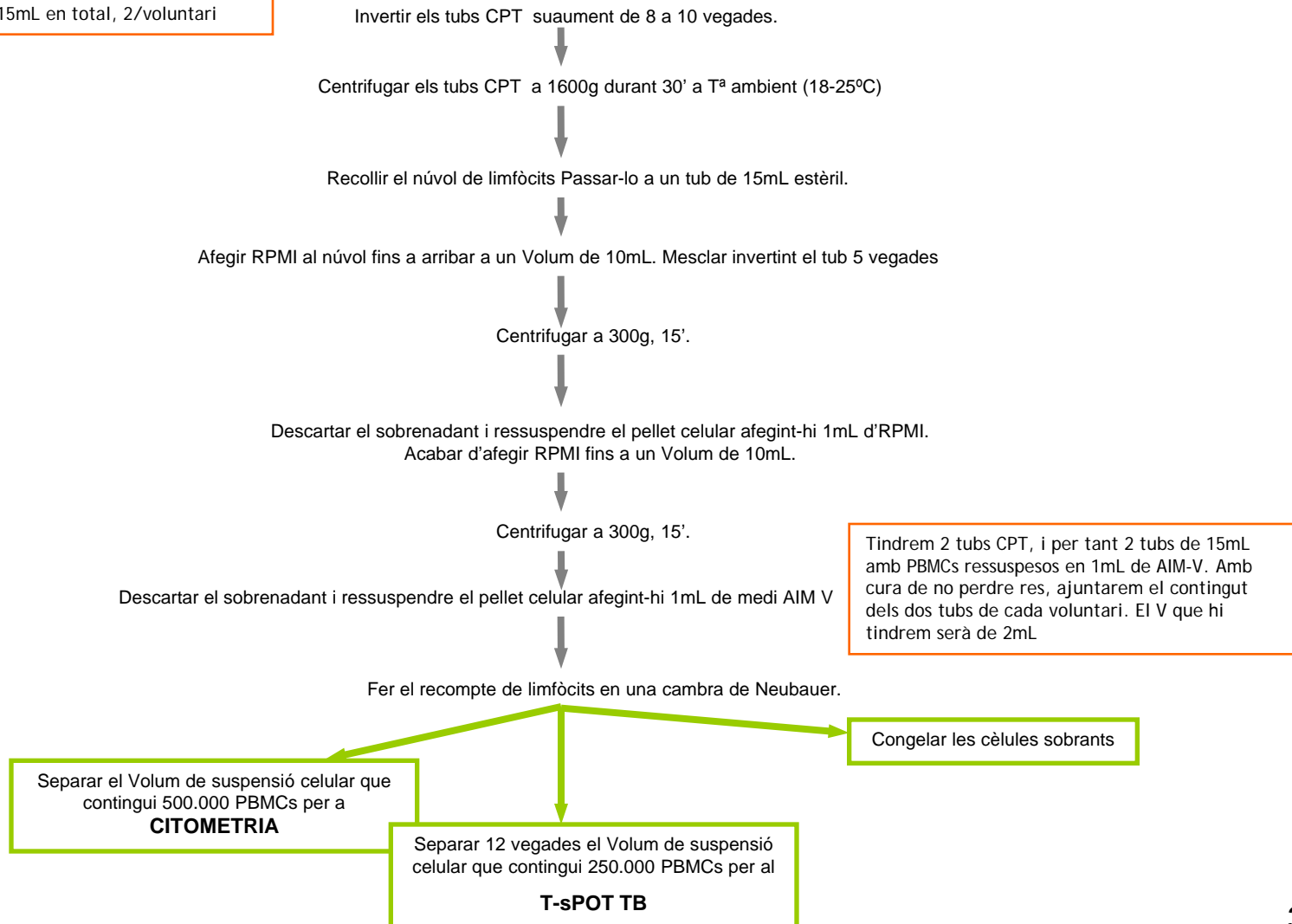
DE T^a AMBIENT

Hepes (1M)	623,2 µL
plaques de 24 pous	8
tubs de 15mL, etiquetats	12
tubs de citometria , etiquetats	12
placa de 96 pous de fons en U	1
criotubs per congelar cèl·lules (NUNC 363401), rotulats	6
criotubs (per congelar el sèrum i els sobrenadants de QTF CMI, QTF-In Tube Gold, l'assaig de les γδ i el de memòria), etiquetats	162
Aigua destil·lada	

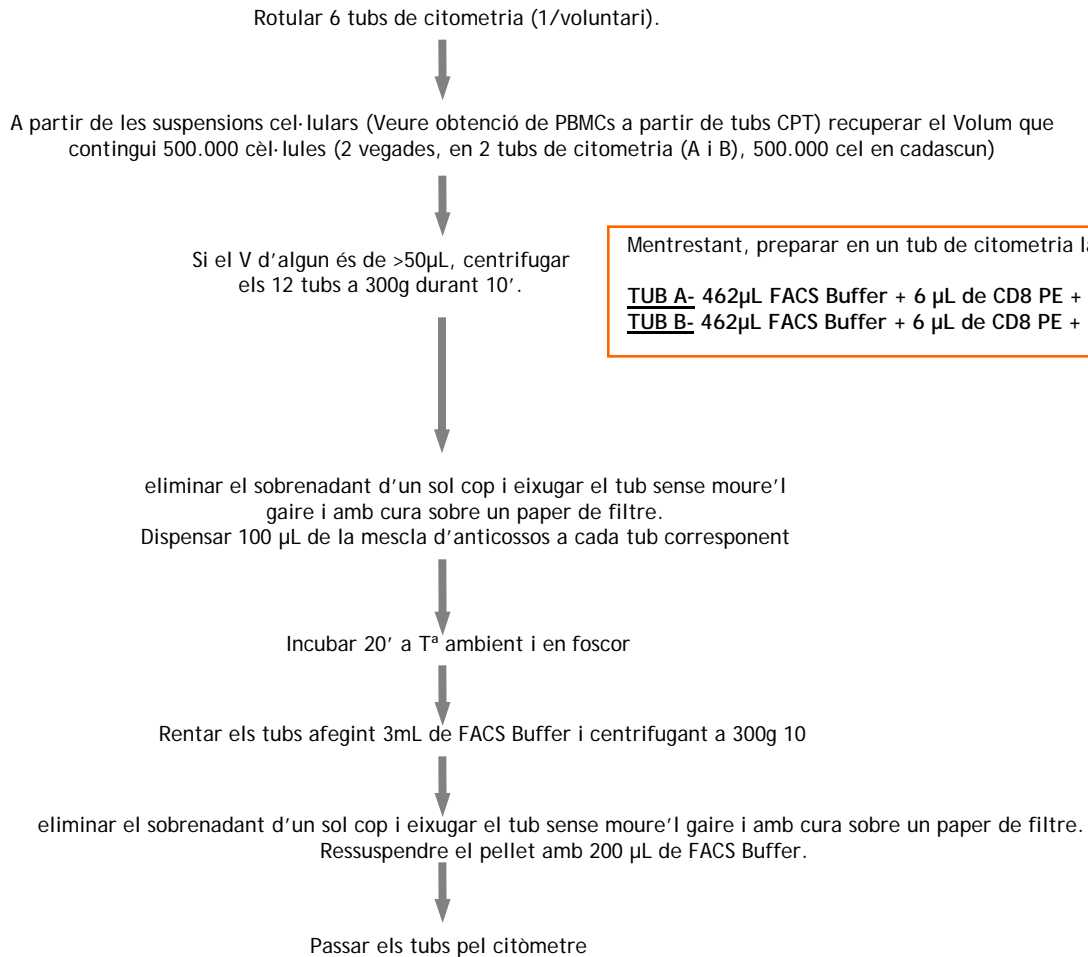
OBTENCIÓ DE PBMCs A PARTIR DE TUBS CPT

Tindrem 2 tubs CPT/voluntari

Necessitem 12 tubs de 15mL en total, 2/voluntari



CITOMETRIA DE MEMBRANA



Mentrestant, preparar en un tub de citometria la mescla d'anticossos:

TUB A- 462µL FACS Buffer + 6 µL de CD8 PE + 6 µL de CD4 FITC + 6 µL de CD3PerCP

TUB B- 462µL FACS Buffer + 6 µL de CD8 PE + 6 µL de CD4 FITC + 6 µL de CD3PerCP + 120 µL de CD25 APC

ELISPOT DIA 0

INCUBACIÓ DELS PBMCs AMB
ELS DIFERENTS ÉSTÍMULS

A partir de les suspensions cel·lulars (Veure obtenció de PBMCs a partir de tubs CPT)

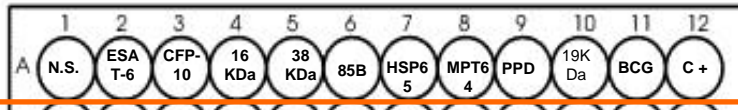
Separar per cada voluntari 12 vegades el Volum que contingui 250.000 cèl·lules en 12
pouets consecutius d'una placa de 96 pouets de fons en U estèril en el mateix ordre que
aniran a la placa del T-SPOT TB, excepte al pou n°10, que cal posar 25.000 PBMCs

Centrifugar la placa a 300g, 10'

PLANTILLA

**250.000 PBMCs/pou 12 pouets/mostra, cada pou estimulat amb ur
antigen o control**

1 MOSTRA/FILA

Descartar el sobrenadant d'un sol cop, enèrgicament. Ressuspendre els pellets amb
150µL de medi AIM-V amb l'antigen o control corresponent.

Transferir els volums a la placa del T-SPOT TB en el mateix ordre.

PREPARACIÓ DEL MEDI AMB ANTÍGENS/CONTROLS PER A 6 VOLUNTARIS

Medi sol: 990 µL	38 kDa: 9,9 µL+ 980 µL de medi AIM-V	PPD: 9,9 µL+ 980 µL de medi AIM-V.
ESAT-6: 19,8 µL+ 971 µL de medi AIM-V	Ag 85 B: 5,2µL+ 984,8µL de medi AIM-V	19KDa: 13,2µL+ 976,8µL de medi AIM-V.
CFP-10: 19,8 µL+ 971 µL de medi AIM-V	HSP65: 9,9 µL+ 980 µL de medi AIM-V	BCG: (reconstituïnt el vial amb 500 µL de medi AIM-V) 49,5µL + 940,5µL de medi AIM-V
16 kDa: 9,9 µL+ 980 µL de medi AIM-V	MPT64: 9,9 µL+ 980 µL de medi AIM-V	PHA: 4,9 µL+ 985 µL de medi AIM-V

Incubar la placa (tapada!) de 16-24 h
(overnight) a 37°

T-SPOT TB DIA 0

A partir de les suspensions cel·lulars (Veure obtenció de PBMCs a partir de tubs CPT)



Separar el Volum que contingui $1 \cdot 10^6$ PBMCs. Centrifugar-lo a 300g, 10'
Descartar el sobrenadant i ressuspendre el pellet amb 400 μ L de medi AIM-V.



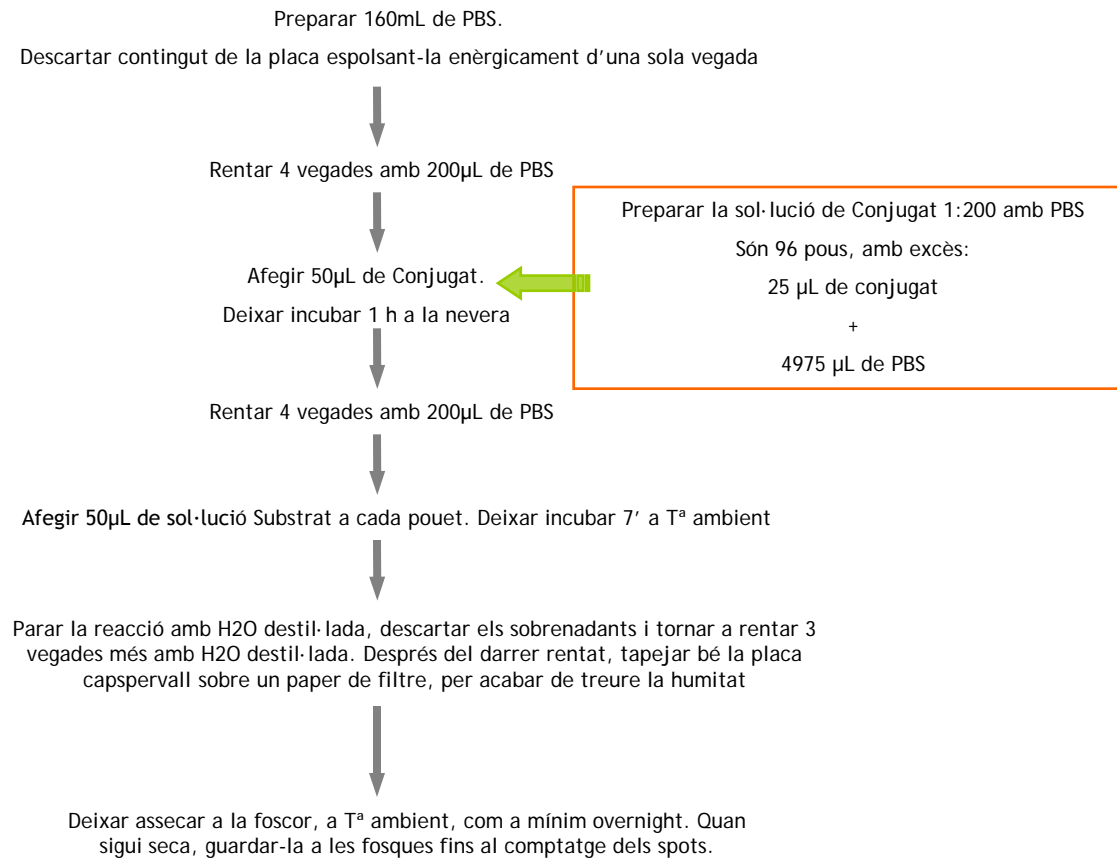
Dispensar en 4 pous consecutius, 100 μ L de la suspensió cel·lular.
Afegir després, a cada pou, 50 μ L del que correspongui:
medi AIM-V, panel A, panel B i control positiu



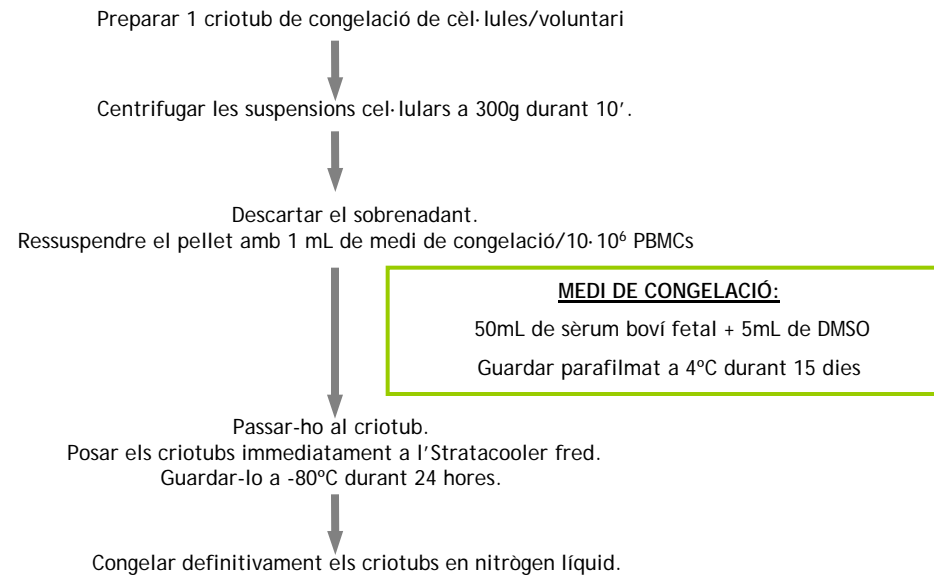
Incubar la placa (tapada!) de 16-24 h
(overnight) a 37°

ELISPOT DIA +1

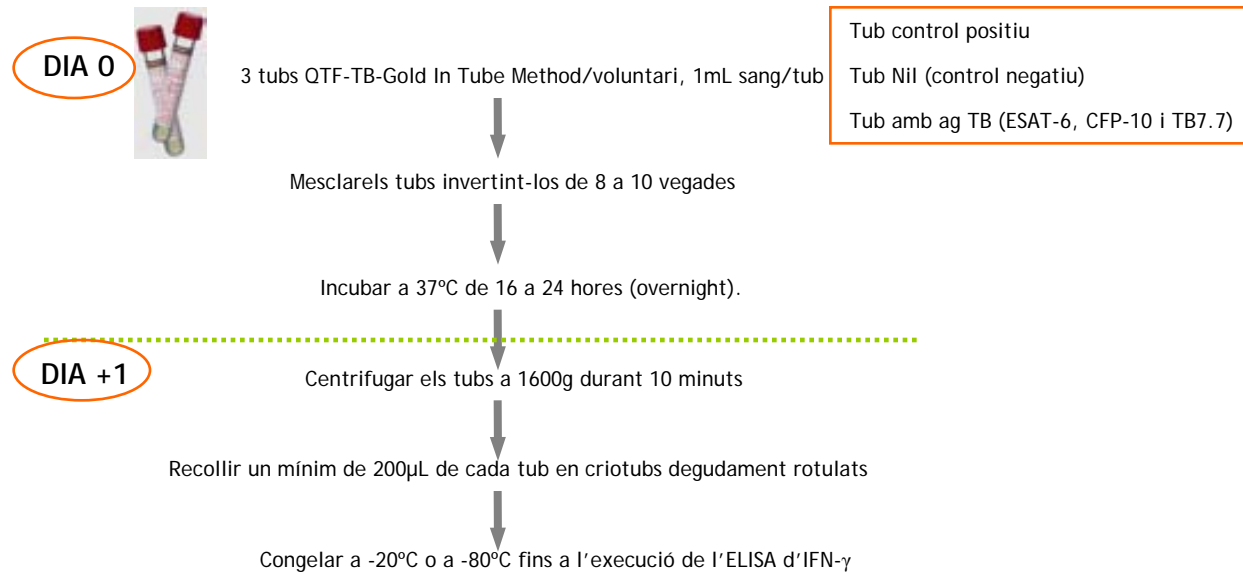
BÚSQUEDA DE LIMFS T IFN- γ + MITJANÇANT
LA TÈCNICA DE L'ELISPOT

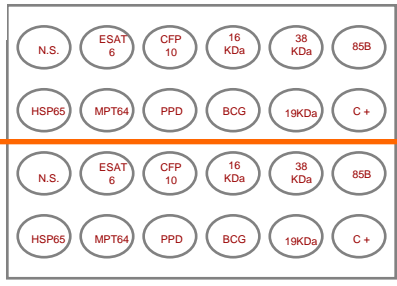
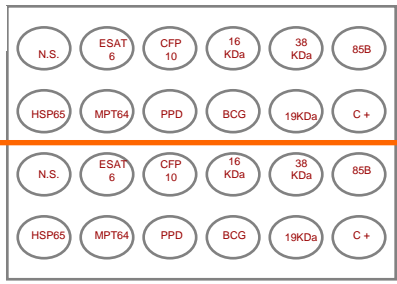
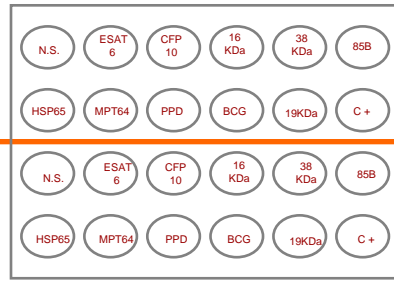


CONGELACIÓ DE PBMCs SOBRERS



QUANTIFERON-TB-GOLD



PLACA 1**Voluntari 1****Voluntari 2****PLACA 3****Voluntari 5****Voluntari 6****PLACA 2****Voluntari 3****Voluntari 4**

ESAT-6: 20 µL	Ag 85 B: 5,2 µL	BCG: 50 µL
CFP-10: 20 µL	HSP65: 10 µL	PHA: 5 µL
16 kDa: 10 µL	MPT64: 10 µL	19KDa: 13,3 µL
38 kDa: 10 µL	PPD: 10 µL	

QUANTIFERON-CMI

Dispensar la sang heparinitzada de cada voluntari (1mL/pou) en plaques de 24 pous segons la plantilla

Dispensar els antígens i controls segons la plantilla

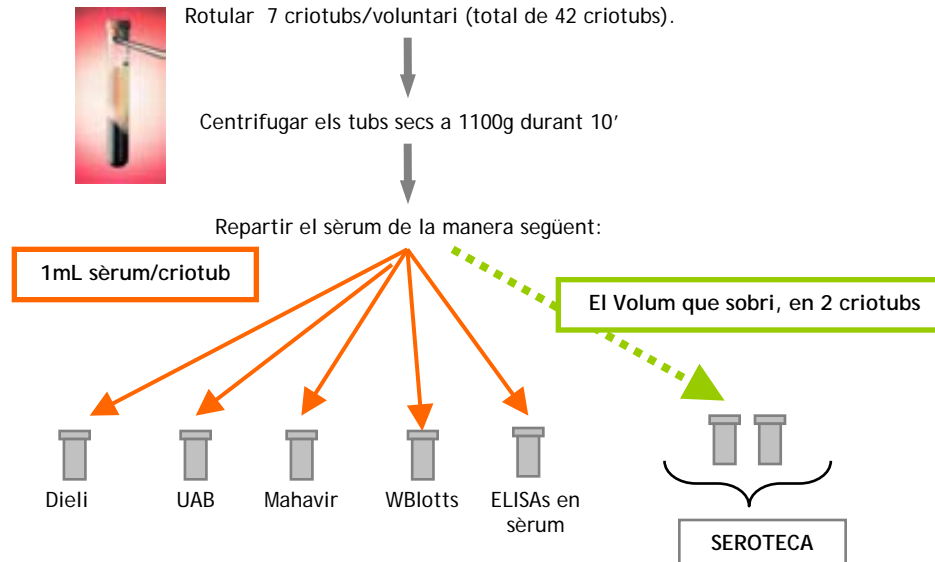
Incubar a 37°C de 16 a 24 hores (overnight).

Centrifugar les plaques a 1600g durant 10 minuts

Recollir un mínim de 200µL de cada tub en criotubs degudament rotulats

Congelar a -20°C o a -80°C fins a l'execució de l'ELISA d'IFN-γ

ALIQUOTES DE SÈRUM



Congelar a -20°C o a -80°C en capses degudament rotulades. Guardar les mostres per en Dieli, UAB i Mahavir en capses diferents segons nivell de dosi a testar. Les mostres pels WB, Elisàs i per la seroteca, guardar-les seguides encara que siguin de nivells de dosis diferents.

WB BACTERICIDA

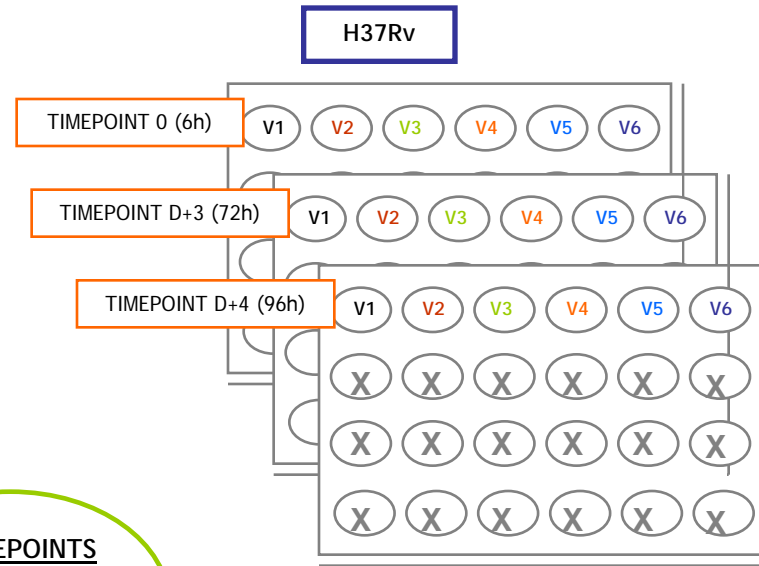
Distribuir la sang dels voluntaris als pous corresponents de la primera fila de les 6 plaques de tal manera que:

A cada pou:

300µl de sang total heparinitzada
+
300 µl de l'H37Rv en RPMI de l'stock Ready to use ($2 \cdot 10^4$)
+
7,8 µL d'HEPES 1M



Incubar a 37° fins al timepoint



3 TIMEPOINTS

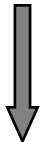
- a les 6h (sebra al 0)
- 72h (sebra al dia +3)
- 96h (sebra al dia +4)

A CADA TIMEPOINT



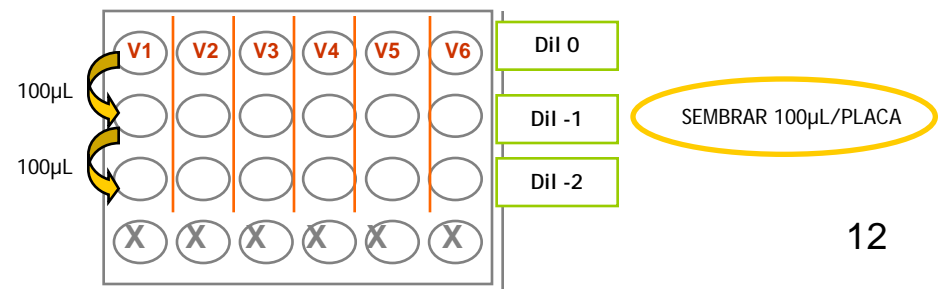
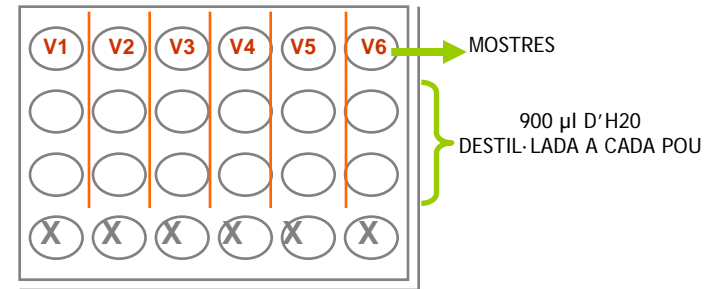
1-Afegir 400 µl H₂O destil als pous amb sang. Deixar-ho 10' per trencar les cels de sang

2-En aquests 10', posar 900 µl H₂O destil a tots els pous de la segona i tercera fila de les 2 plaques del timepoint (Serviran per a fer les dil·lucions). Rotular les 72 plaques que es necessitaran.



Semrar plaques 7H11

DE CADA MOSTRA CAL SEMBRAR 6 PLAQUES:
2 PER DIL·LUCIÓ, 3 DIL·LUCIONS (0, -1, -2)

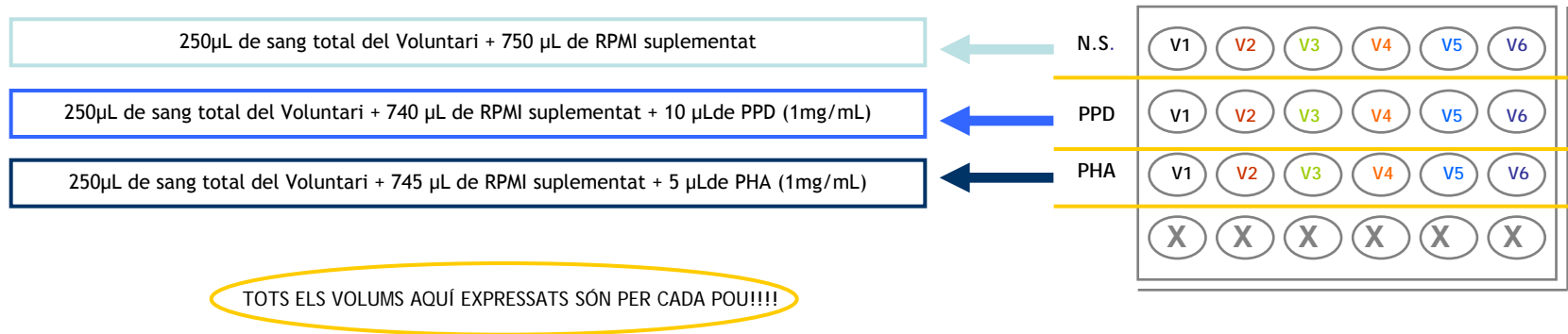


Els resultats els calculen:

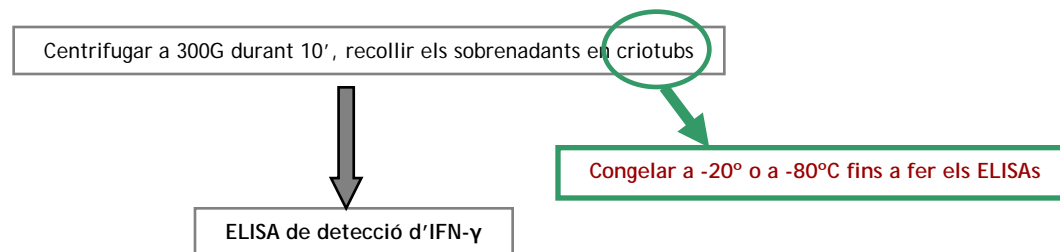
$$\Delta \log_{10} \text{CFU} = \log_{10}(\text{final}) - \log_{10}(\text{initial})$$

PROVA DE MEMÒRIA

Dia 1 Disposar les mostres a la placa segons l'esquema, tapar la placa i deixar-la incubant 7 dies a 37° i un 5% de CO2

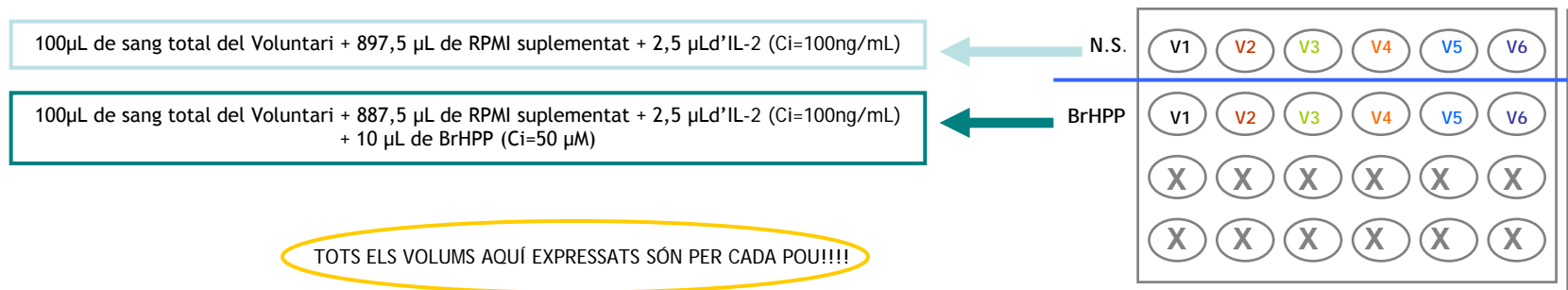


Dia +8

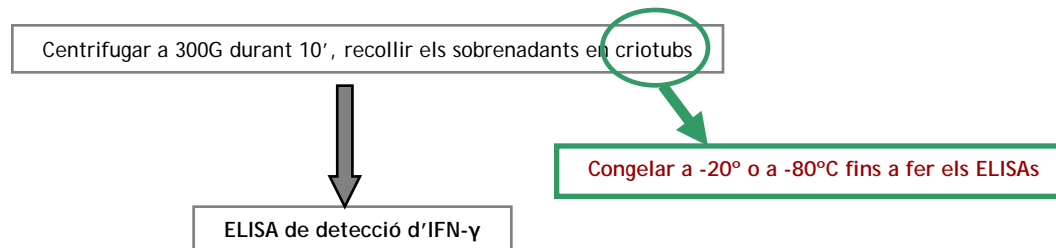


$\gamma\delta$ T CELLS ASSAY

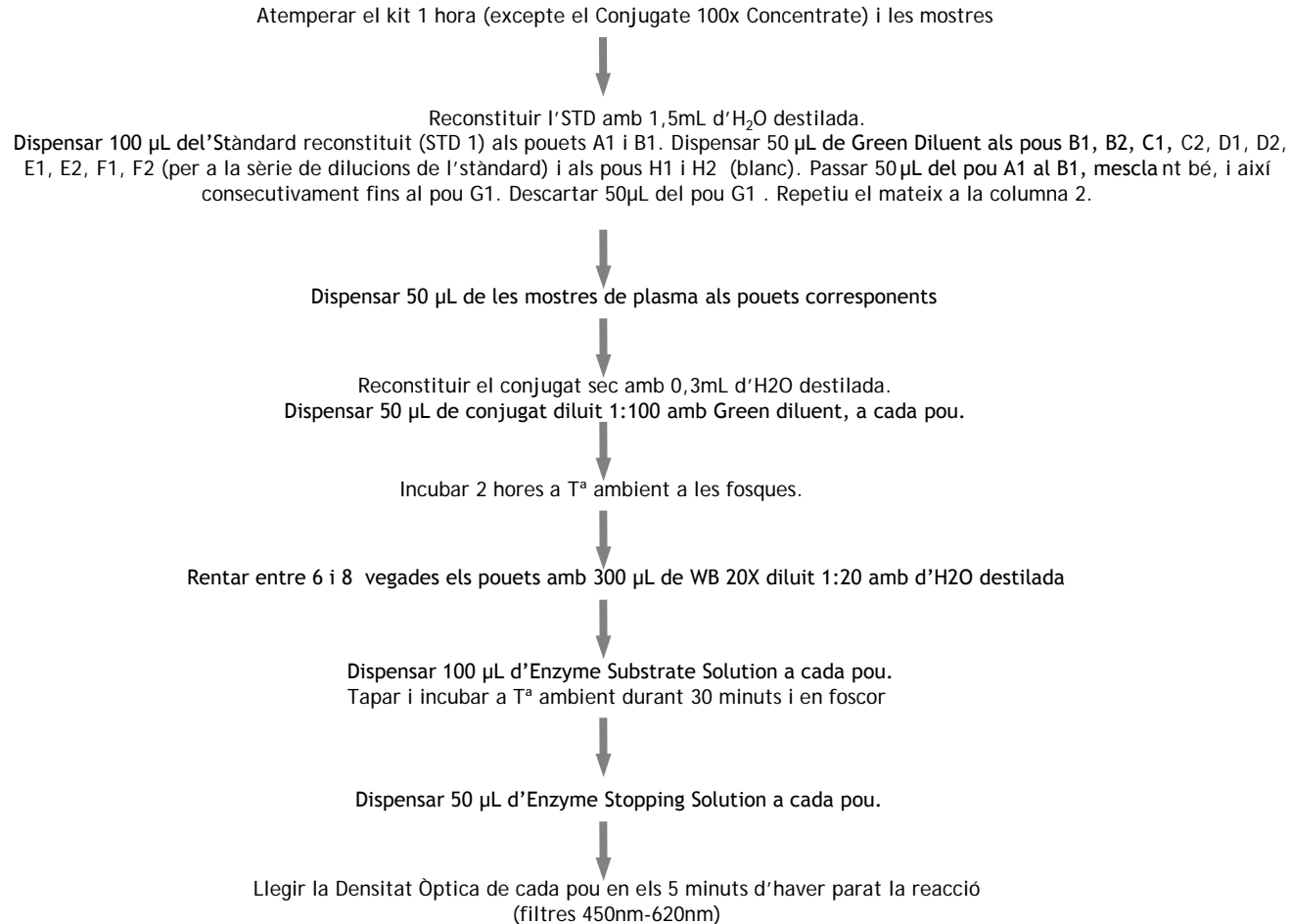
Dia 1 Disposar les mostres a la placa segons l'esquema, tapar la placa i deixar-la incubant 7 dies a 37° i un 5% de CO2



Dia +8



ELISA IFN- γ (kit de QUANTIFERON-CMI)



ELISA IFN- γ QUANTIFERON-TB-GOLD