

# MTBVAC, UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS: DEL LABORATORIO, A LOS ENSAYOS CLÍNICOS EN PAÍSES ENDÉMICOS

POR EL ACADÉMICO ELECTO

ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN PÚBLICA COMO ACADÉMICO DE NÚMERO EL DÍA 16 DE MARZO DE 2017

DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL

EXCMO. SR. D. FERNANDO SOLSONA MOTREL

PRESIDENTE DE HONOR Y ACADÉMICO DE NÚMERO



REAL ACADEMIA DE MEDICINA ZARAGOZA 2017

# MTBVAC, UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS: DEL LABORATORIO, A LOS ENSAYOS CLÍNICOS EN PAÍSES ENDÉMICOS

A mi mujer Chus y a mi hijo Carlos, mis mejores compañeros en este camino



# **Soren Kierkegard,**"En movimiento, una vida" Oliver Sacks

**"Viresque acquirir eundo"**Publio Virgilio, Eneida, IV, 175
"Los Ensayos" de Michel de Montaigne



## INSTITUTO DE ESPAÑA

# MTBVAC, UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS: DEL LABORATORIO, A LOS ENSAYOS CLÍNICOS EN PAÍSES ENDÉMICOS

POR EL ACADÉMICO ELECTO

## ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN PÚBLICA COMO ACADÉMICO DE NÚMERO EL DÍA 16 DE MARZO DE 2017

DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL

## EXCMO. SR. D. FERNANDO SOLSONA MOTREL

PRESIDENTE DE HONOR Y ACADÉMICO DE NÚMERO



REAL ACADEMIA DE MEDICINA ZARAGOZA 2017

Depósito Legal: Z-405-2017

Edita y distribuye: Real Academia de Medicina Plaza Basilio Paraíso, 4 – 50005 Zaragoza

Composición e impresión:

Navarro & Navarro Impresores. Corona de Aragón, 28, local – 50009 Zaragoza

## SUMARIO

# MTBVAC, una nueva vacuna contra la tuberculosis: del laboratorio, a los ensayos clínicos en países endémicos

Carlos Martín Montañés

Agradecimientos
Los microbios y las enfermedades
La vacunación método de lucha contra las enfermedades infecciosas 19
Importancia e impacto de la tuberculosis hoy
La tuberculosis una enfermedad tan antigua como la humanidad20
BCG la actual vacuna contra la tuberculosis, una nueva vacuna es necesaria
La estrategia del bacilo de la tuberculosis
Estudiando al bacilo de la tuberculosis
Epidemiología molecular de la tuberculosis
Epidemiología molecular de la tuberculosis multirresistente 28
Estudio de los mecanismos de resistencia
Desarrollo de herramientas genéticas
Evaluación de nuevas vacunas contra la tuberculosis
Modelos animales
Ensayos clínicos en humanos
Nuevas vacunas contra la tuberculosis
Mejorar la eficacia de BCG: vacunas subunidades
Primer ensayo de eficacia de una nueva vacuna en humanos36
Vacunas vivas capaces de reemplazar a BCG
Vacunas derivadas de BCG recombinante
Vacunas basadas en la atenuación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

#### REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA

Desarmando al bacilo de la tuberculosis
Qué genes elegir?
Qué cepa de M. tuberculosis inactivar?39
Del prototipo de vacuna SO2 a la construcción de MTBVAC40
MTBVAC de la investigación al desarrollo
MTBVAC del desarrollo a los ensayos clínicos
De los adultos suizos
A los bebés sudafricanos
Plan de Desarrollo Clínico de MTBVAC
Una nueva vacuna contra la tuberculosis en el horizonte, retos y desafíos
Referencias
Discurso de contestación Excmo Sr D Fernando Solsona Motrel 53

## MTBVAC, UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS: DEL LABORATORIO, A LOS ENSAYOS CLÍNICOS EN PAÍSES ENDÉMICOS

POR EL ACADÉMICO ELECTO

ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS
DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN PÚBLICA
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

#### **AGRADECIMIENTOS**

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina de Zaragoza, Excelentísimas e Ilustrísimas autoridades

Excelentísimos Académicos y Académicos

Excelentísimos Académicas y Académicos Compañeros, Amigos Querida Familia Señoras y Señores

Me presento ante ustedes dispuesto a pronunciar el discurso de ingreso como Académico, con un doble sentimiento. Por un lado, de enorme gratitud hacia todos ustedes, señoras y señores académicos, por depositar su confianza en mí, al nombrarme Académico electo y, muy especialmente, a su Presidente el Excmo. Sr. Luis Miguel Tobajas Asensio, y al Presidente de Honor de esta Academia, el Excmo. Sr. D. Fernando Solsona Motrel, que me apoyaron en todo momento, a éste último debo añadir mi doble agradecimiento por su aceptación a pronunciar el discurso de contestación en esta sesión.

Por otro lado, me siento embargado por la enorme responsabilidad que la toma de posesión de la plaza conlleva, al formar parte de esta Real Institución centenaria, fundada en 1831, por la que tantos Ilustres prestigiosas personas han pasado, y con las que desde hoy tendré el honor de compartir asiento, siempre dispuesto a aprender de ustedes.

Quiero también expresar mi agradecimiento hacia al Ilmo. Sr. D. Carlos Val-Carredes Guinda y al Ilmo. Sr. D. Juan Pié Juste, que junto con el Profesor Solsona, avalaron generosamente mi candidatura como Académico de Número.

También quisiera expresar mi gratitud, a los Ilmos Sres. D. Mariano Mateo Arrizabalaga, actual Secretario de la Real Academia de Medicina y a D. Juan Pié Juste, que han aceptado ser mis padrinos en el día de hoy.

La parte más importante de este discurso que les presento hoy es, sin duda alguna, la que debo dedicar a agradecer nuestro trabajo, a todas aquellas personas e instituciones que sentaron los cimientos e hicieron posible estar donde estamos, en el desarrollo de la nueva vacuna contra la tuberculosis MTBVAC.

Protagonistas principales son los miembros de nuestro grupo de investigación "Genética de Micobacterias" de la Universidad de Zaragoza, que trabajan en este

#### REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA

proyecto, en la Facultad de Medicina, en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón y en el hospital "Miguel Servet", formando parte del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Aragón. El nuestro es un grupo multidisciplinar formado por personal técnico e investigadores, con gran vocación internacional y un importante componente de jóvenes investigadores procedentes de las tres provincias aragonesas y en el que contamos con médicos, veterinarios, bioquímicos y biotecnólogos, muy bien formados en nuestra Universidad.

También son protagonistas los numerosos equipos nacionales e internacionales con los que, a lo largo de estos años, venimos colaboramos y compitiendo muy estrechamente para el desarrollo de la vacuna.

Pero convencido de que:

"La vida sólo puede ser comprendida hacia atrás.....,

debo agradecer mi introducción al fascinante mundo de la Biología, a D. Juan Jesús Bastero sj, mi maestro en el colegio del Salvador que supo encender, en mí, la chispa de la curiosidad por aprender, diseccionar minuciosamente los problemas y mirar lejos.

Mi pasión por la microbiología empezó al escuchar las clases del Profesor Gómez-Lus, quien me permitió desde los primeros años de carrera, formar parte de su equipo. Don Rafael Gómez-Lus siempre ha sido para mí un ejemplo de tesón, de perseverancia, de pasión y de dedicación plena a la microbiología. Don Rafael me ha guiado durante toda mi carrera científica y es un verdadero privilegio para mí pertenecer a su "Escuela de Microbiología" y seguir sus pasos en esta Real Academia de Medicina de Zaragoza, de la que fue presidente de Honor, y llevar con orgullo esta medalla.

No solo le debo lo que aprendí directamente de él, en la Cátedra de Microbiología de nuestra Universidad, sino su enorme generosidad con la que guio toda mi formación profesional, aconsejándome sobre los centros y personas que pudieran completar mi formación en Biología Molecular e Ingeniería Genética y que ahora atesoro.

Así completé mi formación en España, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Esta estancia de formación que, inicialmente, estaba prevista para tres meses y se alargó 5 años para completar mi aprendizaje. En este período bajo la dirección de los Profesores Juan María García Lobo como estudiante predoctoral y con el Profesor Fernando de la Cruz como posdoctoral, tuve la inmensa suerte de aprender los mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos y de mecanismos de transposición.

Posteriormente apliqué estos conocimientos de Microbiología y Biología Molecular en el Instituto Pasteur de París. Allí, en el Departamento del Profesor

Julian Davies, colaborador de Don Rafael, inicié mi trabajo con las micobacterias, familia de bacterias a la que pertenece el bacilo de la tuberculosis. Mi tarea fue de buscar marcadores de resistencia y transposones que sirviesen como herramientas genéticas en micobacterias ya que hasta la fecha, aún no había sido posible manipularlas genéticamente.

Este trabajo lo realicé bajo la dirección de la Profesora Brigitte Gicquel, pionera en la Genética de las Micobacterias. En los inicios de su grupo de investigación me acogió en su equipo como su primer posdoctoral. Permanecí cinco años, dos como investigador posdoctoral gracias a sendas becas EMBO y de la Organización Mundial de la Salud. Mis tres años siguientes lo fueron como Investigador permanente del Instituto Pasteur.

Quisiera destacar la enorme generosidad de la Dra. Brigitte Gicquel quien nos ayudó enormemente a formar en el año 1992 nuestro propio Grupo de Investigación en la Universidad de Zaragoza y con la que, hoy, seguimos colaborando muy estrechamente.

Ya en la Universidad de Zaragoza, debo agradecer a la Dra. María del Carmen Rubio, Catedrático de Microbiología de nuestro Departamento quien fue de inestimable ayuda para la preparación de mis primeras clases como profesor titular de la asignatura, acercándome a los métodos de transmisión del conocimiento a los alumnos de Medicina.

A la Dra. María José Revillo, Jefa del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario "Miguel Servet", que apoyó mi vinculación a su servicio dándome la oportunidad de llevar el nombre de Miguel Servet con enorme orgullo, en las publicaciones y presentaciones internacionales, de nuestro trabajo, en el campo de la tuberculosis.

Al Servicio de Microbiología de los hospitales Clínico "Lozano Blesa" y "Miguel Servet", especialmente, a las secciones de Micobacterias destacando la colaboración de muchos años con las Dras. Asunción Vitoria y María Antonia Lezcano.

Nuestra Universidad ha apoyado de forma activa e incondicional desde su inicio el proyecto "Vacuna Tuberculosis". Así lo hicieron sus rectores D. Juan Badiola; D. Felipe Pétriz (quien nos permitió, en el año 2006, exponer el proyecto a la comunidad científica en el discurso de San Braulio en Marzo de ese mismo año); D. Manuel López quien siempre ha puesto a nuestra disposición ideas y estrategias para salvar obstáculos y al actual Rector Magnífico D. José Antonio Mayoral que junto al Sr. Vicerrector de Política Científica, D. Luis Miguel García Vinuesa y a la Sra. Vicerrectora de Transferencia e Innovación Tecnológica, Dña. Pilar Zaragoza quienes, nos ayudan a sortear los problemas y retos que encontramos, día a día, cada vez más complejos según avanzamos en el proyecto.

#### REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA

También a los componentes de los diferentes equipos rectorales, que desde el inicio del proyecto lo han apoyado, con los Vicerrectores de Investigación al frente, y entre los que me gustaría destacar a la Dra. Blanca Conde Guerri que creyó firmemente en el proyecto en su inicio y que continuaron D. José García Esteve, D. Miguel Ángel Villar y D. José Ramón Beltrán.

Destacar la labor del Equipo de Gestión de la Investigación de la Universidad de Zaragoza, que con su gran profesionalidad y dedicación sin límites nos ha permitido superar todas las complejas tareas administrativas y con mención especial a su directora Dña. Carmen Baras.

A la Oficina de Transferencia de Resultados, nuestra OTRI, que desde su dirección, con D. Gerardo Sanz, D. Jesús Arauzo y, actualmente, Dña. Raquel Rodríguez, y a sus técnicos que nos vienen ayudando en este complejo mundo; y me gustaría destacar muy especialmente, al futuro Dr. Eduardo Almenara quien, desde un principio, ha tomado el "Proyecto Vacuna" como propio y nos ha apadrinado en cada paso adelante que avanzamos, en patentes y licencias.

A la iniciativa europea, Nuevas Vacunas contra la tuberculosis (TBVI) su fundador Dr. Jelle Thole y a todo su equipo, en Holanda y, a los Comités de Desarrollo Preclínico y Desarrollo Clínico de MTBVAC.

No hubiese sido posible pasar de la investigación académica al desarrollo industrial y clínico de la vacuna sin el apoyo, leal y sincero, de la compañía biofarmacéutica española BIOFABRI. Agradecer, especialmente, a su consejero delaegado D. Esteban Rodríguez, quien desde un principio creyó en el proyecto, tanto o más que nosotros y, a todo su equipo de Biofabri y CZ Veterinaria; con especial mención al director de CZ Veterinaria D. Andrés Fernández, a las Dras. Eugenia Puentes y Conchita Fernández en el desarrollo industrial y a la Dra. Juana Doce, D. Oswaldo Álvarez y Dña. Ingrid Murillo en el desarrollo clínico de la vacuna.

Agradecer también al equipo de investigadores que realizaron los estudios clínicos de la vacuna MTBVAC en el Hospital Universitario de Lausana, Suiza, dirigidos por el Profesor François Spertini, así como a los voluntarios que participaron en el primer estudio clínico de seguridad e inmunogenicidad en adultos de MTBVAC.

Al equipo de investigadores y médicos que, actualmente, están realizando el estudio clínico de MTBVAC en recién nacidos en Worcester y perteneciente a la Iniciativa Sudafricana para el desarrollo de una vacuna contra la tuberculosis (SATVI) dirigidos por la Dra. Michele Tameris y el Dr. Mark Hatherill, así como a las madres y bebes que participan en el primer estudio clínico de seguridad e inmunogenicidad de MTBVAC en recién nacidos.

También agradecer a los organismos financiadores ya que, desde su inicio, el "Proyecto vacuna tuberculosis" ha contado con financiación pública de forma ininterrumpida. A través de proyectos competitivo del Gobierno de España, hemos conseguido financiación para nuestro grupo de investigación, perteneciente al CIBER de Enfermedades Infecciosas del Instituto Carlos III. Al Gobierno de Aragón y a las fundaciones de CAI e Ibercaja. Destacar así mismo la financiación concedida en el marco de la Unión Europea por los distintos programas V, VI, VII y, el actual, Horizonte 2020, que han sido esenciales para el desarrollo de este proyecto.

Me gustaría destacar nuestro agradecimiento a toda la sociedad aragonesa y española por su apoyo al "proyecto vacuna contra la tuberculosis" y a todos aquellos que sienten este proyecto, inicialmente aragonés, pero con una clara vocación universal, tan suyo como nuestro.

Y por último y muy importante, agradecer a toda mi familia, a mi madre "Purita" mi hermano Manolo y mi hermana "Piti" por su apoyo incondicional y estar siempre ahí, y muy especialmente, a mi mujer Chus y a mi hijo Carlos, que tantas alegrías y ánimos me aportan en este Camino. También a mis queridos amigos, que me permiten tener una perspectiva diferente del día a día.

"pero la vida únicamente puede ser vivida hacia delante"

por lo que me gustaría, mostrar aquí y ahora mi total apoyo y ánimo, a las nuevas generaciones de investigadores, a los ya formados y en formación, ya que son ellos, los que nos permiten mirar hacia el futuro, y, serán ellos los que harán posible que nuestro trabajo, pueda alcanzar el objetivo universal en salud global al que aspiramos.

Ellos merecen todo nuestro apoyo, así como el de nuestras instituciones, para afianzar sus carreras profesionales e investigadoras, permitiendo llevar a buen puerto, proyectos de larga duración y envergadura y de enorme impacto social, como este proyecto de lograr una vacuna más eficaz contra la tuberculosis y que hoy nos ocupa.

#### LOS MICROBIOS Y LAS ENFERMEDADES

Desde que nacemos convivimos con cientos de miles de especies de microbios. Nuestro sistema inmune se adapta permitiendo controlar a la gran mayoría; y sólo unos pocos son patógenos, capaces de causar enfermedades en hombres y animales. Desde que el hombre comienza a vivir en comunidad, las enfermedades producidas por estos pocos microorganismos patógenos, han causado algunas graves y devastadoras epidemias de enfermedades infecciosas como fueron la viruela, el cólera y la peste, haciendo que –de forma cotidiana– asociemos microbios con enfermedad. En la historia de la humanidad, en el grupo de enfermedades infecciosas, tuberculosis es la más mortífera, calculándose que ha sido responsable de más de mil millones de muertes, muy por encima de la viruela, la malaria o el SIDA (Paulson, 2013).

Hoy, gracias al descubrimiento y a la amplia cobertura de las vacunas incluidas en los calendarios de nuestros hijos y mayores, las mejoras socio-económicas, las medidas de higiene y de salud pública y al uso racional de los antibióticos, ha sido posible el control de muchas de estas mortíferas epidemias, permitiendo que podamos vivir en comunidad, llevar a nuestros hijos a las guarderías y haber alcanzado un notable aumento en la esperanza de vida.

## LA VACUNACIÓN MÉTODO DE LUCHA CONTRA LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La vacunación es el método de lucha contra las enfermedades infecciosas que presenta una mejor relación coste/beneficio. El dicho popular de "más vale prevenir que curar" describe perfectamente la función de la vacunación. El descubrimiento a finales del siglo XVIII, por el médico inglés Edward Jenner, de la vacuna contra la viruela, obtenida a partir del virus aislado de las vacas que prevenía, las formas graves de la enfermedad; a la distribución universal de la vacuna, iniciada a principios del siglo XIX por los médicos españoles Francisco Javier Balmis y José Salvany, en la Real expedición filantrópica de la vacuna, hicieron posible que, muchos años más tarde, en 1979 -por primera vez en la historia de la humanidad- la Organización Mundial de la Salud declarara erradicada del planeta una enfermedad infecciosa: la viruela.

El desarrollo de las vacunas y las intensas campañas de vacunación contra la polio, la difteria, el sarampión o la rubeola a mediados del siglo XX, han llevado a un increíble descenso en la mortalidad asociada a estas enfermedades, y se estima que actualmente, dos millones de vidas son salvadas cada año por el uso sistemático de las vacunas. Para muchas enfermedades es posible plantearse su futura erradicación, siempre y cuando mantengamos altas tasas de cobertura vacunal en la población y combatamos las ideas reaccionarias

de los movimientos anti-vacunas que, como nos ha enseñado nuestra historia reciente, tanto en Estados Unidos con el sarampión y en España con la difteria, conlleva la no vacunación, especialmente, en relación a la reaparición de graves enfermedades casi olvidadas y poniendo, en riesgo, los importantísimos logros conseguidos, por la humanidad, con el uso de vacunas.

Hoy las vacunas más eficaces, en las que los anticuerpos confieren una respuesta protectora, están disponibles y en uso; mientras que, en las que es necesaria e importante la inmunidad celular, y además, no existen unos marcadores de protección, como es el caso de la malaria, el sida y la tuberculosis, se resisten a que podamos obtener vacunas eficaces contra ellas.

#### IMPORTANCIA E IMPACTO DE LA TUBERCULOSIS HOY

En el último informe de la Organización Mundial de la Salud, de octubre de 2016, las estimaciones relativas al año 2015 señalan que más de 10 millones de nuevos casos enfermaron y cerca de 2 millones más murieron de tuberculosis (WHO, 2016). Estas cifras resultan aún más preocupantes si tenemos en cuenta que 400.000 de estas muertes estuvieron asociadas a personas enfermas de sida (una co-infección habitualmente letal) y a la aparición de brotes de tuberculosis resistentes a los antibióticos más eficaces para su tratamiento. Según las cifras de éste informe sólo se tratan 1 de cada 5 casos de tuberculosis multi-rresistentes de los que cura el 50%. Este hecho junto a la aparición de cepas resistentes a la mayor parte del arsenal terapéutico en uso, pone en riesgo el tratamiento de la enfermedad para las generaciones futuras.

# LA TUBERCULOSIS UNA ENFERMEDAD TAN ANTIGUA COMO LA HUMANIDAD

La presencia de tuberculosis fue descrita en lesiones de momias egipcias, con más de 3.000 años de antigüedad, en las que se ha podido identificar al bacilo de la tuberculosis, así como en momias precolombinas, indicando que estaba presente en América antes de la llegada de los europeos.

Durante los siglos XVIII y XIX la tuberculosis causaba una gran mortalidad en las grandes ciudades de Europa. En el siglo XIX fue la principal causa de mortalidad de la juventud europea. Tras el descubrimiento por Koch del bacilo causante de la tuberculosis y su descripción, el 24 de Marzo de 1882, las medidas clásicas de prevención, se basan en la detección de casos y, en el pasado, en el aislamiento de los enfermos que eran tratados en los sanatorios antituberculosos. La "lucha organizada contra la tuberculosis", unida a la mejora de las condiciones de vida, permitió disminuir drásticamente el número de muertos

en los países industrializados. Hoy, las cifras de tuberculosis que presentaban las grandes ciudades de Europa, en el siglo XVIII, las encontramos en países como China, India, Indonesia, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica, zonas del planeta donde se acumulan el 60% de los casos de esta enfermedad.

La descripción del bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y ser identificada como una enfermedad de transmisión respiratoria supuso un importante hito para su control y representa un buen ejemplo de la repercusión de la ciencia en la salud pública.

El descubrimiento de Koch fue el inicio de un avance de conocimientos que favorecerían su control. Especialmente importantes fue el descubrimiento, en 1943, del primer antibiótico eficaz contra la enfermedad, la estreptomicina, en el laboratorio de Selman Waksman. A la estreptomicina rápidamente se sumaron potentes antituberculosos como la isoniazida, la rifampicina, la pirazinamida o el etambutol, un arsenal terapéutico que conseguía curar a los enfermos de tuberculosis.

Las campañas de prevención, las medidas de higiene, el descubrimiento de los antibióticos, la mejoras socio-económicas, apuntaban a que la tuberculosis parecía condenada a desaparecer. El número de casos descendía considerablemente y los enfermos se curaban con el tratamiento. No parece extraño que la Organización Mundial de la Salud incluyera entre sus objetivos para el año 2000, la erradicación de esta enfermedad.

Este optimismo comenzó a enfriarse en los años 90 cuando el número de enfermos de tuberculosis aumentó de forma alarmante. En 1993 la Organización Mundial de la Salud declaró a la tuberculosis como la primera emergencia sanitaria global.

¿Por qué hemos fracasado en la lucha contra el enemigo?. Hay dos factores fundamentales que explican el resurgir de la enfermedad. El primero fue la aparición y propagación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la década de los 80. Este virus ataca directamente al sistema inmune, especialmente a los linfocitos CD4 responsables de la inmunidad celular, e indispensable en el control de la tuberculosis latente. Así pues *M. tuberculosis* ha encontrado, en el virus del VIH un ideal aliado letal, convirtiendo a los enfermos de SIDA, en víctimas perfectas y vehículos para su transmisión.

La segunda causa del despunte de la tuberculosis se debe a la aparición de bacilos resistentes a los antibióticos, este fenómeno es habitual en todas las bacterias pero, resulta particularmente preocupante en el caso de *M. tuberculosis*, debido al escaso número de antibióticos eficaces contra el bacilo. Una baja adherencia al tratamiento está considerado el principal factor asociado con la aparición de resistencias.

Desde los años 60, en que se iniciaron los primeros tratamientos, se han descrito cepas resistentes a los distintos antituberculosos. En abril de 1991, el 33% de las cepas aisladas en Nueva York eran resistentes al menos a un antibiótico. Esta época coincidió con una importante crisis económica en los Estados Unidos y fuerte disminución de la inversión en salud pública en este país.

Actualmente, países como la antigua Unión Soviética o regiones como el África Subsahariana, amplias zonas de Asia y algunas naciones latinoamericanas, son los que presentan un mayor número de casos de tuberculosis resistente a los principales antituberculostáticos; se han detectado epidemias de tuberculosis resistente y el control de este problema se considera una prioridad para la Organización Mundial de la Salud.

Esta fragilidad nos hace recordar que para las enfermedades infecciosas no existen las fronteras y que todos continuamos siendo vulnerables a tuberculosis.

# BCG LA ACTUAL VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS, UNA NUEVA VACUNA ES NECESARIA

A principios del siglo XX existía una alta mortalidad infantil por tuberculosis transmitida, a partir de leche de vacas infectadas con *Mycobacterium bovis*, el bacilo causante de la tuberculosis en vacas. El Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) es la actual vacuna para tuberculosis. Esta vacuna fue creada entre los años 1908 y 1921 en el Instituto Pasteur por el médico Albert Calmette y el veterinario Camille Guérin, siguiendo los principios establecidos por Louis Pasteur para la atenuación de microorganismos. Según Pasteur el cultivo continuado de un microorganismo en el laboratorio hace que este pierda la capacidad de producir enfermedad. Esta pérdida es irreversible y permite atenuar paulatinamente la virulencia de los microorganismos. Calmette y Guérin utilizaron una cepa de *M. bovis* aislada de una vaca enferma, consiguiendo atenuarla en un largo proceso que duró 13 años, durante los cuales se subcultivó más de 200 veces (se realizaron un total de 230 pases).

Esta bacteria atenuada se probó en distintos animales de laboratorio como cobayas, conejos y vacas. Las técnicas de investigación actuales nos han permitido conocer que BCG durante su crecimiento *in vitro*, perdió regiones de su genoma codificantes de determinantes de la patogenicidad del bacilo, como la región denominada RD1 que codifica para la producción de la proteína Esat-6, que exportada por el bacilo resulta esencial para su virulencia y producir la enfermedad (Brosch et al, 2007).

El ensayo de la vacuna BCG con 50.000 niños, llevado a cabo entre 1921 y 1926, demostró la gran eficacia de BCG en prevenir la mortalidad infantil (1.8% de mortalidad en niños vacunados con BCG frente al 25% de los no

vacunados). Hoy se considera que BCG confiere un efecto beneficioso, no relacionado con su protección contra la tuberculosis, disminuyendo la aparición de otras infecciones y tambien, por consiguiente, sobre la mortalidad infantil (Kleinnijenhuis et al, 2012; Benn et al, 2013; Aaby and Benn, 2012; Iglesias and Martin, 2015 de Castro, et al, 2015; Arts et al, 2016).

BCG es hoy la única vacuna en uso contra la tuberculosis. Su administración es recomendado por la OMS en países con alta incidencia de tuberculosis, siendo de entre todas las vacunas en uso frente a enfermedades infecciosas, la vacuna más utilizada en todo el mundo, alcanzando una covertura vacunal cercana al 90%.

A pesar de su eficacia en la prevención de tuberculosis infantil y sus formas más graves, su principal limitación radica en que, en los casos de tuberculosis respiratoria en adultos responsables de la transmisión de la enfermedad por contagio, el grado de protección que confiere es muy variable, desde un 70% en estudios realizados en Inglaterra hasta la ausencia de protección, en estudios realizados en la India.

En este sentido señalar que durante la vacunación masiva con BCG, a mediados del siglo XX, distintos laboratorios siguieron subcultivado BCG en condiciones similares a las que causaron su atenuación original, lo que provocó la aparición de diversas variantes de BCG y confiriendo una protección variable frente a la tuberculosis.

En palabras del Profesor Ian Orme, "el talón de Aquiles de BCG es su incapacidad de estimular el sistema inmune a largo plazo", ésto explicaría la gran eficacia de la vacuna en niños recién vacunados, con una progresiva pérdida de eficacia cuando crecen. Por ello, desarrollar nuevas vacunas más eficaces que la actual BCG y capaces de estimular el sistema inmune a largo plazo resulta crucial (Orme, 2010).

#### LA ESTRATEGIA DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

Estudios moleculares, de los que hablaremos más adelante, muestran que la estrategia de crecimiento lento del bacilo de la tuberculosis es muy eficaz y se ha adaptado al estilo de vida del ser humano. Hoy gracias al conocimiento del genoma del bacilo de la tuberculosis (Cole et al, 1998) y a la secuenciación de miles de cepas (Stucki et al, 2016) sabemos que, los bacilos de la tuberculosis poseen una gran similitud entre todos los aislamientos. Consiste en una población clonal, descendiente de un antecesor común, que presenta muy poca variación genética entre las diferentes cepas aisladas.

La hipótesis es que el bacilo infectó y se adaptó a los primeros humanos, aproximadamente hace unos 15.000 o 20.000 años, cuando el ser humano

pasó de ser cazador recolector y comenzó a vivir en comunidades agrícolas y ganaderas (Brosch et al, 2002). Algunos autores hablan de una posible co-evolución desde los primeros orígenes del hombre, en el cuerno de África, acompañándolo en las migraciones fuera de África, desde hace más de 70.000 años (Gagneux, 2012).

Numerosos patógenos tratan de evadir al sistema inmune variando genéticamente, pero la estrategia del bacilo de la tuberculosis es la contraria. Las regiones del bacilo que son reconocidas por el sistema inmune, principalmente por las células T (epítopos), están altamente conservadas entre todos los bacilos, incluso más que los genes esenciales para su propia división o su propio metabolismo (house-keeping) (Comas et al, 2010). Esto indicaría que el bacilo de la tuberculosis lejos de evadir al sistema inmune del hospedador se ha adaptado de forma que, busca una confrontación directa, cuando decide causar enfermedad.

A pesar de tratarse de una población clonal muy conservada, hoy es posible clasificar al bacilo de la tuberculosis que afecta a humanos, en diferentes linajes perfectamente adaptados a las diferentes poblaciones humanas según vivan, en grandes concentraciones en ciudades, o en poblaciones dispersas en áreas rurales.

Los linajes considerados "modernos" serían más virulentos y menos inmunogénicos permitiendo una transmisión más rápida, con períodos de incubación de la enfermedad más cortos. Entre éstos se encuentran el linaje 2 en Asia (Linaje Beijing) y el linaje 4 en Europa, África y América. Otros linajes continúan adaptados a poblaciones rurales o más dispersas, con lo que el periodo de incubación requiere ser mayor, hasta lograr encontrar un individuo susceptible para transmitir la enfermedad. Este es el caso de los linajes 5 y 6 que se aíslan y se encuentran confinados en ciertas regiones de África (Comas et al. 2013).

Comparándolo con otras bacterias, el bacilo de la tuberculosis se multiplica muy lentamente (tarda 24 horas, comparado con los 20 minutos de *Escherichia coli*). Crece dentro de las células que infecta, y aunque es posible contraer la enfermedad con bacilos que producen tuberculosis en otros mamíferos, ésta rara vez se transmite. En la mayoría de los casos, las cepas causantes de la tuberculosis humana se transmiten persona a persona, por vía respiratoria y su único hábitat y reservorio, es el ser humano enfermo con una tuberculosis pulmonar y capaz de diseminar estos bacilos.

El mecanismo de transmisión respiratorio resulta altamente eficaz, estimándose que un enfermo de tuberculosis es capaz de infectar a otras 15 personas a lo largo de su vida. Cuando las bacterias inhaladas por personas sanas, llegan a los alvéolos pulmonares, son capaces de infectar las células humanas.

Entre las células a infectar, *M. tuberculosis* elige los macrófagos, y éstos no son capaces de eliminarlo. A diferencia de otras bacterias, *M. tuberculosis* utiliza sofisticados mecanismos para resistir el ataque de los macrófagos y sobrevivir en su interior. Comienza entonces una "batalla o diálogo" entre el sistema inmune de la persona infectada y *M. tuberculosis*. Esta "convivencia" puede prolongarse durante toda la vida de la persona, siempre que el sistema inmune funcione con normalidad, el bacilo es mantenido "a raya" y el sistema inmunitario, especialmente la inmunidad celular, sale reforzado con este "diálogo".

Desde que Koch describió el bacilo de la tuberculosis se le ha considerado un "patógeno obligado" para el hombre. Inoculando muy pocos bacilos es capaz de producir la muerte de animales susceptibles como las cobayas. Hoy la visión que muchos investigadores tenemos del bacilo es que se comporta en muchos casos como un "simbionte", de forma que su infección en el 90% de los casos no producirá enfermedad y en casi un 80% de los individuos infectados estarán protegidos contra nuevas infecciones y de la enfermedad, como muestran los estudios de Andrews (Andrews et al, 2012).

Este estado de infección tuberculosa, sin síntomas de enfermedad, se conoce como tuberculosis latente y no es transmisible. Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*. Mediante esta estrategia, *M. tuberculosis* no busca matar a su hospedador sino permanecer largo tiempo en su interior, garantizándose un nicho duradero.

Sin embargo, si este balance entre patógeno y hospedador se desequilibra, por una bajada de las defensas, se puede producir lo que se denomina reactivación de la enfermedad, desarrollándose una tuberculosis activa en un individuo infectado. Si el enfermo de tuberculosis no es tratado con antibióticos resulta mortal en el 50% de los casos.

Entre las causas que favorecen la reactivación de la tuberculosis se encuentran factores genéticos, y factores ambientales que disminuyen la capacidad defensiva del organismo como son la mala alimentación asociada a la pobreza, el uso de fármacos inmunosupresores y la coexistencia de otros procesos que afectan al sistema inmunológico (como el SIDA). En los pacientes con tuberculosis activa, la bacteria es reconocida por el sistema inmune y la respuesta inmunitaria es alta, de forma que muchos síntomas de la enfermedad son resultado de la exacerbada respuesta inmune del hospedador y el bacilo es capaz de evadir su control diseminándose, principalmente, en el pulmón y en otros órganos y tejidos.

Los síntomas que caracterizan a la enfermedad tuberculosa se relacionan con el órgano o tejido afectado. Así, la diseminación de *M. tuberculosis* en pulmón ocasiona una patología respiratoria que provoca tos en el enfermo, siendo ésta la vía de contagio y facilitando su transmisión. De ahí que, el

descubrimiento de una vacuna eficaz contra la tuberculosis pulmonar responsable de la transmisión de *M. tuberculosis*, podría ser de gran ayuda para la erradicación de esta enfermedad.

#### ESTUDIANDO AL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

#### Epidemiología molecular de la tuberculosis

La epidemiología molecular de la tuberculosis permite diferenciar entre dos cepas del bacilo. El descubrimiento en los años 90 de la secuencia de inserción denominada IS6110, secuencia específica y repetida de forma variable entre las distintas cepas del bacilo, permite la diferenciación de cepas y seguir el rastro del bacilo de la tuberculosis (Otal et al, 1991). La secuencia de inserción IS6110 está presente en un número variable de copias y éstas se localizan en las diferentes cepas, en distintas posiciones del cromosoma de forma polimórfica, pudiendo ser utilizada como la "huella dactilar" de cada cepa (van Embden et al, 1993). Estos estudios pioneros realizados en colaboración con el equipo de la Dra Brigitte Gicquel del Instituto Pasteur, fueron el trabajo de la Dra. Isabel Otal, hoy profesora de nuestra Universidad y dieron origen a la técnica de tipado molecular por RFLP.

Nuestros primeros trabajos se dirigieron al estudio de la estabilidad de este polimorfismo. Se estudiaron las cepas aisladas de pacientes tuberculosos y cepas aisladas de los mismos pacientes años más tarde (Otal et al, 1991). Confirmar que el patrón permanecía estable, nos permitió considerar su potencial utilidad en la detección de futuras epidemias. Posteriormente, nuestros esfuerzos se dirigieron a conocer el mecanismo biológico de ese polimorfismo, descubriendo que era debido al salto o transposición de esta secuencia IS6110 (Mendiola et al, 1992). La utilidad del método, se confirmó por su estabilidad en el tiempo y su universalidad entre cepas, al deberse a un mecanismo de transposición o salto común a otras bacterias. Este método de diferenciación de cepas de tuberculosis, comenzó a ser empleado por diferentes laboratorios de todo el mundo, si bien al utilizarse diferentes sitios de corte del genoma de bacilo y marcar ese polimorfismo de forma diferente, no permitía la comparación entre laboratorios. En una reunión celebrada en los Centers for Disease Control (CDC) de Atlanta, se planteó la necesidad de estandarizar el método de diferenciación de las cepas por RFLP (Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción), con la secuencia de inserción IS6110, para su uso universal en la medicina humana. En este consenso participó activamente nuestra Universidad junto a otros centros e instituciones como los CDC de Atlanta, el Instituto Pasteur de Paris, el National Institute for Public Health de Holanda (RIVM) o la Universidad de California, Los Angeles (UCLA) (van Embden et al, 1993).

Si bien disponemos de nuevas técnicas más rápidas de diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* basadas en PCR, RFLP- IS*6110* tras más de 20 años de uso en estudios de epidemiología molecular, sigue siendo el patrón oro y decenas de miles de cepas, en todo el mundo, han sido estudiadas de forma estandarizada, permitiendo la comparación de bases de datos y facilitando el estudio del comportamiento del bacilo.

Los resultados de estas técnicas se pueden analizar mediante programas informáticos de análisis de imágenes y almacenados en bases de datos. Cada patrón o código de barras de una nueva cepa se compara con las ya existentes y, cuando coinciden, se estudia la relación que pudiera existir entre dos pacientes en los que se aísla una misma cepa. Estas técnicas moleculares permiten identificar la existencia de una transmisión de tuberculosis (un individuo sano es contagiado por un individuo enfermo), o una reactivación (una cepa que infectó previamente y se encontraba en fase silente en un individuo), en función de que los patrones genéticos de las cepas aisladas, sean idénticos o diferentes.

Nuestra Universidad sigue participando en el estudio comparativo internacional de diferentes métodos de tipado, colaborando en la búsqueda de nuevos métodos que permitan acortar tiempos o mejorar las técnicas, en relación a los métodos utilizados en la actualidad.

Los estudios efectuados entre los años 1993 y 1995, fueron pioneros en nuestro país (Samper et al, 1993) y permitieron establecer las similitudes y diferencias de la transmisión de la tuberculosis con estudios nacionales e internacionales (Iglesias Gozalo, Rabanaque Hernández, and Gómez López, 2002) (Iglesias Gozalo, 1998). Actualmente los estudios de epidemiología molecular de la tuberculosis están coordinados por la Dra. Sofía Samper, investigadora del IACS en el hospital Miguel Servet y responsable del Laboratorio Referencia Nacional para el tipado de *M. tuberculosis*, dónde se realiza el estudio genético de todas las cepas de tuberculosis multirresistentes aisladas en España, por el Grupo de Investigación de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza-IIS Aragón (GGM-UZ).

Desde el año 2004, en colaboración y coordinación con la Consejería de Sanidad del Gobierno de Aragón, se realiza la caracterización molecular sistemática de todas las cepas aisladas en nuestra comunidad autónoma. Este trabajo permite detectar y estudiar la presencia de brotes activos, y posibilita a los microbiólogos descartar contaminaciones de laboratorio y diferenciar dentro del complejo *M. tuberculosis*. Estas investigaciones también permiten a los epidemiólogos realizar estudios poblacionales e identificar grupos y factores de riesgo que, a su vez, facilitan a los sistemas de vigilancia epidemiológica de nuestra comunidad autónoma el seguimiento de casos y la detección de brotes, contribuyendo a un mejor control de esta enfermedad. En estos estudios fue fundamental la colaboración de la Unidad de Medicina Preventiva

del Departamento de Microbiología Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza cuya línea de Epidemiologia de Tuberculosis dirige la Dra. María José Iglesias Gozalo. Los estudios se realizan de forma coordinada con los servicios de microbiología de los dos grandes hospitales de la provincia de Zaragoza: el hospital clínico universitario Lozano Blesa y el hospital Miguel Servet, así como del resto de hospitales pertenecientes al SALUD.

Desde el punto de vista de la investigación básica, estos estudios nos permiten reconocer cepas que puedan tener aumentada su virulencia, posibilitando el estudio de los mecanismos de patogenicidad del bacilo de la tuberculosis.

Las técnicas de epidemiología molecular también las hemos aplicado, en colaboración con la Facultad de Veterinaria, a los bacilos de la tuberculosis aislados en animales para su utilización en medicina veterinaria. Se estudiaron aislamientos de bóvidos y cabras, permitiendo detectar en casos aislados la transmisión de determinadas cepas a humanos (Gutiérrez et al, 1997).

Nuestra Universidad ha participado de forma muy activa en estudios de epidemiología de la tuberculosis en colaboración con otras comunidades autónomas. En Gran Canaria (Pena et al, 2003), estos estudios han descrito la posibilidad de reinfección, con nuevas cepas del bacilo, en pacientes con una tuberculosis previa (Caminero, et al, 2001), y que la introducción en el año 1993 en la isla de Gran Canaria de una cepa de la familia denominada "Beijing", perteneciente al linaje 2, produjera ese año el mayor brote de tuberculosis en esta isla. Estudios de años posteriores demostraron que esta cepa causó un 30% de los casos de tuberculosis de toda la isla (Caminero, et al, 2001), señalando la enorme virulencia de esta cepa y que el control de este brote específico habría reducido de forma considerable la incidencia de la tuberculosis en la isla.

#### Epidemiología molecular de la tuberculosis multirresistente

Como ya dijimos anteriormente, el arsenal terapéutico frente a la tuberculosis no es muy amplio y que de los fármacos disponibles, dos isoniacida y rifampicina, son de enorme importancia. La bacteria que adquiere resistencia, al menos a estos dos fármacos, la denominamos tuberculosis multirresistente. La dificultad de su tratamiento, la convierte en la forma más grave de tuberculosis. Su estudio y control es esencial, desde el punto de vista sanitario, epidemiológico y de salud pública.

Tras las epidemias de tuberculosis multirresistentes descritas en los años 90, en Nueva York, estudiamos, en colaboración con hospitales de Málaga y de Madrid, la primera epidemia de tuberculosis multirresistente ocurrida en España (Samper et al, 1997). Una cepa, resistente a la mayor parte de los fármacos conocidos contra la enfermedad, se diseminó entre enfermos con SIDA presentando una alta tasa de reinfección y ocasionando una elevadísima

letalidad (Rivero et al, 2001) y afectando, posteriormente, a gran número de comunidades autónomas, incluida la aragonesa.

Después de esta epidemia causante de más de un centenar de muertes en este país y, con la idea de detectar posibles epidemias de tuberculosis multirresistentes, nuestra Universidad se planteó, en colaboración con la mayoría de los servicios de microbiología de los hospitales públicos, el estudio sistemático de las cepas multirresistentes de tuberculosis y se crea una red de vigilancia de la tuberculosis multirresistente española, pionera a nivel mundial (Samper, Iglesias and Tello, 2000). Esta red se denomina Grupo Español de Trabajo sobre TB-MR y está formada por los laboratorios de micobacterias del Sistema Nacional de Salud, y coordinada por la Dra. Samper desde el grupo de Genética de Micobacterias (http://genmico.unizar.es/).

Así pues desde enero de 1998 y, actualmente, dentro del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) se realiza de forma sistemática el estudio genético de cepas del bacilo de la tuberculosis multirresistentes a los fármacos, en coordinación con el Instituto de Salud Carlos III de Madrid. Los casos idénticos que se detectan entre diferentes comunidades autónomas se comunican al Centro Nacional de Epidemiología. Este sistema de alerta de brotes de tuberculosis multirresistente posibilita la actuación en caso de epidemias.

Las cepas de tuberculosis multirresistentes aisladas en España también se comparan con las aisladas en otros países europeos. Para ello los perfiles de estas cepas multirresistentes se envían al ECDC de Estocolmo, organismo encargado de estudiar las posibles epidemias a nivel europeo.

Tradicionalmente, en modelos animales se ha estudiado que los bacilos que se hacen resistentes a los fármacos son menos virulentos, perdiendo su capacidad de infectar tanto al ratón como al cobayo. Estos estudios han sido corroborados por nuestros trabajos de epidemiología molecular, en los que encontramos que las cepas sensibles a los fármacos, en general, se transmiten más que las cepas multirresistentes (Samper *et al*, 2000, 2005). Sin embargo... ¡determinadas cepas multirresistentes se transmiten de forma epidémica!

#### Estudio de los mecanismos de resistencia

El estudio de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido una de las líneas de investigación prioritarias y pioneras del nuestro maestro el Profesor Gómez-Lus del que aprendimos y continuamos su estudio enfocado al estudio de la resistencia del bacilo de la tuberculosis (Gómez-Lus 2012).

Como hemos indicado anteriormente, la utilización de antibióticos constituye una de las formas más eficaces de luchar contra las enfermedades bacterianas y el estudio de los mecanismos de adaptación del bacilo a los fármacos antituberculosos y de los mecanismos por los que una bacteria se vuelve resistente a los antibióticos, ayuda a prevenir este fenómeno, que representa un grave problema sanitario, y permite comprender y buscar nuevos fármacos más eficaces. Hasta el momento, todas las resistencias descritas en cepas del bacilo de la tuberculosis, que se han estudiado a nivel genético corresponden a modificaciones en el sitio diana de acción de fármaco y no a resistencias transmitidas por plásmidos o transposones.

Sin embargo, se han encontrado bacilos resistentes en los que las proteínas diana no están alteradas, por lo que la resistencia está producida por otro mecanismo diferente. Nos interesamos en el estudio de los mecanismos por los que el bacilo de la tuberculosis aumenta la capacidad de hacerse más resistente, como es el aumento de tasas de mutación (Ebrahimi-Rad et al, 2003).

Actualmente se han aislado cepas resistentes a todos los posibles fármacos antituberculosos y a las posibles combinaciones de los mismos. Hoy nos encontramos con aislados de *M. tuberculosis* frente a los que no tenemos tratamiento. Aunque nuevos antibióticos se encuentran actualmente en desarrollo clínico, las futuras estrategias de tratamiento deberán hacer frente tanto a la tuberculosis latente como a la rápida evolución de brotes resistentes.

Siguiendo esta línea de investigación, enfocada al estudio de los mecanismos de resistencia aplicado a las micobacterias, inicialmente estudiamos las enzimas modificantes de antibióticos (Ainsa, et al, 1996, Ainsa, et al, 1997) y posteriormente, en colaboración con otros laboratorios europeos, la contribución de las bombas de eflujo en la resistencia a antibióticos (Ainsa et al, 1998), (De Rossi et al, 2002). El bacilo tiene más de 40 bombas de eflujo de distintas familias y se están estudiando nuevas bombas de eflujo de la familia Major Facilitator Superfamily (De Rossi, Aínsa and Riccardi, 2006), (Ramón-García et al, 2006).

Actualmente esta línea de investigación en resistencia en tuberculosis y búsqueda de nuevos fármacos, la dirige el Profesor José Antonio Aínsa Claver, Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza, desde las instalaciones ubicadas en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA).

#### DESARROLLO DE HERRAMIENTAS GENÉTICAS

Si bien la genética y la biología molecular se desarrollan en los años 70 utilizando distintas bacterias y virus como modelos, no fue hasta 20 años más tarde, cuando las técnicas moleculares se aplicaron al estudio del bacilo de la tuberculosis. Las razones de esta demora son diversas. El bacilo es difícil de manipular, debe manipularse en laboratorios de seguridad biológica por

tratarse de un patógeno que se transmite por vía respiratoria y que presenta un crecimiento lento. Experimentos, que en otras bacterias no patógenas se realizan en días, con el bacilo de la tuberculosis se retrasan meses y años. A todo ello, se sumó el optimismo de los años 70, en que se pensaba que era posible la erradicación de la tuberculosis, considerándose, erróneamente, que no sería necesario estudiar y conocer el bacilo para luchar contra él.

Manipular directamente al bacilo de la tuberculosis, implica haber desarrollado útiles genéticos, en microorganismos emparentados, que nos sirven de modelo. Para la puesta a punto de estos nuevos útiles genéticos se eligieron especies de micobacterias no patógenas de crecimiento rápido, como *Mycobacterium smegmatis* y, posteriormente, micobacterias de crecimiento lento no patógenas como es el caso de *M. bovis* BCG.

El bacilo de la tuberculosis pertenece al género de las "micobacterias" (*Mycobacterium*). La investigación genética la iniciaron dos grupos, a finales de los años 80: uno, en Estados Unidos y otro en Europa. El grupo americano dirigido por el profesor Jacobs de la Facultad de Medicina del "Albert Einstein Institut" de Nueva York y el grupo europeo, por la profesora Gicquel del Institut Pasteur de París.

En aquel momento, otros miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad se formaron en este Instituto. En este período, se aisló el transposón Tn610, que fue modificado genéticamente, introduciendo un marcador de resistencia a kanamicina, denominándose al nuevo transposón Tn611 (Martin et al, 1990). Con éste se demostró, por primera vez, la transposición en micobacterias. También participamos en el desarrollo de las técnicas de manipulación genética por introducción de DNA por electro transformación (Hermans et al, 1991) y desarrollamos vectores que permiten insertar genes de forma estable en las micobacterias (Martin et al, 1991).

En 1992, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza se creó el Grupo de Investigación en Genética de las Micobacterias. El Grupo se plantea contribuir al desarrollo de las herramientas necesarias para poder manipular el bacilo de la tuberculosis y buscar nuevos elementos genéticos móviles, "transposones", como útiles de mutagénesis en micobacterias, que faciliten el estudio de los mecanismos de patogenicidad del bacilo de la tuberculosis. Se aislaron otros transposones (Guilhot et al, 1992), (Garcia et al, 1994) y se desarrolló un sistema de mutagénesis por transposición de alta eficacia (Guilhot et al, 1994).

Participamos en la construcción de una serie de vectores que replican de forma condicional, como los plásmidos termosensibles para la replicación. La replicación del plásmido da tiempo a que la transposición ocurra en el interior de la célula, a una temperatura permisiva y, al aumentar la temperatura del cultivo, se inhibe la replicación del plásmido, pudiendo seleccionar estos sucesos de transposición. Estos plásmidos mutantes termosensibles para la replicación en micobacterias fueron obtenidos por mutagénesis química *in vitro* con hidroxilamina. Los mutantes se obtuvieron a partir de plásmidos. Un plásmido derivado de pAL5000 seleccionando mutantes kanamicina resistente a 30°C y sensibles a 39°C y termosensibles (Guilhot, Gicquel, and Martín, 1992) (Gavigan et al, 1995), pueden ser utilizados para el reemplazamiento génico, por recombinación homóloga en el bacilo de la tuberculosis (Jackson et al, 1996).

Desde nuestro Grupo también contribuimos a la identificación y construcción de plásmidos en micobacterias que pueden ser útiles para la manipulación del bacilo de la tuberculosis. Se aislaron nuevos plásmidos de cepas clínicas (Gavigan et al, 1997). Se realizaron construcciones de plásmidos para simplificar la manipulación en el laboratorio (Ainsa, et al, 1996).

Hoy, el conocimiento generado por decenas de equipos de investigación en tuberculosis, es enorme. El importante esfuerzo, invertido en capital humano y recursos en investigación contra la tuberculosis, ha permitido que hoy dispongamos de las herramientas necesarias para poder manipular los bacilos y podamos plantearnos metas tan ambiciosas como desactivar el bacilo de la tuberculosis para desarrollar nuevas vacunas frente a esta enfermedad. Los avances en investigación en el campo de las vacunas y de la inmunología, han llevado a que la comunidad científica internacional, tras más de 90 años de uso de BCG como única vacuna contra la tuberculosis, afronte con optimismo el desarrollo de nuevas vacunas capaces de evitar las formas respiratorias de la enfermedad.

#### EVALUACIÓN DE NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

#### Modelos animales

A pesar de no existir modelos animales que mimeticen la tuberculosis humana en todas sus fases, la evaluación de los candidatos a vacuna en diferentes animales de laboratorio permite estudiar su atenuación y anticipar su seguridad, protección y su posible eficacia. Recordando, siempre con cautela, ya que en humanos no disponemos de una correlación de protección (Williams and Orme, 2016) (Philips and Ernst, 2012), y teniendo presente que la eficacia de una nueva vacuna siempre deberá ser probada en humanos países endémicos (Gonzalo-Asensio, Aguiló and Martín, 2014).

En nuestro campo de interés podemos dividir los estudios en modelos animales en dos tipos. Los estudios de atenuación buscan comprobar que los candidatos a vacuna no producen patología y son seguros. Utilizan dosis muy

superiores a las que se usarán en humanos y se comprueba la supervivencia de los animales frente a un grupo control de animales no vacunados.

Los estudios de protección permiten determinar si un candidato a vacuna protege frente a la enfermedad tras ser infectado con *M. tuberculosis*. Para ello se vacunan los animales, se deja pasar un tiempo hasta que el animal desarrolla la inmunidad adquirida y posteriormente se infecta con *M. tuberculosis*. El grado de protección se determina tanto por el número de bacilos que se obtienen (colonias de *M. tuberculosis* en los diferentes órganos del animal), la patología que muestran los animales vacunados frente a los controles sin vacunar y/o su supervivencia tras la infección. Para estos estudios se utilizan diferentes modelos animales, en ratones y cobayas y cuando han superado éstos, en primates no humanos.

Dentro del modelo de seguridad en ratón, es frecuente el uso de ratones inmunocomprometidos, como el ratón SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) que carece de respuesta inmune adaptativa y que se utiliza para medir el grado de atenuación de los candidatos a vacuna, ya que proporciona una excelente información sobre la seguridad de éstos.

Los ratones inmunocompetentes con un sistema inmune sano se utilizan, tanto en experimentos de atenuación como de protección, pudiéndose emplear diferentes razas de ratones más o menos resistentes a la infección. Su uso proporciona buena información sobre la seguridad de candidatos a vacuna y permite conocer si un candidato previene frente a la enfermedad. Una de las principales ventajas con las que cuenta el modelo de ratón, es el alto número de ratones transgénicos que se han desarrollado en las últimas décadas. Entre estos ratones transgénicos, se encuentran los llamados ratones "knockout", que se caracterizan por carecer de un determinado gen, eliminado a la carta para estudiar el fenotipo de los animales en ausencia de dicho gen y, de esa forma, estudiar su funcionalidad. Con respecto a la tuberculosis, esto ha permitido definir toda una serie de genes y mecanismos del hospedador que resultan cruciales para controlar la infección. En los últimos años, este tipo de ratones también están permitiendo conocer que factores inmunológicos son importantes para que una vacuna frente a la tuberculosis resulte efectiva.

El cobaya está considerado el modelo más sensible a la infección con *M. tuberculosis*, estimándose que 1-2 bacilos son suficientes para acabar con la vida de uno de estos animales. Son excelentes modelos para los estudios de atenuación, dada la gran sensibilidad de estos animales y por permitir comparar varios candidatos mediante estudios de protección. Su principal desventaja radica en que la protección de BCG es muy buena, lo que puede dificultar la comparación entre candidatos (Williams et al, 2005).

El modelo primate no humano, es el modelo animal utilizado en los estudios de inmunidad y toxicidad previos a la fase clínica, cuando los estudios anteriores, en modelos ratón o cobaya, han sido prometedores. Proporciona muy valiosa información sobre parámetros inmunológicos y anatomía patológica, dada su semejanza genética con los humanos.

#### Ensayos clínicos en humanos

Sólo cuando el candidato a vacuna ha demostrado su atenuación y protección en los diferentes modelos animales puede ser aprobado su estudio, en ensayos en humanos, por las autoridades regulatorias del país donde se realizará este ensayo. Las agencias reguladoras revisan de forma exhaustiva los datos preclínicos, así como los protocolos que se seguirán en el ensayo clínico; siempre de acuerdo con la legislación vigente y con el visto bueno del comité ético del hospital dónde se realizarán (Gonzalo-Asensio, Aguiló and Martin, 2014).

Los ensayos clínicos en humanos se realizan en varias fases (Checkley and Mcshane, 2011). En una primera etapa se estudia su toxicidad, en un limitado número (decenas) de voluntarios sanos en los que se valora si una vacuna produce efectos adversos. En esta etapa también se puede evaluar su inmunidad (Fase I). Si la vacuna va a ser administrada a una determinada edad, o población, se realiza una Fase I en adultos sanos que se denomina Fase I a y, posteriormente, se estudia la seguridad en la población a la que va dirigida la vacuna. En el caso de recién nacidos se realizará en bebés recién nacidos sanos y se denomina Fase I b.

En una segunda etapa se estudia la relación dosis-respuesta y se evalúa la "respuesta inmune de los vacunados" buscando definir la dosis a utilizar en posteriores estudios de eficacia (Fase II). El número de individuos a estudiar deberá ser suficiente (centenares) para permitir obtener resultados estadísticamente significativos, entre los diferentes grupos de estudio. Cuando el número de individuos es lo suficientemente grande (miles), la incidencia de enfermedad elevada y el estudio se prolonga lo suficiente, podremos obtener datos de eficacia. Este fue el caso de la vacuna MVA85, de la que hablaremos posteriormente, y a esta fase se le denomina Fase II b.

En una tercera etapa se realiza el "estudio de la eficacia" que busca proteger frente a la enfermedad a gran número (miles) de voluntarios vacunados a doble ciego con el nuevo candidato y comparar estos resultados con los vacunados con BCG (Fase III). Si los resultados en las fases anteriores son satisfactorios se comercializa y comienza la etapa de su estudio de eficacia y de sus posibles efectos adversos "fármaco-vigilancia" (Fase IV).

#### NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

Los avances en la investigación en el campo de las vacunas, de la inmunología y el desarrollo de la genética de micobacterias facilitaron la investigación de una nueva vacuna contra la tuberculosis más eficaz que la actual BCG.

La investigación en nuevas vacunas es una tarea tremendamente costosa y compleja que se aborda de una manera multidisciplinar por investigadores de diferentes países y su financiación acostumbra estar subvencionada por fondos públicos. Tras la conferencia de Madrid, en marzo de 1995, "Definition of a Coordinated Strategy Towards a New TB Vaccine" organizada por la OMS y la Unión Internacional contra la tuberculosis (UATLD) se puso en marcha un esfuerzo conjunto de la Unión Europea y los Estados Unidos, a través de los institutos nacionales de Salud (NIH) y la Fundación Bill y Melinda Gates.

Actualmente, son dos las organizaciones internacionales encargadas de acelerar el paso del laboratorio a humanos: la iniciativa europea TBVI (the European TuBerculosis Vaccine Initiative) y AERAS en los Estados Unidos. La iniciativa Europa impulsada por el Dr. Jelle Thole, coordinando desde 2004 proyectos multidisciplinarios a través del VI y VII Programas Marco y, actualmente, del Horizonte 2020, presenta, entre sus resultados, la construcción de gran número de candidatos a vacuna y su estudio comparativo en diversos modelos animales.

Dos son las estrategias fundamentales en la investigación de nuevas vacunas contra la tuberculosis. Una consiste en mejorar la inmunidad conferida por la actual BCG y la segunda, la construcción de nuevas vacunas más eficaces y capaces de reemplazar a BCG (Martin, 2005).

Existe también una tercera estrategia llamada vacunación terapéutica que, a diferencia de la vacunación preventiva, trata de estimular el sistema inmune de personas infectadas de forma latente para así acortar el tratamiento, en un intento de tratar el vasto reservorio que supone la tuberculosis latente. Un ejemplo es RUTI diseñada por el Dr. Pere Joan Cardona de la Unidad de Tuberculosis Experimental del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona.

Dentro del Proyecto Europeo "Tuberculosis Vaccine Development" del V Programa Marco de la Unión Europea, coordinado por la Dra. Gicquel, se desarrollaron y estudiaron más de 100 candidatos vacunas subunidades y más de una veintena de vacunas vivas atenuadas. Hoy se están ensayando diversos candidatos en diferentes modelos animales para determinar su grado de atenuación, inmunidad y protección, para garantizar su eficacia en humanos. Actualmente son 13 los candidatos a vacuna que se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos en humanos (Report WHO, 2016).

#### Mejorar la eficacia de BCG: vacunas subunidades

Las vacunas subunidades se plantean con el objetivo de aumentar la inmunidad conferida por BCG. Son el grupo de candidatos más numerosos y que más han avanzado en los distintos ensayos clínicos en humanos. Estas vacunas subunidades utilizan antígenos de *M. tuberculosis* purificados y se administran junto a potentes adyuvantes, componentes estimuladores del sistema inmune para potenciar la acción de las vacunas, o bien introduciendo los genes que las producen en un virus genéticamente modificado, expresando este virus el antígeno de *M. tuberculosis*.

En ensayos preclínicos las vacunas subunidades no logran conferir por si mismas una inmunidad superior a la actual vacuna BCG. La estrategia que se sigue es potenciar y prolongar la inmunidad de individuos previamente vacunados con BCG. De esta forma, parece posible mejorar y expandir la inmunidad de BCG, utilizando como vacuna subunidad alguno de los antígenos perdidos por BCG, durante su proceso de atenuación.

Diferentes candidatos se han diseñado a partir de antígenos mayoritarios de *M. tuberculosis*, y ausentes en BCG, tal es el caso del antígeno Esat-6. Derivados de esta vacuna se han construido por fusión de la proteína Esat-6 con el antígeno Ag85B. Esta vacuna subunidad administrada junto a diferentes coadyuvantes provoca una respuesta inmunitaria que ha mostrado una cierta protección frente a la infección con *M. tuberculosis*, tanto en modelos animales de ratón y de primate no humano. Actualmente se encuentran en Fase II en humanos.

Tras analizar la respuesta inmunitaria en individuos sanos, que han estado en contacto con *M. tuberculosis*, se han identificados otros antígenos claves en la infección tuberculosa. Algunos de estos antígenos se han seleccionado y fusionado para ser utilizados como vacunas subunidades. Es el caso de la proteína de fusión Mtb72F desarrollada por GlaxoSmithKline. Esta proteína junto con un potente coadyuvante confiere una fuerte respuesta inmunitaria en ratón. En estudios de protección en cobaya la vacunación con MTb72F ha demostrado una supervivencia comparable a la de los cobayas vacunados con BCG y, actualmente, se encuentra en estudios de Fase II.

## Primer ensayo de eficacia de una nueva vacuna en humanos

En la estrategia que busca mejorar la inmunidad de BCG se encuentra el grupo liderado por la Profesora Helen McShane (Universidad de Oxford). Utilizan el virus de la vacuna contra la viruela modificado para introducir un antígeno de *M. tuberculosis* (Ag85A) MVA85A. El empleo de este virus modificado de Ankara (MVA) ha mostrado conferir una potente inmunidad celular y también se ha utilizado como vehículo de diferentes antígenos para

vacunas contra enfermedades en los que la inmunidad celular tiene un papel fundamental, como son SIDA y malaria.

En el modelo cobaya la vacunación con BCG, seguida de la vacunación con MVA85A y una tercera vacunación con el Ag85A junto a un adyuvante, confirió una protección contra la infección con *M. tuberculosis* superior a la obtenida vacunando únicamente con BCG (Williams et al, 2005).

Los resultados preclínicos de MVA85A con diversos modelos animales permitieron iniciar, en 2003, los ensayos clínicos (Mcshane et al, 2004). Se realizaron más de 20 ensayos clínicos en humanos y, en marzo de 2013, se publicaron en Lancet los resultados de los primeros estudios de eficacia de una vacuna contra la tuberculosis tras casi 100 años de uso de BCG. El estudio de protección Fase IIb se realizó en bebés en Worcester Sudáfrica, siendo la Dra. Michele Tameris la investigadora principal del estudio (Tameris et al, 2013).

Los resultados mostraron en bebés vacunados con BCG y, posteriormente con MVA85A, una protección similar a la conferida por BCG. Aunque estos estudios no mostraron una mejoría respecto a BCG, permitieron demostrar la capacitación de Worcester Sudáfrica como un lugar situado en un país endémico dónde poder realizar ensayos clínicos de eficacia de una nueva vacuna contra la tuberculosis y también demostraron que es factible realizar un ensayo clínico, con 3.000 niños, para estudiar la eficacia de las nuevas vacunas.

#### Vacunas vivas capaces de reemplazar a BCG

Vacunas derivadas de BCG recombinante

Las vacunas basadas en BCG recombinante consisten en cepas derivadas de BCG modificadas genéticamente para aumentar su inmunidad. Por tratarse de bacterias vivas, los estudios de seguridad son más exhaustivos que en el caso de vacunas subunidades.

Se han utilizado diferentes estrategias: inicialmente el grupo de Marcus Horwitz (Universidad de California-Los Ángeles) construyó rBCG30 (Horwitz and Harth, 2003). Es una vacuna basada en BCG, que produce grandes cantidades del antígeno Ag85B que BCG no expresa, aumentando la estimulación del sistema inmune con respecto a BCG (Copin et al, 2014). Los experimentos en cobayas demostraron una buena protección de rBCG30 contra la infección con *M. tuberculosis*. Aunque fue el primer candidato a vacuna viva contra la tuberculosis que pasó a Fase I en humanos, dados los bajos resultados obtenidos en inmunidad, no se continuó su estudio.

Otra vacuna basada también en BCG recombinante es rBCG::RD1. Esta se basa en la introducción de genes de *M. tuberculosis* que se han perdido

en BCG ya que algunos, como es el caso de Esat-6, podrían ser importantes antígenos protectores contra *M. tuberculosis* (Bottai et al, 2015). En el momento actual se prueba su seguridad y eficacia en modelos animales.

Una tercera estrategia plantea aumentar la inmunidad celular de BCG insertando un gen de la bacteria *Listeria monocytogenes*. De esta forma BCG se libera en el interior del macrófago infectado lo que, teóricamente, aumenta la presentación de sus antígenos a otras células del sistema inmune, como linfocitos CD8. Esta vacuna ha mostrado protección a largo plazo en el ratón infectado con *M. tuberculosis*. Actualmente la vacuna construida por el Profesor Stefan Kaufmann (Instituto Max Planck de Berlín) se denomina VPM1002 y ha superado los ensayos clínicos de seguridad en adultos. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos en recién nacidos en países endémicos (Fase IIa) (Grode, 2005, Grode, et al, 2013).

#### Vacunas basadas en la atenuación de M. tuberculosis

La publicación de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* por el equipo del profesor Stewart T. Cole (Cole et al, 1998) y, posteriormente, la secuenciación de BCG (Brosch et al, 2007) permitió identificar importantes diferencias genéticas entre BCG y *M. tuberculosis*. Abrió un interrogante sobre si la falta de eficacia de BCG, frente a las formas respiratorias, podría ser debida a su excesiva atenuación y que esas regiones, que se perdieron en BCG y ya ausentes en la cepa original de *M. bovis*, fueran esenciales para la protección contra la tuberculosis.

Tan importante como el conocimiento del genoma del bacilo fue el desarrollo de herramientas, por el equipo de la Dra Brigitte Gicquel, que permiten su manipulación genética, permitiendo la atenuación racional del bacilo de la tuberculosis. Siguiendo los principios de Louis Pasteur, hace casi 100 años, Calmette y Guerin realizaron una atenuación al azar por subcultivos sucesivos en BCG; hoy, utilizando herramientas biotecnológicas, podemos seleccionar que genes inactivar de una forma racional.

#### DESARMANDO AL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

Esta fue la estrategia elegida por nuestro Grupo de Trabajo de la Universidad de Zaragoza, en colaboración con el Instituto Pasteur, para la construcción de una nueva vacuna frente a tuberculosis. A partir de un bacilo de la tuberculosis de origen humano, aislado de un paciente, al que inactivamos sus genes de virulencia de forma racional. Esta estrategia es más laboriosa, implica partir de cero y demostrar, en una primera etapa, la atenuación del candidato a vacuna construido y, en una segunda etapa, una inmunidad superior a BCG.

### Qué genes elegir?

Nuestra hipótesis de partida tuvo su origen en nuestros estudios sobre epidemiología molecular de cepas multirresistentes, si sólo unas pocas se transmiten de una forma mayor que el resto, éstas poseen alguna característica que les hace aumentar su virulencia. Por lo tanto, si logramos saber cómo aumentan su virulencia, podremos inactivar estos genes para conseguir su atenuación.

Concentramos nuestros estudios en la cepa causante del mayor brote identificado de tuberculosis multirresistente en nuestro país (Samper *et al*, 1997) y encontramos que un gen anotado como posible regulador de genes de virulencia en el genoma de *M. tuberculosis* se encontraba altamente expresado en esta cepa (Soto *et al*, 2004). Consideramos que su inactivación podría disminuir la virulencia del bacilo de la tuberculosis.

#### Qué cepa de M. tuberculosis inactivar?

Con objeto de no utilizar cepas de *M. tuberculosis* que hubieran sido subcultivadas en el laboratorio, decidimos iniciar la inactivación de una cepa de *M. tuberculosis* aislada de un paciente y que fue responsable de un brote de tuberculosis. La cepa original denominada MT103 hoy sabemos que pertenece al linaje 4, uno de los más frecuentes aislados en Europa, África y América (Gagneux and Small, 2007).

En esta cepa inactivamos el gen *phoP*, utilizando las técnicas de ingeniería genética previamente desarrolladas (Pérez et al, 2001) y añadiendo un gen de resistencia a kanamicina. Denominándose a esta construcción SO2. La inactivación del gen *phoP* en SO2 conducía a una enorme atenuación, tanto en el modelo celular, como en el modelo ratón, Estos trabajos pioneros en el mutante PhoP fueron realizados por la Dra. Esther Pérez actualmente investigadora en el laboratorio de GSK en Madrid (Pérez et al, 2001). Desde el año 2001 al año 2012 realizamos diferentes estudios preclínicos para demostrar el potencial de SO2 como "prototipo de vacuna atenuada" contra la tuberculosis y utilizando distintos modelos animales.

SO2 resultó estar incluso más atenuado que BCG en ratón SCID (Martin et al, 2006). Por nuestros estudios posteriores sabemos que el gen *phoP* codifica para un factor de transcripción esencial para la virulencia del bacilo de la tuberculosis y que actúa regulando un gran número de genes de *M. tuberculosis* (entre el 2 y el 3 %). Su eliminación conlleva la alteración de varias rutas de virulencia de la bacteria, provocando el desarme de *M. tuberculosis* (Gonzalo-Asensio et al, 2008, Gonzalo-Asensio et al, 2014, Broset, Martin, and Gonzalo-Asensio, 2015). Finalmente tras años de estudio del sistema de regulación del factor de transcripción PhoP en tuberculosis y sobre su función esencial en la virulencia del bacilo, hoy tenemos una idea bastante clara. En estos estudios ha

sido capital el trabajo del Dr Jesús Gonzalo Asensio, experto mundial de referencia en el sistema de regulación PhoP/R de tuberculosis, Profesor Ayudante Doctor en nuestra Universidad y con una enorme capacidad pedagógica tanto con los alumnos de biotecnología como en la formación de futuros doctores.

Los ensayos de protección realizados con SO2, en colaboración con equipos nacionales e internacionales de Inglaterra, Francia y Méjico, han mostrado muy buenos resultados en modelo ratón, y una protección superior a BCG con una inmunidad mayor que la actual vacuna BCG en modelo cobayo (Martin et al, 2006). Los ensayos vacunando primates con SO2, realizados en el PBRC de Holanda, mostraron una importante protección e inmunogenicidad en los macacos vacunados (Verreck et al, 2009).

# Del prototipo de vacuna SO2 a la construcción de MTBVAC

Los buenos resultados obtenidos con el prototipo SO2, en los diferentes modelos estudiados durante más de 12 años, convirtieron a SO2 en un prometedor candidato a vacuna y ser probado en ensayos en humanos.

En el año 2005 se publicó el "Consenso de Ginebra" para la investigación y desarrollo de nuevas vacunas atenuadas contra la tuberculosis. Consistió en una reunión de expertos de la OMS, INH, UE y científicos internacionales. Permitió acordar las características que debería de cumplir una vacuna viva atenuada para su entrada en ensayos clínicos en humanos (Kamath et al, 2005). Señalando como uno de los principales requisitos de las vacunas vivas derivadas de *M. tuberculosis*, su absoluta seguridad para su uso en humanos. Se recomendó que dichas vacunas deberían tener al menos 2 mutaciones independientes, estables y no contener marcadores de genes de resistencia a antibióticos.

Siguiendo este "Consenso de Ginebra" y partiendo de nuestro prototipo de vacuna SO2, construimos una delección en el gen *phoP* y, posteriormente, eliminamos su marcador de resistencia a kanamicina. Como segunda mutación deleccionamos el gen *fadD26*, encargado de la síntesis de un lípido complejo, llamado PDIM, esencial para la virulencia en *M. tuberculosis*. Esta cepa de *M. tuberculosis* atenuada racionalmente tras haber eliminado dos genes *phoP* y *fadD26* y los marcadores de resistencia es el actual candidato a vacuna MTBVAC (*Mycobacterium tuberculosis* <u>Vac</u>cine). La construcción y caracterización se publicó por Arbues y colaboradores en la revista Vaccine en el año 2013. Hoy la Dra. Ainhoa Arbues es investigadora en la Universidad de Basilea (Arbués et al, 2013).

MTBVAC, debido a su mutación en el gen *phoP*, es capaz de producir y no exportar la proteína Esat-6, con lo que se reduce la virulencia del bacilo (J. I. Aguilo et al, 2013), (N. Aguilo, Uranga et al, 2014). Añadir que sí la produce en

su interior por lo que puede ser reconocida por el sistema inmune (Frigui et al, 2008). Hoy sabemos que por contener MTBVAC la región RD1, perdida en los subcultivos de BCG, conserva más de un 20% de los epítopos reconocidos por las células T humanas (Copin et al, 2014). Este hecho podría ser de gran relevancia para el aumento de inmunidad de MTBVAC con respecto a BCG. Otras características que MTBVAC presenta son que su mutación en phoP implica que no se produzcan los lípidos de la capa externa del bacilo PAT, DAT y Sulfolípidos, responsables de enmascarar la respuesta inmunológica de M. tuberculosis (Gonzalo-Asensio et al, 2006, Solans et al, 2014). Otra característica interesante del mutante phoP es que tiene aumentada la secreción de los antígenos del complejo 85 (Ag85A/B/C) debido a una regulación del sistema de secreción TAT, regulado por un pequeño RNA y descrito por vez primera en tuberculosis (Solans et al. 2014). A estas características se añade la mutación en el gen fadD26, también presente en MTBVAC, ya que al no producir el lípido esencial para la virulencia de M. tuberculosis, aumenta su atenuación y seguridad como vacuna (Arbués et al, 2013).

Los estudios preclínicos de la vacuna MTBVAC reflejan que su distribución es similar a la de BCG, con una atenuación igual o superior y una mejor protección (Arbués et al, 2013).

Desde el punto de vista de investigación preclínica en nuestra universidad continuamos estudiando el efecto de vacunación en el modelo neonatal de ratón, obteniendo buenos resultados de seguridad e inmunidad (N. Aguilo, S. Uranga et al, 2016).

Recientemente hemos obteniéndose muy buenos resultados al vacunar por vía pulmonar con BCG (N. Aguilo, et al, 2014, N. Aguilo, et al, 2016), por lo que no descartamos utilizar otras vías diferentes a la intradérmica y estamos muy interesados en estas nuevas vías con MTBVAC.

# MTBVAC DE LA INVESTIGACIÓN AL DESARROLLO

Desde el año 2008 el proyecto vacuna MTBVAC cuenta con un socio industrial, la compañía biofarmacéutica gallega, Biofabri. Me gustaría destacar aquí el impulso y entusiasmo de su equipo y especialmente de su Director Don Esteban Rodríguez.

En el año 2012 Biofabri y la Universidad de Zaragoza firmaron un acuerdo por el que Biofabri es, oficialmente, el fabricante industrial autorizado por la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) y licenciatario exclusivo de MTBVAC. Comprometiéndose en ser el patrocinador del desarrollo industrial clínico de MTBVAC en colaboración con la Universidad de Zaragoza, propietario intelectual del MTBVAC. El desarrollo clínico se realiza con la ayuda de equipos

de trabajo de expertos en estudios preclínicos (Product Development Team, PDT) y expertos independientes en estudios clínicos (Clinical Development Team, CDT). Todos cuentan con una sólida experiencia reglamentaria para MTBVAC y trabajan dentro del paraguas de la iniciativa europea TBVI.

# MTBVAC DEL DESARROLLO A LOS ENSAYOS CLÍNICOS

Numerosos resultados preclínicos de atenuación y protección obtenidos con el primer prototipo de vacuna SO2, debieron ser repetidos tras la nueva construcción MTBVAC. Hubo que repetirlos en diferentes modelos animales como paso previo para obtener los permisos para la entrada en fase de evaluación clínica. En el año 2010 se realizaron estudios preclínicos de MTBVAC solicitados por las autoridades suizas (Swissmedic). Los estudios los realizaron compañías autorizadas independientes y financiados por el programa INNOCASH del Gobierno de España. El diseño de estos estudios fue el resultado de la estrecha colaboración entre la Universidad de Zaragoza, Biofabri y la Iniciativa Europea Vacuna Tuberculosis (TBVI).

Tras presentar estos resultados, MTBVAC recibió, en octubre de 2012, la aprobación de las autoridades suizas para comenzar el primer ensayo clínico en humanos (Fase I a) en el Hospital Universitario de Lausana (CHUV) y dirigido por el Prof. François Spertini (NCT02013245). El promotor del estudio fue Biofabri y fue coofinanciado por la Fundación Gates, a través de la iniciativa europea TBVI.

# De los adultos suizos

El objetivo principal de esta Fase I a consistió en estudiar la seguridad y la tolerancia de MTBVAC en comparación con la vacuna actual BCG SSI y su objetivo secundario, conocer su inmunogenicidad. El estudio se realizó en 36 voluntarios adultos sanos entre 18 y 45 años sin antecedentes de vacunación con BCG o exposición previa a tuberculosis (PPD-negativos) y VIH negativos. El estudio doble ciego consistió en un escalado de dosis de MTBVAC. En una cohorte de 12 voluntarios, 9 recibieron una dosis 100 veces menor que la actual BCG (1.000 bacterias) y 3 recibieron la vacuna BCG. Una vez comprobada su seguridad se aprobó la vacunación de una segunda cohorte de otros 12 voluntarios. En 9 de los voluntarios se aumentó la dosis de MTBVAC a 10 veces menor que BCG (10.000 bacterias) y otros 3 voluntarios fueron vacunados con BCG. Tras comprobar la seguridad se aprobó la vacunación de una tercera cohorte de 12 voluntarios, 9 con una dosis de MTBVAC idéntica a la empleada con BCG de 100.000 bacterias atenuadas y otros 3 voluntarios fueron vacunados con BCG.

Al final del estudio disponíamos de 4 grupos. Nueve voluntarios vacunados con una dosis baja de MTBVAC, 9 voluntarios con una dosis intermedia de MTBVAC y 9 voluntarios con una dosis alta de MTBVAC, similar a la dosis de BCG, así como 9 voluntarios vacunados con BCG.

La conclusión de este primer estudio en humanos mostró que la vacunación con MTBVAC es, al menos, tan segura como BCG y no produce efectos adversos mayores. Los datos de inmunogenicidad mostraron que MTBVAC confería una respuesta inmunológica que aumenta con la dosis. El grupo vacunado con la dosis más alta de MTBVAC mostró mayor respuesta de linfocitos T CD4 + de memoria que reconocían varias citoquinas (IL2+TNF $\alpha$ +INF $\gamma$ ) que el grupo vacunado con BCG siendo mayor el número de individuos que reaccionó a MTBVAC (4) que a BCG (1). Si bien no se pudo obtener una significación estadística de la inmunogenicidad conferida por la vacuna MTBVAC, debido al bajo número de participantes estudiados en la Fase I a, estos resultados abren el camino al ensayo en mayor número de voluntarios (Fase II a) para confirmar el aumento de inmunogenicidad.

Este primer ensayo de Fase I marca un hito histórico en la vacunología humana, por ser la primera vez que una vacuna viva atenuada de *M. tuberculosis* ha entrado en ensayos clínicos; los resultados muestran un excelente perfil de seguridad y una inmunogenicidad superior a BCG; favoreciendo el desarrollo clínico de MTBVAC y su ensayo en países endémicos con alta incidencia de tuberculosis, en los que se pueda demostrar su eficacia. Estos resultados se publicaron en la revista Lancet Respiratory Disease en Diciembre de 2015 (Spertini et al, 2015).

# A los bebés sudafricanos

Para obtener el permiso de las autoridades sudafricanas resultaron fundamentales los resultados positivos obtenidos en adultos sanos en un país con baja incidencia de tuberculosis como Suiza. Permitió iniciar el ensayo clínico de MTBVAC de fase Ib, en recién nacidos sanos, en una región endémica con alta incidencia de tuberculosis.

Los estudios se realizan en Worcester, Sudáfrica, con la Dra. Michele Tameris como investigadora principal (NCT02729571) y siendo BIOFABRI el promotor del estudio cofinanciado por el Fondo Noruego de Cooperación (NORAD), a través de la iniciativa europea TBVI. Worcester es un centro de ensayos clínicos de vacunas de tuberculosis y pertenece a la Iniciativa Sudafricana para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis (SATVI). Dispone de una enorme experiencia por haber realizado la Fase II b de eficacia de la vacuna MVA85A de la Universidad de Oxford.

El diseño del estudio se estableció para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de MTBVAC en recién nacidos, frente a la vacuna BCG. Como paso previo de seguridad una cohorte de 18 adultos sanos previamente vacunados con BCG y no infectados con el bacilo de la tuberculosis y VIH negativos, 9 se vacunaron con BCG y 9 con MTBVAC a la misma dosis. Este estudio finalizó con éxito, en diciembre de 2015, sin eventos adversos mayores relacionados con la vacuna.

En enero de 2016 se inició la etapa de vacunación del recién nacidos que finalizó en septiembre de 2016. Los informes finales de seguridad e inmunogenicidad se esperan para finales del presente año 2017.

Este estudio se diseñó de forma similar al de adultos en Suiza. Corresponde a un estudio doble ciego con un escalado de dosis de MTBVAC, comenzando por una cohorte de 12 bebés de los que 9 recibieron una dosis 100 veces menor que la actual BCG y 3 recibieron BCG. Se comprobó su seguridad durante dos meses y se analizaron sus resultados por el comité de expertos independientes (DSMB), antes de iniciar la vacunación de la segunda cohorte. Doce recién nacidos a los que se aumentó la dosis de MTBVAC en 9 y otros 3 fueron vacunados con BCG. Tras comprobarse la seguridad de esta segunda cohorte se vacunó una tercera cohortes de 9 bebés con una dosis de MTBVAC, idéntica a la empleada con BCG, de 50.000 bacterias atenuadas por voluntario y otros 3 bebés fueron vacunados con BCG.

Al final del estudio se obtienen 4 grupos de 9 bebés vacunados con dosis baja de MTBVAC, 9 con la dosis intermedia de MTBVAC y 9 con dosis alta de MTBVAC similar a BCG, así como 9 bebés vacunados con BCG que actúan como grupo control.

Este Fase I b en recién nacidos tiene como objetivo avanzar a la Fase II a para identificar la dosis a utilizar en los futuros estudios de eficacia de MTBVAC.

# PLAN DE DESARROLLO CLÍNICO DE MTBVAC

El plan de desarrollo clínico de MTBVAC cuenta, en la Universidad de Zaragoza, con la Dra. Dessislava Marinova que, desde el año 2008, coordina con Biofabri, los equipos de desarrollo preclínicos y clínicos de MTBVAC, dentro de la iniciativa europea TBVI. Estos comités son los encargados de la planificación de los futuros ensayos clínicos a realizar y de buscar su potencial financiación. En este plan se define la estrategia en la que se valoran los resultados obtenidos y se define la población diana a la que dirigir la vacunación con MTBVAC. Desde el principio MTBVAC fue concebida como vacuna al nacimiento, con similares características que BCG, si bien los estudios epidemiológicos de tuberculosis muestran que el impacto de vacunación sería mucho mayor, si ésta se realizase en población adolescente y adulta, etapa en que la transmisión de la tuberculosis es mayor. Nos planteamos dirigir la

vacuna también para esta población estableciéndose dos equipos de desarrollo clínico diferentes para MTBVAC, ambos coordinados por TBVI.

El primero tiene como objetivo el desarrollo de MTBVAC como una vacuna preventiva para recién nacidos y está coordinado por la Dra. Ingrid Murillo de Biofabri. Se prevé solicitar financiación para la definición de dosis al programa EDCTP (The European & Developing Countries Clinical Trials Partnership) de la Unión Europea. También, en colaboración con el Instituto Pasteur de Madagascar y con el Centro Espoir Pour La Santé (EPLS), Saint-Louis, de Senegal, para progresar a un ensayo de fase II b /III multicéntrico de eficacia en diferentes endémicos países.

El segundo equipo de desarrollo clínico de MTBVAC se centra en el desarrollo de MTBVAC como vacuna preventiva para adolescentes y adultos (vacunados con BCG al nacimiento) y en el que colaboramos con la organización americana AERAS. Está previsto realizar un estudio de definición de dosis de la Fase II a (NCT 02933281) para lo que se ha solicitado financiación a los National Institutes of Health (INH) de los Estados Unidos y estará coordinado por la Dra. Ann Gisberg de Aeras. El objetivo es progresar a un ensayo de fase IIb /III multicéntrico de eficacia en países endémicos en adolescentes previamente vacunados con BCG.

# UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS EN EL HORIZONTE, RETOS Y DESAFÍOS

El desarrollo de nuevas vacunas que permitan erradicar la tuberculosis a medio plazo constituye actualmente un desafío enorme para la comunidad científica. La población que actualmente está vacunada con BCG supone un importante reto. Otro reto es proteger a la población infectada de forma latente con *M. tuberculosis*. La prevención de la tuberculosis en futuras generaciones debe beneficiarse de la experiencia adquirida durante los casi 100 años de utilización de BCG. Por ello, los nuevos candidatos a vacuna han de estimular el sistema inmune a largo plazo para proteger a recién nacidos y seguir garantizando su protección en la etapa adulta. Para este objetivo, las vacunas vivas atenuadas, capaces de imitar la infección sin causar enfermedad, se perfilan como candidatos potenciales.

Por último, no podemos olvidar la gran incidencia de tuberculosis en países de escasos recursos. Por ello la erradicación de esta enfermedad pasa por campañas de vacunación masiva y las futuras vacunas han de poder ser producidas a gran escala y bajo coste. En este aspecto las vacunas vivas han demostrado una excelente relación coste: beneficio que además podrían beneficiarse de la enorme experiencia en el uso y producción de la vacuna viva BCG.

Actualmente se considera que la inmunidad conferida por las vacunas vivas atenuadas, a diferencia de las vacunas de subunidades, induce una respuesta inmunitaria específica de larga duración. Este efecto podría estar relacionado con su persistencia *in vivo* como la que se observó en otras vacunas vivas humanas (sarampión, fiebre amarilla). La vacunación con *M. tuberculosis* viva atenuada, como es el caso de MTBVAC, induciría a largo plazo una respuesta inmune contra ciertos epítopos de células T que están presentes en *M. tuberculosis* y ausentes en BCG (aislada de animales) y que puede ser elemento importante para la protección.

Además, la vacunación al nacimiento con vacunas vivas atenuadas contra *M. tuberculosis*, podría representar la estrategia más eficaz para conferir inmunidad protectora contra la TB, puesto que los recién nacidos sanos representan la población más sensible sin inmunidad previa a otras micobacterias. Por otra parte la vacunación de los adultos podría conducir a posibles efectos de enmascaramiento y bloqueo de la vacunación (Barreto et al, 2014, Arregui et al, 2016).

Los próximos años están llenos de retos y expectativas tanto para MTBVAC, como para otras vacunas actualmente en desarrollo frente a la tuberculosis. MTBVAC es la única vacuna viva de *M. tuberculosis* en desarrollo clínico y representa, una oportunidad única para estudiar y comprender que se requiere, en términos de una inmunidad efectiva contra la infección por *M. tuberculosis* y la historia natural de la enfermedad. Los datos inmunológicos de los ensayos clínicos planeados de MTBVAC, para definir la dosis en recién nacidos y adolescentes, permitirán establecer diferencias cualitativas y cuantitativas entre las respuestas activadas por MTBVAC y BCG.

En este contexto las colaboraciones, a nivel internacional con expertos en el campo de otras enfermedades infecciosas y desarrollo de nuevas vacunas, nos permiten afrontar con optimismo un futuro en que podamos demostrar la seguridad y eficacia de MTBVAC, en países dónde la tuberculosis sigue truncando miles de vidas.

Si MTBVAC protege como muestran los estudios preclínicos y esperamos confirmar en humanos, el uso de esta vacuna junto con medidas de mejora de desarrollo en los países endémicos, puede ser decisiva en la lucha contra la tuberculosis.

Los estudios en marcha son una base sólida para ampliar el conocimiento y la compresión de los mecanismos de virulencia del bacilo de la tuberculosis y poder estudiar y conocer la inmunidad contra la infección del bacilo y enfermedad. Seguir investigando en MTBVAC es esencial para conocer tanto el mecanismo molecular de su acción como la respuesta inmunitaria a la vacuna. Si consiguiésemos obtener un marcador de protección en modelos animales que

permita estudiar la protección se podría acelerar enormemente el desarrollo clínico de MTBVAC. Para ello contamos en nuestro grupo con el investigador posdoctoral Nacho Aguiló, formado en nuestra universidad en el grupo de los Drs. Alberto Anel y Julian Pardo y que con un sólido conocimiento en inmunología está realizando enormes avances en las investigaciones en este campo y hoy es pieza indispensable del Proyecto Vacuna.

Llegando al final de mi exposición, me gustaría recordar un proverbio africano, de autor desconocido, de una enorme simplicidad en su enunciado y de una tremenda complejidad en ser llevado a la práctica y que simboliza plenamente nuestro proyecto, "Si quieres llegar deprisa, anda solo, si quieres llegar lejos, camina en compañía".

Sean mis últimas palabras para las nuevas generaciones de investigadores de nuestra Universidad. Vuestra labor de futuro, colaborando estrechamente con los expertos mundiales en el campo de las vacunas contra la tuberculosis, es la garantía que permitirá en un futuro, esperemos que cercano, mostrar el impacto que una nueva vacuna, como MTBVAC, puede aportar en el control frente a la tuberculosis a nivel mundial.

HE DICHO.

# REFERENCIAS

Aaby, P P, and C S Benn. 2012. "Saving Lives by Training Innate Immunity with Bacille Calmette-Guerin Vaccine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (43): 17317–18.

Aguilo, N, H Alonso, S Uranga, D Marinova, A Arbués, A de Martino, A Anel, et al. 2013. "ESX-1-Induced Apoptosis Is Involved in Cell-to-Cell Spread of *Mycobacterium tuberculosis*." *Cellular Microbiology* 15 (12): 1994–2005.

Aguilo, N, S Uranga, D Marinova, C Martin, and J Pardo. 2014. "Bim Is a Crucial Regulator of Apoptosis Induced by *Mycobacterium tuberculosis.*" *Cell Death & Disease* 5 (7): e1343.

Aguilo, N, A M Toledo, E Maria Lopez-Roman, E Perez-Herran, E Gormley, J Rullas-Trincado, I Angulo-Barturen, and C Martin. 2014. "Pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination Confers Dose-Dependent Superior Protection Compared to That of Subcutaneous Vaccination." *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 21 (4): 594–97.

Aguilo, N, S Alvarez-Arguedas, S Uranga, D Marinova, M Monzon, J J Badiola, and C Martin. 2016. "Pulmonary but Not Subcutaneous Delivery of BCG Vaccine Confers Protection to Tuberculosis-Susceptible Mice by an Interleukin 17-Dependent Mechanism." *The Journal of Infectious Diseases* 213 (5): 831–39.

Aguilo, N, S Uranga, D Marinova, M Monzon, J J Badiola, and C Martin. 2016. "MTBVAC Vaccine Is Safe, Immunogenic and Confers Protective Efficacy Against *Mycobacterium tuberculosis* in Newborn Mice." *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 96 (January): 71–74.

- Ainsa, J A, C Martin, B Gicquel, and R Gomez-Lus. 1996. "Characterization of the Chromosomal Aminoglycoside 2'-N-Acetyltransferase Gene From *Mycobacterium fortuitum*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (10). American Society for Microbiology (ASM): 2350–55.
- Ainsa, J A, C Martin, M Cabeza, F De la Cruz, and M V Mendiola. 1996. "Construction of a Family of *Mycobacterium/Escherichia coli* Shuttle Vectors Derived From pAL5000 and pACYC184: Their Use for Cloning an Antibiotic-Resistance Gene From *Mycobacterium fortuitum*." *Gene* 176 (1-2): 23–26.
- Ainsa, J A, E Pérez, V Pelicic, F X Berthet, B Gicquel, and C Martin. 1997. "Aminoglycoside 2'-N-Acetyltransferase Genes Are Universally Present in Mycobacteria: Characterization of the *aac(2")-Ic* Gene From *M. tuberculosis* and the *aac(2")-Id* Gene From *M. smegmatis.*" *Molecular Microbiology* 24 (2): 431–41.
- Ainsa, J A, M C Blokpoel, I Otal, D B Young, K A De Smet, and C Martin. 1998. "Molecular Cloning and Characterization of Tap, a Putative Multidrug Efflux Pump Present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis." Journal of Bacteriology* 180 (22): 5836–43.
- Andrews, J R, F Noubary, R P Walensky, R Cerda, E Losina, and C R Horsburgh. 2012. "Risk of Progression to Active Tuberculosis Following Reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*." *Clinical Infectious Diseases* 54 (6): 784–91.
- Arbués, A, N Aguilo, J Gonzalo-Asensio, D Marinova, S Uranga, E Puentes, C Fernandez, et al. 2013. "Construction, Characterization and Preclinical Evaluation of MTBVAC, the First Live-Attenuated *M. tuberculosis*-Based Vaccine to Enter Clinical Trials." *Vaccine* 31 (42): 4867–73.
- Arregui, S, J Sanz, D Marinova, C Martin, and Y Moreno. 2016. "On the Impact of Masking and Blocking Hypotheses for Measuring the Efficacy of New Tuberculosis Vaccines." *PeerJ* 4: e1513.
- Arts, R J W, A Carvalho, C La Rocca, C Palma, F Rodrigues, R Silvestre, J Kleinnijenhuis, et al. 2016. "Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity." *Cell Reports* 17 (10): 2562–71.
- Barreto, M L, D Pilger, S M Pereira, B Genser, A A Cruz, S S Cunha, C Sant'Anna, M A Hijjar, M Y Ichihara, and L C Rodrigues. 2014. "Causes of Variation in BCG Vaccine Efficacy: Examining Evidence From the BCG REVAC Cluster Randomized Trial to Explore the Masking and the Blocking Hypotheses," May. Elsevier Ltd, 1–6.
- Benn, C S, M G Netea, L K Selin, and P Aaby. 2013. "A Small Jab a Big Effect: Nonspecific Immunomodulation by Vaccines." *Trends in Immunology* 34 (9). Elsevier Ltd: 431–39.
- Bottai, D, W Frigui, S Clark, E Rayner, A Zelmer, N Andreu, M de Jonge, et al. 2015. "Increased Protective Efficacy of Recombinant BCG Strains Expressing Virulence-Neutral Proteins of the ESX-1 Secretion System" 33 (23). Elsevier Ltd: 2710–18.
- Brosch, R, S V Gordon, M Marmiesse, P Brodin, C Buchrieser, K Eiglmeier, T Garnier, et al. 2002. "A New Evolutionary Scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6). National Acad Sciences: 3684–89.
- Brosch, R, S V Gordon, T Garnier, K Eiglmeier, W Frigui, P Valenti, S Dos Santos, et al. 2007. "Genome Plasticity of BCG and Impact on Vaccine Efficacy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (13): 5596–5601.
- Broset, E, C Martin, and J Gonzalo-Asensio. 2015. "Evolutionary Landscape of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex From the Viewpoint of PhoPR: Implications for Virulence Regulation and Application to Vaccine Development." *mBio* 6 (5): e01289–15.

- Caminero, J A, M J Pena, M I Campos-Herrero, J C Rodríguez, I García, P Cabrera, C Lafoz, et al. 2001. "Epidemiological Evidence of the Spread of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain of the Beijing Genotype on Gran Canaria Island." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (7): 1165–70..
- Caminero, J A, M J Pena, M I Campos-Herrero, J C Rodríguez, O Afonso, C Martin, J M Pavón, et al. 2001. "Exogenous Reinfection with Tuberculosis on a European Island with a Moderate Incidence of Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (3 Pt 1): 717–20.
- Checkley, A M, and H Mcshane. 2011. "Tuberculosis Vaccines: Progress and Challenges." *Trends in Pharmacological Sciences* 32 (10). Elsevier Ltd: 601–6.
- Cole, S T, R Brosch, J Parkhill, T Garnier, C Churcher, D Harris, S V Gordon, et al. 1998. "Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* From the Complete Genome Sequence." *Nature* 393 (6685): 537–44.
- Comas, I, J Chakravartti, P M Small, J Galagan, S Niemann, K Kremer, J D Ernst, and S Gagneux. 2010. "Human T Cell Epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* Are Evolutionarily Hyperconserved." *Nature Genetics* 42 (6): 498–503.
- Comas, I, Mireia C, T Luo, S Borrell, K E Holt, M Kato-Maeda, J Parkhill, et al. 2013. "Out-of-Africa Migration and Neolithic Coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with Modern Humans." *Nature Genetics* 45 (10): 1176–82.
- Copin, R, M Coscolla, E Efstathiadis, S Gagneux, and J D Ernst. 2014. "Impact of in Vitro Evolution on Antigenic Diversity of *Mycobacterium bovis Bacillus* Calmette-Guerin (BCG)." *Vaccine* 32 (45): 5998–6004.
- De Castro, M J, J Pardo-Seco, and F Martinón-Torres. 2015. "Nonspecific (Heterologous) Protection of Neonatal BCG Vaccination Against Hospitalization Due to Respiratory Infection and Sepsis." *Clinical Infectious Diseases* 60 (11): 1611–19.
- De Rossi, E, J A Aínsa, and G Riccardi. 2006. "Role of Mycobacterial Efflux Transporters in Drug Resistance: an Unresolved Question." *FEMS Microbiology Reviews* 30 (1). The Oxford University Press: 36–52.
- De Rossi, E, P Arrigo, M Bellinzoni, P A E Silva, C Martin, J A Aínsa, P Guglierame, and G Riccardi. 2002. "The Multidrug Transporters Belonging to Major Facilitator Superfamily in *Mycobacterium tuberculosis.*" *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 8 (11). The Feinstein Institute for Medical Research: 714–24.
- Ebrahimi-Rad, M, P Bifani, C Martin, K Kremer, S Samper, J Rauzier, B Kreiswirth, et al. 2003. "Mutations in Putative Mutator Genes of *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the W-Beijing Family." *Emerging Infectious Diseases* 9 (7): 838–45.
- Frigui, W, D Bottai, L Majlessi, M Monot, E Josselin, P Brodin, T Garnier, et al. 2008. "Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 Secretion and Specific T Cell Recognition by PhoP." *PLoS Pathogens* 4 (2). Public Library of Science: e33.
- Gagneux, S. 2012. "Host-Pathogen Coevolution in Human Tuberculosis." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1590): 850–59.
- Gagneux, S, and P M Small. 2007. "Global Phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and Implications for Tuberculosis Product Development." *The Lancet Infectious Diseases* 7 (5): 328–37.
- Garcia, M J, C Guilhot, R Lathigra, M C Menendez, P Domenech, C Moreno, B Gicquel, and C Martin. 1994. "Insertion Sequence IS1137, a New IS3 Family Element From *Mycobacterium smegmatis*." *Microbiology (Reading, England)* 140 ( Pt 10) (10). Microbiology Society: 2821–28.

Gavigan, J A, C Guilhot, B Gicquel, and C Martin. 1995. "Use of Conjugative and Thermosensitive Cloning Vectors for Transposon Delivery to *Mycobacterium smegmatis*." *FEMS Microbiology Letters* 127 (1-2): 35–39.

Gavigan, J A, J A Ainsa, E Pérez, I Otal, and C Martin. 1997. "Isolation by Genetic Labeling of a New Mycobacterial Plasmid, pJAZ38, From *Mycobacterium fortuitum.*" *Journal of Bacteriology* 179 (13). American Society for Microbiology (ASM): 4115–22.

Gómez-Lus Rafael. 2012. "El lenguaje de las bacterias" Solemne apertura de curso de las Academias de Aragón. Navarro Editores. Zaragoza. p5-35.

Gonzalo-Asensio, J, C Maia, N L Ferrer, N Barilone, F Laval, C Yesid Soto, N Winter, et al. 2006. "The Virulence-Associated Two-Component PhoP-PhoR System Controls the Biosynthesis of Polyketide-Derived Lipids in *Mycobacterium tuberculosis.*" *The Journal of Biological Chemistry* 281 (3): 1313–16.

Gonzalo-Asensio, J, S Mostowy, J Harders-Westerveen, K Huygen, R Hernández-Pando, J Thole, M Behr, B Gicquel, and C Martin. 2008. "PhoP: a Missing Piece in the Intricate Puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence." Edited by Niyaz Ahmed. *PLoS ONE* 3 (10): e3496.

Gonzalo-Asensio, J, W Malaga, A Pawlik, C Astarie-Dequeker, C Passemar, F Moreau, Francoise Laval, et al. 2014. "Evolutionary History of Tuberculosis Shaped by Conserved Mutations in the PhoPR Virulence Regulator." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (31): 11491–96.

Gonzalo-Asensio, J, N Aguilo and C Martin. Octubre 2014. "Nuevas vacunas contra la tuberculosis" Investigación y Ciencia.

Grode, L. 2005. "Increased Vaccine Efficacy Against Tuberculosis of Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin Mutants That Secrete Listeriolysin." *Journal of Clinical Investigation* 115 (9): 2472–79.

Grode, L, C A Ganoza, C Brohm, J Weiner 3rd, B Eisele, and S H E Kaufmann. 2013. "Safety and Immunogenicity of the Recombinant BCG Vaccine VPM1002 in a Phase 1 Open-Label Randomized Clinical Trial" 31 (9). Elsevier Ltd: 1340–48.

Guilhot, C, B Gicquel, J Davies, and C Martin. 1992. "Isolation and Analysis of IS6120, a New Insertion Sequence From *Mycobacterium smegmatis*." *Molecular Microbiology* 6 (1): 107–13.

Guilhot, C, I Otal, I Van Rompaey, C Martin, and B Gicquel. 1994. "Efficient Transposition in Mycobacteria: Construction of *Mycobacterium smegmatis* Insertional Mutant Libraries." *Journal of Bacteriology* 176 (2). American Society for Microbiology (ASM): 535–39.

Guilhot, C, B Gicquel, and C Martín. 1992. "Temperature-Sensitive Mutants of the *Mycobacterium* Plasmid pAL5000." *FEMS Microbiology Letters* 98 (1-3): 181–86.

Gutiérrez, M, S Samper, M S Jimenez, J D van Embden, J F Marín, and C Martin. 1997. "Identification by Spoligotyping of a Caprine Genotype in *Mycobacterium bovis* Strains Causing Human Tuberculosis." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (12). American Society for Microbiology (ASM): 3328–30.

Hermans, J, C Martin, G N Huijberts, T Goosen, and J A de Bont. 1991. "Transformation of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis* with the Broad Host-Range Gram-Negative Cosmid Vector pJRD215." *Molecular Microbiology* 5 (6): 1561–66.

Horwitz, M A, and G Harth. 2003. "A New Vaccine Against Tuberculosis Affords Greater Survival After Challenge Than the Current Vaccine in the Guinea Pig Model of Pulmonary Tuberculosis." *Infection and Immunity* 71 (4). American Society for Microbiology: 1672–79.

Iglesias Gozalo, M.J. 1998. "Epidemiologia Molecular de la Tuberculosis en Zaragoza 1993-1995." Universidad de Zaragoza.

Iglesias Gozalo, M J, M J Rabanaque Hernández, and L I Gómez López. 2002. "Tuberculosis in the Zaragoza Province. Estimation by Means of the Capture-Recapture Method." *Revista Clinica Espanola* 202 (5): 249–54.

Iglesias, M J, and C Martin. 2015. "Nonspecific Beneficial Effects of BCG Vaccination in High-Income Countries, Should We Extend Recommendation of BCG Vaccination?." *Clinical Infectious Diseases* 60 (11): 1620–21.

Jackson, M, F X Berthet, I Otal, J Rauzier, C Martin, B Gicquel, and C Guilhot. 1996. "The *Mycobacterium tuberculosis* Purine Biosynthetic Pathway: Isolation and Characterization of the *purC* and *purL* Genes." *Microbiology (Reading, England)* 142 ( Pt 9) (9). Microbiology Society: 2439–47.

Kamath, A T, U Fruth, M J Brennan, R Dobbelaer, P Hubrechts, M M Ho, R E Mayner, et al. 2005. "New Live Mycobacterial Vaccines: the Geneva Consensus on Essential Steps Towards Clinical Development." In, 23:3753–61.

Kleinnijenhuis, J J, J J Quintin, F F Preijers, L A B LA Joosten, D C DC Ifrim, S S Saeed, C C Jacobs, et al. 2012. "Bacille Calmette-Guerin Induces NOD2-Dependent Nonspecific Protection From Reinfection via Epigenetic Reprogramming of Monocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (43). National Acad Sciences: 17537–42.

Marinova, D, J Gonzalo-Asensio, N Aguilo, and C Martin. 2013. "Recent Developments in Tuberculosis Vaccines." *Expert Review of Vaccines* 12 (12): 1431–48.

Martin, C. 2005. "The Dream of a Vaccine Against Tuberculosis; New Vaccines Improving or Replacing BCG?." *The European Respiratory Journal* 26 (1). European Respiratory Society: 162–67.

Martin, C, A Williams, R Hernandezpando, P Cardona, E Gormley, Y Bordat, C Soto, S Clark, G Hatch, and D Aguilar. 2006. "The Live *Mycobacterium tuberculosis phoP* Mutant Strain Is More Attenuated Than BCG and Confers Protective Immunity Against Tuberculosis in Mice and Guinea Pigs" 24 (17): 3408–19.

Martin, C, J Timm, J Rauzier, R Gomez-Lus, J Davies, and B Gicquel. 1990. "Transposition of an Antibiotic Resistance Element in Mycobacteria." *Nature* 345 (6277): 739–43.

Martin, C, P Mazodier, M V Mediola, B Gicquel, T Smokvina, C J Thompson, and J Davies. 1991. "Site-Specific Integration of the Streptomyces Plasmid pSAM2 in *Mycobacterium smegmatis*." *Molecular Microbiology* 5 (10): 2499–2502.

Mcshane, H, A A Pathan, C R Sander, S M Keating, S C Gilbert, K Huygen, H A Fletcher, and A V S Hill. 2004. "Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Antigen 85A Boosts BCG-Primed and Naturally Acquired Antimycobacterial Immunity in Humans." *Nature Medicine* 10 (11). Nature Publishing Group: 1240–44.

Mendiola, M V, C Martin, I Otal, and B Gicquel. 1992. "Analysis of the Regions Responsible for IS6110 RFLP in a Single *Mycobacterium tuberculosis* Strain." *Research in Microbiology* 143 (8): 767–72.

Orme, Ian M. 2010. "The Achilles Heel of BCG" 90 (6): 329-32.

Otal, I, C Martin, V Vincent-Lévy-Frebault, D Thierry, and B Gicquel. 1991. "Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using *IS6110* as an Epidemiological Marker in Tuberculosis." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (6): 1252–54.

Paulson, Tom. 2013. "Epidemiology: a Mortal Foe." Nature 502 (7470): S2-S3.

Pena, M J, J A Caminero, M I Campos-Herrero, J C Rodríguez-Gallego, M I García-Laorden, P Cabrera, M J Torres, et al. 2003. "Epidemiology of Tuberculosis on Gran Canaria: a 4 Year Population Study Using Traditional and Molecular Approaches." *Thorax* 58 (7). BMJ Group: 618–22.

Pérez, E, S Samper, Y Bordas, C Guilhot, B Gicquel, and C Martin. 2001. "An Essential Role for *pboP* in *Mycobacterium tuberculosis* Virulence." *Molecular Microbiology* 41 (1): 179–87.

Philips, J A, and J D Ernst. 2012. "Tuberculosis Pathogenesis and Immunity." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol* 7 7: 353–84.

Ramón-García, S, I Otal, C Martin, R Gómez-Lus, and J A Aínsa. 2006. "Novel Streptomycin Resistance Gene From *Mycobacterium fortuitum." Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (11). American Society for Microbiology: 3920–22.

Rivero, A, M Marquez, J Santos, A Pinedo, M A Sanchez, A Esteve, S Samper, and C Martin. 2001. "High Rate of Tuberculosis Reinfection During a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* Strain B." *Clinical Infectious Diseases* 32 (1): 159–61.

Samper, S, C Martin, A Pinedo, A Rivero, J Blázquez, F Baquero, D Van Soolingen, and J van Embden. 1997. "Transmission Between HIV-Infected Patients of Multidrug-Resistant Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis*." *AIDS (London, England)* 11 (10): 1237–42.

Samper, S, I Otal, M C Rubio, M A Vitoria, R Gomez-Lus, and C Martin. 1993. "Application of RFLP to Typing Strains of *Mycobacterium tuberculosis.*" *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica* 11 (10): 547–51.

Samper, S, M J Iglesias, and O Tello. 2000. "The Spanish Multidrug Resistant Tuberculosis Network." Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin 5 (4): 43–45.

Solans, L, J Gonzalo-Asensio, C Sala, A Benjak, S Uplekar, J Rougemont, C Guilhot, W Malaga, C Martin, and S T Cole. 2014. "The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis.*" *PLoS Pathogens* 10 (5): e1004183.

Spertini, F, R Audran, R Chakour, O Karoui, V Steiner-Monard, A C Thierry, C E Mayor, N Rettby, K Jaton, L Vallotton, C Lazor-Blanchet, J Doce, E Puentes, D Marinova, N Aguilo, C Martín. 2015. "Safety of Human Immunisation with a Live-Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine: a Randomised, Double-Blind, Controlled Phase I Trial". *The Lancet Respiratory Medicine* 3 (12): 953–62.

Stucki, D, D Brites, L Jeljeli, M Coscolla, Q Liu, A Trauner, L Fenner, et al. 2016. "Mycobacterium tuberculosis Lineage 4 Comprises Globally Distributed and Geographically Restricted Sublineages." Nature Genetics, October.

Tameris, M D, M Hatherill, B S Landry, T J Scriba, M A Snowden, S Lockhart, J E Shea, et al. 2013. "Safety and Efficacy of MVA85A, a New Tuberculosis Vaccine, in Infants Previously Vaccinated with BCG: a Randomised, Placebo-Controlled Phase 2b Trial." *The Lancet*, February.

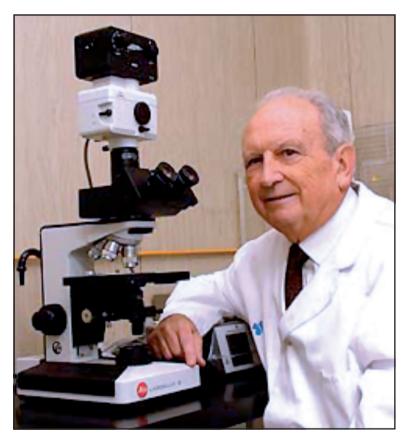
van Embden, J D, M D Cave, J T Crawford, J W Dale, K D Eisenach, B Gicquel, P Hermans, C Martin, R McAdam, and T M Shinnick. 1993. "Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (2): 406–9.

Verreck, F A W, R A W Vervenne, I Kondova, K W van Kralingen, E J Remarque, G Braskamp, N M van der Werff, et al. 2009. "MVA.85A Boosting of BCG and an Attenuated, *phoP* Deficient *M. tuberculosis* Vaccine Both Show Protective Efficacy Against Tuberculosis in Rhesus Macaques." Edited by Niyaz Ahmed. *PLoS ONE* 4 (4): e5264.

WHO. 2016. "GLobal Tuberculosis Report 2016".

Williams, Ann, and Ian M Orme. 2016. "Animal Models of Tuberculosis: an Overview." Microbiology Spectrum 4 (4).

Williams, A, Graham J H, S O Clark, K E Gooch, K A Hatch, G A Hall, K Huygen, et al. 2005. "Evaluation of Vaccines in the EU TB Vaccine Cluster Using a Guinea Pig Aerosol Infection Model of Tuberculosis." *Tuberculosis* 85 (1-2): 29–38.



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



Padre **Juan Jesús Bastero Monserrat** s.j., profesor de Biología y de Religión en el colegio del Salvador de Zaragoza. Estudio Filosofía y Teología, y es licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Barcelona.





Los Profesores **Juanma Garcia Lobo** catedrático de Microbiología y **Fernando de la Cruz**, catedrático de Genética del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.



El Profesor **Julian Davies** (en el centro) recibiendo la Medalla de Académico de Honor de la Real Academia de Medicina de Zaragoza (RAM) con su esposa Dottie y acompañado del Presidente de la RAM Excmo D. Luis Miguel Tobajas y Excmo D. Fernado Solsona, Presidente de Honor de la RAM (Octubre 2008).



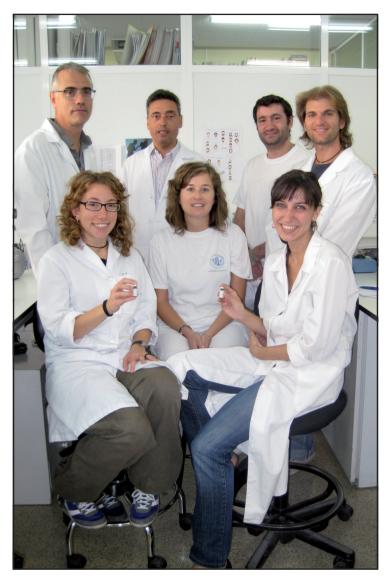
Firma del Acuerdo de Colaboración de la Universidad de Zaragoza / Biofabri. Paraninfo Universidad de Zaragoza. El Rector de la Universidad der Zaragoza Manolo López y El Consejero Delegado de Biofabri D. Esteban Rodríguez. (con Brigitte Gicquel, Carlos Martín) (Prensa Universidad de Zaragoza año 2010).



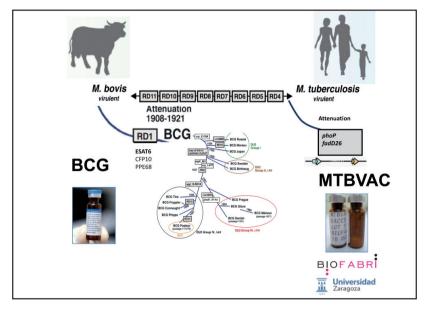
La Profesora **Brigitte Gicquel** en su despacho del Instituto Pasteur de Paris ("Chevalier" de la Legión de Honor de Francia en el año 2004).



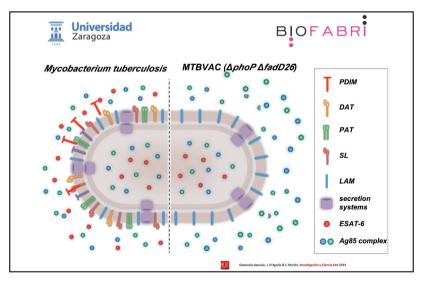
**Grupo de Genética de Micobacterias en el año 2000**. Delante de izquierda a derecha, Esther Pérez, Carmen lafoz, Carlos Martín, Virginie MIck, Sofía Samper, Pedro Almeida, Isabel Otal Ana Belén Gómez (Artículo de Nuria Casas en el Heraldo de Aragón 5 Marzo del año 2000 "CEREBROS EN LA CUERDA FLOJA").



Parte de los componentes del **grupo Vacuna Tuberculosis**. Delante: Carmen Arnal, Ana Belén Gómez, Ainhoa Arbués, Detrás: Santiago Uranga, Carlos Martín, Nacho Aguiló, y Jesús Gonzalo (Foto Heraldo de Aragón 2012).



La actual vacuna contra la tuberculosis **BCG** fue aislada originalmente de un cepa de *Mycobacterium bovis* aislada de una vaca enferma de tuberculosis. La nueva vacuna MTBVAC fue aislada de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente con tuberculosis. La eliminación de los genes *phoP* y *fadD26* hace que MTBVAC sea más atenuada que BCG en diversos modelos animales y contiene todos los antígenos que no posee BCG protegiendo mejor que BCG en diversos modelos animales.



Esquema de la Vacuna MTBVAC y sus diferencias con la cepa *clínica de Mycobacterium tuberculosis* (Investigación y Ciencia 2014).





Entrega de diplomas Curso Avanzado de Vacunología (ADVAC) Annecy 2015 **Profesor Staley Plotkin** y **Profesor Paul Hernri Lambert** a Carlos Martín.



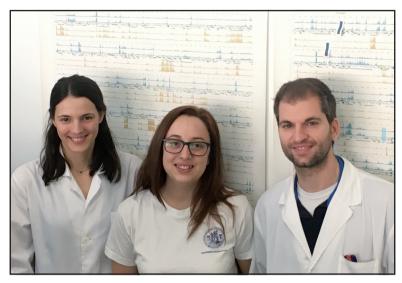
Presentación a la Reina de España Doña Sofía del Profesor Francois Spertini Investigador principal del primer ensayo clínico de MTBVAC en humanos en Lausana, Suiza. Simposio Internacional "Vacunas preventivas contra la tuberculosis: un nuevo Horizonte" organizado por las Fundación Areces en Madrid Mayo 2014. (con Carlos Martín y Federico Mayor Zaragoza).



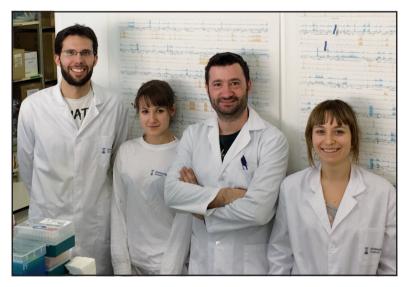
Parte del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza año 2014. Delante: Jesús Gonzalo-Asensio, Ana Picó, Ana Belén Gómez, Begoña Gracia, Nacho Aguiló, Nedra Meftahi, Detrás: Carlos Martín, Irene Pérez, Alberto Cebollada, Sofía Samper, Samuel Álvarez, Santiago Uranga, Carmen Lafoz,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



Visita Sudáfrica en Diciembre de 2015 antes del inicio de la vacunación de los bebes en Worcester: De izda, a Dcha.: Eduardo Almenara (OTRI Universidad de Zaragoza) Juana Doce (Biofabri) Eugenia Puentes (Biofabri) Helen Mearns (Universidad de Ciudad del Cabo) Michele Tameris (Investigadora Principal del Estudio de MTBVAC, Iniciativa Sudafricana Vacuna Tuberculosis SATVI), Bernard Fritzel (Iniciativa Europea Tuberculosis TBVI), Dessislava Marinova (Universidad de Zaragoza), detrás,: Oswaldo Alvarez (Biofabri). Carlos Martín (Universidad de Zaragoza).



Parte del Equipo de investigación de la Vacuna Tuberculosis de la Universidad de Zaragoza dirigidos por Jesús Gonzalo Asensio, Investigador senior responsable de los estudios genómicos del bacilo de la tuberculosis, Irene Pérez (Investigadora en formación DGA) y Esther Broset (Investigadora en formación Ministerio FPI).



Parte del Equipo de investigación de la Vacuna Tuberculosis de la Universidad de Zaragoza dirigidos por Nacho Aguilo (Investigador Senior responsable de los estudios de inmunología de MTBVAC) a la izquierda Samuel Álvarez (Investigador en formación DGA), Elena Mata (Investigadora en formación Ministerio FPU) y Raquel Tarancón (Investigadora en formación Ministerio FPI).



Giinsber (Directora Clínica de AERAS), Esteban Rodriguez (Consejero Delegado Biofabri) Ingrid Murillo (Directora Clínica de Biofabri) Jelle Thole Director CDT TBVI) Dessi Marinova (Project Manager MTBVAC, Universidad de Zaragoza) Barry Walker (Director predinico de Aeras), Detrás de izquierda a derecha Adam Penn (Universidad de Ciudad del Cabo, Sudáfrica), Tait Dereck (Director de AERAS Sudáfrica), Oswaldo Alvarez (Director de Preparación del plan Desarrollo Clinico de MTBVA. Tui (Pontevedra) Junio de 2016. Biofabri, Universidad de Zaragoza, SATVI (Sudádfrica), TBVI (UE) y AERAS (USA). Delante de Izquierda a derecha: Michelle Tameris (investigadora principal del ensayo clínico de MTBVAC en Sudáfrica SATVI), Ann Biofabri) Marck Hatherill (Director de SATVI) Carlos Martín (Universidad de Zaragoza).

# DISCURSO DE CONTESTACIÓN

DEL ACADÉMICO DE NÚMERO EXCMO. SR. D. FERNANDO SOLSONA MOTREL

# DISCURSO DE CONTESTACIÓN AL DE INGRESO DEL PROFESOR CARLOS MARTÍN MONTAÑES EN LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA (16-3-2017)

Excmo. Sr. Presidente y Junta de Gobierno de la RAMZ; Dignísimas autoridades;

> Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos; Ilma. señora Académica; Querida familia del profesor Martín Montañés; Queridos colegas; señoras y señores:

> > I

En pocas ocasiones como hoy puedo agradecer tanto la designación por la Presidencia para representar a la Academia en acto tan importante, como el discurso de contestación al preceptivo de ingreso del Prof. Carlos Martín Montañés (acogido, con ilusión, al igual que lo hice en anteriores ocasiones con los profesores García Julián, Mateo Arrizabalaga y Montull Lavilla), como académico de número.

Llega hoy a esta esta Casa una persona bien deseada como Académico de Número, por su vida su obra y su persona, el Dr. Carlos Martín Montañés; ingresa hoy un hombre de larga labor docente, que comenzó ya en su doctorado con premio extraordinario (1985), es además doctor en Bioquímica por la Universidad de París (1994), diplomado en Inmunología general y de las infecciones (Instituto Pasteur París 2000) y en Vacunología (Annecy 2015), además de Catedrático de la Universidad de Zaragoza desde 2005. Es asímismo, especialista en Microbiología y Parasitología, formado en la prestigiosa escuela zaragozana de Gómez Lus. En estos momentos, el profesor Carlos Martín Montañés es:

- Director del grupo de investigación del Gobierno de Aragón *Genética de Micobacterias*.
- Director del grupo CIBER de Enfermedades respiratorias del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.
- Miembro del comité asesor de la Iniciativa Europea de vacuna para la tuberculosis.

II

Tras su especialización con el profesor Gómez Lus, con quien realizó su doctorado sobre los mecanismos de resistencia bacteriana, disciplina en la que el doctor Rafael Gómez Lus es almogávar; llevó a cabo estancia postdoctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Cantabria para estudiar los mecanismos de transposición en bacterias. De ahí, pasó al Instituto Pasteur, (Unidad de genética microbiológica dirigida por el Prof. Julián Davies, académico de honor de nuestra Real Academia de Medicina de Zaragoza), formando parte del equipo de la profesora Brigitte Gicquel. Permaneció cinco años, siendo nombrado, al cabo de ellos, investigador del Instituto, doctorándose al propio tiempo en Bioquímica por la Universidad de París, (describiendo en su tesis la transposición de bacterias del transposon Tn610 aislado en una cepa de *M. fortuitum* de la colección de Gómez Lus).

La principal actividad de investigación del grupo de Gicquel es profundizar en el conocimiento multidisciplinar del bacilo de la tuberculosis para aumentar las herramientas de prevención y control de la enfermedad, trabajando en diferentes líneas: epidemiología molecular de la tuberculosis; bases moleculares de la resistencia en micobacterias; transposición y latencia en *Mycobacterium tuberculosis*; construcción y desarrollo de nuevas vacunas.

El profesor Carlos Martín es miembro fundador de la red de tuberculosis en Latinoamérica y Caribe (1995) y ha recibido varios premios en investigación: Biomédica 1995, 2006, Premio Aragoneses del año en Ciencia y Tecnología 2010; el mismo año el Premio Aragón Investiga; Premio Peña Solera Aragonesa, 2012 (premio que tiene especial tropismo por académicos de esta casa). Desde 2012, es Académico correspondiente en nuestra Real Academia de Medicina. Pasando a Académico Electo de esta Academia en 2015. Participa desde 1992 en diez proyectos españoles y europeos. Es autor de 131 artículos publicados, muy selectos, en colaboración con los profesores Rafael Gómez Lus, J. Davies (hoy en Vancouver) y con la profesora Brigitte Gicquel. El número de ponencias y comunicaciones en congresos y simposia es de no menos de 79 y sus artículos de investigación han recibido hasta hoy más de 7.000 citas.

El doctor Carlos Martín Montañés es zaragozano de vieja cepa, nacido en la calle de Azoque y hoy vecino de la calle Santa Cruz en el Centro Histórico. Llega con enorme suma de méritos intelectuales y humanos, además de su antigua tradición en esta ciudad. Los antiguos zaragozanos recordamos su segundo apellido desde hace más de medio siglo; pues, cuando yo era niño, destacaba en la calle Azoque un letrero grande que yo leía en voz alta *Pastelería Montañés*, que había fundado su familia materna en el siglo XIX. De niño, mi abuelo paterno, el más laminero de mi familia, y acaso, de Zaragoza, orgulloso de que su nieto mayor hubiera salido tan aplicado como él en

pastelería, me compraba alguna pieza, de no menor calidad que la de otras zuquererías zaragozanas de siempre.<sup>1</sup>

El apellido Montañés es también parte de la esencia histórica y cultural de Zaragoza gracias al insigne Bernardino, uno de los mejores pintores aragoneses de excelente formación y trayectoria, que fue director de la Escuela Española en Roma y que dejó muchas obras de gran calidad, acaso la más conocida sea la espléndida cúpula central del Pilar. Bernardino tenía un hermano, Serapio, el tatarabuelo del Prof. Martín Montañés, único con él que sobrepasó la niñez, siendo estos los únicos que superaron la infacia de los doce hijos que tuvo el matrimonio de don Jorge Montañés y Mariana Pérez Solano; El padre de don Carlos fue profesor mercantil nacido, en Gatón de Campos perteneciente a Tierra de Campos, provincia de Valladolid cercana a la de Palencia se integró bien en Zaragoza por su matrimonio y falleciendo en 2014.

#### TTT

En su larga línea de agradecimientos, el Prof. Martín Montañés muestra su calidad humana citando las ayudas recibidas: el padre Bastero, jesuita, profesor suyo de Biología en el bachillerato, nieto del doctor Bastero Lerga, navarro, catedrático de Medicina Legal de nuestra ciudad cuyos apellidos rotulan hoy el Instituto de Medicina Legal de Zaragoza. El hijo de Bastero Lerga, José María tuvo a su vez dos hijos sacerdotes escolapio uno, jesuita el otro, y ambos de profunda vocación y muy eficaces en el ejercicio de la enseñanza. Reconoce el profesor Martín Montañés que la enseñanza del padre Bastero, al final de su bachillerato, transformó a un "estudiante del montón" en un brillante alumno en la carrera de Medicina, como le ocurriera a don Santiago en su aprendizaje un siglo antes con don Cosme Blasco en el Instituto de Huesca.

Mención especial merece comentar la influencia del Prof. Rafael Gómez Lus (Zaragoza 1931), vivo por fortuna, uno de los mejores catedráticos del siglo XX en nuestra Facultad. Comenzó su docencia en 1955 y tuve yo la suerte de tenerlo entre mis profesores (joven ayudante, cuando cursé Microbiología –1954– y brillante profesor de Higiene en último año de Facultad –1958-59–, en una enseñanza modélica); por todos recordada a pesar de que en aquel curso

<sup>1.</sup> Al menos Irazoqui, Fantoba, Sánchez, Val, Auría, Ferriz, González, Soconusco, Samperiz, Sebastián Gil, Elipe y Montañés, estas dos últimas al comienzo y final de la calle Azoque, todas de tanta calidad como las buenas zuquererías oscenses de Ascaso, Vilas, Ortíz; las jacetanas Echeto, La Imperial y La Suiza; Tolosana (Almudevar); Brescó (Benabarre), Dueso (Fraga), Güerri (Barbastro), Trallero (Sariñena) o las turolenses Alejo (Alcañiz), Marquesán (Hijar), Albalate, Valderrobres, Foz (Beceite). En la provincia de Zaragoza, Caro y Micheto (Calatayud) y Segura (Daroca).

pasaron por nuestra Facultad dos catedráticos de corta estancia (Clavero que se jubiló aquí y González Fusté, trasladado pronto a Barcelona), además del ya muy antiguo profesor adjunto Ladislao Saenz de Cenzano. Conozco pues, de primera mano, desde hace dos tercios de siglo la capacidad, las dotes intelectuales y morales de Rafael Gómez Lus, como muchos de los asistentes por lo que no nos extraña el elogio del profesor Martín Montañés en su discurso ni, el mucho prestigio alcanzado en toda Europa y en otros países por don Rafael.<sup>2</sup>

#### IV

La tuberculosis es asunto propicio a la mentalidad aragonesa, pues su estudio adecuado requiere alguna de las condiciones morales propias de esta vieja y querida tierra nuestra. Varios aragoneses han destacado en el estudio de la tuberculosis, acaso el primero de ellos Royo Villanova, hombre de torrencial talento en saberes y actividad (quien a principios del siglo XX, menos alcalde y arzobispo lo fue todo en Zaragoza), ya lanzó una llamada a la sociedad zaragozana en formidable proclama escrita con su ferviente prosa, que obligó a que la ciudad se volcase en atención hacia la tuberculosis. Hemos de añadir los nombres del barbastrense Andrés Martínez Vargas (a quien se debe la primera descripción radiológica en el mundo de la tuberculosis pulmonar infantil), Joaquín Gimeno (compañero durante la carrera de don Santiago (entre españoles siempre Ramón y Cajal), muy inteligente y generoso catedrático de Fisiología y Terapéutica, director de La Derecha y La Clínica que contrajo tuberculosis pulmonar que él mismo se diagnosticó y, tras ello, como escribió Moneva, "cesó en todo negocio menos en el del alma". Los trabajos de Alvira Lasierra, Andrés Asensio, Andrés Aguilar, Juan José Rivas Bosch, su hijo Rivas Extremera, su nieto Rivas Andrés y sobre todo los excelentes médicos de familia zaragozanos (Oliver Rubio, Ramón Vinós, Jaime Serra, Sardaña, Sariñena, Hernández Iribarren, Aznar, Dominguez, Lanzón, Mainer, Terrise, Malumbres, Suarez Palacios). Lafiguera, Civeira y Guillén, fueron catedráticos muy distinguidos, que nunca descuidaron en su enseñanza práctica, la tuberculosis.

<sup>2.</sup> Sus discípulos se han beneficiado no sólo de su enseñanza didascálica, (en microbiología general, en brucelosis, en resistencias bacterianas, y en el estudio del *Mycobacterium tuberculosis*, sembrando, en el hoy nuevo académico la devoción por su tarea científica). Además de esta enseñanza didascálica, el profesor Gómez Lus, ha ejercido entre alumnos y discípulos, una enseñanza entitática plena, (la del ejemplo, la de su obra, la del estímulo, la de la enseñanza de virtudes morales, necesarias para el modo de trabajar, para el modo de estar en el mundo y para el modo de ser). Pronto se difunde en España y en el Instituto Pasteur de Paris el prestigio del profesor Martín Montañés, al igual que el de otros aragoneses que allí trabajaron (Uriel fue investigador que dejó gran fama en el referido Laboratorio y más tarde en Villejuif), que han sabido dejar bien alto nuestro pabellón en el Instituto Pasteur.

El propio don Santiago padeció, recién vuelto de Cuba, tuberculosis pulmonar, que comenzó con hemoptisis en el zaragozano café de la Iberia, jugando al ajedrez con su amigo el capitán Ledesma, favorecido el proceso por la malaria y disentería que don Santiago había padecido en Cuba. Su padre cuidó con su energía habitual a Santiago y lo envió junto con su hermana Pabla a terminar de curar el proceso en Panticosa y San Juan de la Peña. Su hermano, don Pedro, también dedicó su atención al diagnóstico diferencial de la tuberculosis, entresacándola, como se ha dicho, del complejo cuadro que formaban las fiebres en nuestra ciudad a caballo de los siglos XIX y XX, desglosandola al igual que la brucelosis, al identificar, ésta con la enfermedad descubierta por el mayor Bruce en la Isla de Malta. En todo momento nuestros sanatorios de Agramonte, de Boltaña, de Pineta, y de las localidades de Panticosa y San Juan de la Peña contribuyeron muy eficazmente.

# $\mathbf{v}$

La vacuna zaragozana del Prof. Martín Montañés contra la tuberculosis, la MTBVAC, ha iniciado ya su fase de ensayos clínicos en Sudáfrica, que se realizan durante dos años en recién nacidos. Las autoridades sanitarias sudafricanas han dado el visto bueno a la culminación de dichos ensayos para la vacuna patrocinada por la biofarmaceutica española Biofabri. Se trata de una vacuna experimental diseñada por la Universidad de Zaragoza y la colaboración del Instituto Pasteur y de otros grupos de trabajo. Es la primera vacuna viva atenuada de origen humano en iniciar sus ensayos enhumanos. Estos estudios forman parte de las pruebas para afirmar su seguridad y su capacidad inmunogénica, continuadores de los ensayos clínicos realizados con treinta y seis adultos, voluntarios suizos en Lausana (2013-2014). La nueva vacuna diseñada por ingeniería genética por el grupo de investigación de genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza que dirige nuestro nuevo académico es firme candidata a sustituir a la actual BCG por su mayor eficacia. Todos esperamos que su utilización suponga gran avance médico para la salud mundial, dado que un tercio de la población está infectada por esta bacteria que se propaga a través del aire. Cada año hay diez millones de nuevos casos en el mundo y mueren casi dos millones de personas en el mismo periodo.

La vacuna BCG protege contra diferentes formas de tuberculosis en niños, mientras que su protección en adultos no alcanza el 80%. Se trata, además, de vacuna utilizada masivamente desde 1926. La vacuna propuesta del profesor Martín Montañés pretende activar el sistema inmunitario para que pueda reconocer al agente infeccioso y proteja a largo plazo frente a la enfermedad respiratoria, la forma más común del proceso. Los ensayos clínicos en Sudáfrica están coordinados por la doctora Tameris, investigadora principal del grupo de la

Universidad sudafricana de El Cabo, país en donde la necesidad de esta vacuna es aún mayor. Todos esperamos que con la vacuna zaragozana se solvente en el mundo el problema de la tuberculosis, de gran importancia social puesto que el 10% de la población mundial podría llegar a padecer la tuberculosis, sin duda la enfermedad que mayor número de muertes ha generado en la historia de la humanidad.

# VI

Tanto como sus conceptos, bien expuestos en el trabajo del doctor Martín Montañés que han tenido ustedes la fortuna de escuchar es importante, en su conjunto, el trabajo escrito que constituye el discurso del que el autor, cumpliendo con un deber académico de cortesía, nos ha ofrecido un excelente resumen. El trabajo tiene para mí, *inter alia* como puntos sobresalientes los siguientes:

- Riguroso trabajo de investigación, bien elaborado en su desarrollo, como se deduce de su trayectoria y de los muchos viajes llevados a cabo en los últimos años académicos. Además ha sabido encontrar el tiempo para redactar concienzudamente el espléndido discurso que acabamos de oír.
- La calidad de su discurso, bien estructurado que supone la concatenación y buena ligazón de los diferentes párrafos con prosa clara, unívoca, tersa, como pedía don Santiago.
- 3. La brevedad de su exposición en la que ha sabido condensar bien la necesaria densidad de su trabajo.
- 4. La claridad, sobre todo, en la exposición de datos y cifras.
- 5. La correspondencia de la vacuna propuesta con su antecesora la BCG, en sus resultados y en su valoración.
- 6. Su honestidad intelectual, admirando en todo momento los trabajos anteriores o colaterales que le hayan podido servir de ayuda o de soporte.
- 7. Su reconocimiento a todos los que le han ayudado en este largo trabajo desde la profesora bretona Brigitte Gicquel<sup>3</sup>. la firma Biofabri que ha auspiciado la producción de la vacuna; el grupo de Lausana ya referido, como el de la profesora Tameris en ciudad Del Cabo. El reconocimiento expresado a lo largo del trabajo por el prof. Martín Montañés y la honestidad que ello supone es uno de sus méritos morales.

<sup>3.</sup> El carácter bretón es muy parecido al nuestro por lo que estimo que no habrá sido cómodo tratar con tan poderosa inteligencia, pues "no hay peor cuña que la de la misma madera".

- 8. La sencillez en la exposición de todos los datos. Del contenido que refleja su humildad científica, de la prosa en que ha sido escrita y en la exposición sucinta, de que hace gala el autor fruto de su llaneza moral.
- 9. Insistimos pues "las cosas selectas no cansan repetirlas hasta siete veces" (Gracián) en la brevedad con que ha sido expuesto un tema muy complejo en su concepción y desarrollo histórico y por el rigor con que se ha llevado a cabo.

# VII

Sea bienvenido el doctor Carlos Martín Montañés a esta su Casa. Le auguro, en ella, los mejores éxitos en beneficio de él y de todos, de sus maestros, de nuestra Real Academia y de su Facultad (la nuestra). Deseo al doctor Martín Montañés días de gloria en su nueva Casa en beneficio de su ilusión, de su equipo de trabajo, de las instituciones que le han ayudado en España, Francia, Suiza, Holanda, Sudáfrica y asimismo en beneficio de su querida familia, su esposa la doctora María José Iglesias; su hijo Carlos, economista, doña Purificación su madre (entrañable la imagen, cuando la conocí, en compañía de su hijo en la plaza del Pilar a su vuelta de "ver" a la Virgen); y de esta vieja y querida tierra nuestra.

¡Que la Providencia te siga ayudando, querido compañero, apoyado por tu fe en el trabajo, tu convicción en el esfuerzo, tu independencia de juicio, dureza berroqueña ante el esfuerzo y la adversidad, y "tu santa humildad", que bien lo mereces! Oue Santa María del Pilar te apoye a ti y Dios a todos.

HE DICHO

**Prof. Fernando Solsona**<sup>4</sup> Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Zaragoza

<sup>4.</sup> Con nuestro reconocimiento a don Dionisio García y María Isabel Daudén por la eficacia en la dactilografía de este discurso.

