

ASSAIG CLÍNIC ALEATORITZAT DE FASE I
EN VOLUNTARIS SANS PER AVALUAR LA
SEGURETAT DE LA VACUNA TERAPÈUTICA
ANTITUBERCULOSA RUTI

Treball de Recerca del Programa de Doctorat de Farmacologia

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de
la Universitat Autònoma de Barcelona
Juny de 2010

Autor: Ana M^a Barriocanal Barriocanal

Responsables de la direcció del treball:

Doctor Joan Costa i Pagès
Doctora Eva Montané i Esteva

Centre en el què s'ha dut a terme:

Unitat Docent Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona

ÍNDEX

	<u>Pàgina</u>
Resum	3
Introducció	4
Hipòtesi i Objectiu	8
Metodologia	9
Resultats	18
Discussió	30
Conclusions	34
Bibliografia	36

RESUM

Objectiu

Avaluar la seguretat de quatre dosis diferents (5, 25, 100 i 200 µg de FCMtb) d'una formulació de la nova vacuna anti-tuberculosa RUTI en voluntaris sans comparant-la amb placebo.

Mètodes

Assaig clínic de fase I, de primera administració en humans, unicèntric, doble cec, emmascarat, aleatoritzat (2:1), controlat amb placebo, seqüencial, de 4 grups de tractament i escalada de dosi, administrant dues dosis de vacuna RUTI separades per 28 dies.

Un Comitè de Seguretat va decidir el pas a cada nivell superior de dosi.

Resultats

Es van incloure 24 voluntaris sans d'entre 19 i 34 anys, que van presentar un total de 175 esdeveniments adversos (99% lleus), amb una mitjana de 7, essent la cefalea el més freqüent. Els grup de dosi amb més incidència d'esdeveniments adversos va ser el de 100 µg de FCMtb, i el de menys el de 25 µg. El dolor al lloc d'inoculació (75% dels voluntaris) i les fasciculacions (50%) van ser els esdeveniments locals més freqüents. Dos voluntaris, tractats amb les dosis superiors, van presentar panniculitis granulomatosa amb cultiu negatiu després de la segona inoculació.

Conclusió

Les dosis de 5 µg i 25 µg de FCMtb van presentar una millor relació benefici/risc, essent d'elecció per a futures avaluacions d'eficàcia i efectivitat.

INTRODUCCIÓ

La infecció per *Mycobacterium tuberculosis* afecta actualment a un terç de la humanitat, és a dir, a 2.000 milions de persones. Això suposa un reservori tan important de bacil que fa difícil controlar la malaltia. La morbi-mortalitat s'estima en 8.000.000 de casos nous de malaltia cada any i 2.000.000 de persones mortes a conseqüència de la malaltia.¹ En països amb una elevada incidència de tuberculosi (TB) l'estratègia de control de la malaltia és la detecció dels malalts, especialment els que poden infectar a altres persones, és a dir, els pacients bacil·lífers, i garantir el seu tractament mitjançant estratègies com el tractament directament supervisat a curt termini o DOTS (*Directly Observed Treatment Short-course*).¹

Des dels anys 60 s'ha impulsat el tractament de les persones infectades, que pateixen una tuberculosi latent, en països amb recursos suficients per intentar reduir el reservori de bacils i disminuir el risc de reactivacions i casos de la malaltia.² Aquesta estratègia té l'inconvenient de que requereix un període llarg, de 9 mesos, d'administració d'isoniazida, cosa que dificulta molt l'adherència al tractament, en unes persones que tot i tenir una infecció, no tenen simptomatologia. El Comitè per a l'Eradicació de la Tuberculosi als Estats Units ja recomanava l'any 1998 la necessitat de poder obtenir una vacuna terapèutica contra la infecció per *Mycobacterium tuberculosis*.³

S'ha postulat l'aparició d'una forma bacil·lar després de la infecció per *M. tuberculosis*, amb una activitat metabòlica molt disminuïda i que es manté quiescent a les lesions antigues, amb capacitat de reactivació endògena a TB activa.^{2,4} S'ha anomenat "bacil latent" i es considera que és capaç de sobreviure als macròfags activats. Només es pot detectar la seva presència a través de mètodes immunològics indirectes, com el test cutani de la tuberculina (TST) i el TIGRA (*T-cell interferon-gamma release assays*). En individus amb conversió del TST que es tracten amb isoniazida durant 9 mesos, s'observa un descens de la incidència de TB del 90%.

Malgrat aquesta evidència, sorgeixen dubtes, ja que la isoniazida és activa només contra els bacils en creixement, i per tant només seria capaç de destruir els bacils quiescents després de la seva reactivació.

No queda clar com poden romandre els bacils latents als pulmons durant tant de temps, quan existeix un continu recanvi cel·lular i la curació de teixits danyats. Tampoc queda clar el mecanisme a través del qual arriben els factors de ressuscitació a l'interior de lesions antigues per activar els bacils latents.

Per resoldre aquestes qüestions, recentment s'ha suggerit un escenari dinàmic, en què es produiria una reinfecció endògena constant amb els bacils latents, que donaria lloc a una infecció tuberculosa latent ("hipòtesi dinàmica") que explicaria l'eficàcia del tractament estàndard, i si això és veritat, poden sorgir noves estratègies de maneig de la TB.⁵ Aquesta hipòtesi confirmaria la teoria de que la resposta immune contra *M. tuberculosis* es centra en la identificació de pèptids sintetitzats per bacils que s'estan multiplicant.⁶ Així, per lluitar contra el bacil latent caldria immunitzar al pacient infectat amb antígens estructurals del bacil, presents tant en bacils en fase de multiplicació activa com en fase estacionària o de latència.

El tractament antibiòtic amb isoniazida permet una disminució de la inflamació dels teixits infectats, una estabilització de la població bacil·lar fins a un mínim inactiu i disminueix les possibilitats de generar una reacció de tipus Koch^a tòxica. Donat que el tractament antibiòtic genera una concentració bacil·lar tan baixa que no arriba al llindar estimulador per a generar noves cèl·lules efectores, és a dir, una situació d'immunosupressió específica, és interessant realitzar un tractament immunoterapèutic posterior, evitant la reactivació bacil·lar deguda als bacils latents als teixits.⁷

Per detectar l'eficàcia de la resposta immune en la investigació en TB, s'utilitza la detecció de la secreció d'interferó gamma (INF- γ), ja que es considera una eina potent.

S'ha utilitzat la secreció d'INF- γ per mesurar la resposta immune en assaigs clínics que han avaluat altres vacunes antituberculosos en població sana.

Així la seguretat i la immunogenicitat d'una soca recombinant de vacuna Ankara modificada que expressava l'antigen 85A del *M. tuberculosis*

^a Reacció de tipus Koch: mecanisme que genera la necrosi intragranulomatosa característica de la infecció en humans

(MVA85A) es va valorar en 3 assaigs clínics de fase I a petita escala realitzats en individus sans al Regne Unit, oberts, no aleatoritzats i amb un sol grup de tractament. Dos dels assaigs van incloure voluntaris no vacunats prèviament amb Bacil de Calmette-Guérin (BCG) i se'ls va vacunar bé amb dues dosis de MVA85A intradèrmica separades per 3 setmanes en un dels assaigs (n=14) o bé amb BCG seguida de MVA85A a les 4 setmanes en l'altre (n=10). Un tercer assaig va incloure un grup de 17 voluntaris que havien estat vacunats prèviament amb BCG a qui se'ls va administrar MVA85A com a vacunació de reforç (amb una mediana de temps entre les dues vacunes de 18 anys).⁸⁻¹⁰

Aquest disseny de fase I, obert i d'una sola branca de tractament, es va repetir en un àmbit endèmic de tuberculosi a Gàmbia en població *naïve* per BCG assignada a MVA85A (n=11) i en població vacunada amb BCG que rebé reforç amb MVA85A (n=10), i a Sud-àfrica en adults sans no infectats per *M. tuberculosis*, que es van vacunar amb MVA85A (n=24).^{11,12}

Una nova vacuna antituberculosa recombinant de BCG que sobreexpressa l'antigen de *M. tuberculosis* Ag 85b (rBCG30), s'ha avaluat en un assaig clínic de fase I aleatoritzat, doble cec, amb 35 adults voluntaris sans amb l'objectiu de valorar la seguretat i comparada amb la vacuna no recombinant Tice BCG.¹³

Estudis preclínics (en models murins i de conill porquí) de la vacuna RUTI demostren que és capaç de generar una forta resposta immune cel·lular mesurable com a secreció d'INF- γ .¹⁴⁻¹⁷

L'estratègia de tractament amb la vacuna RUTI es basa en models animals.

- En ratolins infectats després de 8 setmanes de quimioteràpia amb isoniazida i rifampicina, es van inocular 3 dosis de la vacuna de 185 μ g de FCMtb, separades per intervals de 2 setmanes. La vacuna RUTI, induïa una resposta poliantigènica molt potent.¹⁵ La inoculació de 2 dosis de 245 μ g separades per intervals de 3 setmanes, va fer incrementar 10 vegades la població de limfòcits T CD4 productors d'INF- γ i de T CD8.
- En el conill porquí, després de 4 setmanes de quimioteràpia, inoculant 3 dosis de RUTI de 245 μ g de FCMtb, s'indueix un efecte bactericida.¹⁸

- En cabres infectades de forma natural pel complex *M. tuberculosis* tractades amb 300 mg d'isoniazida intramuscular i posteriorment amb 271 µg de FCMtb, es va observar una menor afectació de ganglis pulmonars i un increment de la producció d'INF-γ a sang perifèrica.

L'estratègia de tractament que es pretén utilitzar en humans amb la vacuna RUTI requereix un temps curt de quimioteràpia de 28 dies, per "homogeneïtzar" els pacients amb infecció tuberculosa latent, i eliminar qualsevol bacil en creixement, reduint la resposta inflamatòria local i la reacció de Koch potencial, així com els macròfags activats i la seva activitat immunosupressora inherent.

L'administració posterior de la vacuna terapèutica RUTI funcionaria com un estímul immune que compensaria la immunosupressió induïda per la quimioteràpia, no només contra els antígens produïts pels bacils en creixement sinó també contra els antígens estructurals presents als bacils que no es multipliquen.^{9,11} Aquesta nova resposta immune permetria l'activació específica de macròfags joves contra els bacils que no es multipliquen, amb un efecte bactericida contra els mateixos (figura 1).

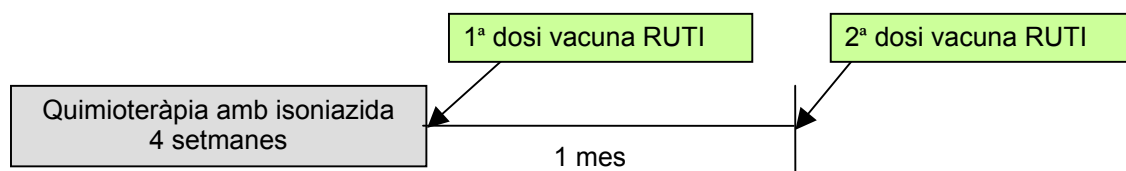


Figura 1: Estratègia de tractament amb la vacuna RUTI

És per això que la vacuna antituberculosa RUTI, que suposa la reducció del tractament amb isoniazida de 9 mesos a 1 mes, seria de gran transcendència per al control de la tuberculosi latent i de la malaltia en general.

La descripció de l'assaig clínic que s'ha dut a terme, s'ha realitzat seguint les recomanacions de la guia CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials Statement*) ja que és un estàndard de qualitat en la comunicació de la informació relacionada amb els assaigs clínics.¹⁹⁻²¹

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi de treball: la formulació de la nova vacuna anti-tuberculosa RUTI és segura en l'administració en humans i produirà una resposta immune mesurable, podent-se identificar un grup de dosi elegible per una futura investigació clínica en fase II.

Objectiu principal:

- Avaluar la seguretat de quatre dosis diferents (5, 25, 100 i 200 µg de FCMtb) d'una formulació de la nova vacuna anti-tuberculosa RUTI en voluntaris sans comparant-la amb placebo.

No és objectiu d'aquest treball de recerca descriure l'avaluació de la immunogenicitat de la vacuna contra antígens de *M. tuberculosis* en població sana, tot i que sí que era un objectiu principal de l'assaig clínic que es va dur a terme. Les dades referents a la resposta immunològica com a criteri d'eficàcia, estan disponibles en articles publicats a revistes mèdiques.²²

METODOLOGIA

1. Disseny general de l'estudi

Assaig clínic de fase I, de primera administració en humans, seqüencial, unicèntric, doble cec, emmascarat, aleatoritzat (2:1) i controlat amb placebo.

Es van establir quatre grups de tractament, de 6 voluntaris cadascú, amb un total de 24 voluntaris. Dins de cada grup de tractament 4 voluntaris es van assignar a rebre vacuna i 2 a rebre placebo.

Un Comitè de Seguretat va fer el seguiment i l'avaluació de cada grup de dosi i va decidir el pas a cada nivell superior de dosi.

El protocol de l'estudi, el full d'informació i el del consentiment informat per al voluntari, van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i per la *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad* amb el codi d'EudraCT 2006-000690-29 (PEI 06-075).

L'assaig es va dur a terme seguint els postulats ètics de la declaració de Helsinki, així com la normativa espanyola d'assaigs clínics recollida al Reial Decret 223/2004 i la Llei 29/2006.^{23,24} Es va seguir la guia de normes de bona pràctica clínica de la Conferència Internacional d'Harmonització.²⁵

El promotor de l'estudi va ser ARCHIVEL S.L, que va proporcionar el producte en investigació.

En la realització de l'assaig clínic van participar diferents serveis de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Farmacologia Clínica, Anàlisi Clíniques i Farmàcia), la Unitat de Tuberculosi Experimental de l'Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, així com empreses externes pel monitoratge (Clinical Research Organization Qódice 82) i per al tractament estadístic de les dades (Laboratorio de Bioestadística y Epidemiología (LBE), Universitat Autònoma de Barcelona).

2. Participants

Per al reclutament dels voluntaris es van utilitzar els fitxers de voluntaris sans de la Unitat de Fase I, i cartells informatius prèviament aprovats pel CEIC, situats a l'hospital, a la Unitat Docent de medicina i a altres facultats de Barcelona.

Als voluntaris candidats a participar en l'estudi se'ls va realitzar una entrevista de pre-selecció per confirmar per anamnesi que eren persones sanes i que complien uns requisits mínims per participar a l'estudi. La població d'estudi es va seleccionar en base als criteris d'inclusió i exclusió.

2.1. Criteris d'inclusió

Homes de raça blanca, d'entre 18 i 40 anys d'edat, ; amb Índex de Massa Corporal (IMC) entre 17 i 29,9 kg/m²; tensió arterial sistòlica entre 100 i 140 mmHg, tensió arterial diastòlica entre 50 i 90 mmHg i freqüència cardíaca entre 50 i 90 batecs per minut (en posició de decúbit supí després de descansar durant 3 minuts) i amb temperatura axil·lar de fins a 37°C, ECG sense troballes clínicament rellevants per l'estudi, amb capacitat per comunicar-se amb l'investigador i complir amb tots els requisits de l'assaig i que haguessin signat el consentiment informat

2.2 Criteris d'exclusió

Antecedents o evidència d'alguna malaltia sistèmica significativa per l'estudi. Desviació de la normalitat a l'exploració física o amb valors de laboratori alterats clínicament rellevant, o per impossibilitat d'obtenir mostres biològiques, antecedents d'al·lèrgia greu, crònica o estacional, asma, urticària, o rinitis al·lèrgica. Antecedents d'hipersensibilitat a qualsevol fàrmac, vacuna o excipients relacionats amb els continguts en la vacuna a estudi. Malaltia aguda amb increment de la temperatura (> 37° C) 72 hores abans de la inoculació de la vacuna a estudi. T-SPOT TB positiu, vacunació prèvia amb BCG o imatge pulmonar suggestiva d'infecció tuberculosa. Antecedents personals o familiars d'afecció d'autoimmunitat. Serologies positives pel virus de l'hepatitis B , C , o pel VIH.

Abús de substàncies o addicció (alcohol, drogues). Presa de fàrmacs en investigació en el mes anterior o de qualsevol medicació que no pogués ser eliminada de l'organisme (5 semivides d'eliminació) abans de la primera administració de la medicació de l'estudi. Pèrdua de més de 400 ml de sang en les 12 setmanes anteriors, o major de 250 ml en les 4 setmanes anteriors.

2.3. Restriccions

Els voluntaris havien d'acudir en dejuni a les visites que requerien l'administració de vacuna o extracció analítica. Es va prohibir la donació de sang des de la selecció fins a un mes després de la visita final. Es va recomanar evitar l'exercici intens durant les 72 hores prèvies a l'administració de la vacuna i fins a tres dies després, així com un període de descans de 8 hores les dues nits anteriors a les visites d'administració de tractament.

2.4. Retirada dels pacients

Els voluntaris inclosos a l'estudi podien retirar el consentiment de participació en l'estudi si així ho decidien. Els voluntaris retirats de l'estudi es podien reemplaçar per altres subjectes, que hagueren rebut la medicació assignada al voluntari retirat, excepte si l'estudi s'hagués aturat per motius de seguretat.

Els investigadors podien retirar als voluntaris de l'estudi per pèrdua de seguiment, incompliment dels requeriments, de les prohibicions i restriccions, si l'estudi s'aturava prematurament o per raons de seguretat per al voluntari.

3. Intervencions - Tractament

3.1. Fàrmac a estudi, compliment i conservació de la medicació

Es van avaluar quatre dosis diferents de vacuna d'una manera seqüencial i creixents: 5, 25, 100 i 200 µg de FCMtb. Cada voluntari va rebre el tractament assignat per aleatorització (vacuna o placebo), en dues dosis separades per 28 dies, per via subcutània al múscul deltoïdes (al braç contralateral la 2^a dosi) .

Es va comprovar la seguretat de la primera administració (a les 4 setmanes), prèviament a la 2^a inoculació.

- La forma farmacèutica de la vacuna RUTI que es va utilitzar va ser un vial injectable amb producte liofilitzat per ser administrat en suspensió per via subcutània. La fórmula qualitativa de l'ingredient actiu va incloure fragments lipídics cel·lulars detoxificats de *M. tuberculosis*, pasteuritzats, liofilitzats i formant liposomes, i excipients com lecitina de soja, glicina, colat sòdic i aigua bidestil·lada injectable, en un únic lot de fabricació.
- La forma farmacèutica del placebo de la vacuna RUTI va ser un vial injectable contenint els mateixos excipients de la vacuna RUTI, sense immunògen actiu FCMtb. L'aspecte del vial de placebo va ser igual que el de la vacuna, per garantir l'emascament.

Ambdós productes, la vacuna i el placebo van ser fabricats pel promotor, l'empresa Archivel Farma S.L, sota normes de bona pràctica de manufactura.

L'administració del tractament es va realitzar pel personal d'infermeria del Servei de Farmacologia Clínica sota la supervisió d'un investigador de l'estudi. La imatge 1 mostra el vial de la vacuna RUTI.

Imatge 1. Vial de vacuna RUTI.



La medicació estava empaquetada en caixes de metacrilat de dos vials injectables, un per a cadascuna de les inoculacions, que es van conservar en nevera entre 4 i 8° C.

3.2. Mètode de dilució

Tots els vials, inclòs els de placebo, contenien una quantitat prefixada de 260 µg, que calia diluir amb aigua bidestil·lada per aconseguir les dosis previstes.

Les 4 dosis diferents de cadascun dels grups de tractament van preparar pel personal d'infermeria del Servei de Farmacologia Clínica a través de dilucions tal com mostra la taula 1. Per a tots els grups, el volum de fàrmac administrat va ser de 0,5 ml de suspensió de la dilució efectuada.

Taula 1. Dilucions dels vials de la medicació de l'assaig

Dosi 5 µg	Volum d'aigua bidestil·lada a introduir al vial RUTI	2,60 mL
	Volum de solució a recuperar del vial RUTI diluït	0,5 ml
	Dilució posterior en vial de dilució apart	Sí = 1:10
	Preparació del vial de dilució i administració	4,5 mL d'aigua bidestil·lada + 0,5 mL del vial RUTI diluït
Dosi 25 µg	Volum d'aigua bidestil·lada a introduir al vial RUTI	2,60 mL
	Volum de solució a recuperar del vial RUTI diluït	0,5 ml
	Dilució posterior en vial de dilució apart	Sí = 1:2
	Preparació del vial de dilució i administració	0,5 mL d'aigua bidestil·lada + 0,5 mL del vial RUTI diluït
Dosi 100 µg	Volum d'aigua bidestil·lada a introduir al vial RUTI	1,30 mL
	Volum de solució a recuperar i administrar	0,5 mL
Dosi 200 µg	Volum d'aigua bidestil·lada a introduir al vial RUTI	0,65 mL
	Volum de solució a recuperar i administrar	0,5 mL

3.3. Tractament previ i concomitant

No es va permetre altres tractaments concomitants durant l'estudi que els requerits per al tractament dels esdeveniments adversos i aquells que fossin comunicats i acceptats pels investigadors.

4. Mètode d'aleatorització i d'assignació cega al tractament

El mètode utilitzat per generar la seqüència d'assignació aleatòria va ser una taula generada per ordinador, que assignava a cada vial de vacuna RUTI o de placebo un número d'ordre de voluntari.

Es van preveure 3 còpies de sobres dels codis d'aleatorització, per l'obertura del cec en cas d'emergència mèdica.

El número d'ordre de voluntari es va assignar aleatòriament per ordre d'arribada al centre el dia de l'administració del tractament, i es va conservar durant tot l'estudi.

El personal de l'estudi va ser cec respecte a l'assignació del fàrmac, i el cec es va mantenir durant la realització de l'estudi.

5. Esquema i activitats de l'estudi

Durant el període de selecció de l'estudi, de 14 dies de durada, es va citar als voluntaris per la visita de selecció. Després d'haver signat el full de consentiment informat van ser avaluats per decidir si eren elegibles per poder participar a l'estudi.

L'esquema de la descripció de les visites de l'estudi, (taula 2), es va repetir per als quatre grups de dosi. Es va realitzar un seguiment dels participants en cadascun dels grups durant 6 mesos en 12 visites, amb una durada global de l'estudi de 14 mesos.

Taula 2. Calendari de les visites i avaluacions de l'estudi.

	Selecció (dies -14 a -1)	Període d'estudi											
		Pre 1 ^a dosi	1 ^a d o s i	Post 1 ^a dosi				Pre 2 ^a dosi	2 ^a d o s i	Post 2 ^a dosi			
Visita	S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dia	S	0	1	3	7	21	28	29	31	35	56	112	168
Setmana	-2- -1	1			2	4	5			6	9	17	25
Informació al voluntari, Consentiment informat	X												
Història clínica	X												
Criteris inclusió/exclusió	X	X											
Constants vitals	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X
Examen físic	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X
Serologia (HIV, VHB, VHC)	X												
Radiologia tòrax	X												
ECG	X							X				X	X
Medicació concomitant	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X
Proves de laboratori	X	X				X	X	X			X	X	X
Extracció mostra inmunogenicitat		X				X	X	X			X	X	X
Extracció mostres seguretat laboratori		X				X	X	X			X	X	X
Administració RUTI o placebo			X						X				
Valoració punt punció			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EA	Espontani / per observador												
	Després de pregunta	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

EA: Esdeveniments Adversos

6. Variables de seguretat

Es va supervisar la seguretat mitjançant els esdeveniments adversos locals i generals (sistèmics) a través d'anamnesi (pregunta tancada o notificació espontània del voluntari), d'exploració física i presa de constants vitals, amb proves de laboratori clínic, (hematologia, bioquímica, anàlisi d'orina), i amb els traçats electrocardiogràfics.

Es van definir 4 criteris de valoració de causalitat: probable, possible, improbable o no avaluable.

- Probable: esdeveniment incloent anomalies de proves de laboratori amb una seqüència temporal raonable amb l'administració del medicament que no pugui ser atribuïda a una malaltia o a altres fàrmacs concomitants, amb una resposta clínicament acceptable a la retirada.
- Possible: la seqüència temporal és raonable amb l'administració del fàrmac, però també pot explicar-se per malaltia o altres fàrmacs, amb poca informació sobre la retirada o poc concloent.
- Improbable: Presenta una relació temporal amb l'administració del medicament que fa que la relació causal sigui improbable, i que es pot explicar per altres fàrmacs o malalties.
- No avaluable: Amb informació insuficient per una adequada valoració.

Es va quantificar el gradient d'intensitat dels esdeveniments adversos en 3 categories:

- Lleu: signes o símptomes ben tolerats
- Moderat: incomodat suficient per interferir amb les activitats habituals
- Greu: incapacitat per treballar o dur a terme activitats habituals

6.1. Esdeveniments adversos locals. Avaluació del lloc de la inoculació:

Es va avaluar l'eritema, el dolor, la inflamació i la induració a les 3 i 24 hores després de l'administració del tractament, i i en els dies 3, 7 i 21 després de la primera administració, seguint-se un esquema igual de visites de control després de la segona inoculació.

- Per mesurar l'eritema, la inflamació i la induració es va utilitzar una escala de 4 punts: Absència del paràmetre = 0; Presència lleu = 1; Presència moderada = 2; Presència severa = 3.

Es va mesurar la superfície d'extensió del paràmetre present a través dels diàmetres major i menor expressats en mil·límetres.

- La presència de dolor es va recollir a través d'una escala analògica visual (EVA) de 0 a 100 mm.
- També es va recollir la presència d'abscess, necrosi o ulceració.

6.2. Esdeveniments adversos sistèmics

A cada visita de l'estudi es van recollir els símptomes o signes referits pels voluntaris, o obtinguts a través d'exploració física i de la presa de constants vitals (tensió arterial, freqüència cardíaca i temperatura axil·lar).

Es va registrar el tipus d'esdeveniment advers, la data/hora d'inici i final, la intensitat, la gravetat i l'evolució/desenllaç, i tractament de l'esdeveniment advers. També es va avaluar la relació de causalitat amb el tractament administrat.

6.3. Paràmetres de laboratori

Es van recollir en dejuni i van incloure:

- Hemograma (hematies, hemoglobina, hematòcrit, VCM, HCM, CHCM, recompte i fórmula leucocitària i recompte plaquetari) i coagulació.
- Bioquímica (ionograma, Ca^{++} , fosfat, clor, funció hepàtica i renal, creatinafosfocinasa, glucosa, triglicèrids, proteïnes, albúmina i àcid úric), així com anàlisi d'orina per tira reactiva.
- Addicionalment serologies víriques d'hepatitis B, C i VIH, i anticossos antinuclears (ANA).

6.4. ECG

Es van recollir paràmetres de freqüència cardíaca, i mesures d'interval PR, QRS, QT i QT corregit segons fórmula de Bazett.

7. Mida de la mostra

Donat que l'assaig clínic va ser un estudi exploratori de primera administració en humans, no es va realitzar una determinació formal de la mida de la mostra basada en criteris estadístics. Es van planejar 4 cohorts de 6 subjectes per cohort, (4 assignables a vacuna i 2 a placebo), un model que està dintre dels estàndards d'aquest tipus d'estudis seqüencials de fase I. el nombre total d'individus a incloure a l'estudi va ser de 24, 16 assignats a vero i 8 a placebo.

8. Mètodes estadístics i població de l'anàlisi

L'anàlisi estadística es va dur a terme en tots els pacients inclosos per intenció de tractament. tot i que la població per intenció de tractament coincidia amb la població per protocol.

La població de seguretat es va definir com tots els voluntaris tractats amb la medicació a estudi. Totes les anàlisis corresponents a les variables de seguretat es van dur a terme en tota la població participant.

Totes les anàlisis s'acompanyen per estadístics descriptius. Les variables categòriques i ordinals, amb poques categories, es van descriure per freqüències i percentatges per grup de tractament. La resta de les variables contínues s'acompanyen pels estadístics descriptius mitjana, desviació estàndard, rang i 95% d'interval de confiança de la mitjana. Els tests inferencials es van utilitzar per a les variables de valoració del punt d'inoculació. El nivell de significació estadística es va establir en el 5% bilateral.

L'anàlisi de les variables contínues es va realitzar per una anàlisi MMRM (*Mixed Model for Repeated Measures*), i per l'anàlisi del punt d'inoculació es va realitzar una anàlisi ordinària a través d'anàlisi no paramètric MMRM i amb un test exacte de Fisher per a les variables dicotòmiques.

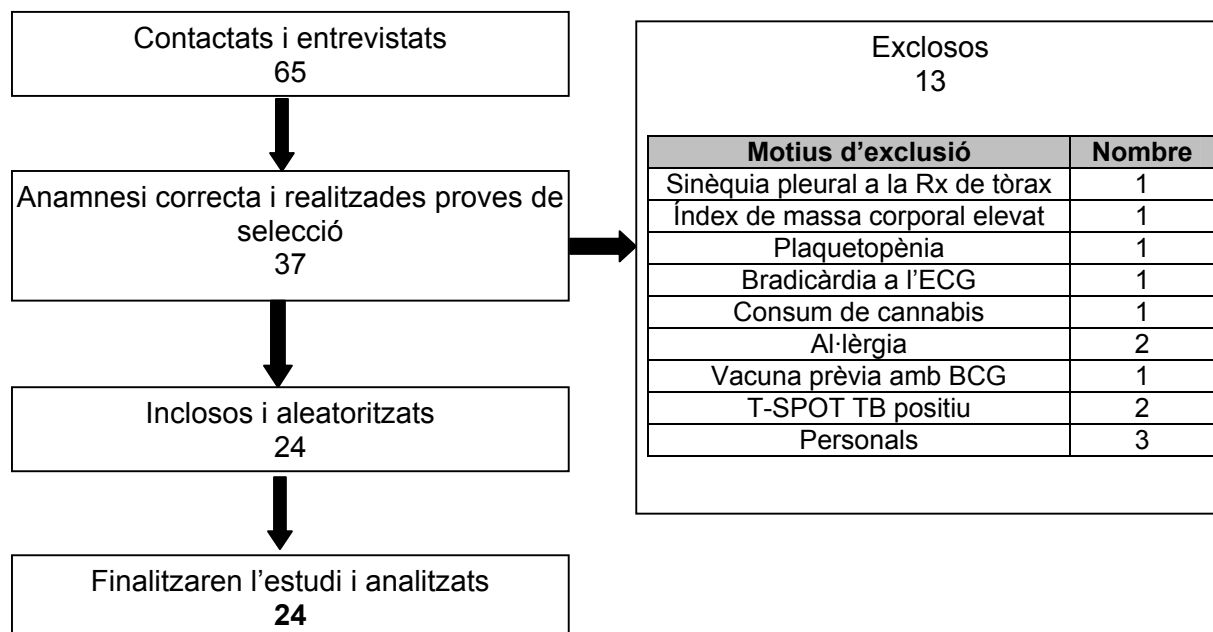
RESULTATS

1. Població de l'estudi i flux

Es van entrevistar un total de 65 voluntaris sans, a les visites de pre-selecció, 37 van presentar una anamnesi que permeté, després de signar el consentiment informat, realitzar una visita de selecció amb les proves complementàries previstes. Es van excloure 13 voluntaris per motius exposats a la figura 2.

No es van detectar alteracions clínicament significatives per anamnesi, exploració física, analítica o registre electrocardiogràfic en 24 voluntaris. En aquests, els valors fora de rang de normalitat establerts per laboratori o de registre electrocardiogràfic, van ser avaluats pels investigadors, considerant-se sense rellevància clínica.

Figura 2. Diagrama de flux dels voluntaris i motius d'exclusió.



Es van incloure 24 voluntaris que complien criteris de selecció, 16 van rebre vacuna RUTI i 8 van rebre placebo.

No es va haver de retirar cap dels voluntaris que es van incloure a l'estudi, ni per voluntat pròpia ni per requeriment dels investigadors. Tampoc no es van produir desviacions significatives del protocol.

El reclutament es va dur a terme entre l'abril i el desembre de 2007. El període de tractament va ser entre el 23 d'abril de 2007 i el 7 de gener de 2008; la visita final de l'últim grup va ser el 26 de maig de 2008.

1.1 Característiques demogràfiques i clíniques basals

Les característiques d'edat, pes corporal, alçada i IMC dels voluntaris inclosos a l'estudi queden reflectides a la taula 3.

Taula 3: Característiques basals dels participants.

Paràmetre	Mitjana	DE	Rang	Unitats
Edat	24,08	3,46	19 - 34	anys
Pes corporal	72,60	10,56	59 - 96,5	kg
Alçada	1,78	0,06	1,66 - 1,92	m
IMC	22,57	2,45	19,90 - 29,65	kg/m ²

DE: desviació estàndard; IMC: índex de massa corporal

Dels 24 voluntaris inclosos, 8 eren fumadors (33,3%). La mitjana de cigarrets fumats al dia van ser 11,5 (rang 1 a 30). Onze dels 24 (45,8%) referien consum d'alcohol, amb un promig de 10 g/dia (rang d'1 a 21), mentre que 13 (54,2%) es van definir com abstemis.

Els valors basals dels paràmetres cardiovasculars com tensió arterial, i freqüència cardíaca, i temperatura axil·lar es mostren a la taula 4.

Taula 4. Constants vitals basals dels participants.

Paràmetre	Mitjana	DE	Rang	Unitats
TA sistòlica	115,50	8,73	103 - 138	mmHg
TA diastòlica	64,83	6,79	54 - 83	mmHg
Freqüència cardíaca	64,25	10,66	50 - 84	bpm
Temperatura axil·lar	36,23	0,45	35,5 - 36,8	°C

DE: desviació estàndard; TA: tensió arterial

2. Avaluacions de seguretat

Es van observar un total de 175 esdeveniments adversos. La majoria van ser lleus (173, 98,9%), dos (1,1%) van ser moderats (1 lesió tendinosa i 1 panniculitis) i cap d'ells va ser greu.

Es van recuperar 172 (98,2%), mentre que 3 van tenir una evolució desconeguda i dos persistien a la finalització de l'estudi (litiasi salival i anèmia normocítica-normocròmica).

2.1 Esdeveniments adversos globals

Els esdeveniments adversos més comuns per òrgans i sistemes segons la classificació MedDRA van estar relacionats amb alteracions al sistema nerviós, amb 81 esdeveniments (46,3%) en 20 participants (83%). També van ser freqüents els episodis d'infecció (27 episodis en 17 participants (70,8%)) i les alteracions gastrointestinals (20 en 13 participants [54%]) (taula 5).

Taula 5. Esdeveniments adversos més freqüents per òrgans i sistemes.

Classificació d'òrgans i sistemes	Incidència (%) (n=175)	Participants (%) (n=24)
Alteracions hemàtiques i limfàtiques	8 (4,5)	5 (20,8)
Alteració de l'oïda i laberint	1 (0,6)	1 (4,2)
Alteracions gastrointestinals	20 (11,4)	13 (54,2)
Alteracions generals i al lloc de l'administració	7 (4)	6 (25)
Infeccions i infestacions	27 (15,4)	17 (70,8)
Lesions, emmetzinament i complicacions del procediment	2 (1,1)	2 (8,3)
Troballes	1 (0,6)	1 (4,2)
Alteracions musculoesquelètiques i del teixit connectiu	11 (6,2)	7 (29,2)
Alteracions del sistema nerviós	81 (46,3)	20 (83,3)
Alteracions psiquiàtriques	1 (0,6)	1 (4,2)
Alteracions respiratòries, toràciques i mediastíniques	10 (5,7)	6 (25)
Alteracions de pell i teixit subcutani	5 (2,8)	4 (16,7)
Procediments quirúrgics i mèdics	1 (0,6)	1 (4,2)

Per tipus d'esdeveniment advers, el més freqüent va ser la cefalea amb 54 episodis (30,8%) que van ocórrer en 16 participants (66,7%) i com altres esdeveniments adversos sistèmics el refredat (16 episodis de nasofaringitis [9,1%] en 12 participants [50%]) (taula 6).

Taula 6. Distribució dels esdeveniments adversos més freqüents.

Esdeveniment advers	Incidència (%) (n=175)	Participants (%) (n=24)
Cefalea, migranya, cefalea tensional	54 (30,8)	16 (66,7)
Dolor al lloc de la inoculació	33 (18,8)	18(75)
Contracció muscular involuntària	22 (12,6)	12 (50)
Nasofaringitis	16 (9,1)	12 (50)
Odinofàgia	6 (3,4)	4 (16,7)
Rinorrea	4 (2,3)	3 (12,5)
Síncope, síncope vasovagal	4 (2,3)	3 (12,5)
Limfadenopatia	4 (2,3)	3 (12,5)
Dolor d'esquena	4 (2,3)	3 (12,5)

Tots els participants van presentar almenys un esdeveniment advers, amb una mitjana de 7. La mitjana d'esdeveniments per participant va ser superior en els grups tractats amb 5, 100 i 200 µg de FCMtb comparats amb el grup placebo (Taula 7).

Taula 7. Nombre d'esdeveniments adversos i mitjana per participant.

Grup	Esdeveniments adversos N (%)	Participants	Mitjana d'esdeveniments adversos per participants
Placebo	43 (24,6)	8	5
5 µg FCMtb	29 (16,6)	4	7
25 µg FCMtb	18 (10,3)	4	4.5
100 µg FCMtb	52 (29,7)	4	13
200 µg FCMtb	31 (17,7)	4	8
Total	175	24	7

La taula 8 mostra els esdeveniments adversos sistèmics amb atribució de causalitat possible o probable.

Taula 8. Distribució dels esdeveniments adversos sistèmics amb atribució de causalitat possible o probable.

Esdeveniment advers	Causalitat	Intensitat	Placebo (n=8) E/S (%)	5 µg (n=4) E/S (%)	25µg (n=4) E/S (%)	100 µg (n=4) E/S (%)	200 µg (n=4) E/S (%)
Sensació febril	Possible	Lleu	0/0	1/1 (25)	0/0	0/0	0/0
Síncope vasovagal	Possible	Lleu	0/0	0/0	2/1 (25)	0/0	0/0
Rinorrea	Possible	Lleu	0/0	0/0	0/0	1/1 (25)	0/0
Esternuts	Possible	Lleu	0/0	0/0	0/0	1/1 (25)	0/0
Limfadenopatia	Possible	Lleu	1/1 (12,5)	0/0	0/0	0/0	0/0
Nasofaringitis	Possible	Lleu	1/1 (12,5)	0/0	0/0	0/0	0/0
Erupció cutània	Possible	Lleu	2/2 (25)	0/0	0/0	0/0	0/0

E= nombre d'esdeveniments; S = Subjectes.

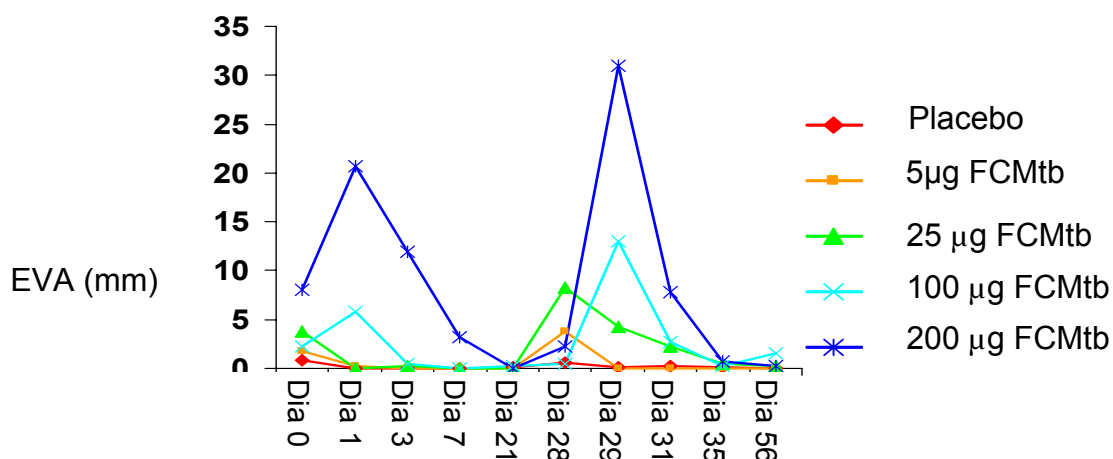
2.2 Esdeveniments adversos locals

Vint voluntaris (83,3%) van presentar alguna reacció al lloc de la inoculació. La reacció adversa local (RAL) més freqüent va ser el dolor, que la van presentar 18 voluntaris (75%), amb intensitats mitjanes més grans després de la 2^a inoculació. La intensitat màxima de dolor mesurat per escala analògica visual (EVA) va ser de 66 mm i la intensitat mitjana total de 9,4 mm.

Tal i com mostra la figura 2, mitjanes de puntuació de l'EVA del dolor al punt d'inoculació, la intensitat del dolor va ser superior als grups tractats amb vacuna comparat amb el grup tractat amb placebo. La intensitat del dolor va ser també superior en els grups de dosi més altes.

En tots els grups, els voluntaris tractats amb vacuna van tenir una intensitat de dolor superior després de la segona inoculació. Als grups de 100 µg i 200 µg de FCMtb la intensitat de dolor va ser màxima 24 hores després de la inoculació i es va resoldre gairebé dintre de les primeres 72 hores.

Figura 3. Mitjana de puntuació de l'escala analògica visual per visita i grup de tractament.



Al grup de 5 µg, la única RAL que es va observar va ser dolor.

Als grups de 25 µg, 100µg, i 200 µg de FCMtb, 12 voluntaris (50%) van presentar fasciculacions, la majoria immediatament després d'alguna de les administracions, i aquelles van durar al voltant d'1 minut.

L'eritema, la inflamació i la induració es van observar als grups de 100 µg de FCMtb, únicament després de la 2^{na} inoculació, i al grup de 200 µg de FCMtb.

A les taules 9 i 10 es descriu la distribució de RAL per grup de tractament.

Taula 9. Nombre de subjectes que van presentar reaccions adverses locals relacionades amb la 1^a inoculació.

Reacció Adversa Local	Grup I 5µg (%) (n=6)	Grup II 25µg (%) (n=6)	Grup III 100µg (%) (n=6)	Grup IV 200µg (%) (n=6)
Fasciculacions	0	2 (33,3)	5 (83,3)	3 (50)
Dolor	2 (33,3)	4 (66,6)	6 (100)	5 (83,3)
Eritema	0	0	0	1 (16,6)
Inflamació	0	0	0	0
Induració	0	0	0	1 (16,6)

Taula 10. Nombre de subjectes que van presentar RAL relacionades amb la 2^a inoculació.

Reacció Adversa Local	Grup I 5µg (%) (n=6)	Grup II 25µg (%) (n=6)	Grup III 100µg (%) (n=6)	Grup IV 200µg (%) (n=6)
Fasciculacions	0	1 (16,6)	4 (66,6)	4 (66,6)
Dolor	3 (50)	4 (66,6)	4 (66,6)	5 (83,3)
Eritema	0	0	1(16,6)	2 (33,3)
Inflamació	0	0	2 (33,3)	3 (33,3)
Induració	0	0	1 (16,6)	3 (33,3)
Hematoma	0	0	0	3 (33,3)
Panniculitis granulomatosa	0	0	1 (16,6)	1 (16,6)

La taula 11 mostra les diferències estadístiques entre els grups de tractament respecte a les reaccions locals eritema, inflamació, induració, abscess, úlcera i necrosi.

Taula 11. Reaccions locals i diferències estadístiques entre els grups de tractament.

Reacció local	Placebo	5 µg FCMtb	25 µg FCMtb	100 µg FCMtb	200 µg FCMtb
Eritema (lleu o moderat)	0	0	0	2 [†]	3 [†]
Inflamació (lleu o moderada)	0	0	0	2 [†]	5 [†]
Induració	0	0	0	0	8 [‡]
Abscessificació	0	0	0	0	0
Úlcera	0	0	0	0	0
Necrosi	0	0	0	0	0

[†] Diferències estadísticament significatives comparat amb els grups de 5 µg, 25 µg, i placebo.

[‡] Diferències estadísticament significatives comparat amb els grups de 5 µg, 25 µg, 100 µg i placebo.

La presència d'eritema lleu a moderat i/o inflamació al punt d'inoculació valorat en un total d'onze visites va ser estadísticament diferent ($p < 0,05$) en els grups tractats amb 100 µg i 200 µg de FCMtb comparat amb placebo, 5 µg i 25 µg dels grups FCMtb. La presència d'induració al punt d'inoculació va ser

estadísticament diferent al grup tractat amb 200µg de FCMtb comparat amb els grups de placebo, 5 µg, 25 µg, i 100 µg de FCMtb.

Dos voluntaris van presentar un nòdul indurat (imatge 2), un d'intensitat lleu i un altre moderat que requeriren biòpsia, on es va observar panniculitis granulomatosa amb necrosi líquüefaent de pannile adipós, amb neutròfils al centre del granuloma. També es van realitzar cultius microbiològics que van ser negatius. La cicatrització de la zona biopsiada va ser per segona intenció (imatges 3 i 4) donada la manca de cicatrització inicial en retirar els punts de sutura, amb una cicatriu residual sense retraccions.



Imatge 2.
Voluntari 023.



Imatge 3.
Voluntari 023.
Ferida després
de la biòpsia.



Imatge 4.
Voluntari 013. Ferida
després de la biòpsia.

Les dues panniculitis van aparèixer amb la segona inoculació de la dosi. A les 3 hores post dosi l'avaluació del lloc de punció va ser anodina en els dos episodis, i el dolor de molt baixa intensitat (0 mm al voluntari 013 i 4 mm al voluntari 023). L'eritema i la inflamació van començar 18 dies després de l'administració al voluntari 013, i 3 dies post dosi al voluntari 023.

2.3 Esdeveniments adversos sistèmics per grup de dosi

Grup placebo (n=8)

Es van observar 38 esdeveniments adversos sistèmics; 23 d'ells van ser diferents. Tots van ser lleus excepte una lesió tendinosa, que va ser moderada però es considerà no relacionada amb la medicació a estudi. Quatre es van

considerar relacionats amb l'administració del fàrmac. La taula 12 mostra la distribució dels esdeveniments adversos que es van considerar relacionats amb el fàrmac al grup placebo.

Taula 12. Esdeveniments adversos relacionats amb la vacuna observats al grup placebo comparats amb el total observat al grup.

Classificació per òrgans i sistemes		Relacionat (%)	Total al grup * (%)
Alteracions hemàtiques i limfàtiques	Leucocitosi	1 (12,5)	1 (12,5)
	Limfadenopatia		2/1 (12,5)
	Limfocitosi		2/1 (12,5)
Alteracions gastrointestinals	Diarrea		2 (25)
	Dispèpsia		1 (12,5)
	Odinofàgia		1 (12,5)
	Odontàlgia		2/1 (12,5)
Alteracions generals	Febre		3/2 (25)
Infeccions i infestacions	Gastroenteritis	1 (12,5)	1 (12,5)
	Nasofaringitis		4/3 (37,5)
	Faringitis		1 (12,5)
	Amigdalitis		1 (12,5)
Lesions, emmetzinament i complicacions del procediment	Lesió d'extremitat		1 (12,5)
	Lesió tendinosa		1 (12,5)
Alteracions musculoesquelètiques i del teixit connectiu	Dolor d'esquena		1 (12,5)
Alteracions del sistema nerviós	Vertigen		1 (12,5)
	Cefalea		7/4 (50)
	Síncope vasovagal		1 (12,5)
Alteracions Respiratòries, toràciques i mediastíniques	Tos		1 (12,5)
	Tos productiva		1 (12,5)
	Rinorrea		1 (12,5)
Alteracions cutànies i del teixit subcutani	Erupció eritematosa	1 (12,5)	1 (12,5)
	Erupció vesicular	1 (12,5)	1 (12,5)

* Quan el nombre s'expressa com una ratio E/S, "E" representa el nombre d'esdeveniments i "S" el nombre de subjectes amb aquest esdeveniment advers.

Grup de dosi 5 µg de FCMtb (n=4)

Es van observar 29 esdeveniments adversos sistèmics, 12 d'ells diferents. Tots van ser d'intensitat lleu. Un es va considerar relacionat amb l'administració del fàrmac. La taula 13 mostra la distribució dels esdeveniments adversos que es van considerar relacionats amb el fàrmac al grup que va rebre 5 µg de FCMtb.

Taula 13. Esdeveniments adversos relacionats amb la vacuna observats al grup de dosi de 5 µg de FCMtb comparats amb el total observat al grup.

Classificació per òrgans i sistemes		Relacionat (%)	Total al grup * (%)
Alteracions hemàtiques i limfàtiques	Limfadenopatia		1 (25)
Alteracions gastrointestinals	Diarrea		1 (25)
	Odontàlgia		1 (25)
Alteracions generals	Quist		1 (25)
	Sensació febril	1 (25)	1 (25)
	Pòlip		1 (25)
Infeccions i infestacions	Grip		1 (25)
	Nasofaringitis		1 (25)
	Amigdalitis		1 (25)
Alteracions musculoesquelètiques i del teixit connectiu	Cervicàlgia		1 (25)
Alteracions del sistema nerviós	Cefalea		18/2 (50)
Procediments quirúrgics i mèdics	Reparació dental		1 (25)

* Quan el nombre s'expressa com una ratio E/S, "E" representa el nombre d'esdeveniments i "S" el nombre de subjectes amb aquest esdeveniment advers.

Grup de dosi 25 µg de FCMtb (n=4)

Es van observar 16 esdeveniments adversos sistèmics, 7 d'ells diferents. Tots van ser d'intensitat lleu. Un es va considerar relacionat amb l'administració del fàrmac. La taula 14 mostra la distribució dels esdeveniments adversos que es van considerar relacionats amb el fàrmac al grup que va rebre 25 µg de FCMtb.

Taula 14. Esdeveniments adversos relacionats amb la vacuna observats al grup de dosi de 25 µg de FCMtb comparats amb el total observat al grup.

Classificació per òrgans i sistemes		Relacionat (%)	Total al grup* (%)
Alteracions hemàtiques i limfàtiques	Limfadenopatia		1 (25)
Alteracions gastrointestinals	Odinofàgia		1 (25)
Infeccions i infestacions	Nasofaringitis		3 (75)
Troballes	Buf cardíac		1 (25)
Alteracions del sistema nerviós	Cefalea		7/3 (75)
	Síncope vasovagal	2/1 (25)	2/1 (25)
Alteracions Respiratòries, toràciques i mediastíniques	Congestió nasal		1 (25)

* Quan el nombre s'expressa com una ratio E/S, "E" representa el nombre d'esdeveniments i "S" el nombre de subjectes amb aquest esdeveniment advers.

Grup de dosi 100 µg de FCMtb (n=4)

Es van observar 41 esdeveniments adversos sistèmics, 25 d'ells diferents. Tots van ser d'intensitat lleu. Tres es van considerar relacionats amb l'administració del fàrmac. La taula 15 mostra la distribució dels esdeveniments adversos que es van considerar relacionats amb el fàrmac al grup que va rebre 100 µg de FCMtb.

Taula 15. Esdeveniments adversos relacionats amb la vacuna observats al grup de dosi de 100 µg de FCMtb comparats amb el total observat al grup.

Classificació per òrgans i sistemes		Relacionat (%)	Total al grup* (%)
Alteracions hemàtiques i limfàtiques	Anèmia normocítica normocroma		1 (25)
Alteracions gastrointestinals	Diarrea		1 (25)
	Dispèpsia		1 (25)
	Gingivitis		1 (25)
	Odinofàgia		1 (25)
	Càlcul de glàndula salivar**		1 (25)
	Augment de glàndula salivar **		1 (25)
	Dolor de glàndula salivar **		1 (25)
Infeccions i infestacions	Grip		1 (25)
	Nasofaringitis		1 (25)
	Herpes oral		2/1 (25)
	Faringitis		1 (25)
Alteracions musculoesquelètiques i del teixit connectiu	Dolor d'esquena		2/1 (25)
	Contractura d'extremitat		1 (25)
	Miàlgia		1 (25)
	Cervicàlgia		1 (25)
	Dolor a l'extremitat		1 (25)
Alteracions del sistema nerviós	Cefalea		11/4 (100)
	Síncope		1 (25)
	Cefalea tensional		4/1 (25)
Alteracions psiquiàtriques	Nerviosisme		1 (25)
Alteracions respiratòries, toràciques i mediastíniques	Tos		1 (25)
	Rinorrea	1 (25)	2/1 (25)
	Esternuts	1 (25)	1 (25)
Alteracions cutànies i del teixit subcutani	Erupció pruriginosa		1 (25)

* Quan el nombre s'expressa com una ratio E/S, "E" representa el nombre d'esdeveniments i "S" el nombre de subjectes amb aquest esdeveniment advers.

** Tots aquets esdeveniments adversos van succeir al mateix voluntari, amb càlcul a la glàndula salival com a patologia subjacent, confirmat per TAC.

Grup de dosi 200 µg de FCMtb (n=4)

Es van observar 25 esdeveniments adversos sistèmics, 13 d'ells diferents. Tots van ser d'intensitat lleu. Un es va considerar relacionat amb l'administració del fàrmac. La taula 16 mostra la distribució dels esdeveniments adversos que es van considerar relacionats amb el fàrmac al grup que va rebre 200 µg de FCMtb.

Taula 16. Esdeveniments adversos relacionats amb la vacuna observats al grup de dosi de 200 µg de FCMtb comparats amb el total observat al grup.

Classificació per òrgans i sistemes		Relacionat (%)	Total al grup * (%)
Alteració d'oïda i laberint	Dolor d'oïda		1 (25)
Alteracions gastrointestinals	Odinofàgia		2/1 (25)
	Vòmits		1 (25)
Infeccions i infestacions	Nasofaringitis		7/4 (100)
	Herpes oral		1 (25)
	Uretritis		1 (25)
Alteracions musculoesquelètiques i del teixit connectiu	Dolor d'esquena		1 (25)
	Dolor musculoesquelètic		1 (25)
	Periartritis		1 (25)
Alteracions del sistema nerviós	Cefalea		4/1 (25)
	Migranya		3/1 (25)
Alteracions Respiratòries, toràciques i mediastíniques	Hemoptisi		1 (25)
	Rinorrea		1 (25)

* Quan el nombre s'expressa com una ratio E/S, "E" representa el nombre d'esdeveniments i "S" el nombre de subjectes amb aquest esdeveniment advers.

2.4 Resultats de les proves analítiques

En línies generals els voluntaris van mostrar valors de resultants dels tests analítics dintre dels límits de la normalitat a la selecció i durant les visites al llarg de l'estudi, tant d'hematologia, bioquímica com l'anàlisi d'orina. Els resultats fora dels límits de normalitat del laboratori van ser avaluats pels metges del Servei de Farmacologia Clínica com a sense rellevància clínica, repetint-se algun test en cas de dubte. El nombre de valors fora dels límits de normalitat del laboratori d'Anàlisi Clíniques va ser de 63, d'entre ells 60 sense rellevància clínica i 3 considerats de rellevància però no atribuïbles al producte en investigació. Dels 63, 16 van ser paràmetres hematològics, 30 bioquímics i 17 de l'anàlisi d'orina.

2.5 Resultats de l'examen físic

A les 12 exploracions físiques que es va sotmetre als voluntaris durant l'estudi es va observar una troballa anormal amb rellevància clínica (una inflamació de la glàndula per litiasi salival) al grup de dosi de 100 µg de FCMtb, que es va considerar com no relacionada amb el fàrmac a estudi, i 117 troballes sense rellevància clínica.

2.6 Signes vitals i ECG

Es van determinar tensió arterial i freqüència cardíaca en 12 ocasions a cada voluntari, ambdós paràmetres després de 3 minuts de descans en decúbit supí, amb un monitor electrònic (Critikon®). Les constants vitals van estar pràcticament totes dintre dels rangs de normalitat. Les desviacions dels valors normals es mostren a la taula 17.

Taula 17. Registre de constants vitals els participants.

		Placebo	RUTI 5 µg FCMtb	RUTI 25 µg FCMtb	RUTI 100 µg FCMtb	RUTI 200 µg FCMtb
TA sistòlica (mmHg)	>140	3/1	0	1/1***	3/1	1/1 [#] , 3/1, 1/1 ^{##}
	<100	0	0	1/1 [†]	1/1	1/1
TA diastòlica (mmHg)	>90	1/1**	0	0	0	0
	<50	0	0	1/1 [‡]	0	0
Freqüència cardíaca (bpm)	>90	1/1	0	0	0	0
	<50	5/1**	0	5/1***, 1/1 [‡] , 1/1 [†]	0	1/1 [#] , 3/1 ^{##}
Temperatura	>37°	0	1/1 (37°)	0	0	0
	<37°	0	0	0	0	0

El nombre s'expressa com una ratio E/S, "E" representa el nombre d'esdeveniments i "S" el nombre de subjectes amb aquest esdeveniment advers.

Observats al mateix voluntari: ** (0021), *** (0008), ‡ (0009), † (0011), # (0019), ## (0024).

Els 4 registres electrocardiogràfics no van demostrar canvis clínicament significatius, ni es van observar canvis que es poguessin atribuir a la medicació.

DISCUSSIÓ

Els resultats de seguretat de la nova vacuna antituberculosa RUTI, mostren una bona tolerabilitat sistèmica en general, i una bona tolerabilitat local en els grups de menor dosi.

Tots els voluntaris van presentar almenys un esdeveniment advers, amb una mitjana per participant de 7. La majoria dels esdeveniments adversos observats van ser d'intensitat lleu (99%), i només en un 1% la intensitat va ser moderada. Els esdeveniments adversos més freqüents van ser les alteracions del sistema nerviós (46%, principalment la cefalea, que la van presentar dues terceres parts dels participants), seguides de les infeccions (15%) i de les alteracions gastrointestinals (11%). El grup de dosi de 25 µg de FCMtb és el que va presentar un menor nombre d'esdeveniments adversos (18, mitjana de 4,5 per participant) i el grup de dosi de 100 µg de FCMtb el que en va presentar més (52, mitjana de 13). El grup de placebo va presentar 43 esdeveniments adversos (mitjana de 5).

Només un 5% dels esdeveniments adversos sistèmics es van considerar com a possible o probablement relacionats amb la vacuna.

Els esdeveniments adversos locals més freqüents van ser el dolor al punt d'inoculació (en el 75% dels voluntaris) i les fasciculacions (50%). La intensitat del dolor al punt d'inoculació va ser superior als grups tractats amb component actiu de la vacuna que al grup placebo, amb un comportament dosi-dependent. La intensitat màxima de dolor es va produir a les 24 hores de l'administració. A tots els grups el dolor va ser superior amb la segona inoculació.

Al grup de 5 µg FCMtb l'únic esdeveniment advers local observat va ser el dolor, mentre que l'eritema i la inflamació es van observar només als grups de 100 i 200 µg de FCMtb ($p < 0,05$); a aquest últim grup la induració va ser més freqüent que als altres grups de tractament ($p < 0,05$).

Les reaccions adverses més greus descrites van ser l'aparició de panniculitis granulomatosa necrotitzant, després de la segona inoculació, amb cultius estèrils, que van presentar dos voluntaris (del grup de 100 µg i 200 µg de FCMtb respectivament) amb cicatriu residual.

Tenint en compte els resultats de seguretat descrits, les dosis de 5 µg i de 25 µg de FCMtb es consideren les que tenen una millor relació benefici/risc, essent susceptibles de ser avaluades en fases de recerca clínica posteriors.

L'origen de la vacuna terapèutica RUTI és diferent al d'altres vacunes antituberculoses profilàctiques constituïdes per soques recombinants o atenuades de BCG (com l'rBCG30) que podrien reemplaçar a la BCG, o bé al de les vacunes amb subunitats que expressen antigens immunodominants del *M. tuberculosis* utilitzades com a reforç de la vacunació inicial amb BCG (com la MVA85A). Malgrat això els resultats de seguretat en voluntaris sans o en estudis de fase I descrits en estudis que avaluen aquest tipus de vacunes són similars als observats amb la vacuna RUTI.^{8,10,12,13}

Així dades de seguretat després d'immunització amb MVA85A intradèrmic de 31 voluntaris sans (14 naïve per BCG i 17 vacunats prèviament) publicades agrupadament, obtingudes de 2 assaigs no aleatoritzats i d'un únic braç de tractament, descriuen dolor, eritema i induració en tots els subjectes (31), i pruija en 30 com esdeveniments locals, i com a generals més freqüents miàlgia, cefalea i síndrome gripal, sense diferències entre els grups BCG naïve o vacunats.⁸ Amb el mateix tipus de vacuna, dades d'un altre assaig de disseny similar en 10 voluntaris sans vacunats un mes abans amb BCG als que es va administrar una dosi única de MVA85A intradèrmica, es descriu eritema (100%), induració (100%) i dolor (90%) com a esdeveniments locals i miàlgia (80%), cefalea (60%) i febre (60%) com a esdeveniments adversos generals.¹⁰

En un assaig clínic de fase I, doble cec, aleatoritzat en 35 voluntaris sans que comparava la immunització amb vacunes intradèrmiques BCG en front de recombinant rBCG sobreexpressant antigen 85b de *M. tuberculosis*,

s'observaren reaccions locals esperables amb pàpules i úlceres, que es van curar als 3 mesos i dolor al lloc de la inoculació durant les dues primeres setmanes.¹³

Una limitació d'aquest estudi és l'exclusió de dones com a participants, que afecta a la validesa externa de l'estudi, és a dir, a la generalització dels resultats a la població real. En primer lloc es va considerar que amb la inclusió únicament d'homes s'obtidria una mostra més homogènia, per tal de minimitzar la variabilitat inter-subjecte. En segon lloc, atès que no es disposava d'estudis de fertilitat en animals, es volien eliminar els riscos potencials en dones fèrtils.

Una altra limitació de l'estudi és el nombre relativament petit de subjectes que s'han inclòs i que no es va realitzar el càlcul de la mida de la mostra basada en criteris estadístics. Malgrat això, la mida de la mostra està dins dels estàndards d'aquest tipus d'estudi i segueixen les recomanacions de les guies europees per minimitzar els riscos en els assaigs clínics de primera administració en humans.^{26,27} En comparació amb altres estudis que avaluaven vacunes antituberculoses, el nombre de voluntaris inclosos va ser superior o similar.^{8,10,12}

El disseny aleatoritzat, doble cec, comparatiu amb placebo i seqüencial suposen fortaleces de l'estudi, per considerar-se estàndards de qualitat metodològica. El disseny de grups seqüencials és un disseny idoni que permet prendre decisions sobre la inclusió de subjectes addicionals segons els criteris fixats prèviament. D'aquesta manera es pretén minimitzar els riscos i assegurar una millor seguretat als participants. L'aleatorització, el cegament doble i la comparació del grup tractat amb placebo són dos aspectes que donen validesa interna a l'estudi.

A més a més, el seguiment dels participants durant 6 mesos també suposa una fortaleza ja que és prou llarg per:

- D'una banda afavorir l'aparició de processos intercurrents, que hagin fet augmentar el nombre total d'esdeveniments adversos ocorreguts durant l'estudi. Si ho comparem amb un altre assaig clínic de fase I amb MVA85A, de disseny obert en 24 voluntaris sans amb un any de seguiment en què es van descriure 186 esdeveniments adversos, 93% dels quals d'intensitat lleu, es pot considerar que la vacuna RUTI té un perfil de seguretat similar a altres vacunes antituberculoses.¹²
- D'altra banda avaluar l'aparició de processos autoimmunes, amb resultats mantinguts d'autoanticossos negatius en tots els voluntaris. La pertinència d'aquesta avaluació de seguretat estava justificada per què s'ha descrit un ventall ampli de malalties autoimmunes d'afectació temporal o casual amb la vacunació, són principalment les alteracions reumàtiques (després de vacunes d'hepatitis B, tètan o àntrax), la Síndrome de Guillain-Barré (després de vacunes de la grip, poliomielitis o tètanus), i la trombocitopènia idiopàtica (per vacuna triple vírica i xarrampió).²⁸

Malgrat que no és un objectiu dels assaigs clínics de fase I obtenir dades d'eficàcia, les guies europees d'avaluació de noves vacunes recomanen obtenir també dades preliminars d'immunogenicitat per fer-ne una valoració inicial.²⁷ Tot i que no se'n fa referència en aquest treball, un objectiu principal de l'estudi va ser la immunogenicitat, avaluada a través de determinacions de secreció d'INF- γ , ja que es considera el principal mecanisme en humans per lluitar contra la tuberculosi.^{29,30}

CONCLUSIONS

1. Aquest assaig clínic de fase I en 24 voluntaris sans ha estat la primera aproximació en humans de la nova vacuna antituberculosa RUTI, prèviament investigada en models animals.
2. La mitjana d'esdeveniments adversos per participant va ser de 7.
3. La majoria dels esdeveniments adversos descrits han estat lleus i amb recuperació completa. No hi va haver esdeveniments adversos greus.
4. La cefalea és l'esdeveniment advers sistèmic més freqüentment descrit, i el dolor i les fasciculacions els esdeveniments adversos locals més freqüents.
5. El grup de dosi que va rebre 25 µg FCMtb va tenir la incidència d'esdeveniments adversos més baixa i la del grup de 100 µg FCMtb la més alta.
6. Només un 5% dels esdeveniments adversos sistèmics es van considerar possiblement o probablement relacionats amb la vacuna.
7. La incidència d'esdeveniments adversos al lloc de la inoculació va ser superior als grups de dosi de 100 i 200 µg de FCMtb.
8. Els grups de dosi de 100 i 200 µg de FCMtb van presentar significativament més eritema i inflamació que la resta de grups, i el grup de dosi de 200 µg de FCMtb més induració.
9. L'esdeveniment advers més rellevant va ser la panniculitis granulomatosa necrotitzant, en dos voluntaris (dels grups de 100 i 200 µg de FCMtb respectivament).
10. En general, la seguretat de la vacuna RUTI ha estat similar a la descrita per altres vacunes antituberculoses tot i les diferències en l'origen de la vacuna. El

nombre total d'esdeveniments adversos així com els tipus més freqüentment observats han estat en la mateixa línia, mostrant un bon perfil de seguretat.

11. Tenint en compte que les dosis de 5 µg i 25 µg de FCMtb van ser les que van presentar una millor relació benefici/risc, són les d'elecció per a futures avaluacions d'eficàcia i efectivitat.

Els resultats preliminars d'aquest assaig clínic han tingut difusió també en els àmbits de la Farmacologia Clínica i de la Microbiologia, a través de publicacions i presentacions a congressos científics.³¹⁻³³

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing WHO Report 2004*. Geneva, Switzerland.
2. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161:S221-47.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Development of new vaccines for tuberculosis. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET). *MMWR Recomm Rep*. 1998; 47:1-6.
4. Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994; 13:908-14.
5. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. 2009; 37:80-6.
6. Cardona PJ, Llatjós R, Gordillo S, Viñado B, Díaz J, Ariza A, et al. Towards a "human-like" model of tuberculosis: Local inoculation of LPS in lungs of *Mycobacterium tuberculosis* aerogenically infected mice induces intragranulomatous necrosis. *Scand J Immunol*. 2001; 53:65-71.
7. Cardona PJ, Julian E, Valles X, Gordillo S, Muñoz M, Luquin M, et al. Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2002; 55:639-45.
8. Mc Shane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing Ag85A boost BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nature Medicine*. 2004; 10:1240-4.
9. Mc Shane 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*. 2005; 85:47-52.
10. Pathan AA, Sander CR, Fletcher HA, Poulton I, Alder NC, Beveridge NE, et al. Boosting BCG with recombinant modified vaccinia ankara expressing antigen 85A: different boosting intervals and implications for efficacy trials. *PLoS One*. 2007;2:e1052.
11. Ibanga HB, Brookes RH, Hill PC, Owiafe PK, Fletcher HA, Lienhardt C, 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.
12. Hawkridge T, Scriba TJ, Gelderbloem S, Smit E, Tameris M, Moyo S, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis*. 2008;15;198:544-52.
13. Hoft DF, Blazevic A, Abate G, Hanekom WA, Kaplan G, Soler JH, et al. A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis*. 2008; 198:1491-501.
14. Cardona PJ. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2006; 86:273-89.

15. Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, 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. Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona PJ. 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*. 2008; 15:1229-37.
17. Gil O, Vilaplana C, Guirado E, Díaz J, Cáceres N, Singh M, et al. Enhanced gamma interferon responses of mouse spleen cells following immunotherapy for tuberculosis relapse. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15:1742-4.
18. Baldwin SL, D'Souza C, Roberts AD, Kelly BP, Frank AA, Lui MA, et al. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun*. 1998; 66:2951-9.
19. Moher D, Schulz KF, Altman DG. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet*. 2001; 357:1191-4.
20. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Fergusson D. CONSORT 2010 changes and testing blindness in RCTs. *Lancet*. 2010; 375:1144-6.
21. Schulz KF, Altman DG, Moher D; for the CONSORT Group*. CONSORT 2010 Statement: Updated Guidelines for Reporting Parallel Group Randomized Trials. *Ann Intern Med*. 2010; [Epub ahead of print]
22. Vilaplana C, Montané E, Pinto S, Barriocanal AM, Domenech G, Torres F, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutic antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine*. 2010 Jan 22; 28(4):1106-16.
23. Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. BOE nº 33 de 7 de febrero de 2004, página 5429
24. Ley 29/2006 de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE nº 178, de 27 de julio de 2006, página 28122.
25. Note for Guidance on Good Clinical Practice (CPMP/ICH/135/95) accessible en http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol3_en.htm.
26. EMEA/CHMP/SWP/28367/07 Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. 19 de juliol de 2007
27. CHMP/VWP/164653/2005 Note for Guidance on the Clinical Evaluation of Vaccines. 18 d'octubre de 2006
28. Tishler M, Shoenfeld Y. Vaccination may be associated with autoimmune diseases. *Isr Med Assoc J*. 2004; 6: 430-432.
29. Flynn J, Chan J, Triebold K, Dalton D, Stewart T, Bloom B. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*. 1993; 178(6):2249-54.
30. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:599-623.
31. Anzola S, Portabella E, Montane E, Lopez N, García F, Cardona PJ. Reacciones adversas en el lugar de la inyección de vacuna RUTI o placebo en voluntarios sanos: resultados preliminares. VIII jornadas de Farmacovigilancia. Murcia, maig de 2008. Pòster

32. Montané E, Vilaplana C, Barriocanal A, Anzola S, Portabella E, López N, García F, Pinto S, ferrándiz C, Ruiz-Manzano J, Cardona PJ, Costa J. Preliminary results of tolerability and immunogenicity of Ruti antituberculous vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase I trial. XXI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica. Barcelona octubre de 2008. Comunicació oral.
33. Vilaplana C, Pinto S, Ruiz J, Montane E, CostaJ, Cardona P. La vacuna terapéutica RUTI, segura e inmunogénica. Estudio de fase I, resultados preliminares. XII Congrés de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, maig de 2008.