

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009237- -00012-0000

Fecha: 2014-07-16 17:00:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 23

Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 412

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: PI.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. y GLAXO GROUP LIMITED.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN LA PROTEÍNA DE TUBERCULOSIS RV2386".-Clase C12N 15/60.-Expediente número 11-009.237.-

Yo, **ALICIA LLOREDA RICAURTE**, mayor, vecina de esta ciudad, identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de las sociedades **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica, domiciliada en Rixensart, Bélgica, y **GLAXO GROUP LIMITED**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales, domiciliada en Middlesex, Inglaterra, atentamente manifiesto a usted que interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución Número **36008**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 30 de Mayo de 2014, en cuanto hace referencia a la negación del privilegio de patente de invención para la solicitud en referencia, por una supuesta falta de **Novedad** y de **Nivel Inventivo** de dicha solicitud.

I. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Me permito manifestar ante ese Despacho que mi mencionado Recurso de Reposición encuentra fundamento en que el contenido de la Resolución Número **36008** evidencia que durante el examen técnico realizado a la solicitud denegada de ninguna manera se consideró en su verdadera dimensión el alcance e importancia de las composiciones que son objeto de la invención allí reclamada.

Es así que, a pesar de los argumentos proporcionados por el solicitante en mi memorial de Enero 15 de 2014 (en respuesta al Oficio No. **16704**), en la Resolución impugnada ese Despacho presenta objeciones frente a la Claridad de las reivindicaciones, y mantiene las objeciones frente a la Novedad y el Nivel Inventivo de la invención, afirmando categóricamente lo siguiente:

Frente a la Claridad de las reivindicaciones:

"En cuanto a la(s) reivindicación(es) 1 a 10 incluida(s) en el escrito radicado bajo el N° 11-009237-00009-0000, no se ajusta(n) a los parámetros establecidos en el artículo 30 anteriormente transcrito, por cuanto no son claras y no se encuentran enteramente sustentadas en la descripción".

Frente a la Novedad de la solicitud concluye que:

"(...) las características esenciales de la proteína de la reivindicación 9 habían sido divulgadas previamente en el (los) documento(s) D1, que se refiere a ácidos nucleicos que codifican la proteína Rv2386c de Mycobacterium tuberculosis, ácidos nucleicos que codifican la fusión del gen que codifica la proteína Rv2386c con el gen que codifica la secuencia señal del activador del tejido humano plasminogen (Pág. 6345, Col. 1, Párr.2), en consecuencia, la reivindicación 9 no es nueva, según lo divulgado en el (los) documento(s) D1.

(...) las características esenciales la proteína reclamada en la reivindicación 10 habían sido divulgadas previamente en el (los) documento(s) D1, el cual da a conocer ácidos nucleicos codificando la proteína Rv2386c de Mycobacterium tuberculosis, ácidos nucleicos que codifican la fusión del gen que codifica la proteína Rv2386c con el gen que codifica la secuencia señal del activador del tejido humano plasminogen (Pág. 6345, Col. 1, Párr.2), en consecuencia, la reivindicación 10 no es nueva, según lo divulgado en el (los) documento(s) D1".

Y frente al Nivel Inventivo de la solicitud concluye que:

"(...) la persona del oficio medianamente versada en la materia se habría visto motivada a generar vacunas alternativas para el tratamiento de la tuberculosis con la combinación de dos componentes antigénicos. Por lo cual la reivindicación 1 se considera obvia.

Puesto que la reivindicación dependiente 2 no menciona características adicionales, se considera tampoco tiene nivel inventivo.

(...) la persona normalmente versada en la materia enfrentada a la necesidad de obtener una composición alternativa buscaría una adyuvante que potencie la respuesta inmunitaria, de manera que dicha composición resulta obvia, por tanto no cumple con el requisito re nivel inventivo.” (Refiriéndose a la reivindicación 3)

En vista de lo anterior, a continuación me permito brindar argumentos técnicos que no sólo demostrarán a ese Despacho que la presente invención sí cumple con el requisito de claridad de las reivindicaciones exigido por el Artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, y con los requisitos de Novedad y Nivel Inventivo exigidos por los Artículos 16 y 18 de la Decisión 486 de 2000, sino que además establecerán que el análisis realizado es incorrecto, toda vez que se interpreta de manera errónea tanto la invención como el arte previo; constituyéndose por lo tanto la negación de la solicitud en una clara violación a los mencionados Artículos 16, 18 y 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

1. MODIFICACIONES A LA SOLICITUD.

1.1 MODIFICACIONES A LA DESCRIPCIÓN

Antes de entrar a discutir los argumentos que demuestran la patentabilidad de la presente solicitud me permito manifestar que el solicitante, al amparo de lo estipulado por el Artículo 34 de la Decisión Andina 486 de 2000, ha modificado la solicitud presentando una corrección de un error material en la Tabla 3 de las páginas 213 a 220 de la descripción.

En este sentido, me permito indicar que la descripción presenta un error en la traducción del encabezado de la primera columna de la Tabla 3, ya que actualmente este se lee como “Nº de epítipo de **CD4** supuesto”, sin embargo, según lo que indica el correspondiente documento de publicación internacional WO2010/010179 dicho encabezado corresponde al “Nº de epítipo de **CD8** supuesto”, dado que la Tabla 3 está haciendo referencia a los epítipos de células-T **CD8+** humanas de Rv2386c supuestos.

Por lo tanto dichas páginas 213 a 220 corregidas, se anexan al presente memorial.

1.2 MODIFICACIONES AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.

Adicionalmente, me permito manifestar que el solicitante, al amparo de lo estipulado por el Artículo 34 de la Decisión Andina 486 de 2000, ha modificado la

solicitud presentando un capítulo reivindicatorio modificado, que reemplaza al actualmente presentado.

En conexión con las señaladas modificaciones, me permito resaltar que estas no se constituyen de ninguna manera en una ampliación del alcance de la solicitud, tal como fue originalmente presentada, toda vez que encuentran sustento en la descripción de la solicitud y en el capítulo reivindicatorio actualmente presentado, tal como se expondrá a continuación:

- **Reivindicaciones 1 a 8:** Corresponden respectivamente a las reivindicaciones 1 a 8 actualmente presentadas.
- **Reivindicaciones 9 y 10:** Han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio.

Es así como, el capítulo reivindicatorio modificado está constituido por **8 reivindicaciones** las cuales enfocan la reclamación en las realizaciones preferidas de la invención.

En vista de estos hechos, y a la luz de la facultad que la Decisión Andina 486 otorga al solicitante mediante las disposiciones que establece el Artículo 34 de la misma:

"Artículo 34.- El solicitante de una patente podrá pedir que se modifique la solicitud en cualquier momento del trámite. La modificación no podrá implicar una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

Del mismo modo, se podrá pedir la corrección de cualquier error material."
(Énfasis añadido)

Resulta claro que la presentación del mencionado capítulo reivindicatorio modificado y de las páginas 213 a 220 corregidas, está amparada bajo la legislación Andina, y por lo tanto muy comedidamente solicito a ese Despacho tenerlos en consideración en su análisis del presente Recurso.

2. CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.

Ahora bien, con respecto a la claridad del capítulo reivindicatorio, el señor Examinador afirma lo siguiente:

-“El capítulo reivindicatorio se refiere a una composición que comprende dos principios activos: un péptido Rv2386c y M72 (reivindicación 1 y dependientes), a una composición que comprende un péptido Rv2386c (reivindicación 3 y dependientes), y a una proteína de fusión del péptido Rv2386c (reivindicación 9 y dependientes). Donde Rv2386c comprende una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 y 3 a 7 o una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 30 a 154, sin embargo, según lo divulgado en la descripción las secuencias SEQ ID NO: 30-154 no corresponden al péptido Rv2386c sino a los epítopes identificados por la solicitante para CD4, de manera que existe una inconsistencia entre lo reclamado y lo divulgado por la descripción, y por tanto se considera que el capítulo reivindicatorio no es claro”.

A este respecto, muy respetuosamente me permito asegurar que no existe inconsistencia entre la materia reclamada en el capítulo reivindicatorio y lo divulgado en la descripción de la presente solicitud.

En este sentido, cabe aclarar que a lo largo de la solicitud, cuando se hace mención de **las secuencias SEQ ID NO: 30-154** claramente se está haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos de **un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv2386c**.

En ese orden de ideas, es relevante destacar que de manera consistente, la descripción (pág. 66) de la presente solicitud explica que: “los epítomos de células-T son estiramientos contiguos cortos de aminoácidos que son reconocidos por las células-T (por ejemplo, las células-T CD4+ o CD8+) y que como un resultado de la involucración crucial de la respuesta de células-T en la tuberculosis, es fácilmente evidente que **los fragmentos del polipéptido de Rv2386c de longitud completa que contengan cuando menos un epítomo de células-T serán inmunogénicos y pueden contribuir a la inmunoprotección**”. En este sentido, claramente resalta que: “Estos fragmentos son referidos en la presente como **fragmentos inmunogénicos**”.

Conjuntamente, la descripción (pág. 68) de la presente solicitud también explica que: “Los fragmentos particulares de la proteína de Rv2386c donde pueden ser útiles incluyen aquéllos que contengan cuando menos un **epítomo de CD4+**, de una manera adecuada cuando menos dos epítomos de CD4+, y en especial todos los epítomos de CD4+ (tales como los epítomos descritos en los Ejemplos y en **las SEQ ID NOs: 30 a 52**, en particular aquéllos asociados con una pluralidad de alelos de HLA, por ejemplo, aquéllos asociados con 2, 3, 4, 5 o más alelos).

Otros fragmentos de la proteína de Rv2386c donde pueden ser útiles incluyen aquéllos que contengan cuando menos un **epítipo de CD8**, de una manera adecuada cuando menos dos epítipos de CD8, y en especial todos los epítipos de CD8 (tales como los epítipos descritos en los Ejemplos y en **las SEQ ID NOs: 53 a 154**, en particular aquéllos asociados con una pluralidad de alelos de HLA, por ejemplo, aquéllos asociados con 2, 3, 4, 5 o más alelos)", lo cual es consistente con la información de las tablas 2 y 3 de la descripción.

En vista de lo anterior, es evidente que contrario a lo que afirma el señor Examinador la presente solicitud de ninguna manera presenta inconsistencias entre la materia reclamada y lo divulgado en la descripción.

- "Por otra parte, las reivindicaciones que se refieren a que los péptidos comprendidos por la composición pueden encontrarse fusionados, no tienen sustento toda vez que no existe evidencia en la descripción que demuestre que la solicitante haya obtenido y evaluado la eficacia de una composición que comprende un péptido de fusión de Rv2386c. Así mismo, las reivindicaciones dependientes se refieren a una composición que puede comprender los componentes Rv2386c y M72 como péptidos o como nucleótidos de manera separada o como moléculas fusionadas, sin embargo en la descripción del documento en los ejemplos 1 a 4 solo se encuentra evidencia de la obtención de una composición que comprende un péptido Rv2386c solo, no existe evidencia o prueba técnica de la obtención de cada una de las composiciones reclamadas."

Frente a lo anterior, amablemente me permito señalar que, tal y como se detalla en el numeral 1.2 del presente memorial, las reivindicaciones 9 y 10, que están relacionadas con **proteínas de fusión**, se han eliminado del capítulo reivindicatorio, por lo tanto, solicito atentamente, retirar la anterior objeción.

En consecuencia, resulta evidente que el capítulo reivindicatorio modificado supera las objeciones presentadas por el Señor Examinador y se enmarca completamente dentro de lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

3. CONSIDERACIONES TÉCNICAS FRENTE A LA NOVEDAD DE LA INVENCION DENEGADA.

El señor Examinador asegura que la materia reclamada en las reivindicaciones 9 y 10, sería anticipada por las enseñanzas del documento "**Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol**

challenge" (D1), el cual fue citado como arte previo en la Resolución Número **36008**.

Al respecto, el señor examinador afirma que las características esenciales de las proteínas de las reivindicaciones 9 y 10 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual enseñaría ácidos nucleicos que codifican la proteína Rv2386c de *Mycobacterium tuberculosis*, ácidos nucleicos que codifican la fusión del gen que codifica la proteína Rv2386c con el gen que codifica la secuencia señal del activador del tejido humano plasminogen (Pág. 6345, Col. 1, Párr.2).

Con referencia a lo anterior, me permito manifestar a ese Despacho que **la materia de las reivindicaciones 9 y 10 ha sido eliminada del capítulo reivindicatorio** y por lo tanto, dicho capítulo reivindicatorio ahora modificado presenta un inequívoco carácter novedoso frente a las enseñanzas del documento D1, cumpliendo a cabalidad con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 16 de la Decisión 486 de 2000.

4. CONSIDERACIONES TÉCNICAS FRENTE AL NIVEL INVENTIVO DE LA INVENCION DENEGADA.

Por otro lado, el señor Examinador afirma que la materia reclamada en las reivindicaciones 1 a 3 carecería de Nivel Inventivo con respecto a las enseñanzas del arte previo citado en la Resolución Número **36008**, esto es, el documento **"Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol challenge" (D1).**

A este respecto el Señor Examinador asegura que teniendo en cuenta que el documento D1 ya divulgaba vacunas para el tratamiento de la tuberculosis con nucleótidos que codifican la proteína Rv2386c y que median la respuesta inmune, y además que sugería la combinación de dos componentes antigénicos, la persona del oficio medianamente versada en la materia se habría visto motivada a generar vacunas alternativas para el tratamiento de la tuberculosis con la combinación de dos componentes antigénicos. Por lo cual considera que la reivindicación 1 es obvia. Además, el señor Examinador señala que la reivindicación 2 no adiciona ninguna característica que haga inventiva a la reivindicación 1 y por lo tanto tampoco se considera inventiva.

Así mismo, el Señor Examinador afirma que teniendo en cuenta que la utilización del DNA que codifica Rv2386c como una vacuna, ya está divulgada en el documento D1 que se refiere a vacunas para la protección de *Mycobacterium tuberculosis* que inducen la mediación de la respuesta inmune y que tienen un adyuvante, la persona normalmente versada en la materia enfrentada a la necesidad de obtener una composición alternativa buscaría un adyuvante que potencie la respuesta inmunitaria, de manera que según su

opinión la reivindicación 3 resulta obvia y por lo tanto no cumple con el requisito de nivel inventivo.

Sobre este particular me permito señalar que las enseñanzas del documento D1, de ninguna manera pueden conducir a las composiciones específicas de la presente invención, tal y como son reclamadas dentro del capítulo reivindicatorio modificado que se presenta junto con este memorial.

Con el fin de demostrar este hecho, a continuación me permito exponer las principales razones que harían que la persona versada en la materia no pudiera de ninguna forma obtener las composiciones reclamadas en la solicitud denegada partiendo de las enseñanzas del citado documento D1, evidenciando así la incorrecta interpretación que realiza ese Despacho del arte previo, interpretación que lo lleva a concluir de forma errónea con respecto a la patentabilidad de la solicitud.

En primer lugar, me permito manifestar respetuosamente que el análisis de patentabilidad de la materia de la presente invención, se está llevando a cabo de manera incorrecta, dado que se basa en una revisión "Ex post facto" de las enseñanzas del documento D1, en lugar de considerar dicho documento bajo la mirada de una persona experta que NO posee el conocimiento de la presente invención. En este sentido, un adecuado análisis de las enseñanzas de D1 claramente demuestra que afirmar que la presente invención carece de nivel inventivo es un hecho completamente injustificado.

En conexión con lo anterior, cabe resaltar que el documento D1 da a conocer que 47 supuestos candidatos a vacunas contra la tuberculosis (TB) fueron seleccionados de listas de genes inducidos en respuesta a un estímulo *in vivo*, y probados como vacunas de ADN plasmídico por su capacidad de proteger contra la exposición a *M. tuberculosis* en un modelo de infección de conejillo de indias.

Dado que no fue posible evaluar los 47 candidatos en un ensayo, se dividieron en 8 grupos de ensayo (generalmente 6 candidatos más los controles) (Ver D1, pág. 6345, sección 2.6, párrafo 1 y pág. 6347, sección 4, párrafo 1).

Durante la evaluación inicial de los 47 candidatos a vacuna, se encontró que **sólo ocho de ellos** brindaron una protección estadísticamente mayor, en comparación con el control negativo salino (D1, Figura 2A y pág. 6347 sección 3.4). Repitiendo el ensayo de exposición **con los ocho candidatos** que fueron inicialmente exitosos, los autores de D1 observaron que **sólo cuatro** de ellos demostraron una vez más dicha protección estadísticamente significativa (el análisis de los datos se realizó mediante la t de Student ($p < 0,05$) y ANOVA. Ver D1, Figura 2B y pág. 6347 sección 3.4).

En vista de las revelaciones del documento D1, implícitamente, se puede concluir que **sólo cuatro candidatos** (Rv0111, Rv0198c, Rv3812 y Rv1806) generan una protección significativa reproducible, los cuatro candidatos adicionales (Rv0785, Rv0847, Rv0237 y Rv2999) mostraron una capacidad protectora inconsistente y **los 39 candidatos restantes, entre los que se encuentra el RV2386c, no mostraron ninguna capacidad protectora significativa como vacunas de ADN plasmídico.**

En este sentido, si bien una persona versada en la materia puede identificar el producto proteico asociado con las vacunas de ADN probadas en el documento D1, la pregunta sigue siendo por qué la persona versada en la materia estaría motivada por D1 para seguir investigando con el componente Rv2386c y así llegar a las composiciones que se reclaman en la presente solicitud?

En este punto, cabe resaltar que el estándar para la evaluación del nivel inventivo no es simplemente si algo **podría** haber sido concebido, sino más bien si **habría** sido concebido.

Además, cabe señalar que el documento D1 claramente señala en su pág. 6346, columna 1, punto 3.1 que:

*"Los criterios de selección contra los cuales se eligieron los candidatos fueron: (1) Novedad: hasta donde sabemos, todos los candidatos que fueron seleccionados no fueron patentados, publicados o **investigados** por otros como una vacuna contra la tuberculosis en el momento del estudio"*

En consecuencia, **no parece haber ninguna razón específica para investigar los antígenos identificados en D1, es decir, el Rv2386c no era "a primera vista" un candidato para la investigación.**

De hecho, el documento D1 enseña que Rv2386c fue un fracaso y por lo tanto no sería objeto de investigaciones adicionales (los autores de D1 ni siquiera lo eligieron para la segunda etapa de sus propios ensayos, y tampoco vieron ninguna razón para distinguir el Rv2386c de las otras 38 vacunas de ADN fallidas).

Solamente, a la luz de la labor inventiva presentada en la presente solicitud, esto es que, el Rv2386c entregado como una vacuna de proteína, es capaz de provocar fuertes y multifuncionales respuestas de células T CD4 y CD8, respuestas que se sabe que están asociadas con la eficacia protectora, **queda claro el valor de la proteína Rv2386c como una candidata a vacuna.**

Como un complemento a los argumentos anteriores, también me permito resaltar que el documento Derrick et al.¹ demuestra que la magnitud y la calidad de las células T CD4 multifuncionales es una correlación de la protección en ratones. En la presente solicitud se resalta el hecho de que Rv2386c induce una respuesta multifuncional o polifuncional de las células T.

De otra parte, es de gran importancia resaltar que el análisis de patentabilidad realizado en la Resolución impugnada, presenta una serie de imprecisiones como se muestra a continuación:

- En primer lugar, en la página 4 de la Resolución impugnada, el cuadro comparativo de las características esenciales sugiere que el documento D1 describe un polipéptido en el contexto de una vacuna, lo cual es incorrecto.

- En segundo lugar, en la misma página 4, el señor Examinador establece que *"el documento D1 ya divulgaba vacunas para el tratamiento de la tuberculosis con nucleótidos que codifican la proteína Rv2386c y que **median la respuesta inmune**"*. En este sentido cabe resaltar que, como bien se ha demostrado anteriormente, D1 no contiene datos que muestren un efecto protector, y tampoco contiene datos que muestren algún efecto inmunológico.

Finalmente, con respecto a las objeciones específicas que se han hecho a las reivindicaciones caracterizadas por una combinación de un componente Rv2386c y el antígeno M72, muy amablemente me permito señalar que, es claro que el antígeno M72 se conocía en el estado de la técnica a la fecha de prioridad. Sin embargo, en ausencia de las enseñanzas y de las evidencias dadas por la presente solicitud (es decir, que Rv2386c podría tener utilidad en vacunación) no existe ninguna motivación en el estado del arte para combinar el antígeno M72 con un componente Rv2386c o compuestos relacionados. La ausencia de datos de combinación específicos en la presente solicitud no es determinante, ya que el nivel inventivo resulta de la utilización del Rv2386c por sí mismo.

Por último, muy respetuosamente me permito señalar una vez más, que la única motivación que tendría la persona versada en la materia para llegar a las composiciones aquí reclamadas, sería la revelación hecha por la presente invención, por lo que el análisis de nivel inventivo realizado por el Señor Examinador está enmarcado dentro de lo que en el ámbito de las patentes se conoce como "hindsight", o análisis "Ex post facto", toda vez que conociendo de antemano la invención el Señor Examinador está seleccionado partes específicas de las enseñanzas contenidas dentro de D1 y

¹ Derrick et al. "Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells" Vaccine 29 (2011) 2902-2909.

modificándolas de manera que permitan construir las composiciones reclamadas por la presente solicitud, pasos que de ninguna manera podrían ser evidentes para la persona versada en la materia en el momento en el cual se desarrolló la invención.

En este sentido vale la pena resaltar que al tener conocimiento de la invención es de esperarse que dichas modificaciones particulares de las enseñanzas de D1 parezcan obvias, toda vez que ya se sabe de antemano que efectivamente estas modificaciones resuelven el problema planteado; sin embargo, esta información no era conocida por el inventor en el momento de desarrollar la invención, por lo que no podría tener certeza de la utilidad de realizar estos pasos.

Visto lo anterior, me permito manifestar ante ese Despacho que a la luz de los argumentos anteriores es evidente que las composiciones que se definen en el capítulo reivindicatorio modificado que se adjunta presentan un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del documento D1, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

5. REQUISITOS EXIGIDOS POR EL ARTÍCULO 18, LA EVALUACIÓN DEL NIVEL INVENTIVO DE UNA SOLICITUD DE PATENTE.

Dentro del contexto de los argumentos discutidos anteriormente, me permito señalar que el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000 exige de forma manifiesta que la invención no debe resultar obvia ni se debe poder derivar de forma evidente de lo existente en el arte previo, y por lo tanto es en este sentido que el examinador debe encaminar su análisis para sopesar si una solicitud es o no merecedora del beneficio de patente.

Así mismo, me permito llamar la atención a ese Despacho a que el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina se ha pronunciado con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente²:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por Nivel Inventivo.

² Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de Nivel Inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

Con respecto a este señalamiento me permito resaltar que resulta indiscutible que para la legislación Andina, para que exista afectación del requisito de Nivel Inventivo de una solicitud de patente, es necesario que la invención allí revelada sea derivable de forma clara y directa del arte previo, y que las enseñanzas de este arte previo sin lugar a dudas conduzcan a dicha invención.

Consecuentemente, para el caso que nos compete dado que a partir de las enseñanzas del arte previo no "saltan a la vista de manera clara y directa" las composiciones de la presente invención, es evidente que el arte previo no puede afectar el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio.

II. CONCLUSIONES

Con base en las modificaciones y los argumentos técnicos mostrados previamente, me permito manifestar ante ese Despacho que la materia revelada en la solicitud de patente en cuestión, especialmente como es ahora reclamada dentro del capítulo reivindicatorio modificado, no solamente es clara y se encuentra sustentada en la descripción, sino que además es novedosa y presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del arte previo citado en la Resolución Número **36008** aquí impugnada, cumpliendo así a cabalidad las disposiciones establecidas en los Artículos 16, 18 y 30 de la Decisión Andina 486 de 2000, y por lo tanto demostrando ser merecedora del privilegio de patente requerido.

Como consecuencia de lo anterior, me permito resaltar que dado que la solicitud denegada sí se ajusta completamente a los requerimientos establecidos por la Decisión Andina 486, al negar el privilegio de patente ese Despacho claramente contraviene los Artículos 14, 16, 18 y 30 de dicha Decisión.

III. SOLICITUD

En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y de los argumentos presentados y revocar la Resolución Número **36008** impugnada para conceder el privilegio de patente solicitado.

IV. PODER

En este punto me permito mencionar ante ese Despacho que los documentos que acreditan mi calidad de Representante Legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de las sociedades peticionarias fueron presentados junto con la solicitud de patente el 27 de Enero de 2011.

V. ANEXOS

Anexo al presente recurso me permito presentar:

- (i) Recibo número 14-0071444, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- (ii) Copia de las páginas corregidas **213** a **220** que corresponden a la descripción de la presente solicitud.
- (iii) Copia de las páginas **236** a **238** que corresponden al capítulo reivindicatorio modificado, discutido en el presente memorial, el cual consta de **8** reivindicaciones;
- (iv) Artículo: Derrick et al. "Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells" Vaccine 29 (2011) 2902-2909.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

VI. DOMICILIO

Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º, Bogotá D.C.

Del Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0071444

Bogotá D.C., Julio 08 de 2014 - 08:24:31

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	12233	03/02/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	12234	03/02/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	12388	03/02/2014		515.000.00
RECIBO DE CA	999999999	12389	03/02/2014		515.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	128.000.00	128.000.00
			<u>\$128.000.00</u>

SON: **CIENTO VEINTIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009237- -00012-0000

Fecha: 2014-07-16 17:00:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 23

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 8 de 2014 - 08:24:33

[Handwritten signature]

Tabla 3

Epítomos de células-T CD8+ humanas de Rv2386c supuestos

5

10

15

20

25

No. de Epíto- po de CD8 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
1	3	ELSVATGAV	SEQ ID No: 53	A_0201
2	5	SVATGAVST	SEQ ID No: 54	A_0201
3	18	IPMPAGVNP	SEQ ID No: 55	B_0702, B51, Cw_0401
4	19	PMPAGVNPA	SEQ ID No: 56	A_0201
5	21	PAGVNPADL	SEQ ID No: 57	A_2402, B_3501
6	23	GVNPADLAA	SEQ ID No: 58	A3
7	25	NPADLAAEL	SEQ ID No: 59	A24, B_0702, B44, Cw_0401, Cw_0602, B7, B_3501, B51
8	28	DLAAELAAV	SEQ ID No: 60	A_0201
9	33	LAADVTESV	SEQ ID No: 61	A2, A_0201, B51
10	37	VTESVDEDY	SEQ ID No: 62	A1, A_0101, A_0301
11	38	TESVDEDYL	SEQ ID No: 63	B44

5

10

15

20

25

No. de Epítopo de CD8 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
12	40	SVDEDYLLY	SEQ ID No: 64	A1, A_0101, A3
13	48	YECDGQWVL	SEQ ID No: 65	A24, B_4403, B51, Cw_0401, B44
14	52	GQWVLAAGV	SEQ ID No: 66	A2, A_0201
15	55	VLAAGVQAM	SEQ ID No: 67	A2, B8
16	65	ELDSDELRV	SEQ ID No: 68	A_0201
17	67	DSDELRVIR	SEQ ID No: 69	A_0101, A_0301
18	82	QQWSGRPGA	SEQ ID No: 70	A_0201, A_0301
19	86	GRPGAALGE	SEQ ID No: 71	A3, B8
20	87	RPGAALGEA	SEQ ID No: 72	B7, B_0702, B_3501, B51
21	91	ALGEAVDRL	SEQ ID No: 73	A2, A_0201
22	93	GEAVDRLLL	SEQ ID No: 74	B44
23	106	AFGWVAFEF	SEQ ID No: 75	A24
24	124	RLAPHTPLA	SEQ ID No: 76	A2, A_0201, A3

5

10

15

20

25

No. de Epítopo de CD8 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
25	125	LAPHTPLAR	SEQ ID No: 77	A_0101, A_0301
26	126	APHTPLARV	SEQ ID No: 78	B7, B_3501, B51
27	127	PHTPLARVF	SEQ ID No: 79	A24, B44
28	130	PLARVFSPR	SEQ ID No: 80	A_0101, A3, A_0301
29	133	RVFSPRTRI	SEQ ID No: 81	B7
30	134	VFSPRTRIM	SEQ ID No: 82	A24, B8
31	143	VSEKEIRLF	SEQ ID No: 83	A1, A24
32	153	AGIRHREAI	SEQ ID No: 84	B8, B51
33	164	LLATGVREV	SEQ ID No: 85	A2, A_0201
34	170	REVPQSRSV	SEQ ID No: 86	B44
35	172	VPQSRSDV	SEQ ID No: 87	B7, B8
36	180	VSDDPSGFR	SEQ ID No: 88	A_0101, A_0301
37	183	DPSGFRRRV	SEQ ID No: 89	B_3501, B51
38	185	SGFRRRVAV	SEQ ID No: 90	B8, B51

5

10

15

20

25

No. de Epíto- po de CD8 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
39	186	GFRRRVAVA	SEQ ID No: 91	A_0301, B8
40	187	FRRRVAVAV	SEQ ID No: 92	A3, B8, B51
41	190	RVAVAVDEI	SEQ ID No: 93	A24, B7
42	198	IAAGRYHKV	SEQ ID No: 94	B8, B51
43	200	AGRYHKVIL	SEQ ID No: 95	B7, B8
44	202	RYHKVILSR	SEQ ID No: 96	A3, A24
45	206	VILSRCVEV	SEQ ID No: 97	A2, A_0201
46	214	VPFAIDFPL	SEQ ID No: 98	B7, B_3501, B51
47	216	FAIDFPLTY	SEQ ID No: 99	A1, A_0101, B_3501, B51
48	218	IDFPLTYRL	SEQ ID No: 100	B44
49	226	LGRRHNTPV	SEQ ID No: 101	B8, B51
50	228	RRHNTPVRS	SEQ ID No: 102	A3, B8
51	231	NTPVRSFLL	SEQ ID No: 103	A_0101, A24
52	233	PVRSFLLQL	SEQ ID No: 104	A_0201, B7

5

10

15

20

25

No. de Epítopo de CD8 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítipo	SEQ ID No:	Alelo HLA
53	245	RALGYSP EL	SEQ ID No: 105	A2, A_0201, B_3501, B51
54	246	ALGYSP ELV	SEQ ID No: 106	A_0101, A2, A_0201
55	249	YSP ELVTAV	SEQ ID No: 107	A2
56	250	SP ELVTAVR	SEQ ID No: 108	B_0702, B_3501, B51
57	256	AVRADGVVI	SEQ ID No: 109	A3, A_0301, B7
58	264	ITEPLAGTR	SEQ ID No: 110	A_0101, A_0301
59	266	EPLAGTRAL	SEQ ID No: 111	B7, B8, B_3501, B51
60	270	GTRALGRGP	SEQ ID No: 112	A3, B8
61	272	RALGRGPAI	SEQ ID No: 113	A24, B7, B51
62	288	LESNSKEIV	SEQ ID No: 114	B44
63	294	EIVEHAISV	SEQ ID No: 115	A_0201
64	295	IVEHAISVR	SEQ ID No: 116	A_0101
65	298	HAISVRSSL	SEQ ID No: 117	B7, B8, B_3501
66	301	SVRSSLEEI	SEQ ID No: 118	B7

5

10

15

20

25

No. de Epítopo de CD8 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
67	305	SLEEITDIA	SEQ ID No: 119	A2
68	311	DIAEPGSAA	SEQ ID No: 120	A_0101, A_0301
69	313	AEPGSAAVI	SEQ ID No: 121	B44
70	327	RERGSVQHL	SEQ ID No: 122	B7, B44
71	331	SVQH LGSTI	SEQ ID No: 123	A24, B7
72	342	RLDPSSDRM	SEQ ID No: 124	A2, A_0201
73	344	DPSSDRMAA	SEQ ID No: 125	B7, B_3501
74	346	SSDRMAALE	SEQ ID No: 126	A1, B8
75	348	DRMAALEAL	SEQ ID No: 127	B7, Cw_0401, Cw_0602
76	349	RMAALEALF	SEQ ID No: 128	A24
77	351	AALEALFPA	SEQ ID No: 129	A2, A_0201, B_3501
78	352	ALEALFPAV	SEQ ID No: 130	A_0101, A2, A_0201
79	353	LEALFPAVT	SEQ ID No: 131	B8, B_4403
80	357	FPAVTASGI	SEQ ID No: 132	B7, B8, B_3501, B51

✓

5

10

15

20

25

No. de Epítopo de CD8 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
81	359	AVTASGIPK	SEQ ID No: 133	A3, A_0301, B7
82	360	VTASGIPKA	SEQ ID No: 134	A_0201
83	364	GIPKAAGVE	SEQ ID No: 135	A_0301, B8
84	365	IPKAAGVEA	SEQ ID No: 136	B7, B_3501
85	367	KAAGVEAIF	SEQ ID No: 137	A24, B_3501
87	369	AGVEAIFRL	SEQ ID No: 138	A_0201, B51
87	376	RLDECPRGL	SEQ ID No: 139	A2, A_0201
88	380	CPRGLYSGA	SEQ ID No: 140	B7, B_3501
89	383	GLYSGAVVM	SEQ ID No: 141	A2, A_0201, A_0301, A3
90	384	LYSGAVVML	SEQ ID No: 142	A24, B44
91	390	VMLSADGGL	SEQ ID No: 143	A2, A_0201, A24
92	397	GLDAALTLR	SEQ ID No: 144	A_0101, A3, A_0301
93	398	LDAALTLRA	SEQ ID No: 145	A_0201, B_4403
94	400	AALTLRAAY	SEQ ID No: 146	A_0101, A_0301, B_3501

5

10

15

No. de Epítopo de CD8 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
95	402	LTLRAAYQV	SEQ ID No: 147	A_0201
96	407	AYQVGGRTW	SEQ ID No: 148	A24
97	414	TWLRAGAGI	SEQ ID No: 149	A24
98	424	EESEPEREF	SEQ ID No: 150	B44
99	430	REFEETCEK	SEQ ID No: 151	B44
100	438	KLSTLTPYL	SEQ ID No: 152	A2, A_0201
101	440	STLTPYLVA	SEQ ID No: 153	A_0101, A_0201
102	441	TLTPYLVAR	SEQ ID No: 154	A3, A_0301

20

Como se puede ver a partir de las Tablas 2 y 3, Rv2386c contiene un número de epítomos de células-T CD4+ y CD8 predichos. Adicionalmente, esta información sugiere que la proteína lleva epítomos que pueden ser reconocidos por los HLAs que se presentan en todo el mundo (es decir, los HLAs de individuos caucásicos, africanos, asiáticos, o latinoamericanos –

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un componente Rv2386c y un componente M72, en donde dicho componente
5 Rv2386c es un polipéptido el cual comprende:

(i) una secuencia de proteína de Rv2386c de SEQ ID No 1 o 3-7 o;

10 (ii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv2386c, dicho fragmento inmunogénico comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID No: 30-154;

Y dicho componente M72 es:

(i) un polipéptido que comprende los residuos 2-723 de la SEQ ID No: 25; o

(ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende los residuos 2-723 de la SEC ID No: 25;

y en donde, cuando dicho componente M72 se proporciona en la forma de un polipéptido, el componente Rv2386c y un componente M72 puede ser proporcionado por cualquiera de los dos componentes polipéptidos individuales o como una proteína de fusión que comprende ambos componentes de polipéptidos.

2. Una composición que comprende un componente Rv2386c y un componente M72, en donde dicho componente Rv2386c es un polinucleótido el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

(i) una secuencia de proteína de Rv2386c de SEQ ID No 1 o 3-7; o

5 (ii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv2386c, dicho fragmento inmunogénico comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID No: 30-154;

Y dicho componente M72 es:

10 (i) un polipéptido que comprende residuos de 2 – 723 de la SEQ ID No: 25; o

(ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende los residuos 2-723 de la SEC ID No: 25;

y en donde, cuando dicho componente M72 se proporciona en la forma de un polinucleótido, el componente Rv2386c y un componente M72 pueden ser proporcionados como dos componentes de polinucleótidos individuales, como un único polinucleótido que codifica dos componentes polipeptídicos individuales o como un único polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende ambos componentes de polipéptidos.

3. Una composición inmunogénica, la cual comprende:

(a) un polipéptido que comprende:

(i) una secuencia de proteína de Rv2386c de SEQ ID no: 1 o 3 - 7; o

(ii) un fragmento inmunogénico de una

secuencia de proteína de Rv2386c, dicho fragmento inmunogénico comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No: 30 - 154;

5

y

(b) un potenciador de respuesta inmunitaria no específica.

10

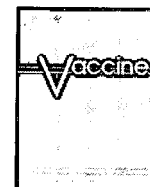
4. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el potenciador de respuesta inmunitaria no específica es un adyuvante.

5. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 4, en donde el adyuvante comprende una combinación de QS21 y 3D-MPL.

6. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el polipéptido comprende una secuencia de proteína de Rv2386c de SEQ ID No: 1 o 3-7.

7. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el polipéptido comprende un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv2386c dicho fragmento inmunogénico comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID Nos: 30 - 154.

8. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la proteína de Rv2386c tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.



Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells

Steven C. Derrick, Idalia M. Yabe, Amy Yang, Sheldon L. Morris*

Laboratory of Mycobacterial Diseases and Cellular Immunology, Center for Biologics Evaluation and Research, United States Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2010

Received in revised form

13 December 2010

Accepted 5 February 2011

Available online 21 February 2011

Keywords:

Tuberculosis

Cytokines

BCG

Vaccine

ABSTRACT

The development of improved vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* has been hindered by a limited understanding of the immune correlates of anti-tuberculosis protective immunity. In this study, we examined the relationship between long-term anti-tuberculosis protection and the mycobacterial-specific CD4 multifunctional T (MFT) cell responses induced by five different TB vaccines (live-attenuated, subunit, viral vectored, plasmid DNA, and combination vaccines) in a mouse model of pulmonary tuberculosis. In a 14-month experiment, we showed that TB vaccine-induced CD4 T cell responses were heterogeneous. Antigen-specific monofunctional CD4 T cells expressing single cytokines and MFT CD4 T cells expressing multiple cytokines (IFN- γ and TNF- α , IFN- γ and IFN- γ , TNF- α , and IL-2, and all three cytokines) were identified after the immunizations. Interestingly, compared to the monofunctional cells, significantly higher median fluorescent intensities (MFIs) for IFN- γ and TNF- α were detected for triple-positive MFT CD4 T cells induced by the most protective vaccines while modest differences in relative MFI values were seen for the less protective preparations. Most importantly during the 14-month study, the levels of vaccine-induced pulmonary and splenic protective immunity correlated with the frequency and the integrated MFI (iMFI, frequency $\times$ MFI) values of triple-positive CD4 T cells that were induced by the same vaccines. These data support efforts to use MFT cell analyses as a measure of TB vaccine immunogenicity in human immunization studies.

Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Despite the widespread use of BCG vaccine and the availability of anti-tuberculosis medications for more than 50 years, tuberculosis (TB) remains an international public health tragedy with about two million deaths resulting annually from *Mycobacterium tuberculosis* infections. Globally, TB is second to only HIV disease as a cause of death among infectious agents [1]. In the past decade, the increasing prevalence of multiple drug resistant TB and the intersection of the HIV and TB epidemics have amplified public health concerns about this disease [2,3]. The STOP TB partnership has established compelling future goals for global TB control. This STOP TB group proposes that the global TB incidence should be reduced by 50% of 1990 levels by 2015 and in 2050, the case rate should be decreased to one case per million per year [4]. Clearly, to achieve these targets,

improved interventions including better drugs and vaccines will be required.

In the development of novel immunization strategies against TB, an inadequate understanding of the correlates of protective immunity has limited rational vaccine design and has complicated assessments of vaccine effectiveness. Although T cell responses (especially CD4 responses) are known to be essential components of anti-tuberculosis immunity and IFN- γ and TNF- α have been shown to be necessary for efficiently controlling TB infections, well defined correlates of protective immunity against TB have not been established [5]. Many TB vaccine studies have measured IFN- γ responses to assess vaccine immunogenicity and effectiveness but recent experiments in mice and cattle have shown that IFN- γ responses do not correlate with protection against virulent mycobacterial challenge. These data have suggested that IFN- γ alone is necessary but not sufficient to limit mycobacterial disease [6,7]. It is becoming increasingly clear that single measurements of the magnitude of anti-mycobacterial immune responses including evaluations of IFN- γ production are probably not adequate to predict vaccine effectiveness.

Evaluating only IFN- γ levels as a protective correlate has probably not been successful because this approach underestimates the complexity of the functional heterogeneity of T cell cytokine

* Corresponding author at: Laboratory of Mycobacterial Diseases and Cellular Immunology, Center for Biologics Evaluation and Research, United States Food and Drug Administration, Bldg. 29/Room 502, CBER/FDA, 29 Lincoln Dr., Bethesda, MD 20892, United States. Tel.: +1 301 496 5978; fax: +1 301 435 5675.
E-mail address: sheldon.morris@fda.hhs.gov (S.L. Morris).

responses. Recent studies have indicated that the ability of vaccines to evoke T cell responses of sufficient magnitude and quality for the successful containment of intracellular microbial infections is associated with the induction of multifunctional T (MFT) cells which express multiple cytokines per cell [8–15]. Experiments in several disease models have shown that CD4 MFT cells, which express IFN- γ , IL-2, and TNF- α , are functionally superior to their monofunctional counterparts. The induction of these MFT cells has correlated with protection against leishmania infections in mice and the control of SIV viremia in non-human primates [8,12]. Interestingly, the presence of MFT cells is characteristic of the immune responses seen in nonprogressive HIV patients whereas HIV non-controllers elicit responses dominated by monofunctional IFN- γ secreting CD4 T cells [14]. The factors responsible for the optimized effectiveness of MFT cells are uncertain but probably include the capacity of MFT cells to secrete high levels of cytokines per cell, the synergistic intracellular killing resulting from the secretion of IFN- γ and TNF- α from the same cell, and the promotion of T cell expansion by cells expressing IL-2 [16].

Several studies have shown that TB vaccines can induce potent CD4 MFT cell responses. For example, Lindenstrom et al. showed that immunization with the Ag85-ESAT6 fusion protein/CAF01 adjuvant formulation evoked long-term protective responses characterized by high levels of persisting MFT cells [11]. Immunization of adolescents or children with a MVA85A vaccine alone or as a BCG booster vaccine in mice induced multiple CD4 T cell subsets including cells which co-express IFN- γ , TNF- α , and IL-2 [17,18]. BCG vaccination of newborns also induced a complex profile of T cells expressing multiple cytokines [19]. Despite these intriguing results, it has not been shown in animal models or in clinical studies that the induction of vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity correlates with the frequencies and/or quality of CD4 MFT cellular responses for different types of TB vaccines. In this study, we analyzed the persistence of anti-tuberculosis protective immunity (including the CD4 MFT cell responses) for five different types of TB vaccines – live attenuated, subunit, viral vectored, plasmid DNA and combination vaccines. Importantly, we show during a 14-month study period that the extent of vaccine-induced protective immunity correlates with the magnitude and quality of multi-functional CD4 T cells expressing IFN- γ , TNF- α , and IL-2 that were elicited by immunization with these different TB vaccine preparations.

2. Materials and methods

2.1. Animals

C57BL/6 female mice were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbour, Maine). All mice used in this study were maintained under sterile conditions at the Center for Biologics Evaluation and Research, Bethesda, MD. The mice were immunized with selected vaccine preparations at 6–8 weeks of age.

2.2. Vaccine preparations

In earlier studies, the vaccine preparations, the immunizing dose, and the immunizing schedule had been optimized to maximize vaccine effectiveness ([20,21], S. Derrick, unpublished results). The E6-85 fusion protein consists of the ESAT6 gene fused to the N-terminus of the antigen 85B gene without the Ag85B signal sequence as previously described [22]. The E6-85 protein/adjuvant preparation was prepared by mixing 1.5 mg/ml dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) (Kodak, Rochester, NY), 0.25 mg/ml monophosphoryl lipid A (MPL) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) and 25 μ g/ml of the E6-85 protein in a final volume of 1.0 ml in

PBS. For this study, 0.2 ml of the E6-85/DDA/MPL vaccine were given to mice subcutaneously (s.c.) three times, two weeks apart. An adenovirus serotype 5 construct expressing the E6-85 fusion protein was prepared by ViraQuest, Inc. (North Liberty, IA). The AdE6-85 construct was administered twice intramuscularly (i.m.) one month apart at 1×10^7 plaque forming units (pfu) per dose. A DNA vaccine expressing the E6-85 fusion protein was prepared as previously described [20] and was administered i.m. three times three weeks apart. The BCG Pasteur vaccine was administered once s.c. at 1×10^6 CFU/ml or three times two weeks apart mixed with the E6-85/DDA-MPL (BCG/E6-85) formulation described above.

2.3. Evaluation of vaccine-induced protective immunity in an aerogenic infection model

Five mice per group were infected with *M. tuberculosis* Erdman by aerosol at 2, 8 and 14 months following the immunizations. The mice were challenged at a concentration known to deliver about 200 CFU in the lungs over a 30-min exposure in a Middlebrook chamber (Glas Col, Terre Haute, IN) [20]. At each time point, the lungs and spleens were homogenized separately in PBS with 0.05% Tween 80 using a Seward Stomacher 80 blender (Tekmar, Cincinnati, OH). The homogenates were serially diluted in PBS + 0.05% Tween 80 and plated on Middlebrook 7H11 agar (Difco) plates containing 10% OADC enrichment (Becton Dickinson, Sparks, MD) medium, 10 μ g/ml ampicillin, 50 μ g/ml cycloheximide, and 2 μ g/ml 2-thiophenecarboxylic acid hydride (TCH) (Sigma). The addition of TCH to the agar plates inhibits BCG growth but has no effect on *M. tuberculosis* growth. Plates were incubated at 37 °C for 2–3 weeks and then counted to determine the number of mycobacterial colony forming units (CFU) per organ.

2.4. Flow cytometry

Four to five unchallenged mice were used to determine the frequency of CD4 MFT cells for each vaccine at each time point post-vaccination [22]. Spleen cells from naïve and vaccinated mice were isolated by disrupting the spleens using a 3cc syringe barrel in complete DMEM (cDMEM) consisting of 10 mM HEPES, 2.0 mM L-glutamine, 0.1 mM MEM non-essential amino acids with 10% fetal bovine serum (FBS). After passing the spleen homogenates through a 70 μ m cell strainer, the resulting single cell suspension was washed with cDMEM-FBS and treated for 1 min with 5.0 ml ACK lysing buffer (Lonza, Walkersville, MD) and then counted. Lung cells were isolated by homogenizing the lung tissue as described above in PBS containing 2% FBS (PBS-FBS). The tissue was then incubated in PBS-FBS containing 4 mg/ml collagenase (final concentration) at 37 °C for 1 h. Afterwards, the lung tissue was removed from the cells by placing the suspension in a Filtra-Bag (Labplas, Quebec, Canada). The resulting single cell suspension was centrifuged to pellet the cells and treated with ACK lysing buffer as described above. After washing, the cells were passed through a 70 μ m cell strainer, pelleted and counted.

After washing the lung and spleen cells with an equal volume of media, the cells were resuspended in cDMEM-FBS, counted and added to wells of a 24-well plate at a density of 2.5×10^6 cells per well in 1.0 ml cDMEM-FBS. For measurement of antigen-specific responses, BCG Pasteur (or BCG + PPD) was added to the wells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 bacilli per spleen cell. Wells which contained only spleen cells served as unstimulated controls. Infections were allowed to proceed overnight followed by the addition of Golgiplug (BD Biosciences, San Jose, CA) (1 μ l per well). It should be noted that in initial experiments, a stimulating mixture of BCG and PPD (which contains ESAT6) was used but did not result in enhanced activation of immune cells relative to BCG alone (see supplementary Fig. 1). Therefore, although BCG does not contain

ESAT6 (a component of some of the vaccines), the use of the potent immunogen BCG as the stimulating agent did not underestimate the activation detected for splenocytes recovered from vaccinated animals.

After 4–5 h of incubation, the unbound cells were removed from the wells and transferred to 12 mm × 75 mm tubes, washed with PBS and resuspended in ~50 µl PBS. Live-Dead stain (Invitrogen, Carlsbad, CA) (10 µl of a 1:100 dilution) was added to each tube and incubated for 30 min at room temperature to allow for gating on viable cells. After washing the cells with PBS-FBS, antibody against CD16/CD32 (FcγIII/II receptor, clone 2.4G2) (Fc block) was added in a volume of ~50 µl and incubated at 4 °C for 15 min. The cells were then stained for 30 min at 4 °C by adding antibodies against the CD4 (rat anti-mouse CD4 Alexa Fluor 700 [AF-700] Ab, clone RM4-5), and CD8 (rat anti-mouse CD8 peridinin chlorophyll protein complex [PerCP] Ab, clone 53-6.7) proteins at 0.1 and 0.2 µg per tube respectively. Following the incubation, the cells were washed twice with PBS and then fixed for 30 min at 4 °C with 2% paraformaldehyde in PBS. After fixing, the cells were pelleted, washed twice with PBS-FBS and stored at 4 °C. Fixed cells were washed twice with perm-wash buffer (1% FBS, 0.01 M HEPES, 0.1% saponin in PBS) followed by intracellular staining using the following antibodies at 0.2 µg per tube: rat anti-mouse IFN-γ allophycocyanin [APC] Ab, clone XMG1.2; rat anti-mouse TNF-α fluorescein isothiocyanate [FITC] Ab, clone MP6-XT22; rat anti-mouse IL-2 phycoerythrin [PE] Ab, clone JES6-5H4. The cells were incubated at 4 °C for 30 min, washed twice with perm-wash buffer and then twice with PBS-FBS. All antibodies were obtained from BD Biosciences.

The cells were analyzed using a LSRII flow cytometer (Becton Dickinson) and FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR). We acquired 100,000–250,000 events per sample and then, using FlowJo, gated on live, single cell lymphocytes. To determine the frequency of different populations of MFT cells, we gated on CD4 T cells staining positive for TNF-α and IFN-γ, TNF-α and IL-2, IFN-γ and IL-2 or all three cytokines.

2.5. Median fluorescence intensity (MFI) assessments

The MFI for IFN-γ or TNF-α for monofunctional and CD4 MFT cells was evaluated in the different vaccine groups using the FlowJo software. For this study, the MFI is the fluorescence intensity value representing the middle number of the distribution of CD4 T cells secreting only IFN-γ or TNF-α, secreting both IFN-γ and TNF-α or cells secreting IFN-γ, TNF-α and IL-2. The data are presented as the mean of the individual MFI assessments for 4–5 mice.

2.6. Statistical analysis

The Graph Pad Prism 4 program was used to analyze the data for these experiments (Graph Pad Software, San Diego, CA). The anti-tuberculosis protection data, the flow cytometry results, and the MFI data were evaluated using *t* test analysis. The correlations between the protection results and the flow cytometry data were assessed using the Pearson correlation analysis.

3. Results

3.1. Evaluation of vaccine-mediated protection

The aim of these studies was to investigate whether the long-term levels of vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity correlated with the magnitude and quality of mycobacterial-specific CD4 MFT cellular responses induced by the same vaccines. For these experiments, we selected five different types of TB vaccines that differ substantially in the number, amount, and persistence of TB antigens. In previous studies, we had shown

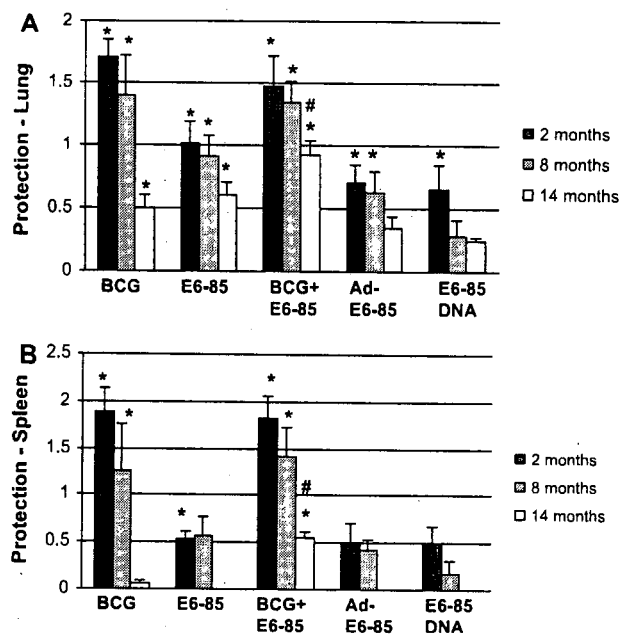


Fig. 1. The relative anti-tuberculosis protective immunity over a 14-month period induced by immunization with either BCG, E6-85 fusion protein, BCG/E6-85 combination vaccine, Ad-E6-85 adenovirus vaccine or the E6-85 DNA vaccine. Mice received an aerosol challenge of *M. tuberculosis* Erdman at 2, 8 and 14 months post-vaccination and were then sacrificed 28 days later to assess the organ bacterial burden. Protection is defined as the reduction in pulmonary (A) or splenic (B) log₁₀ CFU relative to naïve mice. The results are presented as the mean relative protection ± the standard error of the mean. * Statistical significance relative to the naïve control group, *p* < 0.05. # Statistical significance relative to the BCG alone group, *p* < 0.05.

that these vaccines elicited different levels of protective immunity against *M. tuberculosis* at 1–3 months post-immunization and the activity of some of these vaccines waned during studies which exceeded one year [20]. By evaluating several different vaccines in a long-term 14-month experiment, we were able to compare the magnitude and quality of vaccine-induced MFT CD4 T cells with a range of vaccine-induced protective responses.

At two, eight, and fourteen months post-vaccination, mice immunized with the 5 different vaccines and naïve controls were aerogenically challenged with *M. tuberculosis* and then were sacrificed one month later to assess bacterial burdens in the lungs and spleens. As shown in Fig. 1A, each vaccine induced significant anti-tuberculosis pulmonary protective responses at 2 months post-vaccination with substantial reductions in bacterial CFU in the lung (relative to naïve controls) being seen at this time point. Reductions in mycobacterial burdens of greater than 1 log₁₀ (a 90% reduction) were detected for three vaccine groups (BCG, E6-85, and the BCG/E6-85 combination) while more modest decreases in mycobacterial concentrations were observed for the AdE6-85 (0.69 log₁₀) and E6-85 DNA (0.66 log₁₀) vaccines. At 8 months after the immunizations, similar post-challenge protection patterns in the lung were detected. The three most effective vaccines (BCG, E6-85, and BCG/E6-85) were again highly protective and immunization with the AdE6-85 construct again yielded significant but moderate pulmonary protection. However, at 8 months, the E6-85 TB DNA vaccine was not protective. For all test vaccines, waning anti-tuberculosis immunity in the lung was clearly detected at 14 months post-vaccination. Relative to the 2-month values, the level of pulmonary protection had declined –1.2 log₁₀ for BCG, –0.5 log₁₀ for the E6-85 vaccine, and –0.4 log₁₀ for the TB adenovirus construct and the TB DNA vaccine. Importantly, although decreasing protective immunity was also seen for the BCG/E6-85 mixture,

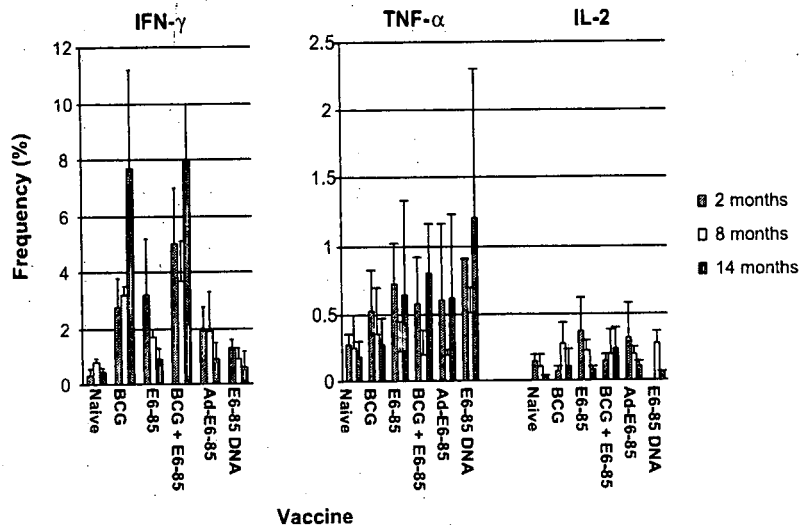


Fig. 2. The frequency (%) of CD4 T cells producing only IFN- γ , TNF- α or IL-2 at 2, 8 and 14 months post-vaccination was determined by flow cytometry analysis of spleen cells from mice immunized with BCG, the E6-85 fusion protein, BCG/E6-85 combination, Ad-E6-85 adenovirus construct, or the E6-85 DNA vaccine. Nonimmunized mice served as negative controls.

strong pulmonary protection still persisted for this vaccine preparation ($0.95 \log_{10}$) and its vaccine-induced protective responses were significantly elevated compared to the responses detected for BCG and the other vaccines at 14 months.

The patterns of protection against dissemination to the spleen of the *M. tuberculosis* aerosol infection were similar to the lung data (Fig. 1B). Significant protective immunity in the spleen (compared to naïve controls) was seen for the three most active vaccines (BCG, E6-85, and BCG/E6-85) at 2 months post-immunization while protective responses generally waned in subsequent months. Again, at the 14-month time point, the anti-tuberculosis protective responses detected in the spleen for the BCG/E6-85 mixture was significantly better than the protection seen for all other vaccines including live BCG.

3.2. Evaluation of the frequencies of monofunctional and MFT CD4 T cells

Recent studies have suggested that the levels of vaccine-induced protection against intracellular pathogens were associated with the frequency of vaccine-induced MFT cells [8–15]. To assess whether the number of cytokine-expressing cells correlated with levels of anti-mycobacterial protective responses in immunized animals, splenocytes from vaccinated and naïve mice were stimulated overnight, stained for intracellular cytokines, and analyzed by multiparameter flow cytometry.

Since CD4 T cells are a critical component of anti-tuberculosis immunity, we focused on CD4 cells for these experiments. Initially, the numbers of monofunctional cells expressing a single cytokine (IFN- γ , TNF- α , or IL-2) were enumerated. Subsequently, the frequency of vaccine-induced double-positive cells expressing 2 cytokines (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /IL-2, and TNF- α /IL-2) and cells producing all three cytokines (triple-positive) were determined at the 2, 8, and 14-month time points. As shown in Fig. 2, the frequency of CD4 T cells expressing only IFN- γ were relatively high in the BCG containing groups throughout the 14-month experiment. For the BCG and BCG/E6-85 vaccines, 3–5% of CD4 T cells expressed only IFN- γ at 2 months and were still elevated at 14 months (~8%). In contrast, for the E6-85, AdE6-85, and pVaxE6-85 vaccine preparations, the relatively high values for monofunctional IFN- γ producing cells seen at 2 months post-vaccination decreased substantially at the 14-month time point. Compared to the IFN-

γ responses, generally lower frequencies of cells expressing only TNF- α were detected following vaccination of all groups. Moreover, very modest numbers of IL-2 expressing cells were identified in all vaccine groups.

For the most active vaccines (BCG, E6-85, and BCG/E6-85), significantly increased frequencies (relative to naïve controls) of all double positive cells that were evaluated (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /IL-2, and TNF- α /IL-2) were detected at 2 months post-vaccination (Fig. 3A). Importantly, significantly elevated numbers of triple positive cells were seen for each vaccine group at this early time point, too. As seen in Fig. 3B, the cellular immune responses had generally declined by 8 months post-vaccination. Significant relative increases were only detected in double positive IFN- γ /TNF- α expressing cells taken from mice immunized with the BCG, E6-85, and BCG/E6-85 vaccines. Again, elevated frequencies of triple-positive cells were seen for the BCG and BCG/E6-85 vaccine preparations. By the 14-month time point, even lower overall CD4 MFT cell numbers were detected (Fig. 3C). The only CD4 T cell frequencies exceeding 0.2% at this time point were IFN- γ /TNF- α double positive cells for the BCG (0.45%) and BCG/E6-85 (1%) vaccine groups and triple positive cells taken from mice immunized with the BCG/E6-85 mixture (0.5%). At 14 months, it should be noted that the significantly elevated levels of IFN- γ /IL-2 and TNF- α /IL-2 double-positive cells were only seen for the BCG/E6-85 vaccine group. Taken together, the 14-month flow cytometry results indicate the BCG/E6-85 vaccine, which evoked the most durable protective immunity, also induced the most persistent mycobacterial-specific CD4 MFT cell responses.

In addition to comparisons to naïve controls, the vaccine-induced CD4 T cell frequencies for the most active vaccines were compared to the values of the other vaccines. While the E6-85 vaccine-induced CD4 T cell frequencies were not significantly elevated (at all time points) compared to the four other vaccines, CD4 T cell levels in the BCG and BCG/E6-85 vaccinated groups were relatively increased for specific CD4 T cell subsets (supplementary Table 1). For the BCG immunized mice, significant increases in CD4 T cell frequencies (relative to the E6-85, Ad E6-85, and pVaxE6-85 vaccines) were seen at 8 months post-immunization for CD4 T cells expressing IFN- γ , IFN- γ /TNF- α , and IFN- γ /TNF- α /IL-2 and at 14 months for IFN- γ expressing cells. Interestingly, for the most persistent BCG/E6-85 vaccine, significant or approaching significant increases in CD4 T cell frequencies relative to the same three

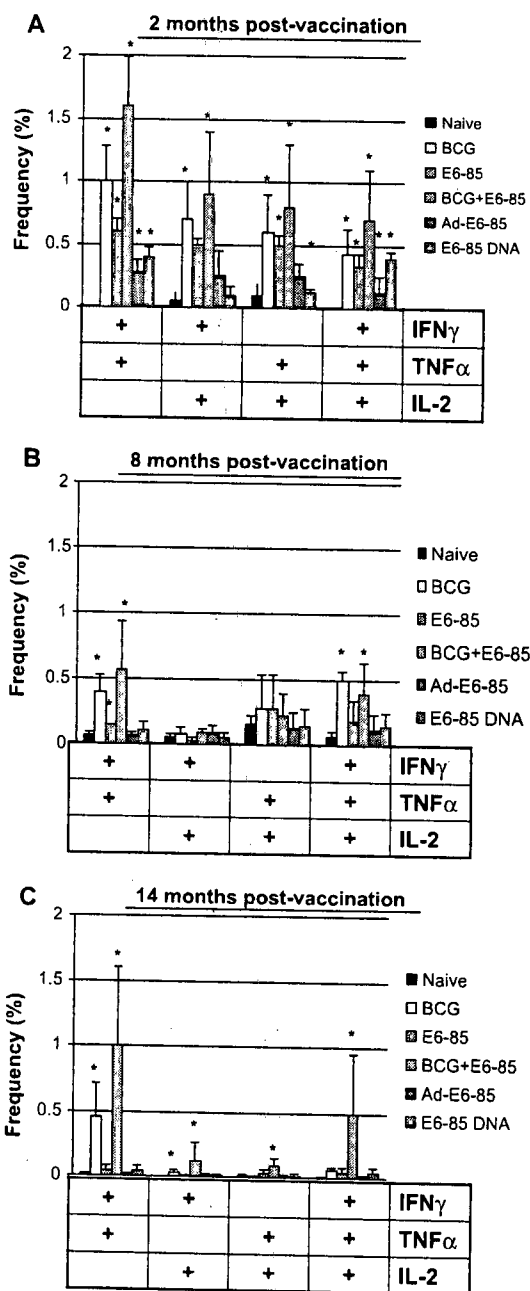


Fig. 3. Multiparameter flow cytometry was used to determine the frequency of multifunctional CD4 T cells secreting IFN- γ and TNF- α , IFN- γ and IL-2, TNF- α and IL-2 or all three (right) at 2 (A), 8 (B) and 14 months (C) post-vaccination. * Statistical significance relative to the naive control group, $p < 0.05$.

vaccines were generally detected at 8 and 14 months for the IFN- γ , IFN- γ /TNF- α , and IFN- γ /TNF- α /IL-2 expressing cells.

3.3. Correlation of the frequency of vaccine-induced CD4 T cells with the levels of pulmonary anti-tuberculosis protection

To assess whether the frequency of cytokine expressing CD4 T cells correlated with the levels of pulmonary protective immunity induced by the five different vaccines, the association between MFT cell frequency and the mouse protection data at early and late time points were evaluated using Pearson correlation analysis. Based on the 2, 8, and 14-month data, the relationship between the frequency of CD4 triple-positive T cells and the levels of vaccine-induced

anti-tuberculosis pulmonary protection were highly correlative ($p = 0.007$). Moreover, the correlation between the frequency of CD4 triple-positive T cells and the mouse spleen protection data was also highly significant ($p = 0.01$). By contrast, the correlation between the levels of protection and the frequency of CD4 T cells expressing IFN- γ /TNF- α was of borderline significance ($p = 0.06$ for the lung, $p = 0.09$ for the spleens). The frequency of monofunctional IFN- γ producing cells also did not correlate with the extent of vaccine-induced pulmonary ($p = 0.5$) and splenic protection ($p = 0.7$).

3.4. Evaluation of the median fluorescence intensity (MFI) and the integrated MFI (iMFI) of cytokine-expressing cells

A previous report had shown that CD4 MFT cells produce more cytokine on a per cell basis than monofunctional CD4 T cells [8]. To evaluate whether MFT cells induced by the different types of TB vaccines produced elevated concentrations of cytokines relative to monofunctional cells, the MFIs for IFN- γ and TNF- α were determined for CD4 monofunctional T cells, CD4 T cells expressing IFN- γ /TNF- α double positive T cells, and triple positive CD4 T cells. For these studies, the IL-2 MFIs were not systematically evaluated because generally low levels of IL-2 were detected in most experiments. At 2 months post-vaccination, the MFIs for IFN- γ in the double-positive CD4 T cell subset were elevated in all vaccine groups 4–18 fold relative to corresponding monofunctional cells but were only elevated substantially in the BCG and BCG/E6-85 groups at the 14-month post-vaccination time point (Fig. 4A). For the triple-positive CD4 T cells, four vaccine groups had elevated MFI responses (2–7 fold increases) at 2 months post-vaccination compared to monofunctional cells induced by the same vaccine. Although the MFI values for triple-positive cells from mice immunized with the most active vaccines did not substantially decline at the 14-month time point, lower overall MFIs and obvious MFI reductions were detected at 14 months for the less potent AdE6-85 and pVaxE6-85 vaccines.

In these experiments, the TNF- α MFI values paralleled the IFN- γ results (Fig. 4B). Elevated MFI responses (relative to monofunctional cells) were observed in double-positive (3–4 fold) and triple-positive (2–12 fold) CD4 T cells at the early 2-month time point for all vaccine groups. At the later time points, the MFI values for TNF- α from triple-positive cells were considerably higher for the E6-85 protein/adjuvant and the BCG containing vaccine groups compared to other vaccine preparations.

In an earlier report, Darrah et al. developed a metric for evaluating the total response of a population of cytokine-producing cells [8]. This integrated MFI metric combined the magnitude and quality of T cell responses by multiplying the frequency of cytokine expressing cells by the MFI (iMFI). Darrah et al. showed that iMFI values statistically correlated with the protection induced by several vaccine formulations in a mouse model of leishmania. In our studies, we compared the iMFI values at 2, 8, and 14 months with the anti-tuberculosis protection using Pearson correlation analysis. Interestingly, the iMFI values for IFN- γ for triple positive MFT cells also correlated with the anti-tuberculosis protective responses seen in the lungs ($p = 0.007$) and spleens ($p = 0.006$) of vaccinated mice (Table 1). The IFN- γ iMFI data for CD4 T cells secreting both IFN- γ and TNF- α correlated with protection in the lung ($p = 0.05$), but not the spleen, and the iMFI values for monofunctional CD4 T cells secreting only IFN- γ were not statistically correlative. Furthermore, significant correlations were seen between the TNF- α iMFI values and the protection results for triple-positive (lung, $p = 0.004$; spleen, $p = 0.002$) and IFN- γ /TNF- α expressing double positive CD4 T cells (lung and spleen, $p = 0.01$). Again the TNF- α iMFI values for monofunctional CD4 T cells did not correlate with the animal protection data.

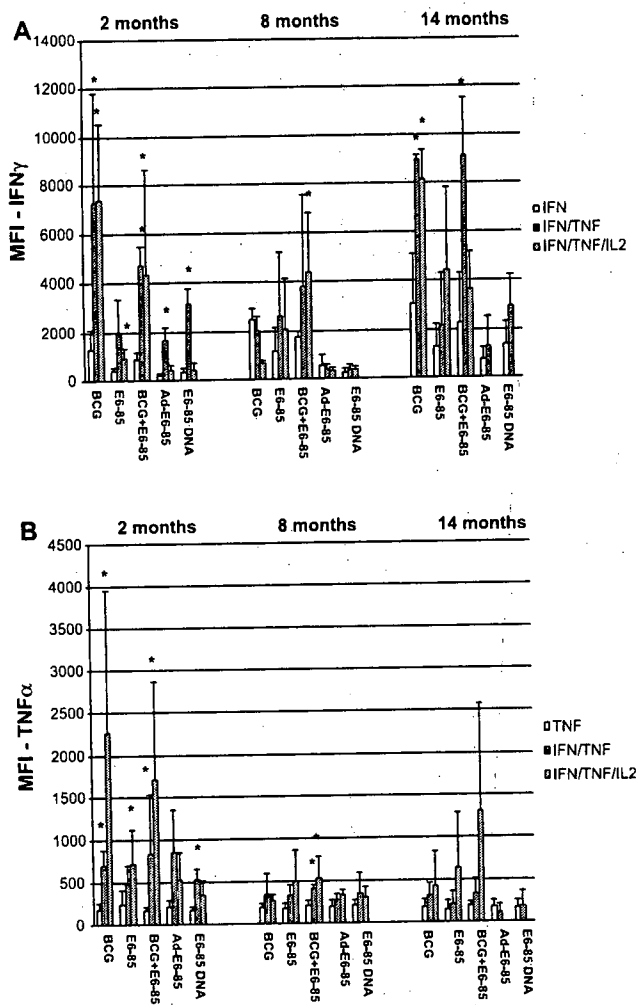


Fig. 4. Median fluorescence intensity (MFI) of IFN- γ (A) or TNF- α (B) in monofunctional (yellow bars) or multifunctional (red and green bars) CD4 T cells taken from the spleens of vaccinated mice at 2, 8 and 14 months post-vaccination. The data are presented as the mean $\pm$ SEM of the individual MFI values for 4–5 mice. * Statistical significance relative to monofunctional cytokine expressing cells, $p < 0.05$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

4. Discussion

A critical outcome for any immunization regimen is the induction of an adequate reservoir of antigen-specific memory cells. For T cell based vaccines, it is becoming increasingly recognized that

Table 1
Pearson correlation analysis between iMFI values and anti-tuberculosis protective responses.

CD4 T cells ^a	Lung	Spleen
IFN- γ		
TP	0.007 ^b	0.006
DP	0.05	ns
SP	ns	ns
TNF- α		
TP	0.004	0.002
DP	0.01	0.01
SP	ns	ns

ns, not significant.

^a TP – CD4 MFT cells expressing IFN- γ , TNF- α and IL-2; DP – MFT cells expressing IFN- γ and TNF- α ; SP – monofunctional cells expressing either IFN- γ or TNF- α .

^b p values.

the magnitude and the quality of vaccine-induced T cell responses is crucial for developing effective immunization strategies [16]. Therefore, in addition to frequency and durability, the phenotype and quality of the T cell response should be assessed in the analysis of the immunogenicity of TB vaccines. In this study, we evaluated the complexity of T cell responses induced by 5 different TB vaccine types in mice during a 14-month study period. Overall, we showed that the vaccine-induced CD4 T cell responses were functionally heterogeneous. Compared to the naïve group, relatively high levels of monofunctional cells expressing only IFN- γ and multifunctional cells expressing IFN- γ and TNF- α , TNF- α and IL-2, IFN- γ and IL-2, and all three cytokines were detected after immunization with all of these vaccines. Interestingly, relatively low levels of vaccine-induced monofunctional cells expressing IL-2 were consistently detected in these studies. However, it is uncertain whether developing strategies to enhance IL-2 synthesis in the vaccine boosting phase would improve vaccine effectiveness. While increased IL-2 production can have a positive immune impact through expansion of recently activated T cells, IL-2 can also inhibit T cell responses after vaccination by inducing T regulatory cells and promoting activation induced cell death [23,24].

Partially because of the complexity of vaccine-induced cellular immunity, well defined and validated correlates of protection for infections requiring T cell responses have not been identified [25]. For TB vaccines, finding immune correlates of protection would define the T cell responses that must be induced to optimize vaccine effectiveness. Moreover, the use of protective immune correlates as early endpoints in vaccine trials may reduce the time and cost associated with clinical studies and should facilitate the testing of numerous candidate vaccine formulations. In this study, the frequency of vaccine-induced splenic triple-positive MFT cells significantly correlated with the levels of anti-tuberculosis protection detected in the lungs and spleens of vaccinated mice. In contrast, the frequency of monofunctional IFN- γ or TNF- α expressing CD4 T cells or CD4 MFT cells expressing any combination of the two cytokines did not correlate with the pulmonary or splenic protection elicited by immunization with the TB vaccines. Importantly, for the triple-positive CD4 T cell subset, we showed the IFN- γ and TNF- α values for the integrated MFI metric (which incorporates the magnitude and the quality of the cytokine response) correlated with the protection seen in the lungs and spleens of vaccinated mice. It is not surprising that vaccine-induced protective responses correlate with iMFI values because the iMFI metric is essentially a measure of overall cytokine production from a specific T cell subset. Earlier murine studies with leishmania vaccines and a TB subunit vaccine preparation have also shown an association between vaccine-induced MFT cells and protective immunity against intracellular pathogens [8,11]. Interestingly, a complex, non-linear relationship between polyfunctional T cell responses and plasma viral loads was recently detected in a SIV non-human primate infection model [26]. Taken together, the data from our study and previous reports strongly suggest that induction of CD4 MFT cells is likely an important component of vaccine-induced protective immunity against intracellular pathogens in the mouse.

Successful vaccination regimens against tuberculosis will require a persistent T cell response of sufficient magnitude and quality. For long-lived protection against infectious agents, it is important to identify populations of vaccine-induced T cells which are durable over a prolonged period of time. A clear definition of the dynamics of anti-tuberculosis T cell responses should assist in developing optimal vaccination strategies including potent prime/boost protocols. Previous studies have shown that MFT cell responses are relatively stable. In mice, anti-tuberculosis MFT cell responses were detected greater than 40 weeks after vaccination with BCG or an antigen 85-ESAT6 subunit vaccine, and antigen 85-specific CD4 MFT cells were maintained at least 24 weeks after

boosting BCG immunized humans with the MVA-85A vaccine [11,17]. Quality MFT cell responses were also seen at 12–18 months after immunizing non-human primates with HIV prime/boost regimens [12]. A surprisingly high frequency of CD4 and CD8 T cells expressing IFN- γ and TNF- α persisted for more than 50 years after human smallpox vaccination [27]. In this study, substantial numbers of CD4 T cells expressing either IFN- γ and TNF- α or IFN- γ , TNF- α , and IL-2 were detected at 14 months following immunization with the BCG/E6-85 mixture. It should be emphasized the levels of cells expressing IFN- γ and TNF- α and triple positive cells induced by the BCG/E6-85 mixture (the most active preparation) did not wane significantly during the 14-month study. For the other vaccine groups, considerable reduced frequencies of MFT cells were seen at 14 months compared to the relatively high levels detected at 2 months post-vaccination.

It has been hypothesized that the capacity of MFT cells to secrete elevated levels of cytokines (compared to monofunctional cells) contributes to their enhanced anti-microbial activity [8,16]. Elevated median fluorescence intensities for MFT cells (relative to controls) induced by malaria, leishmania, and tuberculosis vaccines have been previously demonstrated [8,10,15]. However, in comparing MFIs for different vaccine formulations, the MFIs for triple-positive CD4 MFT cells induced by different types of vaccines have not been identical. For example, live leishmania vaccines induced about 15-fold elevated CD4 MFT cell MFI values (relative to monofunctional IFN- γ producing cells) in splenocytes from vaccinated mice, while only 2–3 fold increases, relative to monofunctional IFN- γ producing cells, were detected after immunization with a recombinant adenovirus vaccine [8]. Similarly, in this study, the IFN- γ MFI values for triple-positive cells were substantially elevated (relative to corresponding monofunctional cells) in the BCG vaccine containing groups. Although 6–7 fold MFI increases were seen for vaccine formulations containing BCG, the MFIs for the triple-positive cells recovered from mice immunized with the protein or genetic vaccines were only 2 fold elevated compared to MFI values for IFN- γ secreting monofunctional cells from the same animals. Additionally, the MFI values for TNF- α from the triple-positive cells taken from mice immunized with the BCG-containing vaccines were 9 and 12 fold elevated compared to naïve controls while only 2–3 fold relative MFI increases were seen for the other test vaccines at the 2-month time point. Overall, similar to the leishmania model, the highly protective live vaccine preparations induced MFT cells with the highest levels of cytokine production while protein and gene-based TB vaccines evoked more modest MFT cellular responses. The enhanced MFI values seen in CD4 MFT cells taken from mice vaccinated with live vaccines could reflect the greater persistence of these vaccines. The resulting persistent low level antigen exposure could prime CD4 T cells for optimal effector function. A challenge for the designers of highly potent non-living T cell-based vaccines will be to create immunizing formulations that induce immune responses characterized by persistent MFT cells which secrete high levels of cytokines.

Another important finding of this study is the longevity of the protective immune responses induced by immunization with the BCG/E6-85 formulation. Although similar levels of protection and BCG-specific CD4 T cell responses were detected at 2 and 8 months after vaccination with BCG and the BCG/E6-85 vaccines, significantly higher levels of anti-tuberculosis protective immunity and CD4 MFT cell responses were seen at 14 months post-vaccination for the BCG–protein combination vaccine. These data support earlier results which showed that co-administration of BCG with mycobacterial protein/adjuvant preparations or with TB DNA vaccines induced protection against virulent mycobacterial challenge in mice and cattle that was superior to that obtained with BCG or the individual component vaccines [28–31]. While the mechanisms of the immunopotentiating activity of BCG

have not been fully defined, the capacity of BCG to bind Toll-like receptors on antigen presenting cells likely initiates robust innate immune responses. Additionally, TLR activation can amplify the antigen specific adaptive responses induced by vaccination with subunit vaccine formulations. Overall, the results from this and other studies indicate that BCG can be a potent co-adjuvant which can potentiate antimycobacterial protective immunity evoked by protein or genetic vaccines. Clearly, these data suggest that TB immunization strategies which combine BCG with subunit or genetic vaccines could be highly protective and should be tested in future clinical trials.

In sum, we have shown in a 14-month study that the magnitude and quality of lung and spleen CD4 MFT cells expressing IFN- γ , TNF- α , and IL-2 induced by 5 different types of TB vaccines correlates with the extent of vaccine-induced anti-tuberculosis protection measured in the mouse model of pulmonary tuberculosis. In contrast, in a recent BCG immunization study of South African infants, the frequency and cytokine profile of mycobacterial specific T cells in whole blood did not correlate with protection against TB [32]. While the reasons for the different mouse and human results are uncertain, species specific responses, systemic vs. organ responses, or the heterogeneity of responses seen in the diverse human population may have caused the discordant results. Clearly, further characterization of the quality of MFT cell responses induced in humans is needed to assess whether flow cytometric procedures should become an integral component of immunogenicity measurements in human TB vaccine trials.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.010.

References

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death. Fact sheet 310; 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs310/en/>.
- [2] Dye C. Doomsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug-resistant tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(1):81–7.
- [3] Vitoria M, Granich R, Gilks CF, Gunneberg C, Hosseini M, Were W, et al. The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: current status and future perspectives. *Am J Clin Pathol* 2009;131(6):844–8.
- [4] Glaziou P, Floyd K, Ravignone M. Global burden and epidemiology of tuberculosis. *Clin Chest Med* 2009;30(4):621–36, vii.
- [5] Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2009;27:393–422.
- [6] Johnson L, Gough J, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M, Wangoo A. Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;111(3–4):219–29.
- [7] Palma C, Iona E, Giannoni F, Pardini M, Brunori L, Orefici G, et al. The Ag85B protein of *Mycobacterium tuberculosis* may turn a protective immune response induced by Ag85B-DNA vaccine into a potent but non-protective Th1 immune response in mice. *Cell Microbiol* 2007;9(6):1455–65.
- [8] Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against leishmania major. *Nat Med* 2007;13(7):843–50.
- [9] Forbes EK, Sander C, Ronan EO, McShane H, Hill AV, Beverley PC, et al. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J Immunol* 2008;181(7):4955–64.
- [10] Huaman MC, Mullen GE, Long CA, Mahanty S. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells. *Vaccine* 2009;27(38):5239–46.
- [11] Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, et al. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol* 2009;182(12):8047–55.
- [12] Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, et al. Polyfunctional CD4+ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2009;83(11):5514–24.
- [13] Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol* 2007;81(16):8468–76.

- [14] Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol* 2007;81(21):12071–6.
- [15] Genesca M, Rourke T, Li J, Bost K, Chohan B, McChesney MB, et al. Live attenuated lentivirus infection elicits polyfunctional simian immunodeficiency virus Gag-specific CD8⁺ T cells with reduced apoptotic susceptibility in rhesus macaques that control virus replication after challenge with pathogenic SIVmac239. *J Immunol* 2007;179(7):4732–40.
- [16] Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008;8(4):247–58.
- [17] Beveridge NE, Price DA, Casazza JP, Pathan AA, Sander CR, Asher TE, et al. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ memory T lymphocyte populations. *Eur J Immunol* 2007;37(11):3089–100.
- [18] Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Isaacs F, et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 2010;40(1):279–90.
- [19] Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, Harbacheuski R, Murray RA, Gelderbloem SJ, et al. Bacillus Calmette–Guerin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *J Immunol* 2008;180(5):3569–77.
- [20] Derrick SC, Yang AL, Morris SL. A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6–Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. *Vaccine* 2004;23(6):780–8.
- [21] Parra M, Yang AL, Lim J, Kolibab K, Derrick S, Cadieux N, et al. Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(7):1025–32.
- [22] Kolibab K, Yang A, Derrick SC, Waldmann TA, Perera LP, Morris SL. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(5):793–801.
- [23] Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858–61.
- [24] Ha SA, West EE, Araki K, Smith KA, Ahem R. Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune system towards the success of therapeutic vaccination against chronic viral infections. *Immunol Rev* 2008;223:317–33.
- [25] Hawkrigide T, Scriba TJ, Gelderbloem S, Smit E, Tameris M, Moyo S, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis* 2008;198(4):544–52.
- [26] Sui Y, Zhu Q, Gagnon S, Dzutssev A, Terabe M, Vaccari M, et al. Innate and adaptive immune correlates of vaccine and adjuvant-induced control of mucosal transmission of SIV in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;9843–8.
- [27] Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 2003;9(9):1131–7.
- [28] Dietrich J, Billeskov R, Doherty TM, Andersen P. Synergistic effect of bacillus calmette guerin and a tuberculosis subunit vaccine in cationic liposomes: increased immunogenicity and protection. *J Immunol* 2007;178(6):3721–30.
- [29] Wedlock DN, Denis M, Painter GF, Ainge GD, Vordermeier HM, Hewinson RG, et al. Enhanced protection against bovine tuberculosis after coadministration of *Mycobacterium bovis* BCG with a Mycobacterial protein vaccine–adjuvant combination but not after coadministration of adjuvant alone. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(5):765–72.
- [30] Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, et al. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine* 2007;25(24):4735–46.
- [31] Skinner MA, Wedlock DN, de Lisle GW, Cooke MM, Tascon RE, Ferraz JC, et al. The order of prime-boost vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG and a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins Hsp65, Hsp70, and Apa is not critical for enhancing protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2005;73(7):4441–4.
- [32] Kagina BM, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Keyser A, et al. Specific T cell frequency of cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis, following BCG vaccination of newborns. *AJRCCM* 2010.