



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

MVA85A: UN PUNTO DE INFLEXIÓN
EN LA INVESTIGACIÓN DE VACUNAS
CONTRA LA TUBERCULOSIS

MVA85A: A TURNING POINT IN THE
TUBERCULOSIS' VACCINE RESEARCH

Autor: Alicia Climente González

Director: Dr. D. Carlos Martín Montañés

Facultad de Medicina

Curso académico 2016/2017

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
2. Tuberculosis en cifras globales.....	5
3. El bacilo de <i>Calmette-Guérin</i> (BCG).....	8
3.1. La eficacia de BCG.....	8
3.2. Variabilidad en la respuesta.....	9
4. Ausencia de biomarcadores.....	11
5. La vacuna candidata MVA85A.....	12
5.1. Ensayos en animales.....	13
5.2. Un resultado inesperado	14
5.3. Nuevas incógnitas.....	16
5.4. Nuevas líneas de investigación.....	17
5.4.1. Papel de la enzima IDO.....	18
5.4.2. Inmunidad y riesgo de tuberculosis.....	18
5.4.3. Potenciación de MVA85A.....	19
5.4.3.1. El adyuvante IMX131.....	19
5.4.3.2. Asociación a otras vacunas.....	20
6. Las diferentes estrategias en el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis.....	21
6.1. Vacunas profilácticas.....	21
6.2. Vacunas terapéuticas.....	23
7. Esperanzas en nuevas candidatas.....	24
7.1. MVA85A en aerosol.....	24
7.2. MTBVAC.....	25
7.3. VPM1002 (rBCG).....	25
8. Conclusiones.....	26
9. Bibliografía.....	28

RESUMEN

Desde la sociedad actual la tuberculosis se presenta como un problema de interés mundial. El número de infectados y de muertos por la enfermedad no consigue mitigarse, principalmente porque la actual vacuna, BCG (Bacilo de *Calmette-Guérin*), muestra una gran variabilidad en su eficacia. Tras la revisión bibliográfica de las diferentes líneas de investigación centradas en una nueva vacuna contra la tuberculosis, se observó una fuerte inclinación hacia MVA85A en el año 2013. A pesar de mostrar dudosa eficacia en ensayos preclínicos, pasó a ser evaluada en ensayos clínicos. En adolescentes y adultos se obtuvieron resultados que invitaban al optimismo. Sin embargo, al ser probada en bebés de 4 a 6 meses de Sudáfrica, no mostró ser inmunogénica. Por este motivo, se abrieron diferentes frentes en la investigación que intentaban mejorar MVA85A y obtener la vacuna definitiva contra la tuberculosis (búsqueda de biomarcadores que explicaran una menor respuesta, adyuvantes, asociación a otras vacunas...), sin obtenerse hasta el momento resultados tangibles. Actualmente las esperanzas están depositadas en tres vacunas interesantes por su carácter innovador (MVA85A en aerosol, MTBVAC y VPM1002).

Palabras clave: Tuberculosis, BCG, MVA85A, ensayos clínicos.

ABSTRACT

In today's society, tuberculosis disease appears as a problem on a global scale. Nowadays tuberculosis cases and deaths are still increasing. Current vaccine BCG (Bacillus of Calmette-Guérin) shows wide variability in its efficacy. In the year 2013, an important inclination towards MVA85A took place after having all the bibliographic references from different researches with a focus in the new vaccine against tuberculosis. Despite of no significant results in preclinical essays, MVA85A was evaluated in clinical trials. In adolescents and in adults, rewarding results were obtained; nevertheless, results from clinical trials in babies of 4 to 6 months old of South Africa, did not prove its immunogenicity. For this very reason, different investigations started to look for an improvement for MVA85A, aiming for the desired vaccine against the tuberculosis (a search of biomarkers explaining lower responses, adjuvants, association to other vaccines...), without obtaining to the date results. Nowadays hopes are placed on three candidating vaccines because of their innovative character (MVA85A in aerosol spray, MTBVAC and VPM1002).

Key words: Tuberculosis, BCG, MVA85A, clinical trials.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, la cual es capaz de colonizar cualquier órgano del cuerpo humano. En su forma más típica afecta el pulmón, originando una tuberculosis pulmonar.

En la tuberculosis pulmonar, *M. tuberculosis* infecta a los macrófagos alveolares cuando intentan fagocitarlo. Gracias a su resistencia al principal mecanismo de defensa de los fagosomas, su pH ácido, es capaz de sobrevivir y proliferar en su interior. Así puede permanecer en el organismo de un humano durante toda su vida sin producir clínica de ningún tipo, siempre que la inmunidad del individuo funcione correctamente; esto es conocido como tuberculosis latente. Por el contrario, ante cualquier situación que afecte al estado inmunitario de una persona (inmunosupresión por alteraciones genéticas, malnutrición, fármacos, SIDA...), el bacilo puede propagarse por todo el pulmón e, incluso, por otros órganos del cuerpo (hígado, riñones, ganglios linfáticos, meninges...), produciendo clínica característica del lugar en el que se encuentre (meningitis tuberculosa, linfadenitis, tuberculosis renal...).

La infección tiene una mayor capacidad de progresión a enfermedad en los niños pequeños, dado que el germen encuentra un sistema inmunitario en desarrollo, por lo que es más frecuente la patología en su forma diseminada y en su forma meníngea.

OBJETIVO

En el presente trabajo se refleja un proceso documental basado en la producción científica existente, donde coexisten diferentes líneas de investigación centradas en la obtención de una nueva vacuna contra la tuberculosis, que sustituya a la actual o que consiga potenciar su inmunogenicidad. Tras la revisión bibliográfica se observa una fuerte inclinación hacia la MVA85A, que resultó no mostrar eficacia. Por ello la revisión incluye diferentes mejoras que se propusieron para esta vacuna, y otras vacunas que actualmente se encuentran en estudio.

METODOLOGÍA

La actualización del tema ha sido realizada mediante una revisión bibliográfica de las bases de datos científicas PubMed y MeSH. Con el fin de facilitar la tarea, se ha utilizado el buscador de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (“AlcorZe”).

La búsqueda se inició con las palabras clave “tuberculosis disease”, “MVA85A vaccine” y “tuberculosis vaccine clinical trials”. Entre los 51782 artículos que se incluían dentro del concepto “tuberculosis disease”, se seleccionaron 9. De los 88 artículos referentes a “MVA85A vaccine”, se eligieron 20. De los artículos referentes al concepto de “tuberculosis vaccine clinical trials”, se filtraron únicamente aquellos publicados en los últimos 5 años, obteniendo 88 en la búsqueda; de éstos se seleccionaron 9. Así, se utilizaron 38 fuentes, incluidas todas ellas en la bibliografía.

En consecuencia, es necesario señalar que en la búsqueda se ha acotado a los artículos publicados en revistas y libros médicos, en castellano e inglés, posteriores al año 2010.

2. TUBERCULOSIS EN CIFRAS GLOBALES

Se estima que actualmente existen entre 2.000 y 3.000 millones de personas infectadas por *M. tuberculosis* en el mundo (1). Sin embargo, tan solo un 5-15% de ellos desarrollarán la enfermedad a lo largo de su vida, coincidiendo con una situación de inmunosupresión. El 60% del total de afectados se concentra en países en vías de desarrollo (India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica) (1), lo que muestra una relación entre el desarrollo de la enfermedad y las condiciones socio-económicas [Figura 1].

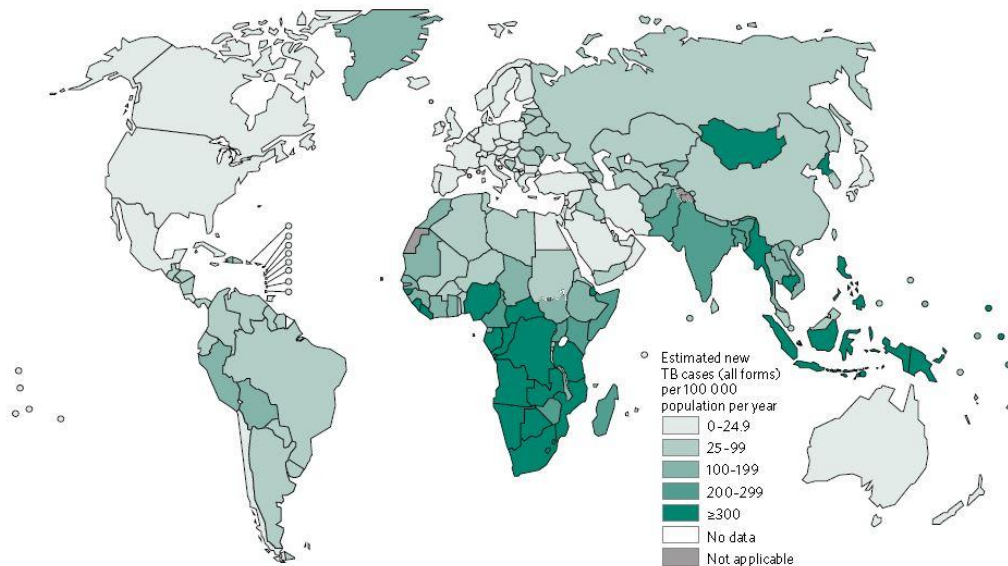


Figura 1. Distribución por países de la tuberculosis. Fuente: WHO global TB report 2016

A pesar de un diagnóstico precoz y de un tratamiento que ha mostrado ser eficaz, la enfermedad de la tuberculosis se encuentra entre las causas infecciosas más frecuentes de mortalidad, junto con el VIH y la malaria. Se calcula que el 70% de los enfermos en los que se detecta el bacilo en el esputo, moriría en un plazo de 10 años si no recibiera el adecuado tratamiento para la tuberculosis. De la misma forma, el 20% de aquellos que presentan un cultivo pulmonar positivo, pero esputo negativo, acabarían igualmente falleciendo en un plazo similar (1).

Sólo en 2015 se registraron 1,84 millones de muertes por la enfermedad. La mayoría de ellas se concentran en el Sudeste Asiático y varias regiones de África. A esta cifra se debe añadir el número de muertos VIH positivos (0,4 millones de personas) (1). También aparecieron 10,4 millones de casos nuevos, de los cuales 5,9 eran hombres; 3,5, mujeres; y 1, niños. Entre ellos se encontraban 1,2 pacientes VIH+ (1) [Figura 2].

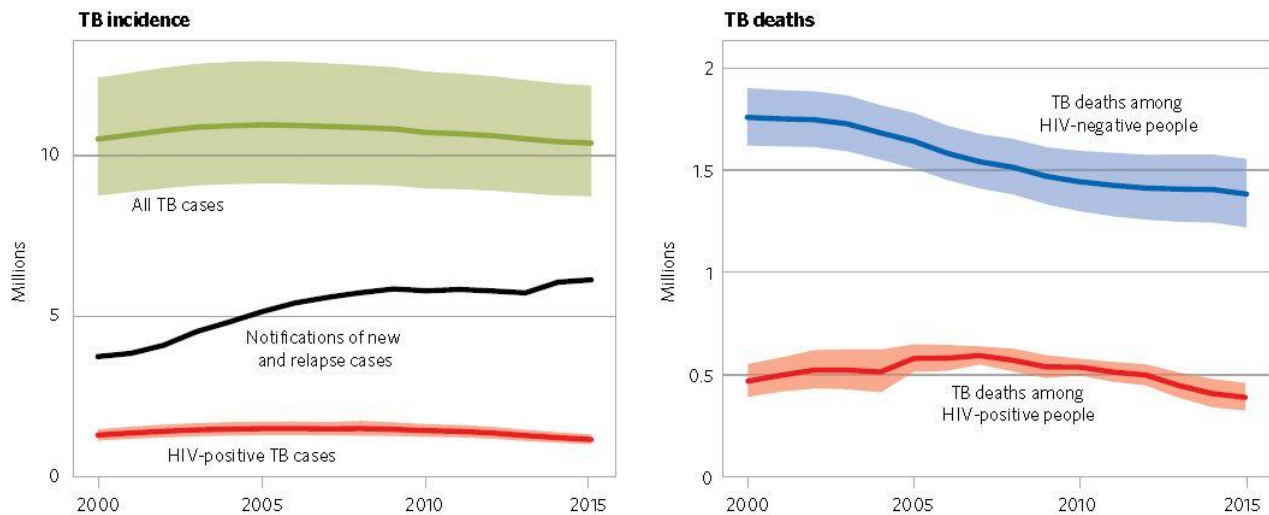


Figura 2. Cifras globales de tuberculosis entre 2000 y 2015. A la izquierda, incidencia de tuberculosis; a la derecha, muertes por la enfermedad. Fuente: informe WHO global TB report 2016

Dada la importancia de esta enfermedad a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con el apoyo de otras organizaciones, puso en marcha tres estrategias de salud pública: *DOTS* (*Directly Observed Treatment, Short Course*; 1993), *Stop TB strategy* (2006) y *The End - TB strategy* (2015). Las diferentes campañas tienen como propósito para el año 2035 la reducción del 90% tanto de las muertes por tuberculosis como de las infecciones por el bacilo, tomando como referencia los datos del 2015; también tienen como objetivo la reducción a cero del número de familias que se enfrentan a elevados costes a causa de la enfermedad, prácticamente impagables para ellos (2). Para lograrlo, pretenden mejorar la atención y la prevención centradas en el paciente, implantar políticas y sistemas de apoyo eficaces e intensificar la investigación de nuevas vacunas y antibióticos.

El éxito de estos proyectos se encontró con dos dificultades: la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la aparición de resistencias a los fármacos antituberculosos (3). Las claves para lograr estos propósitos se esconden en un diagnóstico más rápido, un tratamiento efectivo y la mejora de las condiciones socioeconómicas en los países de mayor incidencia.

Es especialmente interesante desarrollar una nueva vacuna, que sustituya a la actual BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), que sea efectiva en todos los individuos y supere todas las carencias de ésta. Una vacunación eficaz es la única medida costo-efectiva que permite alcanzar un control a largo plazo de cualquier enfermedad epidémica.

3. EL BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)

La BCG es una vacuna viva atenuada obtenida a partir de *Mycobacterium bovis*, desarrollada entre 1908 y 1921. La atenuación consiste principalmente en la pérdida de la región cromosómica de diferenciación 1 (RD1), que conlleva la desaparición del factor de virulencia ESAT-6 (*Early Secretory Antigen of 6kDa*). Es actualmente la única aceptada en la prevención de la enfermedad en seres humanos. Por ello, a partir de 1974, la OMS la incluyó en un amplio programa de vacunación al nacimiento, responsable de 100 millones de vacunas al año en todo el mundo. Se administra en niños y en adultos de alto riesgo. Está considerada la vacuna más utilizada a nivel mundial, así como una de las más seguras.

3.1. LA EFICACIA DE BCG

BCG presenta una serie de inconvenientes que se desarrollan a continuación. La actual vacuna solo ha demostrado ser eficaz contra la infección en países con baja prevalencia de tuberculosis, ya que en aquellos lugares en los que la enfermedad es endémica, la incidencia sigue aumentando a pesar de la administración.

BCG no protege de la tuberculosis pulmonar. Administrada en niños, la vacuna previene de las formas más graves de la enfermedad (tuberculosis meníngea y tuberculosis miliar). Sin embargo, los diferentes ensayos muestran una eficacia muy variable en cuanto a la profilaxis de la tuberculosis en su forma pulmonar (4). Esto constituye un hándicap importante, ya que la enfermedad pulmonar supone una forma de propagación altamente eficaz: de media, cada persona infectada puede transmitir la infección a lo largo de su vida a otras 15 más (5).

Por otro lado, no proporciona inmunidad a largo plazo, ya que se observa una disminución de la protección según aumenta la edad del individuo. La revacunación con BCG en estos casos resulta ineficaz.

Por último, la vacuna está contraindicada en personas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) dado el riesgo de diseminación del bacilo por el organismo, lo que crea cierta inquietud por obtener una vacuna que pueda ser administrada en estos individuos.

3.2. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA

La importancia de que una vacuna no presente variabilidad en su respuesta reside en la posibilidad de usarla en cualquier población con total confianza con respecto a su protección. La respuesta frente a BCG muestra diferentes resultados dependiendo de la población en la que es administrada. Entre los factores que se han propuesto implicados en esta discordancia destacan:

- La respuesta a la prueba cutánea de sensibilidad a la tuberculina
- La latitud del país de residencia
- La edad de vacunación
- La interferencia de una coinfección parasitaria
- La cepa de BCG utilizada

La vacunación ha mostrado una mayor eficacia en recién nacidos, en aquellos niños que presentan una reacción negativa a la inyección de PPD (derivado proteico purificado) y en aquellos que residen en países alejados del Ecuador (evidencia de mayor eficacia en países situados a más de 40° de latitud) (6).

La influencia de la latitud en la respuesta a la vacuna podría deberse a que una proximidad al Ecuador se relaciona con una mayor presencia de micobacterias en el medioambiente. Sin embargo, otras investigaciones atribuirían este hecho a otras razones, con menor evidencia científica (6): diferencias genéticas entre los seres humanos, diferencias en el genotipo de las micobacterias, situación geográfica del país (la intensidad de la luz ultravioleta, podría incidir en los mecanismos de infección de la bacteria; y los niveles de vitamina D según la

exposición solar) o situación económica (la influencia de la desnutrición en la respuesta inmune).

También se postula que la incongruencia en la respuesta podría tener relación con el proceso de obtención de la vacuna. Al atenuar el bacilo en sus sucesivos cultivos, la pérdida de los factores de virulencia podría explicar su baja eficacia, ya que éstos son antígenos capaces de estimular de forma muy potente al sistema inmune. Por otro lado, a mediados del siglo XX, tras la aparición de BCG, múltiples laboratorios trabajaron en la obtención de la vacuna de manera similar a la original, lo que originó la aparición de variantes que pueden tener diferentes tasas de éxito.

Existen diferentes hipótesis que intentan explicar la importancia de un contacto previo con micobacterias no tuberculosas en la respuesta inmunitaria frente a la BCG (7). Se basan en la presencia de antígenos comunes tanto en *M. tuberculosis* como en otras micobacterias del entorno, que generarían una respuesta de inmunidad cruzada. Principalmente se han descrito dos:

- La hipótesis del enmascaramiento defiende que una exposición previa a micobacterias podría conferir una leve inmunidad a la tuberculosis donde la vacunación posterior con BCG ofrecería una limitada protección añadida.
- La hipótesis del bloqueo postula que un previo contacto con micobacterias ambientales produciría una respuesta inmune que bloquearía la asimilación de la posterior vacuna por el huésped.

La influencia de estas 2 hipótesis se llevó a estudio, en el denominado BCG-REVAC, que comparaba la eficacia de la vacunación con BCG en 2 ciudades brasileñas, las cuales tenían una misma latitud (8). Sin embargo, se creía en la disminución de la eficacia a la vacunación con BCG predominaba un mecanismo frente a otro, diferente en cada ciudad. Eso las convertía en idóneas para comprobar la validez de ambas hipótesis.

Este estudio concluyó que el enmascaramiento por sí solo (o incluso asociado a bloqueo) no es un mecanismo que explique la ineficacia de la vacuna. Por el contrario, sí que podría justificarse por el bloqueo. Se desconoce si el mecanismo de bloqueo funciona igual en individuos previamente vacunados con

BCG (en los que se realizaba la revacunación) que en individuos no vacunados (sensibilizados a micobacterias medioambientales).

Sin embargo BCG-REVAC consideraba que en su evaluación podrían haber interferido otros factores, como la producción, administración y cepa empleada de la vacuna.

Este estudio únicamente evaluaba el desarrollo posterior de la enfermedad, no de la infección. Por este motivo, se desconoce si el mecanismo de bloqueo interviene en el papel de la vacuna de evitar la infección o en el de evitar la progresión de infección a enfermedad.

Con respecto a la investigación en vacunas frente a la tuberculosis, este estudio es relevante al plantear una posible variable a tener en cuenta en el diseño de ensayos clínicos. Sin duda la población ideal en la que probar nuevas vacunas es aquella que nunca ha tenido contacto con micobacterias ambientales.

4. AUSENCIA DE BIOMARCADORES

Una de las principales dificultades que presenta la investigación en vacunas contra la tuberculosis, es que no se dispone de un biomarcador ideal que permita conocer si existe una sensibilización frente a la infección o frente a la enfermedad (9).

Tal biomarcador puede tratarse ser un gen, un proceso biológico o un fenotipo clínico que nos indique que la interacción huésped-patógeno está teniendo lugar de manera correcta.

Hasta ahora se había pensado en el interferón gamma (IFN- γ) para comprobar la eficacia de la vacunación contra la tuberculosis. Se trata de una citoquina liberada en grandes cantidades por las células T cuando se estimula el sistema inmune. No se degrada fácilmente en los cultivos o cuando se almacena, lo que facilita su detección por ELISA o ELISpot (*Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*). Sin embargo, en ensayos clínicos recientes se ha observado que la medida de este parámetro no se corresponde con protección frente a la tuberculosis. Incluso la cuantificación de células T secretoras tanto de IFN- γ como de otras

moléculas como factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleucina 2 (IL-2) no se ha logrado correlacionar con la eficacia de una vacuna (6).

Por tanto, es necesario obtener nuevas herramientas que permitan evaluar la eficacia de nuevas vacunas. Por ello se debe profundizar en el conocimiento de los mecanismos de patogénesis e inmunidad de *M. tuberculosis*. La cuantificación de la inhibición del crecimiento micobacteriano en los reservorios del patógeno o el análisis de la expresión de genes del huésped por microarrays o RNA-Seq, que posibilitan la obtención de perfiles de expresión génica frente a la respuesta inmune, son posibles métodos actualmente en estudio (10,11).

5. LA VACUNA CANDIDATA MVA85A

MVA85A se encontraba entre las vacunas más prometedoras y avanzadas entorno al año 2013. Fue desarrollada por la Universidad de Oxford y financiada por Aeras, el Wellcome Trust y el Consorcio de Oxford de Tuberculosis Emergente (OETC). La vacuna utiliza como vector el virus de la vacuna Modificado de Ankara (MVA) que pertenece a la familia *Poxviridae*. El virus incluye el gen que codifica el antígeno conservado 85A de *M. tuberculosis* [Figura 3]. Se ha desarrollado para potenciar la inmunogenicidad de la actual vacuna. El fundamento de elegir el antígeno 85 A de *M. tuberculosis* reside en que el complejo antigénico 85 tiene una fuerte inmunogenicidad, estimulando la producción tanto de anticuerpos como de moléculas dependientes del linfocito T. Este complejo está formado por los antígenos 85 A, 85 B y 85 C. Parece tener gran importancia en la fisiología de la micobacteria y en la interacción con el huésped (12).

Se han llevado a cabo ensayos clínicos en fase I y II en adultos (incluidos individuos VIH+) y adolescentes en Reino Unido, Gambia, Sudáfrica y Senegal. Éstos han mostrado una buena tolerancia de la vacuna, además de una robusta respuesta de células T CD4⁺ específica del antígeno 85A (13, 14, 15). Esta respuesta linfocitaria T es polifuncional, generando un estímulo del tipo Th1 y Th17. Entre las citoquinas generadas por linfocitos Th1 IFN γ , IL-2 y TNF α . La respuesta de linfocitos CD8⁺ es demasiado baja como para poder caracterizarse (13).

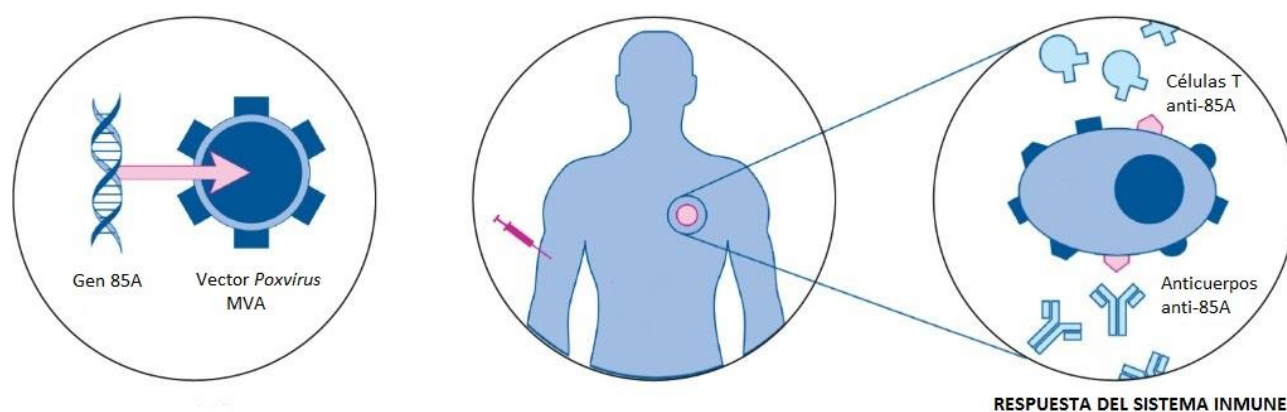


Figura 3

5.1. ENSAYOS EN ANIMALES

Los ensayos en animales con MVA85A fueron llevados a cabo en ratones, vacas y cobayas, que presentan lesiones pulmonares y extrapulmonares similares a las halladas en seres humanos. También en primates no humanos, los más semejantes a humanos en la evaluación de la seguridad, inmunogenicidad y protección de las vacunas, ya que son susceptibles a la infección por *M. tuberculosis*. Las vacunas fueron administradas de forma intradérmica, intravenosa e intranasal.

Entre sus objetivos se encontraba la evaluación del porcentaje de muertes (incluyendo aquellos obligados a morir por su elevada morbilidad) y de enfermos en la forma pulmonar, además se mediría la reserva pulmonar del bacilo, expresada en unidades formadoras de colonias. En estos ensayos no se encontró evidencia de eficacia como potenciador de la inmunidad de la BCG (16). No se evidenció diferencia entre la inmunidad desarrollada en aquellos vacunados con BCG/MVA85A y aquellos con BCG solamente. En general, la vacunación potenciada con MVA85A resultaba estadísticamente significativa en 4 de 8 parámetros medidos, mientras que BCG sola, en 1 de 8 únicamente (17).

La modesta mejora de MVA85A con respecto a BCG se suele atribuir a una disminución de la carga bacteriana, no a una desaparición del bacilo atribuible a la inmunidad desarrollada.

Existen varias razones por las que no se encontró suficiente evidencia de la eficacia de MVA85A en animales. En humanos, los ensayos clínicos se llevan a

cabo en individuos de todas las edades, mientras que en animales no suelen existir modelos neonatales. Por otro lado muchos factores que intervienen en la respuesta a las vacunas, como la exposición a bacterias o a helmintos, la dieta o la susceptibilidad genética, no se tienen en cuenta en el laboratorio, donde todas las variables externas están controladas. Además la infección en humanos se produce con mayor probabilidad por una exposición repetida al bacilo, que se encuentra en cantidades relativamente bajas. En el laboratorio los animales son sometidos a un único contacto con el microorganismo en elevadas concentraciones. Dharmadhikari et al propusieron la inhalación en cobayas de aire extraído de una sala de pacientes tuberculosos, intentando emular el ambiente en el que se produce la infección en seres humanos (18). Por otro lado, la infección en fases avanzadas es un requerimiento obligado en los ensayos con animales. En humanos no se percibe el desarrollo de la enfermedad en su forma severa, ya que se lleva un estrecho seguimiento para impedir un fatal desenlace. Por último la ausencia de un biomarcador de protección en animales, que nos indique la existencia de infección, es un hándicap en estos ensayos. Al contrario que en otras vacunas, no se ha encontrado un parámetro en animales que nos muestre una activación de la respuesta inmune innata. Por lo tanto, no hay distinción en animales entre enfermedad latente y enfermedad activa, lo que aleja estos modelos de la situación real.

Hasta la fecha los ensayos en animales han mostrado una disminución de la progresión de la enfermedad (16), pero ninguna ha logrado una prevención de la tuberculosis.

Por ello existe un interés por mejorar los criterios de selección y los métodos llevados a cabo en los ensayos con animales. Una vacuna que muestre datos firmes e invariables en varias especies animales va a tener mayor probabilidad de tener éxito en humanos.

5.2. UN RESULTADO INESPERADO

El 15 de julio del 2009 se inició la fase IIb del ensayo clínico con MVA85A en Sudáfrica (región de Ciudad del Cabo), que se extendería hasta el 4 de mayo del

2011 (19) (ClinicalTrial.gov Identifier: NCT00953927). Sus principales objetivos eran probar su seguridad e inmunogenicidad.

En ella participaron 4.754 niños - de entre 4 y 6 meses- y vacunados con BCG al nacer, a los que se hizo un seguimiento durante 2-3 años. Los criterios de inclusión comprendían: negatividad VIH, no exposición a VIH, ausencia de enfermedad activa o crónica y no convivencia con adultos enfermos de tuberculosis activa. De éstos, solo entraron en el ensayo 2.797 recién nacidos: a 1.398 se les administró placebo (el antígeno de *Cándida* utilizado en el test cutáneo) y a 1.399 se les administró la vacuna MVA85A.

El estudio demostró una buena tolerancia a la vacuna, ya que no se relataron efectos adversos graves relacionados con MVA85A. Además se detectó una respuesta celular tipo T dirigida contra el antígeno 85A mediante IFN γ ELISpot. Se observó que MVA85A inducía la aparición de linfocitos T CD4⁺ secretores de IFN γ , TNF α e IL-2, y la de otros CD4⁺ igualmente que expresaban IL-17. Sin embargo, el estímulo de las poblaciones CD4⁺ de linfocitos T no se correlacionaba con una protección de la enfermedad tuberculosa ni de la infección por *M. tuberculosis*. Además la proporción de linfocitos Th1 detectada en niños fue diez veces menor que la observada en adultos y adolescentes en otro estudio previo desarrollado en Reino Unido. Tampoco indujo ninguna forma de respuesta linfocitaria tipo CD8⁺ (19).

Por ello se concluyó que la vacuna inducía en niños una modesta respuesta inmune, insuficiente para asegurar la protección. El estímulo de las poblaciones CD4⁺ de linfocitos T no se correlacionaba con una protección de la enfermedad tuberculosa ni de la infección por *M. tuberculosis*.

En el seguimiento a los 2 años de las poblaciones, el porcentaje de eficacia a largo plazo fue similar en ambos grupos. Además la proporción de niños que desarrollaron tuberculosis fue similar en el grupo vacunado y en el grupo placebo: de los que recibieron el placebo, 39 niños padecieron tuberculosis (cultivo bacteriano positivo o detección de ADN de *M. tuberculosis*); y de los que recibieron la vacuna, 32 niños (19).

5.3. NUEVAS INCÓGNITAS

La importancia de esta vacuna reside en haber sido la primera que emplea un virus de la vacuna como vector en llegar a una fase IIb de un ensayo clínico, lo cual generó muchas expectativas. A pesar de su fracaso, ha abierto una serie de interrogantes que pueden ayudar a hallar métodos de análisis de la eficacia de otras nuevas vacunas en desarrollo.

La principal causa de falta de respuesta en niños se atribuye a la inmadurez de su sistema inmune (20). La producción de linfocitos T específicos del antígeno 85A son abismalmente superiores en adultos y adolescentes revacunados con MVA85A, lo que apoya la teoría. Podría ser necesario un sistema inmune en óptimas condiciones de funcionamiento para obtener una respuesta protectora de la vacuna. Esto abre cierto interés en conocer cómo funciona la vacuna en aquellos individuos infectados por el VIH. De hecho, en la revisión 6 años después de los individuos vacunados con MVA85A tras BCG en 2005, se observó que la cantidad de linfocitos T CD4⁺ específicos del antígeno MVA85A continuaba siendo importante. Por el contrario, en pacientes VIH⁺ que no habían recibido tratamiento, estas cifras se hacían indetectables a los 3-5 años (21). Estos resultados sugerían la importancia de un funcionamiento óptimo del sistema inmune, lo que apoyaría la teoría de que la inmadurez del sistema infantil interfiere en la eficacia de la vacuna.

Un ensayo en fase IIa llevado a cabo en 2015 en individuos VIH⁺ en Sudáfrica y Senegal, aseguró que MVA85A era segura en estos pacientes (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01151189). Se observó que tras la vacunación se producía un estímulo del sistema inmune. Sin embargo, esta respuesta liderada por linfocitos T CD4⁺ era de tipo monofuncional, lo que podría explicar la ausencia de evidencia de protección contra la tuberculosis en este estudio (22).

También se observó que las células CD4⁺ a nivel central expresaban CCR7 en altas cantidades, molécula de membrana que dota a las células de memoria de la capacidad de *homing* en los nódulos linfáticos (20). Por el contrario, las células de memoria efectoras carecen de este receptor de membrana, ya que lo pierden al migrar a los lugares de infección. En los adultos y en los adolescentes, predominaba el fenotipo linfocitario CCR7⁺/CD45RA, mientras que en los niños, lo hacía CCR7⁻/CD45RA (21). Una interesante propuesta de vacunación ha sido la estimulación

antigénica crónica, que produciría un mantenimiento de las células de memoria efectoras. Se ha postulado que las células efectoras confieren una mejor protección contra la infección de *M. tuberculosis* que las células de memoria centrales.

A pesar de los resultados desesperanzadores en cuanto a la eficacia de la vacuna, el ensayo clínico situó al MVA en el punto de mira para el desarrollo de vacunas en niños, dada su seguridad demostrada. Y, quizá más importante, el hallazgo abrió una batería de preguntas que motivan al grupo a seguir investigando el funcionamiento de la vacuna y a mejorarla para explotar todas sus posibilidades.

Entre ellos se encuentra si la vacuna MVA85A podría funcionar por sí misma, sin una previa vacunación de BCG que hubiera bloqueado su funcionamiento con el previo desarrollo de inmunidad. Relacionado con esto está la cuestión de qué resultados se obtendrían si la población a estudiar perteneciera a un país con menor incidencia de la enfermedad. Podría deberse a una erradicación eficaz de *M. tuberculosis* autóctona de Western Cape por la vacunación con BCG, que no requeriría una potenciación con MVA85A.

Por otro lado, los niños no son los principales responsables de la transmisión de la enfermedad tuberculosa, por lo que podría ser importante, aunque no suficiente, demostrar la protección contra la forma pulmonar en adolescentes y adultos.

Finalmente el estudio invita a plantearse si la vacuna es realmente inmunogénica. A pesar de generar una leve estimulación de los linfocitos Th1 y Th17, la vacuna no mostró adecuada protección frente a la infección o a la enfermedad tuberculosa. Esta paradoja podría explicarse como la inexistencia de un método admitido que permita correlacionar parámetros inmunitarios con una protección de una vacuna antituberculosa.

5.4. NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

El fracaso de MVA85A en la fase IIb del ensayo clínico en niños de Sudáfrica generó una necesidad de investigar el mecanismo de funcionamiento de MVA85A para intentar mejorarlo y explotar todo su potencial antes de abandonar esta línea de investigación.

5.4.1. PAPEL DE LA ENZIMA IDO

La búsqueda de un parámetro capaz de explicar la variabilidad en la respuesta a MVA85A en individuos de Sudáfrica y de Reino Unido se convirtió en un objetivo perseguido por muchos grupos de investigación.

En 2014 se analizaron las muestras de sangre recogidas durante los ensayos clínicos en fase I realizados en Sudáfrica y en Reino Unido, con el fin de buscar una correlación entre la actividad de la indolamina 2,3-desoxidrogenasa (IDO) y la inmunogenicidad de la vacuna. Esta enzima se encarga de la degradación de triptófano, aminoácido esencial del cual dependen los linfocitos T. Además está implicada en la inducción de apoptosis, proliferación de linfocitos T reguladores e inhibición de células Natural Killer. Por esta razón la actividad de IDO impide la proliferación de los linfocitos T, pudiendo interferir en el desarrollo de una respuesta inmune tras la vacunación con MVA85A.

Aunque no se observaron cambios en la actividad de la enzima tras la vacunación con MVA85A en ninguna de las dos poblaciones, sí se registraron mayores niveles basales de IDO en los individuos de Sudáfrica que en aquellos de Reino Unido. Los datos obtenidos concuerdan con ensayos clínicos previos, en los que se observó una mayor respuesta a MVA85A en individuos británicos que en sudafricanos. Se especula que la actividad de IDO podría impedir la formación de células T de memoria, impidiendo el desarrollo de una inmunidad a largo plazo contra la tuberculosis. Estos resultados podrían tenerse en consideración en la eficacia en la vacuna en ensayos clínicos posteriores (23).

5.4.2. INMUNIDAD Y RIESGO DE TUBERCULOSIS

En 2015, Fletcher et al decidieron estudiar el comportamiento del sistema inmune tras la vacunación con BCG, buscando una correlación con el riesgo de desarrollar la enfermedad tuberculosa (24). Al analizar muestras de sangre de niños vacunados con BCG al nacimiento y posteriormente con MVA85A, se encontró que una mayor proporción de linfocitos T HLA-DR4⁺ CD4⁺ activados detectados en el día 7 post-vacunación se correlacionaba con un mayor riesgo de padecer tuberculosis. Por otro lado, la detección de una mayor cantidad de linfocitos T BCG-

específicos productores de IFN γ se correlacionaba con una menor probabilidad de desarrollar la enfermedad. Además la detección el día 28 post-vacunación de anticuerpos IgG específicos del antígeno 85A se relacionaba con un menor riesgo de enfermar.

Por otro lado, recientemente Andrews et al han llevado a cabo un estudio en el que pretendían correlacionar la respuesta a IGRa con el riesgo de desarrollar la enfermedad tuberculosa, utilizando los sujetos que habían participado en la fase IIb del ensayo clínico. En aquellos individuos en los que se apreciaba una alta respuesta a QuantiFERON TB-Gold In-Tube, se observaba igualmente una mayor incidencia de tuberculosis (25).

La importancia de estos hallazgos se encuentra en que una prevención precoz y un seguimiento en profundidad de los individuos con este perfil de respuesta podrían evitar un alto número de casos nuevos.

5.4.3. POTENCIACIÓN DE MVA85A

5.4.3.1. EL ADYUVANTE IMX131

IMX131 es una proteína de pequeño tamaño formada por 7 cadenas idénticas, semejante a una nanopartícula. Se obtiene partir del dominio de oligomerización de la proteína de unión de la subunidad C4b del complemento de pollo (C4bp). Al unirse con proteínas antigénicas ha mostrado un aumento de la producción de anticuerpos dirigidos contra éstos. Recientemente se ha utilizado unida a Pfs25 en ensayos clínicos de la vacuna contra la malaria, mostrando resultados muy satisfactorios (26). Por todo ello, se decidió probar su efecto adyuvante junto a MVA85A. En ensayos clínicos con ratones y primates, demostró un aumento de su inmunogenicidad, lo que le introdujo por primera vez en ensayos clínicos en humanos. En la fase I de un ensayo clínico realizado entre julio de 2013 y julio de 2014, se vacunó con MVA85A-IMX131 a adultos de Reino Unido previamente vacunados con BCG (27) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01879163). Los resultados se compararon con otro grupo que recibió únicamente MVA85A. Se logró mostrar su seguridad, dado que no se detectaron efectos adversos graves

atribuibles a la vacuna, además de que la proporción de efectos adversos leves era similar a la de MVA85A únicamente.

Con respecto a la inmunogenicidad, no se encontraron diferencias entre las dos vacunas. No se obtuvieron variantes significativas en la estimulación de poblaciones linfocitarias y en la producción de anticuerpos. La discordancia con las pruebas en modelos animales puede deberse a que en éstos se requería una segunda dosis de la vacuna unida al adyuvante para obtener una mayor respuesta que MVA85A.

A pesar de no mostrar ventaja frente a MVA85A, IXM131 abrió una nueva línea a investigar en la potenciación de la eficacia de esta vacuna.

5.4.3.2. ASOCIACIÓN A OTRAS VACUNAS

Dado que MVA85A es capaz de estimular de manera eficaz la población de linfocitos T CD4⁺, pero no la de CD8⁺, se propuso la asociación de la vacuna junto con otras que sí sean capaces de fomentar la respuesta tipo CD8. Los virus de la familia *Poxviridae* y aquellos de la familia *Adenoviridae* han mostrado generar un potente estímulo de los linfocitos T CD8⁺, por lo que se han situado en el punto de mira en la potenciación de MVA85A.

Basándose en los resultados de ensayos clínicos de vacunas candidatas contra la malaria, se planteó la asociación de MVA85A a la vacuna *Fowlpox virus* (FP9). Ésta es obtenida igualmente a partir de un *Poxvirus* recombinado. Se integró en su genoma el gen del antígeno 85A, denominándose así FP85A.

En ensayos preclínicos FP85A mostró una protección mayor en cobayas al administrarse tras BCG y MVA85A, que en aquellos vacunados solamente con BCG.

Entre 2007 y 2009 se realizó un ensayo clínico en fase I para probar su seguridad e inmunogenicidad (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00653770). Se administró FP9 tanto sola, como asociada a MVA85A, en individuos que previamente había recibido BCG.

A pesar de no provocar una mayor tasa de efectos adversos locales o sistémicos que la administración de BCG sola, no mostró una mayor respuesta celular específica del antígeno 85A. Una posible explicación de este hecho podría ser la producción de anticuerpos IgG por reacción cruzada tras la vacunación con FP9, que reaccionarían contra antígenos de MVA85A tras su inoculación (28).

Entre 2007 y 2009 se probó la asociación de MVA85A a otra vacuna candidata contra la tuberculosis, ChadOx1.85A. Ésta utiliza un *adenovirus* como vector, ChadOx1, modificado para expresar el antígeno 85A. Los resultados mostraban que la producción de IFN γ era mayor en aquellos vacunados con ChadOx1.85A únicamente o con ChadOx1.85A seguido de MVA85A que en aquellos con ChadOx1.85A seguido de MVA85A (29). A pesar de no obtener datos gratificantes sobre la potenciación de MVA85A, se dejó abierta una nueva línea de investigación sobre la posibilidad de aumentar la eficacia de BCG con una posterior vacunación de las 2 candidatas citadas.

6. LAS DIFERENTES ESTRATEGIAS EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

Actualmente existen 13 vacunas en ensayo clínico en diferentes fases [Figura 4]. La investigación en vacunas tiene dos vertientes: la prevención de las enfermedades y su tratamiento.

6.1. VACUNAS PROFILÁCTICAS

Las vacunas profilácticas pueden tener diferente objetivo en función de la población diana: preexposición, en aquellos individuos en los que se pretende prevenir la infección (mayoritariamente recién nacidos), o postexposición, en aquellos infectados en los que se pretende evitar la progresión de la infección (adolescentes y adultos). Se distinguen dos estrategias en esta línea de investigación:

1. La revacunación. Su objetivo es reforzar la inmunogenicidad de la actual BCG en adolescentes y adultos, prolongándola y aumentándola. Puede constar de antígenos de *M. tuberculosis* unidos a un adyuvante que estimula

la presentación antigénica por parte del macrófago o puede introducirse un gen que codifica un antígeno de *M. tuberculosis* en el genoma de un virus, el cual actúa como vector. Las vacunas que están actualmente en ensayo clínico y siguen esta táctica son:

- MVA85A en aerosol (universidad de Oxford): utiliza el Virus de Ankara Modificado como vector para la producción del antígeno 85A de *M. tuberculosis*, administrado por vía inhalatoria.
- Crucell Ad35: se compone de los antígenos 85A, 85B y TB10.4 de *M. tuberculosis*, expresados a través del *Adenovirus* serotipo 35.
- H4:IC31 y H56:IC31 (Statens Serum Institute y Aeras): incorporan la fusión de diferentes antígenos de *M. tuberculosis*, asociados al adyuvante IC31.
- ID93 + GLA-SE (Infectious Disease Research Institute, Wellcome Trust y Aeras): fusiona los antígenos Rv2608, Rv3619, Rv3620 y Rv1813, con el adyuvante GLA-SE.
- M72+AS01E (GlaxoSmithKline y Aeras): incorpora la proteína de fusión Mtb72F (antígenos 32A y 39A de *M. tuberculosis*), con el adyuvante AS01E.

2. El reemplazo. Las vacunas vivas pretenden reemplazar a la actual vacuna BCG. Deberían ser administradas al nacimiento. Se diferencian dos tipos en cuanto a su funcionamiento:

- a. Vacunas recombinantes. Se basan en la incorporación de genes que aumentan la producción antigénica o de genes de otra bacteria en el genoma del Bacilo de Camette-Guérin. Siguiendo esta línea se encuentran:
 - VPM1002 (Instituto Max Planck)
- b. Vacunas atenuadas. Se basan en la inactivación de los genes responsables de la virulencia de *M. tuberculosis*. La principal ventaja que presentan es la conservación de genes que codifican antígenos inmunodominantes ausentes en la actual BCG.
 - MTBVAC (Universidad de Zaragoza, Instituto Pasteur, Biofabri y TB Vaccine Initiative)

6.2. VACUNAS TERAPÉUTICAS

Las vacunas terapéuticas pretenden estimular el sistema inmune de la persona infectada con el fin de disminuir el tiempo de tratamiento y de reducir el volumen de reservorio en el organismo del enfermo. De esta forma, impiden la progresión de la enfermedad o su reactivación. Necesitan asociarse con antibióticos o con inmunoterapia. Las principales dificultades para su desarrollo son la necesidad de laboratorios con un estricto control biológico al transmitirse la micobacteria por el medio aéreo y el lento crecimiento en los cultivos.

Las vacunas que buscan este objetivo y se encuentran en estudio clínico actualmente son:

- RUTI (Archivel pharma): consta de fragmentos muy pequeños y detoxificados de *M. tuberculosis*. Se acompaña de un intenso tratamiento con fármacos antituberculosos.
- Vaccae (Anhui Zhifei Longcom Biologic Pharmacy Co.): se compone del organismo *M. vaccae*, una micobacteria con baja patogenicidad que comparte una amplia gama de genes con *M. tuberculosis*, como las proteínas de choque térmico.

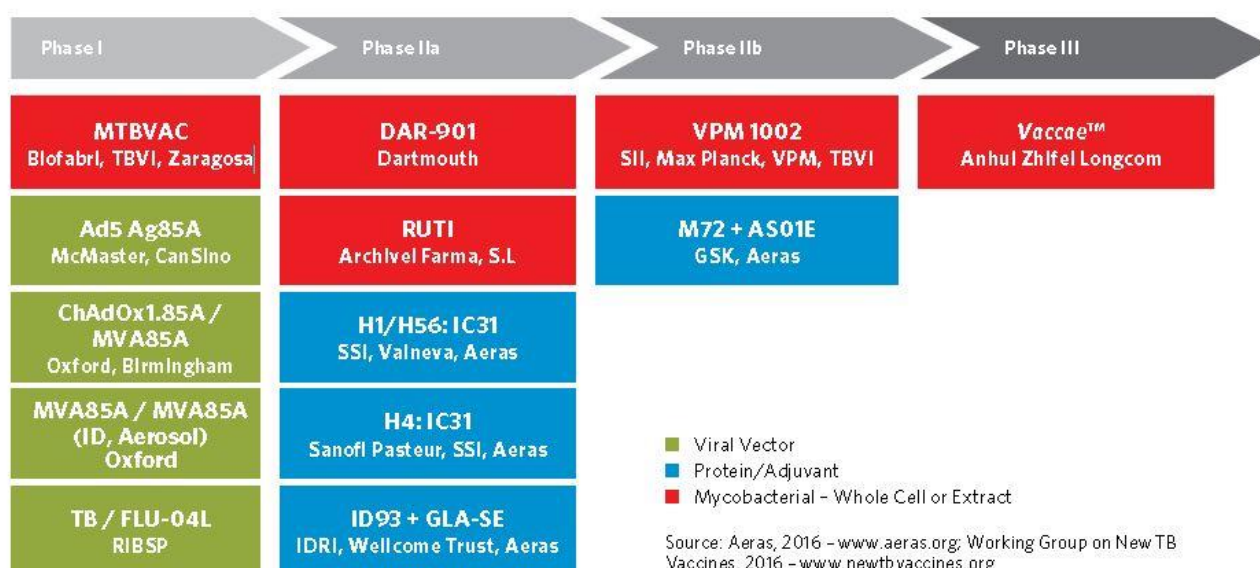


Figura 4. Situación actual de la investigación en vacunas contra la tuberculosis. Fuente: WHO global TB report 2016

7. ESPERANZAS EN NUEVAS CANDIDATAS

A pesar de encontrar actualmente 13 vacunas en ensayos clínicos, cabe destacar el funcionamiento en 3 de ellas, por haber mostrado hasta el momento resultados muy prometedores.

7.1. MVA85A EN AEROSOL

Los resultados obtenidos en niños con MVA85A invitaron a replantearse si el estímulo del sistema inmune generado por la vacunación intradérmica es suficiente para generar una protección duradera contra la tuberculosis. Induce una respuesta potente a nivel periférico, pero la respuesta a nivel de las mucosas (tejido linfoide asociado a mucosas) no ha sido evaluada todavía. Dado que la vía inhalatoria es la puerta de entrada del germen, la potenciación de la inmunidad en el lugar primario de infección puede implicar una mayor protección contra la patología. Al optimizar la respuesta inmune a nivel pulmonar, se podría prevenir la instauración de la infección a este nivel (30). Por ello, la universidad de Oxford ha desarrollado también la vacuna MVA85A en administración por nebulizador.

A pesar de unos resultados dudosos en ensayos animales (31, 32), pasó a la fase I de ensayos clínicos, mostrando seguridad e inmunogenicidad en 24 adultos previamente vacunados con BCG de Reino Unido (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01497769). Parece proporcionar una mayor respuesta de los linfocitos T CD4⁺ MVA85A específicos que la vacuna en su forma intradérmica, al igual que una mayor detección de éstos en el lavado broncoalveolar. La respuesta celular tipo CD8⁺ no mostró diferencias entre ambos grupos. Por el contrario, la formación de anticuerpos específicos únicamente fue detectada en el suero de aquellos con administración intradérmica (33).

Aunque podría encontrarse lejos de una vacunación eficaz y duradera contra la tuberculosis, la potenciación de la inmunidad en los pulmones ha ofrecido resultados esperanzadores que animan a seguir investigando el mecanismo de funcionamiento de la vacuna.

7.2. MTBVAC

Es una vacuna desarrollada por la Universidad de Zaragoza, el Instituto Pasteur, la empresa farmacéutica Biofabri y TB Vaccine Initiative. Se trata de la primera vacuna viva atenuada que llega a ser probada en ensayos clínicos. Se obtiene a partir de la cepa MT103 de *M. tuberculosis*, delecionando de su genoma dos genes que codifican para factores esenciales para la virulencia del bacilo: *phoP* y *fadD26* (34, 35). La inactivación del gen *phoP* incapacita al bacilo para secretar ESAT-6 y para sintetizar algunos lípidos de la membrana celular. La inactivación del gen *fadD26* le impide producir el lípido de membrana PDIM, esencial en la patogénesis de la bacteria.

En previos ensayos en animales mostró un adecuado perfil de seguridad, además de una mayor eficacia contra la tuberculosis pulmonar que BCG (5). Por ello entre diciembre del 2012 y noviembre del 2013 se incluyó en la fase I de ensayos clínicos en adultos sanos, no vacunados con BCG, VIH y tuberculosis negativos. MTBVAC demostró una seguridad y una tolerancia similares a BCG (36). Aunque el estudio de la inmunogenicidad no se encontraba entre sus objetivos, se detectó una respuesta polifuncional de linfocitos T CD4⁺ y de células T de memoria más potente que la observada en vacunados con BCG. Estos resultados no tienen suficiente potencia dado el tamaño muestral en una fase Ia, pero merecen ser investigados en profundidad en una fase IIa (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02933281).

Actualmente se planea iniciar la fase IIa del ensayo clínico en adultos. En septiembre del 2015 se inició un ensayo en fase Ib en recién nacidos de una región de Sudáfrica. A pesar de que el estudio ha concluido, todavía no se han publicado conclusiones respecto a su seguridad e inmunogenicidad (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02729571).

7.3. VPM1002 (rBCG)

La candidata desarrollada por el Instituto Max Planck de Biología de Infecciones es una vacuna viva recombinante (rBCG) que incorpora 2 modificaciones del genoma de BCG. Una de ellas es la introducción del gen *hly* del

patógeno *Listeria monocytogenes*, que codifica la proteína listeriolisina O (LLO). LLO es un tipo de perforina que permite lisar los fagosomas del macrófago sin dañar su membrana plasmática. De esta forma, los antígenos de BCG pueden permanecer en el citosol y ser presentados en mayor cantidad. La segunda modificación consiste en la inactivación del gen *ureC* de BCG, que codifica la subunidad C de la ureasa. Esta eliminación contribuye a impedir la acidificación del medio interior del fagosoma.

VPM1002 mostró resultados muy prometedores en ensayos en una variedad de animales experimentales altamente susceptibles a la tuberculosis, destacando una seguridad y eficacia mayor a BCG en ratones infectados por *M. tuberculosis* (37, 38).

Posteriormente se obtuvieron resultados igual de exitosos en ensayos clínicos en fase I en adultos de Alemania (ClinicalTrial.gov Identifier: NCT00749034) y Sudáfrica (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01113281), asegurando la seguridad de la vacuna en humanos (38).

Actualmente se están llevando a cabo ensayos en fase IIa en recién nacidos de Sudáfrica, expuestos y no expuestos al VIH, para comprobar si realmente es una vacuna segura e inmunogénica en niños nacidos en países de alta incidencia de tuberculosis (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01479972).

En cuanto a los ensayos actuales en adultos, se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase IIb/III en India para estudiar la eficacia en la prevención de la enfermedad (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03152903).

8. CONCLUSIONES

La tuberculosis es percibida por la sociedad occidental como enfermedad erradicada, que ya no se encuentra entre la población. Sin embargo se trata de una enfermedad muy actual y las cifras de infectados por el bacilo no disminuyen con el paso del tiempo. La actual vacuna BCG ha mostrado una eficacia variable a lo largo de la geografía mundial, siendo ésta mayor en países de baja incidencia de tuberculosis.

Dado que uno de los factores determinantes en la variabilidad de la respuesta a BCG es la exposición previa a micobacterias medioambientales, que varían según la latitud, en mi opinión sería ideal potenciar el estudio de vacunas capaces de proteger contra la tuberculosis en función de la zona geográfica en la que se quiere actuar. Cobra especial importancia el éxito en países donde la enfermedad es endémica, ya que la mayoría son de nivel socio-económico bajo. Un menor acceso a medicamentos antituberculosos es un problema añadido en estos lugares, lo que contribuye a una tasa alta de mortalidad por tuberculosis.

La investigación debe dar importancia a la búsqueda de un biomarcador que nos permita detectar un posible fracaso de vacunas candidatas en fases muy precoces de los ensayos. De esta forma se podrían evitar inversiones improductivas y un uso en vano de recursos humanos. La importancia de MVA85A reside en haber motivado a la búsqueda de éstos marcadores, además de haber promovido el estudio de condicionantes individuales en la respuesta del sistema inmune.

El panorama actual en investigación de vacunas contra la tuberculosis se muestra muy prometedor. La ausencia de una clara candidata ha motivado la aparición de múltiples hipótesis innovadoras. Entre ellas podemos destacar MTBVAC, la primera vacuna viva atenuada de *M. tuberculosis*; VPM1002, una de las vacunas profilácticas más avanzadas en los ensayos clínicos (fase IIb/III); y MVA85A en aerosol, que pretende potenciar la inmunidad en el sistema respiratorio, cortando de raíz la infección.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. WHO Press G.
2. Sotgiu G., Sulis G., Matteelli A. Tuberculosis – a world health organization perspective. *Microbiol Spectrum*. 2017 Jan; 5 (1).
3. Hazel M. Dockrell; Towards new TB vaccines: What are the challenges?. *Pathog Dis*. 2016 Jun; 74 (4): ftw016.
4. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2014 Feb; 58(4):470-80.
5. Gonzalo Asensio J, Aguiló N, Martín Montañés C. Nuevas vacunas contra la tuberculosis. *Investigación y ciencia*. 2014 Oct; 457: 38-46.
6. Marinova D, Gonzalo-Asensio J, Aguiló N, Martin C. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013; 12 (12): 1431–1448.
7. Arregui S, Sanz J, Marinova D, Martín C, Moreno Y. On the impact of masking and blocking hypotheses for measuring the efficacy of new tuberculosis vaccines. *PeerJ*. 2016 Feb; 4: e1513.
8. Barreto ML, Pilger D, Pereira SM, Genser B, Cruz AA, Cunha SS, et al. Causes of variation in BCG vaccine efficacy: examining evidence from the BCG REVAC cluster randomized trial to explore the masking and the blocking hypotheses. *Vaccine*. 2014 Jun; 32 (30): 3759-3764.
9. Mascart F, Locht C. Integrating knowledge of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis for the design of better vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Oct; 14 (12): 1573-1585.
10. Valentini D, Rao M, Ferrara G, Perkins M, Dodoo E, Zumla A, et al. Immune recognition surface construction of *Mycobacterium tuberculosis* epitope-specific antibody responses in tuberculosis patients identified by peptide microarrays. *Int J Infect Dis*. 2017 Mar; 56:155-166.

11. De Araujo LS, Vaas LA, Ribeiro-Alves M, Geffers R, Mello FC, De Almeida AS, et al. Transcriptomic biomarkers for tuberculosis: evaluation of *DOCK9*, *EPHA4*, and *NPC2* mRNA expression in peripheral blood. *Front Microbiol.* 2016 Oct; 7: 1586.
12. Morandi M, Sali M, Manganelli R, Delogu G. Exploiting the mycobacterial cell wall to design improved vaccines against tuberculosis. *J Infect Dev Ctries.* 2013 Mar; 7 (3): 169-81.
13. Hawkrigde 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 Ago; 198 (4): 544–552.
14. Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, Smit E, Van der Merwe L. Dose-finding study of the novel tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy BCG-vaccinated infants. *J Infect Dis.* 2011; 203: 1832–1843.
15. Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, Smit E, Van der Merwe L, Isaacs F, et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 2010 Ene; 40 (1): 279–290.
16. Kashangura R, Sena ES, Young T, Garner P. Effects of MVA85A vaccine on tuberculosis challenge in animals: systematic review. *Int J Epidemiol.* 2015 Sep; 44 (6): 1970-1981.
17. McShane H, Williams A. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberc.* 2014 Mar; 94 (2): 105-110.
18. Dharmadhikari AS, Basaraba RJ, Van Der Walt ML, Weyer K, Mphahlele M, Venter K, et al. Natural infection of guinea pigs exposed to patients with highly drug-resistant tuberculosis. *Tuberc.* 2011 Jul; 91 (4): 329-38.
19. Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously

vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013 Mar; 381 (9871): 1021-1028.

20. Dye C, Fine PE. A major event for new tuberculosis vaccines. *Lancet*. 2013 Mar; 381 (9871): 972-974.

21. Tameris M, Geldenhuys H, Luabeya AK, Smit E, Hughes JE, Vermaak S, et al. The candidate TB vaccine, MVA85A, induces highly durable Th1 responses. *PLoS ONE*. 2014 Feb; 9 (2): e87340.

22. Ndiaye BP, Thienemann F, Martin Ota M, Landry BS, Camara M, Dièye S, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in healthy adults infected with HIV-1: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Mar; 3 (3): 190-200.

23. Tanner R, Kakalacheva K, Miller E, Pathan A, Chalk R, Sander CR, et al. Serum indoleamine 2, 3-dioxygenase activity is associated with reduced immunogenicity following vaccination with MVA85A. *BMC Infectious Diseases*. 2014 Dic; 14(1): 660-670.

24. Fletcher HA, Snowden MA, Landry B, Rida W, Satti I, Harris SA, et al. T cell activation is an immune correlate of risk in BCG vaccinated infants. *Nat. Commun*. 2016 Abr; 7:11290.

25. Andrews JR, Nemes E, Tameris M, Landry BS, Mahomed H, McClain JB, et al. Serial QuantiFERON testing and tuberculosis disease risk among young children: an observational cohort study. *Lancet Respir Med*. 2017 Abr; 5 (4): 282-290.

26. Li Y, Leneghan DB, Miura K, Nikolaeva D, Brian IJ, Dicks MD, et al. Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Sci Rep*. 2016; 6: 18848.

27. Minhinick A, Satti I, Harris S, Wilkie M, Sheehan S, Stockdale L, et al. A first-in-human phase 1 trial to evaluate the safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A-IMX313, administered to BCG-vaccinated adults. *Vaccine*. 2016 Ene; 34(11): 1412-1421.

28. Rowland R, Pathan AA, Satti I, Poulton ID, Matsumiya MML, Whittaker M, et al. Safety and immunogenicity of an FP9-vectored candidate tuberculosis vaccine (FP85A), alone and with candidate vaccine MVA85A in BCG-vaccinated healthy adults: a phase I clinical trial. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Ene; 9(1): 50–62.
29. Stylianou E, Griffiths KL, Poyntz HC, Harrington-Kandt R, Dicks MD, Stockdale L, et al. Improvement of BCG protective efficacy with a novel chimpanzee adenovirus and a modified vaccinia Ankara virus both expressing Ag85A. *Vaccine*. 2015; 33 (48): 6800-6808.
30. Rappuoli R. Changing route: aerosol vaccine against tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct; 14 (10): 901-902.
31. Sharpe SA, McShane H, Dennis MJ, Basaraba RJ, Gleeson F, Hall G, et al. Establishment of an aerosol challenge model of tuberculosis in Rhesus macaques and an evaluation of endpoints for vaccine testing. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Ago; 17 (8): 1170-1182.
32. White AD, Sibley L, Dennis MJ, Gooch K, Betts G, Edwards N, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine, MVA85A, delivered by aerosol to the lungs of macaques. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 May; 20 (5): 663-672.
33. Satti I, Meyer J, Harris SA, Thomas ZR, Griffiths K, Antrobus RD, et al. Safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine MVA85A delivered by aerosol in BCG-vaccinated healthy adults: a phase 1, double-blind, randomized controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct; 14 (10): 939-946.
34. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, Puentes E, et al. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine*. 2013 Oct; 31 (42): 4867-4873.
35. Marinova D, Gonzalo-Asensio J, Aguilo N, Martin C. MTBVAC from discovery to clinical trials in tuberculosis-endemic countries. *Rev Vaccines*. 2017 Jun; 16 (6): 565-576.

36. Spertini F, Audran R, Chakour R, Karoui O, Steiner-Monard V, Thierry AC, et al. Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet*. 2015 Dic; 3 (12): 953-962.
37. Kaufmann SH, Cotton MF, Eisele B, Gengenbacher M, Grode L, Hesselning AC, et al. The BCG replacement vaccine VPM1002: from drawing board to clinical trial. *Expert review of vaccines*. 2014 May; 13(5):619-30.
38. Velmurugan K, Grode L, Chang R, Fitzpatrick M, Laddy D, Hokey D, et al. Nonclinical development of BCG replacement vaccine vandidates. *Vaccines*. 2013 Jun; 1 (2): 120-138.