

**No. 08-023024- -00015-0000**Fecha: 2014-09-19 17:05:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 58Señor Superintendente
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y C
E. S. D.**Trámite : 011**
Evento : 378
Actuación : 412Referencia : Expediente No. **08.023.024**
Asunto : Solicitud de patente para: **"VIRUS DE LA INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE UNA VACUNA"**
Solicitante : ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL
Fecha de solicitud : 04 de Marzo de 2008

I. RECURSO VÍA GUBERNATIVA

Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad **ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL** solicitante de la patente de la referencia, por el presente escrito atentamente manifiesto a usted que debidamente notificada de la Resolución No. **48192** del 05 de Agosto de 2014, interpongo en su contra el recurso de **REPOSICIÓN**, para que sea revocada y en consecuencia se conceda el privilegio de patente de invención para **"VIRUS DE LA INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE UNA VACUNA"** a favor de **ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL**.

II. OPORTUNIDAD DE LA IMPUGNACIÓN

La Resolución No. **48192** del 05 de Agosto de 2014, con fecha de publicación listado el 12 de Agosto de 2014, fecha de vencimiento el 12 de Septiembre de 2014, y fecha del término legal el 19 de Septiembre de 2014.

III. LA DECISIÓN RECURRIDA

3.1 Mediante la Resolución objeto de la presente impugnación, el Superintendente de Industria y Comercio decidió:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

3.1.1 Denegar la patente de invención a la creación titulada: **“VIRUS DE LA INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE UNA VACUNA”**

3.2 En la parte motiva de la providencia, se mencionaron los siguientes fundamentos:

3.2.1 “En cuanto a las reivindicaciones 1 – 49 incluidas en el escrito radicado bajo el N° 08-023024-00012-0000, no se ajustan a los parámetros establecidos en el artículo 30 anteriormente transcrito debido a que no definen la molécula de hemaglutinina (HA) a partir de la secuencia nucleótida de la misma, y utilizan las expresiones “una molécula de ácido nucleico aislado”, un vector recombinante”, “un sistema de genética inversa”, “introducción de un vector recombinante”, “reaccionar in vitro”, “un vehículo”, “una molécula inmunoestimuladora” y “un portador membranoso inmunopotenciador”, lo cual dificulta determinar la extensión del objeto que se busca proteger. Por otra parte, es oportuno precisar que la composición reclamada en las reivindicaciones 33 – 49 debe ser definida por sus ingredientes, indicando las proporciones de cada uno de ellos dentro de la composición y las reivindicaciones 34–37 incluyen un segundo ingrediente como si fuera un adyuvante, y realmente se trata de un segundo ingrediente farmacéutico que no se puede definir por función sino por su nombre común. Además no hay sustento para todas las posibles combinaciones reclamadas.”

3.2.2 Las características esenciales de la invención de la reivindicación 1 habían sido derivadas de manera evidente previamente en el documento D2, el cual da a conocer una molécula de hemaglutinina (HA) del virus recombinante de influenza H5.

3.2.3 “Como se dijo anteriormente, el documento D2 es considerado el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1.”

3.2.4 “La diferencia entre la materia reclamada en la reivindicación 1 y el documento D2 consiste en que en la molécula de la solicitud se sustituye el aminoácido 223 por una asparagina, mientras que en el documento D2 se sustituyen aminoácidos alrededor de la posición 222, sin indicar que se incluya asparagina.”

- 3.2.5 “Esta diferencia no parece conceder un efecto técnico inesperado o una ventaja a la molécula de hemaglutinina reclamada, puesto que en ambos casos se logra que la hemaglutinina tenga una reactividad aumentada.”
- 3.2.6 “El problema técnico objetivo resuelto por la invención consiste en obtener una hemaglutinina alternativa con reactividad aumentada.”
- 3.2.7 “Ahora bien, teniendo en cuenta que la sustitución del aminoácido 223 para colocar asparagina, tiene el mismo efecto que la sustitución del aminoácido 222 reportada en el documento D2, esto es, modificar un sitio de glicosilación con la repercusión en la capacidad de unión del virus a su receptor del ácido siálico (Pág. 280, Col. derecha, Párr. 2). La persona del oficio normalmente versada en la materia incluiría sustituciones en esta región con el fin de obtener una molécula de HA modificada.”
- 3.2.8 “Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 a 23 no mencionan características adicionales, se considera que tales reivindicaciones tampoco tienen nivel inventivo.”
- 3.2.9 Las características esenciales de la invención de la reivindicación 24 habían sido derivadas de manera evidente previamente en los documentos D2 y D3, los cuales dan a conocer un método para hacer un virus que incluye la molécula de HA del virus recombinante de influenza.
- 3.2.10 “El documento D2, considerado el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 24.”
- 3.2.11 “La diferencia entre la materia reclamada en la reivindicación 24 y la enseñanza del documento D2 consiste en que el método comprende la introducción de un vector recombinante en un sistema de genética inversa.”
- 3.2.12 “El efecto que logra el incluir un sistema de genética inversa para la producción del virus es que permite la manipulación del genoma viral.”
- 3.2.13 “Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo producir el virus conocido en el documento D2 de manera que se pueda manipular el genoma viral”.”

- 3.2.14 “Sin embargo, la utilización de un sistema de genética inversa para la producción de un virus de influenza ya está divulgada en el documento D3 que se refiere a un método para hacer un virus H5N1 del virus de influenza A que incluye la introducción de un vector recombinante en un sistema de genética inversa (Pág. 6108, Col. derecha, Párr. 3), en el que se usa un vector recombinante (Pág. 6109 Col. izquierda) que codifica proteínas estructurales que presentan sustituciones (Pág. 6112). El documento D3 también enseña que el método permite desarrollar vacunas eficientes (Pág. 6113, Col. izquierda, Párr.1).”
- 3.2.15 “En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría el método del documento D3 para producir el virus del documento D2 para llegar así al objeto de la reivindicación 24 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.”
- 3.2.16 “De manera que la solución propuesta por esta solicitud en la reivindicación 24 y en las reivindicaciones 25 – 49 es obvia y no tiene nivel inventivo.”
- 3.2.17 “La solicitante argumenta que una persona versada en la materia no podría llegar a la sustitución del aminoácido con asparagina en la posición correspondiente al aminoácido 223 en H5HA a la luz de las enseñanzas de D1, D2 o D3, sólo o en combinación, particularmente que D2 no suministra enseñanzas o sugerencias de cómo sustituir un aminoácido con asparagina en la posición correspondiente al aminoácido 223 en H5HA; y que D2 sólo habla del cambio en el aminoácido 222 la cual es una posición diferente, D2 no suministra sugerencia o motivación para usar cambios en los aminoácidos en la región del aminoácido 222 para alcanzar una reactividad incrementada con antisueros derivados de animales expuestos al virus de la influenza H5 o a la vacuna de la influenza H5; por favor noten que D2 enseña (página 280, columna derecha) que los cambios en el aminoácido 222 puede llevar a interacciones o interferencias esféricas. Esta deficiencia no es compensada por D1 o D3.”
- 3.2.18 “Este despacho aclara que, contrario a lo afirmado por la solicitante, la molécula H5HA del virus de la influenza recombinante de la solicitud tiene una reactividad incrementada con antisueros derivados de animal expuestos al virus de la influenza H5 o a una vacuna de la influenza H5, en comparación al que ocurre naturalmente con la molécula HA (que comprende un aminoácido diferente a la

asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA), pero no hay evidencia de que se haya logrado algún efecto técnico inesperado frente a la actividad ya reportada en el documento D2 en el que se sustituyen aminoácidos alrededor de la posición 222 sin indicar que se incluya asparagina, aumentado la afinidad de unión al virus (Pág. 280, Col. derecha, Párr. 2); en ambos casos se logra que la hemaglutinina tenga una reactividad aumentada, a través de la modificación de un sitio de glicosilación con la repercusión en la capacidad de unión del virus a su receptor de ácido siálico. Basada en las enseñanzas del documento D2 que divulga que los cambios en el aminoácido 222 pueden llevar a interacciones o interferencias esféricas, la persona del oficio normalmente versada en la materia se vería motivada a realizar esta modificación en un sitio cercano para obtener una hemaglutinina alternativa con reactividad aumentada.”

IV. OBJETO DEL RECURSO

De acuerdo con los argumentos que expongo a continuación, solicito atentamente a su Despacho lo siguiente:

1. Revocar la Resolución No. **48192** del 05 de Agosto de 2014.
2. Conceder el privilegio de patente de invención para **“VIRUS DE LA INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE UNA VACUNA”** a favor de **ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL**.

V. MODIFICACIÓN DE UNA SOLICITUD EN TRÁMITE

En virtud del Artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 48 reivindicaciones.

A este respecto, la reivindicación 23 ha sido eliminada. Adicionalmente, las reivindicaciones 32 (anterior 33) y 43 (anterior 44) han sido modificadas de manera que se ha especificado el vehículo que se selecciona de agua y aceites, aceite de maní, aceite de

soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. Finalmente, se han modificado las reivindicaciones 34 a 36 (anteriores 35 a 37) para incluir la expresión 'además', con la cual se especifica que cada uno de los componentes descrito en cada una de dichas reivindicaciones corresponde a un componente diferente a un adyuvante.

Así, las reivindicaciones son ahora muy claras y precisas en el momento de señalar la naturaleza de la invención reivindicada y es evidente que las características técnicas esenciales de la invención están establecidas.

Por otro lado, amablemente señalamos que el señor Examinador no tuvo en cuenta los argumentos con respecto a la claridad de las reivindicaciones proporcionados por el Solicitante en la respuesta a la Acción Oficial No. 2428, pues no se refirió a ellos en la presente Resolución No. 48192. De esta manera, reiteramos dichos argumentos:

En relación a las reivindicaciones 1 a 22, respecto a las cuales el señor Examinador objeta que se encuentran mal caracterizadas, amablemente ponemos de presente nuestro desacuerdo, ya que la molécula de hemaglutinina se encuentra bien definida y caracterizada, pues se hace referencia a que dicha molécula corresponde a una molécula HA que tiene uno o más cambios de secuencias en la posición 223 de aminoácido en H5HA, en donde el aminoácido que se encuentra en dicha posición 223 es reemplazado por el aminoácido asparagina. Por lo tanto, una persona versada en la materia conocería la secuencia de una molécula HA, pues dicha molécula se encuentra en la naturaleza, y la presente invención es diferente respecto a la molécula que se encuentra en la naturaleza debido la sustitución del aminoácido de la posición 223 por una asparagina. Adicionalmente, la presente descripción proporciona soporte de dicha secuencia haciendo referencia al documento Suzuki y Nei (2002), Figura 1 adjunto a este documento.

Con respecto al método de la reivindicación 26 (nueva 24), atentamente señalamos que dicho método se encuentra bien caracterizado, pues dicho método para hacer un virus que incluye la molécula de HA del virus recombinante de influenza comprende un sistema de genética inversa, el cual es conocido por una persona del oficio *normalmente versada en la materia*. Dicho sistema de genética inversa comprende una serie de pasos secuenciales para que un técnico medio versado en la técnica lo pueda reproducir. Sin embargo, como dicho sistema es conocido para una persona versada en la materia y en el campo de la invención, no es necesario incluir dichos pasos en la reivindicación 26 (nueva 24). En adición, en la descripción de la presente solicitud se

encuentra el soporte necesario para entender dicho sistema de genética inversa, así como también el vector recombinante divulgado en la presente invención, en el párrafo [80].

En vista de la objeción del señor Examinador respecto a la definición de la composición de las reivindicaciones 36 a 55 (nuevas 33-49), respetuosamente manifestamos que el Instructivo para Exámenes de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de Utilidad establece lo siguiente: *"Si, por ejemplo, la característica técnica esencial de la composición es el compuesto activo, el examinador no deberá requerir que se mencionen también otras características estructurales."* En este sentido, atentamente señalamos que la composición inmunogénica reivindicada, se encuentra clara y adecuadamente definida, puesto que describe el componente correspondiente al compuesto activo apropiadamente, el cual corresponde a la molécula de hemaglutinina (HA) del virus recombinante de la influenza H5 definida adecuadamente en el pliego reivindicatorio, tal como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, no se requiere definir otros componentes como los excipientes ni tampoco sus proporciones.

Adicionalmente, con respecto a la expresión *'reaccionar in vitro'*, es importante señalar que es muy clara para un técnico medio ya que significa someter o causar una reacción química que en este caso es entre el antisuero del animal vacunado o infectado con una molécula de hemaglutinina (HA). Además, el término *in vitro* significa por fuera del cuerpo vivo y en un ambiente artificial. Por tanto, dicha expresión es total y completamente clara para un experto en la técnica.

En relación a las expresiones *'una molécula inmunoestimuladora'* y *'portadores membranosos inmunopotenciador'* se encuentran de la misma forma soportados en la descripción (párrafo [0104]) y por lo tanto, una persona versada en la materia entendería claramente la invención.

De la misma forma, con respecto a las reivindicaciones 34 a 37, como ya se mencionó anteriormente, fueron modificadas para clarificar que la molécula inmunoestimuladora, las microcapsulas y/o un portador membranoso inmunopotenciador y, los glóbulos rojos de la sangre (RBC), RBC fantasmas, o antígeno azul de la lengua no corresponden al adyuvante, en consecuencia, manifestamos nuestro desacuerdo con respecto a lo anterior. Adicionalmente, todas la posibles combinaciones se encuentran soportadas en el párrafo [104] de la descripción y por lo tanto, la objeción no tiene validez.

Por otro lado, es importante resaltar que la Superintendencia no puede llevar a cabo el análisis de patentabilidad de una invención, si las reivindicaciones no divulgan clara y ampliamente la invención, y en este caso el señor Examinador llevó a cabo el análisis de patentabilidad, objetando el nivel inventivo de la presente invención, por lo tanto, se demuestra que las reivindicaciones son suficientemente claras y concisas y así, una persona del oficio normalmente versada en la materia sería capaz de entender y reproducir la invención.

En este sentido, teniendo en cuenta las anteriores aclaraciones y las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio, atentamente señalamos que las objeciones anteriormente argumentadas, con respecto a la claridad y concisión del pliego reivindicatorio carecen de validez y por lo tanto, se consideran superadas.

Por lo tanto, los argumentos esgrimidos a continuación con respecto a la patentabilidad de la invención, en los términos del capítulo reivindicatorio modificado, resultan plenamente predicables del capítulo reivindicatorio sobre el cual la patente fue negada. En efecto, la no ampliación de la materia en el nuevo pliego es evidencia suficiente de que el presente recurso controvierte el análisis de patentabilidad efectuado por su Despacho, de tal manera que el presente recurso cumple con los requisitos de ley para su aceptación y trámite.

VI. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Respetuosamente me permito disentir de lo expuesto por ese Despacho en la Resolución objeto del presente recurso, toda vez que la presente solicitud sí cumple con los requerimientos de novedad y nivel inventivo exigidos en la Decisión 486, como se demostrará a continuación:

6.1 La presente solicitud sí tiene nivel inventivo

El artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

“Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa

invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.”

Consecuentemente, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que, a partir de un conocimiento medio en dicho campo, le permitan llegar de manera obvia a la invención reivindicada. Adicionalmente se considera que una mejora sustancial, un efecto inesperado o una ventaja con respecto al arte previo es un indicio de nivel inventivo, por cuanto aporta un salto tecnológico en la regla técnica.

Respecto a lo anterior, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha expuesto en la Interpretación Prejudicial del proceso 13-IP-2010:

“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 es consecuencia clara y directa de dicho estado”.

[señalado fuera del texto]

Por lo anterior, se entiende que para que una persona medianamente versada en la materia pudiera derivar de manera obvia una invención, requeriría simplemente aplicar sus conocimientos técnicos. En contraste, todo aquello que va más allá de la simple aplicación de los conocimientos técnicos y que no ha sido revelado en el estado de la técnica, debe ser considerado inventivo.

A este respecto, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos

atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se decidió negar la patente, con base en la siguiente información:

En vista de las objeciones realizadas por el señor Examinador, atentamente señalamos que reiteramos los argumentos previamente presentados a su Despacho:

En primer lugar, ponemos de presente que tal y como se mencionó anteriormente, puede considerarse que D2 es el documento más cercano del estado del arte. El documento D2 describe el enlace de fucosa sustituido con residuos de ácido siálico a diferentes virus de la influenza y enseña que el cambio al aminoácido 222 de la influenza HA podría conducir a interacciones favorables o interferencia estérica.

En segundo lugar, la molécula del virus de la influenza recombinante reclamado H5HA tiene una sustitución ácida de asparagina en la posición correspondiente a la posición del aminoácido 223 in H5 HA y se diferencia del estado del arte en:

- El documento D2 describe el enlace de fucosa sustituido con residuos de ácido siálico a diferentes virus de la influenza pero no suministra enseñanzas o sugerencias acerca de la influencia de los residuos de aminoácidos correspondientes a la posición 223 en H5 HA (o cualquier otro residuo HA) en enlaces de anticuerpos. La descripción de D2 relaciona la influencia del residuo 222 en enlaces de ácidos siálicos específicos y no dice nada acerca de enlaces de anticuerpos o reactividad de anticuerpos. Esta deficiencia no es compensada por D1 o D3
- El documento D1 muestra que el cambio de un solo aminoácido (en el residuo 155 de Gly a Glu) puede afectar la pleitropicidad y antigenicidad viral pero no enseña nada acerca de los residuos correspondientes a la posición 223 en H5 HA
- El documento D3 describe un sistema de genética inversa. No dice nada en relación a los residuos correspondientes a la posición 223 en H5HA

Por otra parte, la molécula H5HA del virus de la influenza recombinante tiene una reactividad incrementada con antisueros derivados de animal expuestos al virus de la influenza H5 o a una vacuna de la influenza H5 en comparación al que ocurre naturalmente con la molécula HA (que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA).

D2 enseña que los cambios en el aminoácido 222 pueden favorecer interacciones o pueden llevar a interferencias estéricas (ver página 280). Entonces D2 no suministraría ninguna enseñanza o motivación para usar cambios en los aminoácidos en la región del aminoácido 222 para alcanzar una reactividad incrementada con un antisuero derivado de un animal expuesto al virus de la influenza H5 o a una vacuna de la influenza H5. Más aún, no se puede concluir desde un enlace de un receptor alterado que la molécula de HA tendrá la capacidad para detectar anticuerpos.

Adicionalmente, tomando la diferencia entre la anterioridad D2 y la presente solicitud, el problema a solucionar correspondería a: partiendo del documento D2 “¿cómo suministrar una molécula del virus de la influenza recombinante con una reactividad incrementada con antisueros derivados de animales expuestos al virus de la influenza H5, o a vacunas de la influenza H5, en comparación a las que ocurren naturalmente con una molécula HA (que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA)?

Finalmente, una persona versada en la materia no podría llegar a la sustitución del aminoácido con asparagina en la posición correspondiente al aminoácido 223 en H5HA a la luz de las enseñanzas de D1, D2 o D3, sólo o en combinación. Particularmente D2 no suministra enseñanzas o sugerencias de cómo sustituir un aminoácido con asparagina en la posición correspondiente al aminoácido 223 en H5HA; D2 sólo habla del cambio en el aminoácido 222 la cual es una posición diferente. Más aún D2 no suministra sugerencia o motivación para usar cambios en los aminoácidos en la región del aminoácido 222 para alcanzar una reactividad incrementada con antisueros derivados de animales expuestos al virus de la influenza H5 o a la vacuna de la influenza H5; por favor noten que D2 enseña (página 280, columna derecha) que los cambios en el aminoácido 222 pueden llevar a interacciones o interferencias estéricas. Esta deficiencia no es compensada por D1 o D3.

En consecuencia, la presente solicitud es nueva e inventiva en relación al arte previo citado.

De esta forma, es importante señalar que la solución al problema técnico referenciado sólo es solucionado por lo señalado en el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud, más particularmente con lo referido en la reivindicación 1.

Además de lo anterior, queremos llamar la atención que una persona versada en la materia no llegaría a lo reivindicado en la presente solicitud porque:

- Primero, la persona versada en la materia no llegaría a la sustitución de un aminoácido con asparagina en la posición del aminoácido 223 en H5 HA a la luz de los documentos D1 a D3 solos o en combinación. D1 refiere materia totalmente diferente a lo aquí reivindicado (cambio de un solo aminoácido en el residuo 155 de Gly a Glu). D3 describe un sistema de genética inversa. D2 describe el enlace de fucosa sustituido con residuos de ácido siálico a diferentes virus de la influenza. Ninguno de los documentos enseña o sugiere la sustitución de un aminoácido con asparagina en la posición del aminoácido 223 en H5 HA
- Segundo. La presente solicitud relaciona efectos técnicos sorprendentes no revelados por el estado del arte encontrado. Esto es un claro indicio de altura inventiva.

Por otro lado, ponemos de presente argumentos adicionales, los cuales se mencionan a continuación:

Es importante señalar que la descripción de la presente solicitud proporciona evidencias experimentales directas obtenidas de diferentes cepas del virus de la influenza H5 que indican que una sustitución de un aminoácido en la posición 223 por asparagina en diferentes moléculas de H5 HA resulta en un cambio en la reactividad del antisuero de las moléculas de H5 HA mutadas en comparación con las moléculas de HA tal como se encuentran en la naturaleza. Específicamente, como se muestra en la Tabla 1, lo siguiente tres cepas de H5 diferentes fueron mutadas en la posición 223 de la secuencia de aminoácidos en la molécula H5 HA y fueron probadas para la reactividad en los Ejemplos de trabajo.

- A/Vietnam/1203/04 $\Delta H5_{S223 \rightarrow N} \times$ PR/8/34 (es decir, $\Delta H5_{S223 \rightarrow N/4}$), la cual es una cepa mutante derivada del virus de la influenza humana subtipo H5 A/Vietnam/1213/04 aislada y sometida a la única mutación de aminoácidos de S223 $\rightarrow$ N (énfasis añadido);

- A/pato/Singapur/3/97 $\Delta H5_{S223 \rightarrow N} \times$ PR/8/34 (es decir, $\Delta H5_{S223 \rightarrow N/97}$), la cual es una cepa mutante derivada del virus de la influenza aviar subtipo H5 A/pato/Singapur/3/97 aislada y sometida a la única mutación de aminoácidos de S223 $\rightarrow$ N (énfasis añadido); y

- A/HK/213/03 $\Delta H5_{S223 \rightarrow S} \times$ PR/8/34 (es decir, $\Delta H5_{S223 \rightarrow S/03}$), la cual es una cepa mutante derivada del virus de la influenza humana subtipo H5 A/HK/213/03 aislada y sometida a la mutación reversa de aminoácidos de S223 $\rightarrow$ N (énfasis añadido).

Adicionalmente, las cepas del mutante H5 de diferentes orígenes también fueron construidas mediante la introducción ya sea de una única mutación o mutaciones dobles en posiciones de aminoácidos diferentes a la posición 223 en las moléculas de H5 HA (Tabla 1) y probadas para la reactividad del antisuero.

Como se demostró en los Ejemplos 2, 5 y 6, $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$, se encontró que muestra una reactividad significativamente incrementada con un espectro ampliado en comparación con su versión no mutada ($\Delta H5/04$) en ensayos HI usando MAb anti-H5 de diferentes orígenes (Tabla 2) o antisuero (Tablas 3 y 5). Y también se encontró que $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/97$ muestra una reactividad significativamente incrementada con un espectro ampliado en comparación con su versión no mutada ($\Delta H5/97$) en ensayos HI usando antisuero policlonal o anticuerpos monoclonales de diferentes orígenes (Tabla 6). En contraste, se encontró que $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/03$ llevando a cabo una mutación reversa de $NS223 \rightarrow S$, mostró reactividad del anticuerpo reducida en comparación con su versión no mutada ($\Delta H5/03$) en ensayos HI usando MAb anti-H5 de diferentes orígenes (Tabla 2). Adicionalmente, no se encontró ningún resultado que llevara a un cambio significativo en la reactividad del antisuero cuando las cepas de H5 mutante de diferentes orígenes, llevando a cabo ya sea mutaciones dobles o únicas en posiciones de aminoácidos diferentes a la posición 223 en una molécula de H5 HA (Tabla 1).

En adición a los datos experimentales anteriores, la descripción de la presente invención también proporciona explicaciones para los cambios en la reactividad causada por la mutación del aminoácido en la posición 223 en la molécula H5 HA. Así, existe un análisis extensivo en la descripción en términos de los cambios funcionales y estructurales causados por una sustitución de aminoácido e la posición 223 por asparagina en la molécula de H5 HA, que incluye un cambio en la especificidad de la molécula H5 HA mutada para receptores de ácido siálico, y un cambio o remoción de sitios de glicosilación de la molécula HA (párrafo [0086]).

Además, se enfatiza que la descripción muestra que mutaciones adicionales dentro de la proteína H5 HA no tienen impacto en la función inmunogénica de la proteína H5 HA. Tal como se divulga en la Tabla 1, no se encontró un resultado que mostrara un cambio significativo en la reactividad del antisuero cuando las cepas de mutantes H5 adicionales de diferentes orígenes que llevan a cabo ya sea mutaciones únicas o dobles en otras posiciones de aminoácidos diferentes a la posición 223 en la molécula H5 HA.

Adicionalmente, existen regiones dentro de la proteína H5 HA, las cuales pueden ser mutadas sin ningún efecto en la inmunogenicidad mejorada causada por el cambio del aminoácido 223. En referencia al documento WO2008-052173, el cual proporciona una secuencia de H5 (SEQ ID NO. 1) que es distinta de la secuencia descrita en la presente solicitud y la cual es protectora en aves (Ejemplo 4) y proporciona altos títulos de HI en porcinos (Ejemplo 3). Por lo tanto, existe un soporte post-presentación de que la proteína H5 de la reivindicación 1 puede tener mutaciones adicionales sin afectar la función inmunogénica de la proteína H5 HA.

Por lo tanto, un técnico con conocimientos medios en la materia no estaba en condiciones de plantearse el problema, tampoco de resolverlo en la forma en que se reivindica y tampoco de prever el resultado, por lo que la presente solicitud posee la altura inventiva para que se le conceda el privilegio solicitado.

En consecuencia de lo anterior, la invención de la presente solicitud tiene nivel inventivo en vista de los documentos D2 y D3 del estado de la técnica citados por el Examinador.

Conclusión

El documento D2, el documento D3, o su combinación no resulta anterioridad válida capaz de afectar el nivel inventivo de la invención de la presente solicitud.

En consecuencia, el mérito investigativo de la presente invención ha sido reconocido por otras oficinas de patentes del mundo, las cuales han otorgado patentes para invenciones equivalentes. Tal es el caso de Estados Unidos de América, Rusia, Japón, y Corea del Sur.

A este respecto, deseamos poner de presente que si bien cada país es autónomo de conceder o negar una solicitud luego de la realización del estudio de fondo, es claro que el hecho de que la novedad y el nivel inventivo de una invención hayan sido reconocidos por varias oficinas a nivel mundial, es un indicio de la patentabilidad de la misma toda vez que (i) el estudio de novedad y nivel inventivo en todas las Oficinas de Patentes del mundo es realizado por personas con conocimientos técnicos en el área de interés que son consideradas personas idóneas para emitir conceptos sobre la patentabilidad de una invención y que (ii) los resultados de los exámenes de novedad o

de patentabilidad efectuados respecto a solicitudes extranjeras pueden ser reconocidos como suficientes para acreditar el cumplimiento de las condiciones de patentabilidad de la invención, tal como se señala en el artículo 46 de la Decisión 486:

“Artículo 46.- La oficina nacional competente podrá requerir el informe de expertos o de organismos científicos o tecnológicos que se consideren idóneos, para que emitan opinión sobre la patentabilidad de la invención. Asimismo, cuando lo estime conveniente, podrá requerir informes de otras oficinas de propiedad industrial.

De ser necesario, a efectos del examen de patentabilidad y a requerimiento de la oficina nacional competente, el solicitante proporcionará, en un plazo que no excederá de 3 meses, uno o más de los siguientes documentos relativos a una o más de las solicitudes extranjeras referidas total o parcialmente a la misma invención que se examina:

a) copia de la solicitud extranjera;

b) copia de los resultados de exámenes de novedad o de patentabilidad efectuados respecto a esa solicitud extranjera;

(...)

*La oficina nacional competente podrá **reconocer los resultados de los exámenes referidos en el literal b) como suficientes para acreditar el cumplimiento de las condiciones de patentabilidad de la invención***” (Negrilla fuera del texto).

Por todo lo anterior, consideramos que la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos de patentabilidad exigidos por la legislación actual, por lo que atentamente solicitamos en consideración lo siguiente:

VII. PETICIÓN

Por todo lo anterior, solicito a ese Despacho lo siguiente:

7.1 Que al considerar las razones precedentes se revoque la decisión contenida en la Resolución No. **48192** del 05 de Agosto de 2014, en cuanto resuelve negar el privilegio de patente de invención.

7.2. Que se acepte el nuevo pliego reivindicatorio presentado con este escrito, conformado por 48 reivindicaciones.

7.3. Que se otorgue el privilegio de patente de invención para **“VIRUS DE LA INFLUENZA MODIFICADO PARA CONTROL Y MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE UNA VACUNA”** a favor de **ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL**.

VIII. NOMBRE Y DIRECCIÓN

El nombre y la dirección del solicitante recurrente son los siguientes:

ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL

332 North Lauderdale Street,
Memphis, Tennessee 38105-2794,
Estados Unidos de América

IX. ANEXOS

- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente
- Recibo por concepto de presentación de modificaciones a las reivindicaciones por valor de \$ 128.000
- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 48 reivindicaciones
- Artículo 1: Suzuki y Nei (2002)
- Artículo 2: Gillian M. Air (1981)
- Secuencia del gen de hemaglutinina del virus de la influenza A
- Primera página de tres patentes concedidas en Estados Unidos de América
- Reivindicaciones concedidas en Rusia
- Reivindicaciones concedidas en Japón
- Reivindicaciones concedidas en Corea del Sur

X. NOTIFICACIONES

Atentamente manifiesto a usted que recibiré notificaciones en la Secretaria de su Despacho o en mi oficina de abogada situada en la Carrera 4ª. No. 72-35, piso 4º, de esta ciudad de Bogotá, D.C.

Señor Superintendente,

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

mem.
COLO-16331-0841-001-2
SGD\SGD\ID-271893\WPC16331
No. M-2014-271893\SGD

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material ☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	332 North Lauderdale Street, Tennessee 38105-2794	Memphis
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre De Páez Luz Clemencia	Documento de identificación C.C. 35.456.344	Tarjeta profesional T.P.A. 23.555
---	--	--------------------------------------

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 4ª No. 72 –35	Bogotá	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 08.023.024

Aparece

Debe ser

Modificación:

☒ Modificación al capítulo reivindicatorio.
Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 48 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas. Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

☐ Modificación al capítulo descriptivo.

5. Anexos

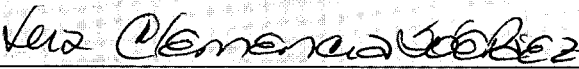
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación por \$128.000.

☐ Comprobante de pago por ----- reivindicaciones adicionales a la décima por \$-----.

☐ Poder, si fuere el caso.

☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 de Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

MLM

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de hemaglutinina (HA) del virus recombinante de influenza H5, donde dicha molécula H5HA:
 - a. Comprende uno o más cambios de secuencias de aminoácidos en comparación a una molécula de HA que se encuentra en la naturaleza, que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA,
 - b. Comprende el aminoácido asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA,
 - c. Posee una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5 o una vacuna contra la influenza en comparación a la molécula de HA que se encuentra en la naturaleza, y
 - d. No es una molécula A/HK/213/03 HA .
2. La molécula HA del virus recombinante de influenza de la reivindicación 1, en donde uno o más cambios en la secuencia de aminoácido altera un sitio de glicosilación.
3. La molécula HA del virus recombinante de influenza de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de influenza A humana.
4. La molécula HA del virus recombinante de influenza de la reivindicación 3, en donde el virus de influenza A humana es del subtipo H5.
5. La molécula HA del virus recombinante de influenza de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de influenza aviar.
6. Un virus recombinante de influenza que contiene una molécula de H5HA del virus recombinante de influenza , donde dicha molécula H5HA:

- a. Comprende uno o más cambios de secuencias de aminoácidos en comparación a una molécula de HA que se encuentra en la naturaleza, que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA,
 - b. Comprende el aminoácido asparagina en el lugar correspondiente a la posición 223 en la HA del H5,
 - c. Posee una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5 o una vacuna contra la influenza en comparación con la molécula HA que se encuentra en la naturaleza, y
 - d. No es una molécula A/HK/213/03 HA.
7. Una vacuna del virus de la influenza que contiene una molécula de hemaglutinina (HA) del virus recombinante de influenza H5, donde dicha molécula H5HA:
- a. Comprende uno o más cambios de secuencias de aminoácidos en comparación a una molécula de HA que se encuentra en la naturaleza, que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 del aminoácido en H5HA,
 - b. Comprende el aminoácido asparagina en el lugar correspondiente a la posición 223 en H5HA,
 - c. No es una molécula A/HK/213/03 HA,
 - d. Posee una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5 o una vacuna contra la influenza en comparación con la molécula HA que se encuentra en la naturaleza, y
 - e. Resulta en un aumento de la inmunogenicidad de dicha vacuna del virus en comparación con la molécula HA que se encuentra en la naturaleza.
8. La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la asparagina en la posición del aminoácido 223 cambia la especificidad para los receptores del ácido siálico.

9. La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde dicha molécula HA que se encuentra en la naturaleza comprende una serina en una posición del aminoácido equivalente a dicha posición del aminoácido 223.
10. Un virus recombinante de la influenza de acuerdo a la reivindicación 6, en donde una o más secuencias de aminoácidos cambian el sitio de glicosilación.
11. Un virus recombinante de la influenza de acuerdo a la reivindicación 6, en donde la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de la influenza humana A.
12. Un virus recombinante de la influenza de acuerdo a la reivindicación 11, en donde el virus de la influenza humana A es del subtipo H5.
13. Un virus recombinante de la influenza de acuerdo a la reivindicación 6, en donde dicha molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de la influenza aviar.
14. Un virus recombinante de la influenza de acuerdo a la reivindicación 6, en donde una o más secuencias de aminoácidos cambian la especificidad para los receptores del ácido siálico.
15. Un virus recombinante de la influenza de acuerdo a la reivindicación 6, en donde la molécula HA que se encuentra en la naturaleza comprende una serina en una posición del aminoácido equivalente a dicha posición del aminoácido 223.
16. La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde uno o más cambios en las secuencias de aminoácidos alteran el sitio de glicosilación.
17. La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de la influenza humana A.

- 18.** La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 17, en donde el virus de la influenza humana A es del subtipo H5.
- 19.** La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de la influenza aviar.
- 20.** La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la asparagina en la posición de aminoácido 223 cambia la especificidad para los receptores del ácido siálico.
- 21.** La vacuna del virus de la influenza de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la molécula HA que se encuentra en la naturaleza comprende una serina en la posición de aminoácido equivalente a dicha posición de aminoácido 223.
- 22.** El virus recombinante de influenza de la reivindicación 6, en donde el virus es usado como virus de referencia para diagnóstico en un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI).
- 23.** Un método para hacer un virus que incluye la molécula de HA del virus recombinante de influenza de la reivindicación 1, método que incluye la introducción de un vector recombinante que expresa la molécula HA del virus recombinante de influenza de la reivindicación 1 en un sistema de genética inversa.
- 24.** Un método que incrementa la sensibilidad de un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI), método el cual incluye
- (a) obtener un antisuero de animales vacunados o infectados; y
 - (b) hacer reaccionar in vitro dichos antisueros de animales vacunados o infectados con una molécula de hemaglutinina (HA), en donde dicha molécula HA comprende (i) asparagina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 223 en H5HA y (ii) no es molécula A/HK/223/03 HA.
- 25.** El método de la reivindicación 24 que resulta en un incremento de dos veces en la sensibilidad del ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).

- 26.** El método de la reivindicación 24 que resulta en un incremento de cuatro veces en la sensibilidad del ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HI).
- 27.** Un método para determinar la eficacia de una vacuna del virus de influenza en un animal, método el cual incluye:
- (a) obtener un antisuero de un animal vacunado; y
 - (b) hacer reaccionar in vitro dicho antisuero obtenido del animal vacundo con un virus de referencia de diagnóstico que contiene una molécula HA del virus de la influenza, en donde dicha molécula HA comprende (i) asparagina en una posición de aminoácido que corresponde a la 223 en H5HA y (ii) no es una molécula A/HK/223/03 HA.
- 28.** Un método para determinar la eficacia de una vacuna del virus de influenza en un animal, método el cual incluye:
- (a) obtener un antisuero de un animal vacunado; y
 - (b) hacer reaccionar in vitro dicho antisuero obtenido del animal con un virus de referencia de diagnóstico que contiene una molécula HA del virus de la influenza, en donde dicha molécula HA comprende asparagina en una posición de aminoácido que corresponde a la 223 en H5HA y en donde la inclusión de asparagina resulta en una actividad aumentada del virus de referencia de diagnóstico con antisueros derivados del animal expuesto a una molécula HA que se encuentra en la naturaleza.
- 29.** Un método para determinar si un animal ha sido expuesto a un virus de influenza, método el cual incluye:
- (a) obtener un antisuero del animla; y
 - (b) hacer reaccionar in vitro dicho antisuero del animal con un virus de referencia de diagnóstico como el descrito en la reivindicación 6.
- 30.** El método de la reivindicación 27, 28 y 29, en donde el animal es un hurón.
- 31.** El método de la reivindicación 27, 28 y 29, en donde el animal es un humano.
- 32.** Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende:

- a. Una molécula de hemaglutinina (HA) del virus recombinante de la influenza H5, en donde dicha molécula H5HA recombinante
- i. Comprende uno o más cambios de secuencias de aminoácidos en comparación a la molécula HA que se encuentra en la naturaleza que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición del aminoácido correspondiente a la posición 223 en H5HA,
 - ii. Comprende el aminoácido asparagina en la posición correspondiente a la posición 223 en H5HA,
 - iii. Posee una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5 o una vacuna contra la influenza H5 comparada con la molécula HA que se encuentra en la naturaleza, y
 - iv. No es una molécula A/HK/213/03 HA y
- b. Un vehículo, en donde dicho vehículo se selecciona de agua y aceites, aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares.
33. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque contiene un adyuvante.
34. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque contiene además una molécula inmunoestimuladora.
35. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque la composición inmunogénica contiene además microcapsulas y/o un portador membranoso inmunopotenciador.
36. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque la composición inmunogénica contiene además glóbulos rojos de la sangre (RBC), RBC fantasmas, o antígeno azul de la lengua.
37. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque uno o más cambios en las secuencias de aminoácidos alteran un sitio de glicosilación.

38. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus A de la influenza humana.
39. La composición de la reivindicación 38, caracterizado porque el virus A de la influenza humana es del subtipo H5.
40. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de la influenza aviar.
41. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque la asparagina en la posición 223 del aminoácido de la molécula HA altera la especificidad para los receptores del ácido siálico.
42. La composición de la reivindicación 32, caracterizado porque la molécula HA es parte de un virus recombinante o atenuado.
43. Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende:
- Un virus recombinante de influenza que comprende una molécula de hemaglutinina (HA) del virus recombinante de la influenza H5, en donde dicha molécula H5HA recombinante:
 - Comprende uno o más cambios de secuencias de aminoácidos en comparación a la molécula HA que se encuentra en la naturaleza que comprende un aminoácido diferente a la asparagina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 223 en H5HA,
 - Comprende el aminoácido asparagina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 223 en H5HA,
 - Posee una reactividad aumentada con los antisueros obtenidos de un animal expuesto a un virus de influenza H5 o una vacuna contra la influenza H5 comparada con la molécula HA que se encuentra en la naturaleza, y
 - No es una molécula A/HK/213/03 HA, y
 - Un vehículo, en donde dicho vehículo se selecciona de agua y aceites, aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares.

44. La composición de la reivindicación 43, caracterizado porque uno o más cambios en las secuencias de aminoácidos alteran un sitio de glicosilación.
45. La composición de la reivindicación 43, caracterizado porque la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus A de la influenza humana.
46. La composición de la reivindicación 45, caracterizado porque el virus A de la influenza humana es del subtipo H5.
47. La composición de la reivindicación 43, caracterizado porque la molécula HA que se encuentra en la naturaleza es de un virus de la influenza aviar.
48. La composición de la reivindicación 43, caracterizado porque la asparagina en la posición 223 del aminoácido de la molécula de HA altera la especificidad para los receptores del ácido siálico.

Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes

Yoshiyuki Suzuki and Masatoshi Nei

Institute of Molecular Evolutionary Genetics and Department of Biology, The Pennsylvania State University

Influenza A, B, and C viruses are the etiological agents of influenza. Hemagglutinin (HA) is the major envelope glycoprotein of influenza A and B viruses, and hemagglutinin-esterase (HE) in influenza C viruses is a protein homologous to HA. Because influenza A virus pandemics in humans appear to occur when new subtypes of HA genes are introduced from aquatic birds that are known to be the natural reservoir of the viruses, an understanding of the origin and evolution of HA genes is of particular importance. We therefore conducted a phylogenetic analysis of HA and HE genes and showed that the influenza A and B virus HA genes diverged much earlier than the divergence between different subtypes of influenza A virus HA genes. The rate of amino acid substitution for A virus HAs from duck, a natural reservoir, was estimated to be 3.19×10^{-4} per site per year, which was slower than that for human and swine A virus HAs but similar to that for influenza B and C virus HAs (HEs). Using this substitution rate from the duck, we estimated that the divergences between different subtypes of A virus HA genes occurred from several thousand to several hundred years ago. In particular, the earliest divergence time was estimated to be about 2,000 years ago. Also, the A virus HA gene diverged from the B virus HA gene about 4,000 years ago and from the C virus HE gene about 8,000 years ago. These time estimates are much earlier than the previous ones.

Introduction

Influenza viruses are members of the viral family *Orthomyxoviridae* and have a segmented, single-stranded, and negative-sense RNA genome in an enveloped virion (Smith, Andrewes, and Laidlaw 1933). The genome encodes envelope glycoproteins, matrix proteins, nonstructural proteins, nucleoproteins, and polymerase proteins. According to the antigenic properties of matrix proteins or nucleoproteins, influenza viruses are classified into types A, B, and C. Influenza A viruses cause epidemics and pandemics of influenza in mammals and birds, and aquatic birds are known to be the natural reservoir of these viruses (Slemons et al. 1974; Webster et al. 1978; Hinshaw, Webster, and Turner 1980). Influenza B and C viruses are isolated mainly from humans and are less pathogenic than influenza A viruses. Phylogenetic analyses of nucleoproteins and polymerase proteins have indicated that influenza A and B viruses are more closely related to each other than to influenza C viruses (Gammelin et al. 1990; Krossoy et al. 1999; Cox et al. 2000).

Hemagglutinin (HA) is the major envelope glycoprotein of A and B viruses, and hemagglutinin-esterase (HE) in C viruses is a protein homologous to HA. HA (HE) is cleaved into the signal peptide (about 20 amino acids in influenza A viruses), protein HA1 (HE1) (about 320 amino acids), and protein HA2 (HE2) (about 220 amino acids) when mature proteins are produced (fig. 1). HA1 (HE1) is a receptor-binding protein and the major target of immune responses, whereas HA2 (HE2) is an anchor protein of the envelope and mediates fusion of the envelope and the cellular endosomal membrane. Influenza A virus HA genes are classified into 15 subtypes (H1–H15), according to their antigenic properties

(WHO Memorandum 1980), whereas B and C virus HA (HE) genes are not classified into subtypes. Because influenza A virus pandemics in humans appear to occur when new subtypes of HA genes are introduced from aquatic birds, an understanding of the origin and evolution of HA genes is of particular importance.

From the phylogenetic analyses of A and B virus HA genes, Webster et al. (1992) suggested that the divergence between these two genes occurred later than the divergences between some subtypes of A virus HA genes. However, the reliability of their conclusion is unclear because they did not use any outgroup to root their phylogenetic tree. Saitou and Nei (1986) estimated the earliest divergence time between subtypes of A virus HA genes to be 200–300 years ago, using the rate of amino acid substitution for human A virus HAs. This estimate is also unreliable because the natural reservoir of these viruses is aquatic birds, and the evolutionary rate is known to be slower in birds than in humans (Saitou and Nei 1986; Bean et al. 1992; Schafer et al. 1993; Makarova et al. 1999; Reid et al. 1999; Suarez 2000).

The purpose of this paper is to study the evolutionary relationships of influenza A, B, and C virus HA (HE) genes. We are also interested in estimating the divergence times between these genes.

Materials and Methods

Phylogenetic Analyses

For constructing a phylogenetic tree for influenza A, B, and C virus HA (HE) genes, we used amino acid sequences because they are known to give more reliable results than nucleotide sequences when the sequence divergence is high (Nei and Kumar 2000, pp. 17–32). We also used only the HA2 (HE2) region of HA (HE) because in the multiple alignment for the entire region of A, B, and C virus HAs (HEs), the signal peptide and HA1 (HE1) protein regions generated many gaps and only the HA2 (HE2) region appeared reliable (fig. 1) (Nakada et al. 1984).

Amino acid sequences of influenza A, B, and C virus HA2s (HE2s) were collected from the international

Key words: influenza virus, hemagglutinin, hemagglutinin-esterase, rate of amino acid substitution, divergence time.

Address for correspondence and reprints: Yoshiyuki Suzuki, Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State University, 328 Mueller Laboratory, University Park, Pennsylvania 16802. E-mail: yis1@psu.edu.

Mol. Biol. Evol. 19(4):501–509. 2002

© 2002 by the Society for Molecular Biology and Evolution. ISSN: 0737-4038



FIG. 1.—Multiple alignment for 17 randomly chosen amino acid sequences (see table 1) of the entire region of influenza A, B, and C virus HAs (HEs). Dashes indicate gaps. Stars indicate amino acid sites where the same amino acid exists for all sequences, and dots indicate amino acid sites where amino acids with similar properties exist for all sequences. HAs in A and B viruses (HEs in C viruses) are cleaved into the signal peptide and the proteins HA1 (HE1) and HA2 (HE2) when mature proteins are produced.

Table 1.
Amino Acid Sequences of the HA or HE Genes used for a Phylogeneic Analysis of A Viruses (15 subtypes) and B and C Viruses^a

Type and Subtype	Virus ^b	Accession Number ^c
Influenza A virus H1	A/PR/8/34 (H1N1)	V01088
Influenza A virus H2	A/herring gull/DE/677/88 (H2N8)	L11132
Influenza A virus H3	A/Beijing/353/89 (H3N2)	U97740
Influenza A virus H4	A/budgerigar/Hokkaido/1/77 (H4N6)	M25285
Influenza A virus H5	A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1)	AF144305
Influenza A virus H6	A/shearwater/Australia/1/72 (H6N5)	D90303
Influenza A virus H7	A/turkey/Oregon/71 (H7N3)	M31689
Influenza A virus H8	A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)	D90304
Influenza A virus H9	A/turkey/Wisconsin/66 (H9N2)	D90305
Influenza A virus H10	A/chicken/Germany/N/49 (H10N7)	M21647
Influenza A virus H11	A/duck/England/56 (H11N6)	D90306
Influenza A virus H12	A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)	D90307
Influenza A virus H13	A/gull/Maryland/704/77 (H13N6)	D90308
Influenza A virus H14	A/mallard duck/Gurjev/263/82 (H14N5)	M35997
Influenza A virus H15	A/duck/Australia/341/83 (H15N8)	L43916
Influenza B virus	B/Lee/40	K00423
Influenza C virus	C/Johannesburg/66	M17868

^a In the phylogenetic analysis, only the HA2 (HE2) region of the HA (HE) gene was used.
^b The virus name consists of type/host species/place of isolation/strain number if available/year of isolation (the HA subtype and the neuraminidase subtype). By convention, the host species is omitted if the virus is isolated from humans (WHO Memorandum 1980).
^c The accession number in the international DNA databank (DDBJ/EMBL/GenBank).

DNA databank (DDBJ release 43). After excluding sequences from laboratory-adapted viruses and identical sequences within species, we obtained 57, 34, 58, 10, 29, 2, 41, 1, 4, 2, 1, 1, 3, 1, and 2 amino acid sequences for the H1–H15 subtypes of A virus HA2s, respectively. We also obtained 15 sequences for B virus HA2s and 35 sequences for C virus HE2s. A total of 296 amino acid sequences were aligned by the computer program CLUSTAL W (Thompson, Higgins, and Gibson 1994). After removing all alignment gaps, 207 amino acid sites were used for estimating p, Poisson correction (PC), and gamma distances (Nei and Kumar 2000). The gamma shape parameter (α) was estimated to be 1.83 by Gu and Zhang’s (1997) method. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987), and the reliability of each interior branch was tested by the bootstrap method with 1,000 resamplings (Felsenstein 1985; Kumar et al. 2001). The NJ trees were also constructed for 17 amino acid sequences which were randomly chosen from each subtype of A virus HA2s and from B virus HA2s and C virus HE2s (table 1).

Estimation of Divergence Times

For estimating the divergence times between subtypes of influenza A virus genes, we used only A virus sequences because B and C virus sequences were not necessary. We also used amino acid sequences for the entire region of HA because the alignment for A virus HAs appeared to be reliable (fig. 1) (Rohm et al. 1996), and longer sequences were expected to give more reliable estimates.

We obtained 50, 25, 24, 10, 21, 2, 25, 1, 4, 2, 1, 1, 3, 1, and 2 amino acid sequences for the H1–H15 subtypes of A virus HAs from the databank, respective-

ly, and made a multiple alignment for a total of 172 sequences by CLUSTAL W. After removing all alignment gaps, 540 amino acid sites were used for estimating gamma distances with $\alpha = 1.20$, which was obtained by Gu and Zhang’s method. An NJ tree was constructed, and the branch lengths were recalculated by the ordinary least squares method (Rzhetsky and Nei 1993) to estimate the rate of amino acid substitution accurately (see subsequently).

When the years of isolation are available for viral sequences in a phylogenetic tree, the rate of amino acid substitution may be estimated by the regression coefficient of the numbers of amino acid substitutions from a common root on the years of isolation (Nei 1983; Suzuki, Wyndham, and Gojobori 2001). Using the phylogenetic tree for 172 sequences of influenza A virus HAs, we estimated the rate of amino acid substitution for duck A virus HAs because duck provided the largest number (28) of sequences among aquatic birds. For estimating the divergence times between subtypes of A virus HA genes, we constructed a linearized tree (Takezaki, Rzhetsky, and Nei 1995) for 28 amino acid sequences of duck A virus HAs using the gamma distance with $\alpha = 1.20$. The standard errors (SEs) and 99% confidence intervals (CIs) of the rates and the divergence times were estimated by the bootstrap method, under the assumption that the topologies of the phylogenetic trees for 172 sequences of influenza A virus HAs and 28 sequences of duck A virus HAs were correct (Nei and Kumar 2000).

Results
Phylogenetic Relationships of Influenza A, B, and C Virus HA Genes

The NJ trees constructed by using p, PC, and gamma distances for 17 randomly chosen amino acid se-

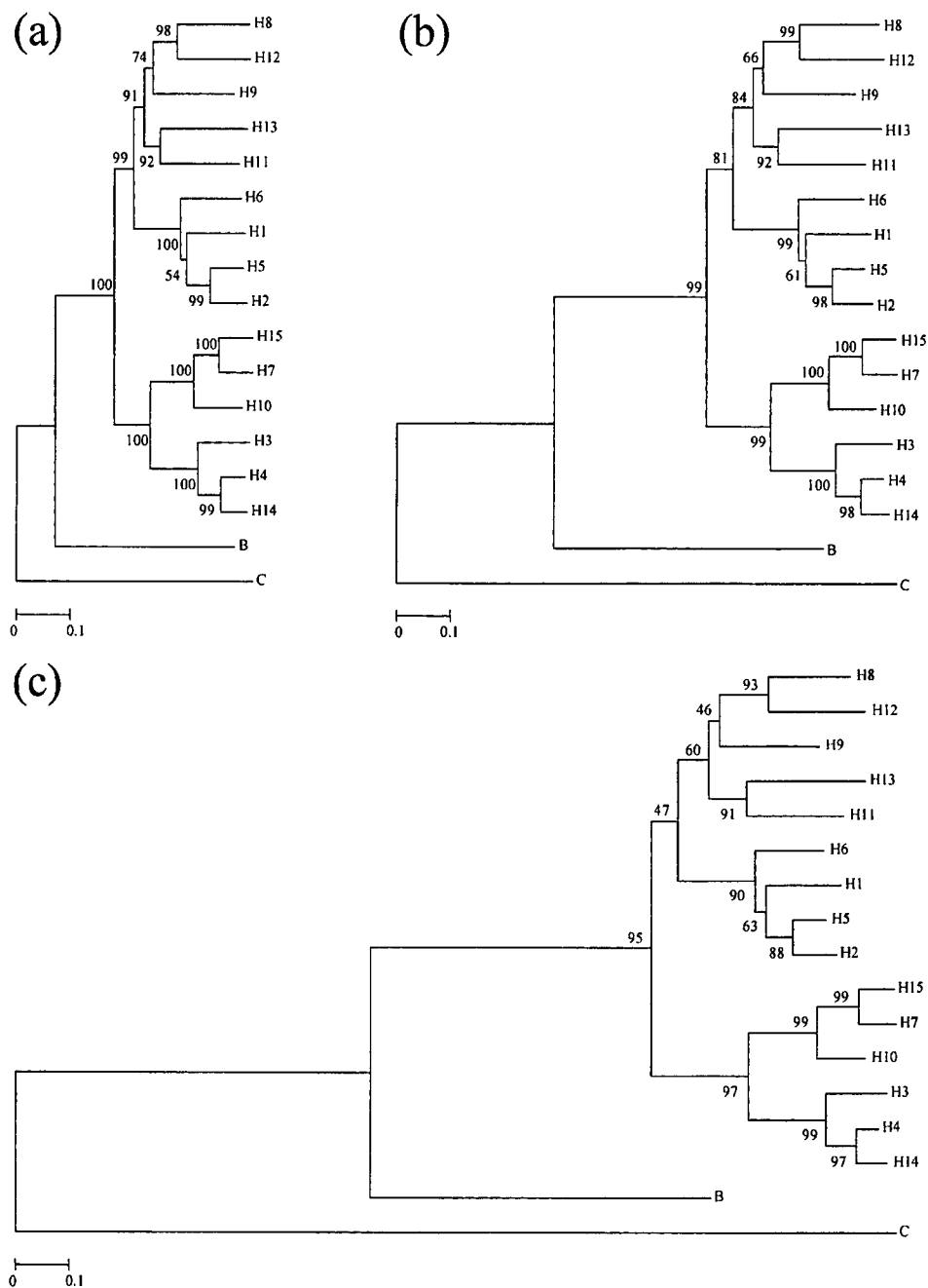


FIG. 2.—Phylogenetic trees for 17 randomly chosen amino acid sequences (see table 1) of the HA2 (HE2) region of influenza A, B, and C virus HAs (HEs). Trees (a), (b), and (c) were obtained by using p, PC, and gamma distances, respectively. The bootstrap value is indicated for each interior branch. The scale bars indicate the numbers of amino acid substitutions per site.

quences of the HA2 (HE2) protein are shown in panels (a), (b), and (c) of figure 2, respectively. All trees show the same topology and indicate that all influenza A virus HA genes diverged after they separated from B virus HA genes. The monophyly of A virus HA genes is supported by a bootstrap value of 100%, 99%, and 95% in trees (a), (b), and (c), respectively. This relationship was also supported by the NJ trees for 296 amino acid sequences of influenza A, B, and C virus HA2s (HE2s) with high bootstrap values (100%, 99%, and 86% for p, PC, and gamma distances, respectively) (data not shown).

Divergence Times Between Subtypes of A Virus HA Genes

For estimating the divergence times between subtypes of A virus HA genes, we first estimated the rate of amino acid substitution for duck A virus HAs because duck is one of the natural reservoirs of these viruses and provided the largest number of sequences among them. In the phylogenetic tree for 172 amino acid sequences of the entire region of A virus HAs, only the H1 and H2 subtypes included sufficient numbers of sequences for estimating the rate for duck A virus HAs and are

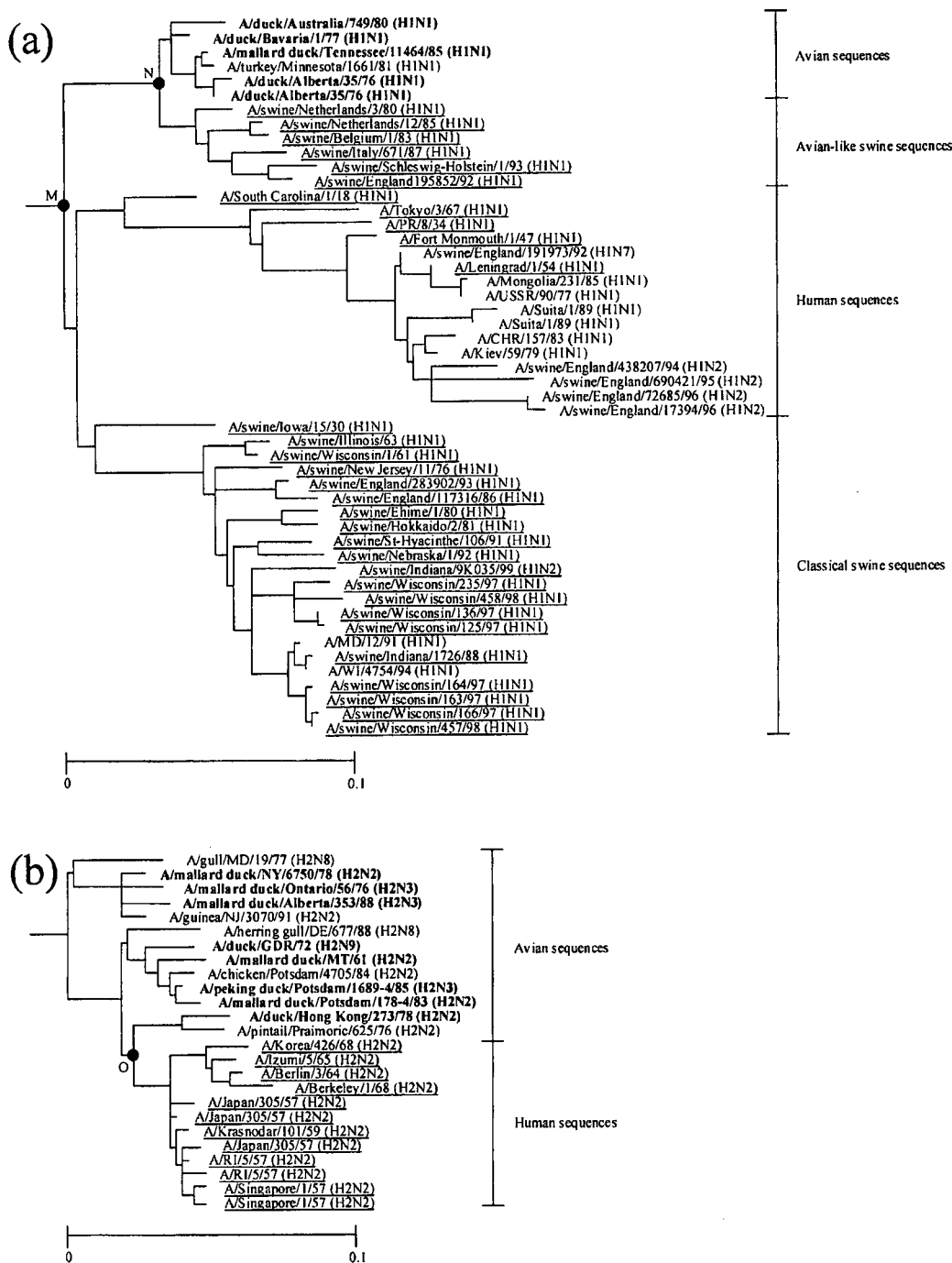


FIG. 3.—(a) H1 and (b) H2 subtype subtrees in the phylogenetic tree for 172 amino acid sequences of the entire region of influenza A virus HAs. For the nomenclature of influenza viruses, see the footnotes of table 1. The nodes at which the year of divergence was estimated (table 3) are denoted by black circles and labeled with letters. The human and swine sequences used for estimating the rates and the years of divergences are underlined. The duck sequences used for estimating the rates are boldfaced. The scale bars indicate the numbers of amino acid substitutions per site.

shown in panels (a) and (b) of figure 3, respectively. In this figure, avian sequences had generally shorter branch lengths than human and swine sequences in both subtypes, indicating that the rate for the former was slower than that for the latter. To estimate the rate of amino acid substitution, we conducted a regression analysis using duck sequences but failed to obtain the rate because it became negative in both H1 and H2 subtypes (data

not shown). This happened probably because the evolutionary rate for duck sequences was too slow to give reliable estimates (Bean et al. 1992; Schafer et al. 1993; Suarez 2000). To obtain a reliable rate for duck sequences, it was necessary to analyze duck sequences which were more distantly related from one another than those analyzed earlier in the article. For this purpose, we estimated the

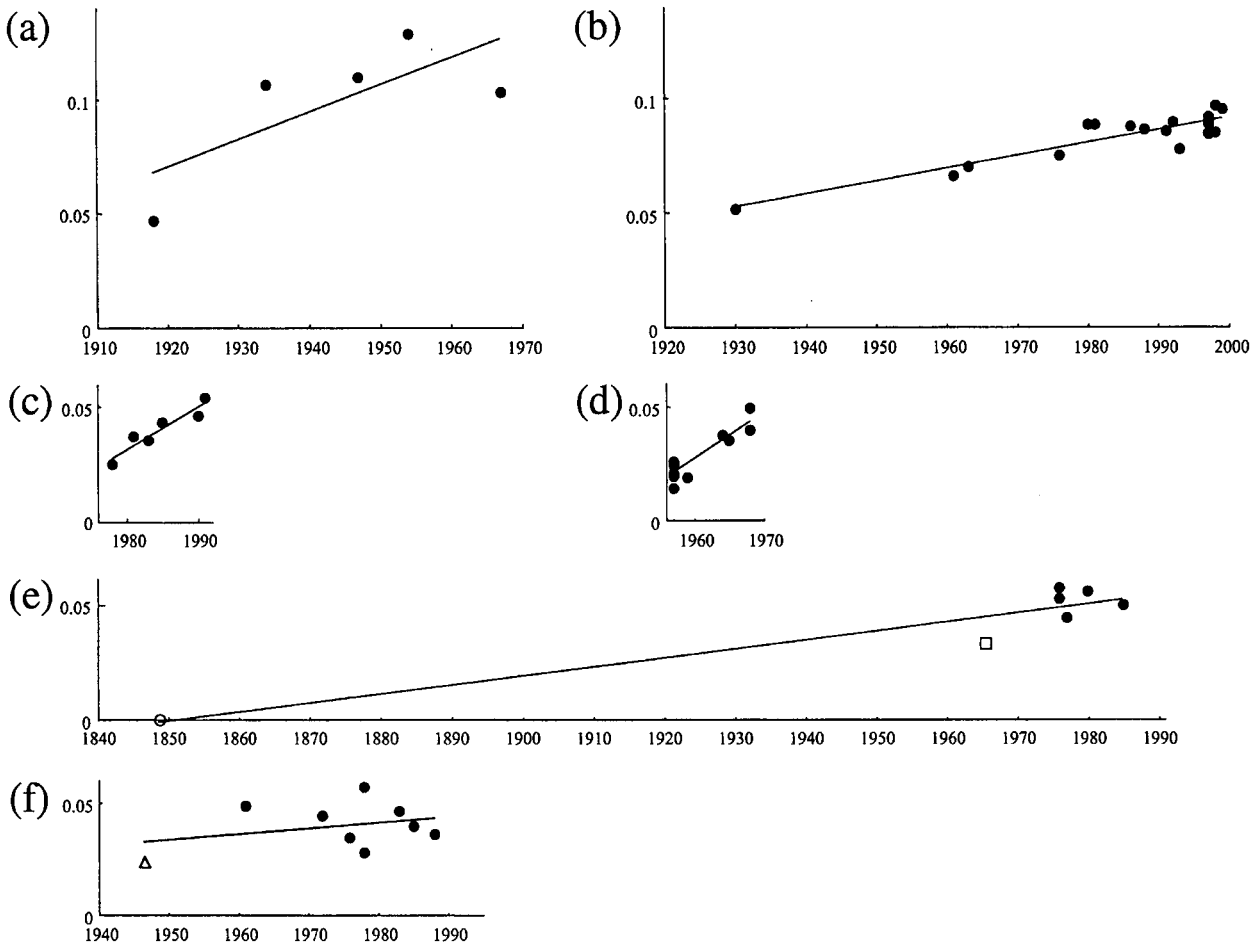


FIG. 4.—Regression analyses for estimating the rate of amino acid substitution for the entire region of (a) human, (b) classical swine, and (c) avian-like swine influenza A virus HAs in the H1 subtype and for (d) human sequences in the H2 subtype and for the (e) H1 and (f) H2 subtype sequences of duck HAs. In each panel, the abscissa indicates the year of isolation or divergence, and the ordinate indicates the number of amino acid substitutions from node (a) M, (b) M, (c) N, (d) O, or (e) M, or from (f) the earliest node of panel (b) in figure 3. An open circle and an open square in panel (e) indicate nodes M and N in figure 3a, respectively, and an open triangle in panel (f) indicates node O in figure 3b.

years of divergences between duck sequences and human and swine sequences in figure 3, using the rates for the latter sequences and added these nodes to the regression analysis of duck sequences. The rates for human and swine sequences were easily estimated by the regression analysis using these sequences only because

the rates were relatively high. In the H1 subtype, we first estimated the year of divergence at node M using the rate for human sequences (fig. 3a). We used only human sequences which were isolated before 1977 because human A viruses circulating after 1977 are known to have originated from a laboratory-adapted virus (Kendal et al. 1978; Nakajima, Desselberger, and Palese 1978; Scholtissek, von Hoyningen, and Rott 1978; Palese and Young 1982; Hayashida et al. 1985). The rate of amino acid substitution for human sequences was estimated to be 1.20×10^{-3} per site per year (fig. 4a and table 2), and the year of divergence at node M was A.D. 1862. We also estimated the year of divergence at the same node using classical swine sequences. This gave a rate of 0.56×10^{-3} per site per year (fig. 4b) and a date of 1836 at node M. Taking the average for human and classical swine sequences, we obtained 1849 as the final estimate of the year of divergence at node M (table 3). In addition, we estimated the year of divergence at node N using avian-like swine sequences. These sequences apparently evolved at a rate of 1.87×10^{-3} per site per year (fig. 4c), and the year of divergence at node N was

Table 2. Rates of Amino Acid Substitution ($\times 10^{-3}$) for Influenza A Virus HAs ^a			
Subtype	Host Species	Rate $\pm$ SE (Per Site Per Year)	99% CI (Per Site Per Year)
H1.....	Human	1.20 ± 0.32	0.49–2.11
H1.....	Classical swine	0.56 ± 0.20	0.16–1.21
H1.....	Avian-like swine	1.87 ± 0.79	0.30–4.21
H1.....	Duck	0.39 ± 0.12	0.14–0.72
H2.....	Human	2.03 ± 0.77	0.15–4.01
H2.....	Duck	0.25 ± 0.19	–0.23–0.85
H1-H2 ^b ...	Duck	0.32 ± 0.11	0.07–0.66

^a The entire region of the HA gene was used for analysis.
^b The average rate for the H1 and H2 subtypes.

Table 3.
Years of Divergences Between Influenza A Virus HA Genes in the H1 and H2 Subtypes

Node ^a	Year of Divergence ± SE (A.D.)	99% CI (A.D.)
M	1849 ± 32	1660–1886
N	1965 ± 53	1843–1977
O	1946 ± 80	1781–1953

^a The nodes correspond to those indicated in figure 3.

1965. By adding nodes M and N to the regression analysis of duck sequences (fig. 4e), the rate for these sequences was estimated to be 3.89×10^{-4} per site per year. We also estimated the rate for duck sequences in the H2 subtype. In this subtype, we estimated the year of divergence at node O using human sequences (fig. 3b). The rate of amino acid substitution for these sequences was estimated to be 2.03×10^{-3} per site per year (fig. 4d and table 2) and the year of divergence at node O was 1946 (table 3). We added node O to the regression analysis of duck sequences (fig. 4f) and obtained a rate of 2.48×10^{-4} per site per year for these sequences. Taking the average for the H1 and H2 subtypes, we obtained 3.19×10^{-4} per site per year as the final estimate of the rate of amino acid substitution for duck influenza A virus HAs.

A linearized tree for 28 amino acid sequences of duck A virus HAs is shown in figure 5. The topology of subtypes was the same as that shown in figure 1, except for the branching pattern of the H11 subtype, which was supposed to make a cluster with the H12 subtype but made a cluster with the H1, H2, and H5 subtypes. The estimates of the divergence times between different subtypes of influenza A virus HA genes are listed in table 4. Although the SE and 99% CI are large, all subtypes apparently diverged from several thousand to several hundred years ago. In particular, the earliest divergence (node X) is likely to have occurred about 2,000 years ago. We further estimated the divergence times between influenza A, B, and C virus HA (HE) genes by linearizing the phylogenetic tree in figure 2c. Assuming that the earliest divergence between subtypes of A virus HA genes occurred 1,971 years ago (table 4), A and B virus HA genes apparently diverged 3,832 years ago, and the separation of A and B virus HA genes from C virus HE genes occurred 7,919 years ago.

Discussion

The divergence between influenza A and B virus HA genes apparently occurred earlier than the divergences between different subtypes of A virus HA genes. This is different from the conclusion of Webster et al. (1992) that the divergence between A and B virus HA genes occurred later than the divergences between some subtypes of A virus HA genes. This difference is apparently caused by the fact that Webster et al. did not use an outgroup for their phylogenetic analysis. In the present study, the phylogenetic relationship was supported with a high bootstrap value, indicating that the relationship obtained is highly reliable.

The rate of amino acid substitution for duck A virus HAs (3.19×10^{-4} per site per year) was slower than that for human and swine A virus HAs ($[0.56\text{--}2.03] \times 10^{-3}$ per site per year) but similar to that for B virus HAs (5.3×10^{-4} per site per year [Air et al. 1990]) and C virus HEs (2.3×10^{-4} per site per year [Muraki et al. 1996]). These results suggest that the rate for HAs (HEs) is more or less constant in the natural reservoir but is accelerated in the newly infected host species. This is probably caused by variation in the strengths of immune responses and functional constraints on HAs (HEs) among different host species (Yamashita et al. 1988; Bean et al. 1992; Schafer et al. 1993; Scholtissek, Ludwig, and Fitch 1993; Makarova et al. 1999; Suzuki and Gojobori 1999).

The earliest divergence time between subtypes of influenza A virus HA genes was estimated to be about 2,000 years ago. Also, the divergence time between A and B virus HA genes was estimated to be about 4,000 years ago, whereas A and B virus HA genes and C virus HE genes diverged about 8,000 years ago. These estimates are substantially higher than those (200–300 years) by Saitou and Nei (1986), who used human HA sequences. Because the evolutionary rate for human A virus HAs is known to be higher than that for aquatic birds, their estimates are considered to be underestimates. In fact, influenza pandemics in humans have been recorded as early as 412 B.C. (Kaplan and Webster 1977), suggesting that influenza A viruses existed more than 2,400 years ago. This observation is consistent with the estimates obtained in the present study.

We estimated the rates and the divergence times under the assumption that the molecular clock has held throughout the evolutionary history of HA (HE) genes. To examine whether this was really the case, we tested the linear relationship between the year of isolation and the number of amino acid substitutions in figure 4 and found that the linearity was not supported at the 1% significance level in both panels (a) and (f). However, the rate of amino acid substitution for human A virus HAs obtained from panel (a) (1.20×10^{-3} per site per year) was similar to that from previous studies (1.0×10^{-3} per site per year [Saitou and Nei 1986]), and the rate for duck A virus HAs obtained from panel (f) (3.89×10^{-4} per site per year) was similar to that obtained from panel (e) (2.48×10^{-4} per site per year). These observations suggest that the rates obtained from panels (a) and (f) are approximately correct. Also, the molecular clock was not rejected at the 1% significance level for the phylogenetic tree in figure 5 by the likelihood-ratio test (Rambaut 2000; Yang 2000) but was rejected for the tree in figure 2c. The latter observation may reflect the fact that the biochemical functions are different between HAs and HEs and the natural reservoirs are not the same for influenza A, B, and C viruses. Therefore, some caution is necessary in estimating the divergence times between influenza A, B, and C virus HA (HE) genes. However, the rate of amino acid substitution for duck influenza A virus HAs was similar to that for B virus HAs and C virus HEs, as indicated previously. Also, in reality, no strict molecular clock is likely to

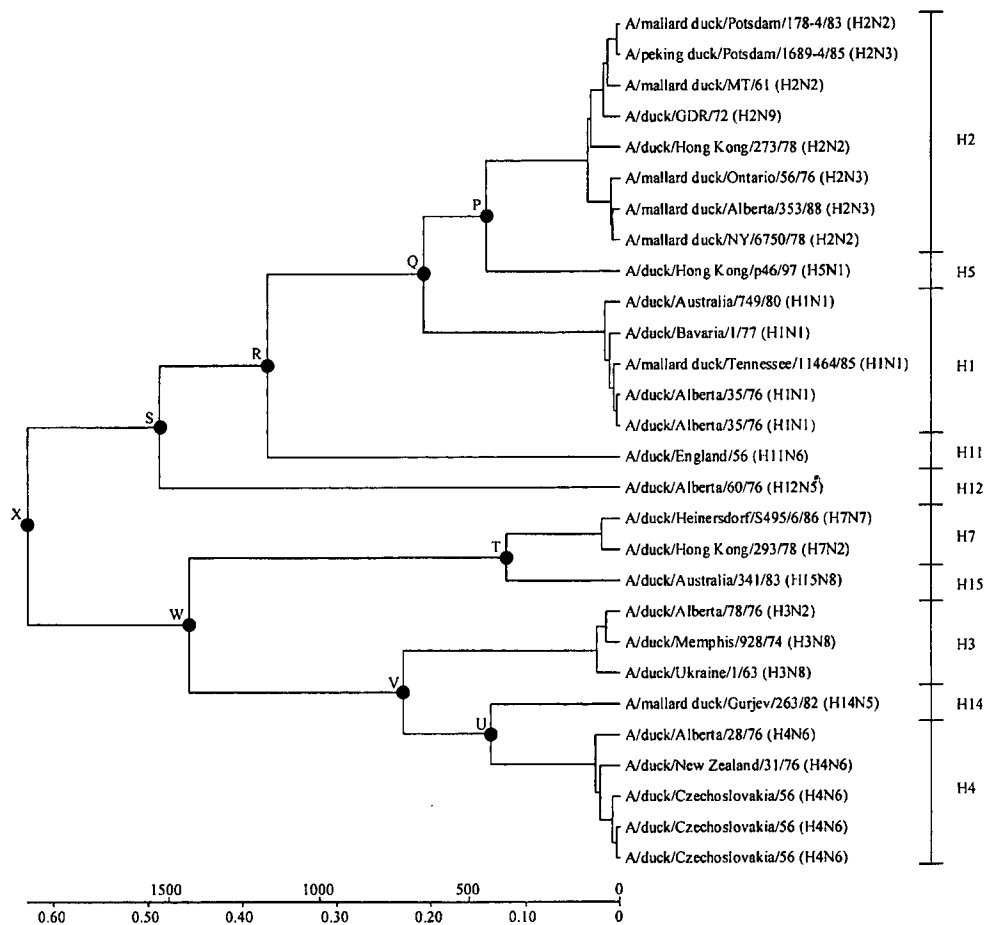


FIG. 5.—Linearized tree for 28 amino acid sequences of the entire region of duck influenza A virus HAs. For the nomenclature of influenza viruses, see the footnotes of table 1. The nodes at which the divergence times were estimated (table 4) are denoted by black circles and labeled with letters. The scale bar indicates the number of years before present (above the line) and the number of amino acid substitutions per site (below the line).

hold for any protein but it is known that rough divergence times can be obtained even if the molecular clock is violated to some extent (Nei and Kumar 2000, pp. 187–206; Nei, Xu, and Glazko 2001). Therefore, these estimates also appear to be appropriate as rough estimates.

In conclusion, influenza virus HA (HE) genes apparently evolved at a rate of amino acid substitution of 10^{-4} per site per year in the natural reservoir. These

genes apparently diverged into influenza A, B, and C virus HA (HE) genes several thousand of years ago and subsequently into subtypes in influenza A viruses from several thousand to several hundred years ago.

Acknowledgments

The authors thank two anonymous reviewers for their valuable comments. This study was supported by grants from the National Institutes of Health to M.N. (GM20293). Y.S. is supported by the JSPS Research Fellowships for Young Scientists.

Table 4.
Divergences Times Between Subtypes of Influenza A Virus HA Genes

Node ^a	Divergence time ± SE (years ago)	99% CI (years ago)
P	443 ± 43	342–579
Q	655 ± 57	519–819
R	1,175 ± 90	966–1,439
S	1,533 ± 119	1,252–1,870
T	379 ± 41	279–491
U	433 ± 45	331–562
V	722 ± 60	576–882
W	1,433 ± 105	1,204–1,731
X	1,971 ± 132	1,680–2,336

^a The nodes correspond to those indicated in figure 5.

LITERATURE CITED

AIR, G. M., A. J. GIBBS, W. G. LAVER, and R. G. WEBSTER. 1990. Evolutionary changes in influenza B are not primarily governed by antibody selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3884–3888.

BEAN, W. J., M. SCHELL, J. KATZ, Y. KAWAOKA, C. NAEVE, O. GORMAN, and R. G. WEBSTER. 1992. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J. Virol.* 66:1129–1138.

COX, N. J., F. FULLER, N. KAVERIJN, H. D. KLENK, R. A. LAMB, B. W. J. MAHY, J. MCCAULEY, K. NAKAMURA, P. PALESE, and R. WEBSTER. 2000. Family *Orthomyxoviridae*. Pp. 585–

- 597 in M. H. V. VAN REGENMORTEL, C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, et al. (11 co-editors), eds. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- GAMMELIN, M., A. ALTMULLER, U. REINHARDT, J. MANDLER, V. R. HARLEY, P. J. HUDSON, W. M. FITCH, and C. SCHOLTISSEK. 1990. Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests that human influenza A viruses emerged from a 19th-century avian ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **7**:194–200.
- GU, X., and J. ZHANG. 1997. A simple method for estimating the parameter of substitution rate variation among sites. *Mol. Biol. Evol.* **14**:1106–1113.
- HAYASHIDA, H., H. TOH, R. KIKUNO, and T. MIYATA. 1985. Evolution of influenza virus genes. *Mol. Biol. Evol.* **2**:289–303.
- HINSHAW, V. S., R. G. WEBSTER, and B. TURNER. 1980. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J. Microbiol.* **26**:622–629.
- KAPLAN, M. M., and R. G. WEBSTER. 1977. The epidemiology of influenza. *Sci. Am.* **12**:88–106.
- KENDAL, A. P., G. R. NOBLE, J. J. SKEHEL, and W. R. DOWDLE. 1978. Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977–1978 to “Scandinavian” strains isolated in epidemics of 1950–1951. *Virology* **89**:632–636.
- KROSSOY, B., I. HORDVIK, F. NILSEN, A. NYLUND, and C. ENDRESEN. 1999. The putative polymerase sequence of infectious salmon anemia virus suggests a new genus within the *Orthomyxoviridae*. *J. Virol.* **73**:2136–2142.
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN, and M. NEI. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244–1245.
- MAKAROVA, N. V., N. V. KAVERIN, S. KRAUSS, D. SENNE, and R. G. WEBSTER. 1999. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. *J. Gen. Virol.* **80**:3167–3171.
- MURAKI, Y., S. HONGO, K. SUGAWARA, F. KITAME, and K. NAKAMURA. 1996. Evolution of the haemagglutinin-esterase gene of influenza C virus. *J. Gen. Virol.* **77**:673–679.
- NAKADA, S., R. S. CREAGER, M. KRYSTAL, R. P. AARONSON, and P. PALESE. 1984. Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. *J. Virol.* **50**:118–124.
- NAKAJIMA, K., U. DESSELBERGER, and P. PALESE. 1978. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature* **274**:334–339.
- NEI, M. 1983. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. Pp. 165–190 in M. NEI and R. K. KOEHN, eds. *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- NEI, M., and S. KUMAR. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- NEI, M., P. XU, and G. GLAZKO. 2001. Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:2497–2502.
- PALESE, P., and J. F. YOUNG. 1982. Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science* **215**:1468–1474.
- RAMBAUT, A. 2000. Estimating the rate of molecular evolution: incorporating noncontemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies. *Bioinformatics* **16**:395–399.
- REID, A. H., T. G. FANNING, J. V. HULTIN, and J. K. TAUBENBERGER. 1999. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:1651–1656.
- ROHM, C., N. ZHOU, J. SUSS, J. MACKENZIE, and R. G. WEBSTER. 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* **217**:508–516.
- RZHETSKY, A., and M. NEI. 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **10**:1073–1095.
- SAITOU, N., and M. NEI. 1986. Polymorphism and evolution of influenza A virus genes. *Mol. Biol. Evol.* **3**:57–74.
- . 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
- SCHAFER, J. R., Y. KAWAOKA, W. J. BEAN, J. SUSS, D. SENNE, and R. G. WEBSTER. 1993. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology* **194**:781–788.
- SCHOLTISSEK, C., S. LUDWIG, and W. M. FITCH. 1993. Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. *Arch. Virol.* **131**:237–250.
- SCHOLTISSEK, C. V., V. VON HOYNINGEN, and R. ROTT. 1978. Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology* **89**:613–617.
- SLEMONS, R. D., D. C. JOHNSON, J. S. OSBORN, and F. HAYES. 1974. Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis.* **18**:119–124.
- SMITH, W., C. H. ANDREWES, and P. P. LAIDLAW. 1933. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **225**:66–68.
- SUAREZ, D. L. 2000. Evolution of avian influenza viruses. *Vet. Microbiol.* **74**:15–27.
- SUZUKI, Y., and T. GOJOBORI. 1999. A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.* **16**:1315–1328.
- SUZUKI, Y., A. WYNDHAM, and T. GOJOBORI. 2001. Virus evolution. Pp. 377–413 in D. J. BALDING, M. BISHOP, and C. CANNINGS, eds. *Handbook of statistical genetics*. Wiley, Chichester.
- TAKEZAKI, N., A. RZHETSKY, and M. NEI. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.* **12**:823–833.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, and T. J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
- WEBSTER, R. G., W. J. BEAN, O. T. GORMAN, T. M. CHAMBERS, and Y. KAWAOKA. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **56**:152–179.
- WEBSTER, R. G., M. YAKHNO, V. S. HINSHAW, W. J. BEAN, and K. G. MURTI. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* **84**:268–278.
- WHO MEMORANDUM. 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses. *Bull. WHO* **58**:585–591.
- YAMASHITA, M., M. KRYSTAL, W. M. FITCH, and P. PALESE. 1988. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**:112–122.
- YANG, Z. 2000. *Phylogenetic analysis by maximum likelihood (PAML)*. Version 3.0. University College London, London, U.K.

NARUYA SAITOU, reviewing editor

Accepted December 4, 2001

Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus

(antigenic shift/antigenic drift/dideoxy sequence analysis)

GILLIAN M. AIR

John Curtin School of Medical Research, Australian National University, P.O. Box 334, Canberra, A.C.T. 2601, Australia

Communicated by Frank Fenner, June 3, 1981

ABSTRACT Nucleotide sequences of the 3' 20% of the hemagglutinin gene of 32 influenza A virus strains from the 12 known hemagglutinin subtypes have been determined. Although the sequences of hemagglutinin genes and proteins of different subtypes differ greatly, cysteine and some other amino acid residues are totally conserved, presumably reflecting evolution of the 12 different hemagglutinins from a single gene. When viruses of one subtype, isolated over a period of time, are compared, the hemagglutinin gene and protein sequences show a slow accumulation of nucleotide changes and some amino acid changes. Since sequence data from the genes coding for the matrix and nonstructural proteins also show an accumulation of changes with time, it seems that antigenic selection (of the surface antigens) does not contribute significantly to the rate of change of influenza gene sequences. Although the rate of nucleotide change during drift is more than sufficient to account for the amino acid sequence differences observed in the 12 subtypes, there is a clear distinction, by antigenic as well as sequence analyses, between viruses of one subtype (0-9% amino acid variation) and viruses of other subtypes (20-74% amino acid variation). No virus has yet been found that is intermediate between subtypes.

Influenza remains an uncontrolled disease in man, largely because of variations in the amino acid sequences of the two surface antigens, hemagglutinin (HA) and neuraminidase. Year by year, the influenza A virus becomes progressively more resistant to neutralization by antibody made against older HAs as antigenic changes accumulate. In addition, every so often, a "new" virus appears having such differences in the HA sequence and antigenic properties that it is clearly not derived by mutation from previously circulating viruses. The most recent examples are the appearance of "Asian" flu in 1957 (H2 subtype), "Hong Kong" flu in 1968 (H3 subtype) and "Russian" flu in 1977 (H1 subtype). It is possible that the new HA is normally derived from viruses circulating or sequestered in species other than man (1) and, for this reason, much work has been focused on characterizing influenza A viruses from birds and animals. Currently, 12 subtypes of HA are defined, designated H1-H12 (2), based on lack of serological crossreactivity.

HA contains two polypeptide chains, HA1 and HA2, which are derived by proteolysis of a single precursor molecule that includes loss of a signal peptide (3). Both polypeptides are glycosylated and contain hydrophobic regions (3, 4), making protein sequence analysis difficult. The amino acid sequence has been determined directly for HA1 and HA2 of only one strain of virus, of the Hong Kong (H3) subtype (4) and, in spite of much effort, part of the hydrophobic COOH-terminal sequence of HA2 could not be determined.

On the other hand, the segmented single-stranded genome

is ideal for making a cDNA copy and inserting this into plasmids for amplification in *Escherichia coli* and nucleotide sequence analysis. Thus, the sequences of the fowl plague virus HA gene (H7) (5) and some human strains, an Asian (H2) type (6) and several Hong Kong (H3) strains (7-9), have been determined. From the nucleotide sequences, amino acid sequences were predicted using the genetic code.

When the sequences of these three subtypes of HA (H2, H3, and H7) are compared, at either the nucleotide or amino acid level, they are remarkably dissimilar. The complete lack of antigenic crossreactivity among them is well characterized but, because substitution of a single amino acid can completely destroy interaction between a particular antigenic determinant and monoclonal antibody (10) and because there is a limit to the number of independent determinants on the hemagglutinin (11, 12), the degree of divergence in sequence is remarkable.

This paper describes nucleotide sequence data from the HA genes of 32 virus strains. Most of the influenza sequences published have been derived from cloned cDNA copies (5-9), but there are possibilities of artifacts being introduced during the cloning procedure or cloning an unrepresentative molecule (5, 7). In this study, the sequences have been derived by dideoxy sequence analysis (13) of cDNA primed from the 3' end of the viral RNA strand. The length of sequence obtained ranges up to 380 nucleotides and includes the 5'-noncoding region of the mRNA [except for the extra nucleotides derived from cell mRNA (14)], the signal peptide coding sequence, and the region that codes for up to a third of the HA1 polypeptide. The information for each HA is far from complete but is a significant proportion and of manageable size for detailed comparison.

MATERIALS AND METHODS

Viruses were grown in embryonated eggs and purified by adsorption to and elution from chicken erythrocytes followed by sucrose density-gradient centrifugation (15).

Isolation of HA RNA and sequence analysis of the cDNA by using as primer a synthetic dodecanucleotide complementary to the 3' 12 nucleotides common to all segments of influenza A viral RNA (16) (Collaborative Research, kindly given by C. J. Lai) and the dideoxy method (13, 17) were as described (18, 19). Sequences were obtained from HA genes of the following viruses: H1—A/NWS/33, A/PR/8/34 (Mt. Sinai), A/Bellamy/42, A/USSR/90/77, A/Fort Warren/1/50, A/Loyang/4/57, A/swine/Wisconsin/15/30, A/New Jersey/11/76, H2—A/RI/5-57, A/Tokyo/3/67, A/Netherlands/68, A/Berkeley/68, A/duck/GDR/72, A/duck/Alberta/77/77, A/pintail/Alberta/293/77; H3—A/Memphis/1/71, A/black duck/Australia/702/78, A/duck/Ukraine/1/63; H4—A/duck/Alberta/28/76; H5—A/

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U. S. C. §1734 solely to indicate this fact.

Abbreviations: HA, hemagglutinin; HA1, large HA polypeptide; HA2, small HA polypeptide.

shearwater/Australia/75; H6—A/shearwater/Australia/72; H7—A/turkey/Oregon/71, A/equine/Prague/1/56; H8—A/turkey/Ontario/6118/68; H9—A/turkey/Wisconsin/1/66; H10—A/duck/Manitoba/53; H11—A/duck/England/56, A/duck/Ukraine/1/60, A/tern/Australia/75, A/duck/Memphis/546/76, A/duck/New York/12/78; H12—A/duck/Alberta/60/76.

The sequence data were stored and analyzed in a PDP-11 computer using programs adapted from those of Staden (20) and Gibbs and McIntyre (21). To enhance the accuracy of the data, every experiment was repeated, often many times with differ-

ent virus preparations, and each region of sequence was read from several gels run for different times. The sequence gels of closely related strains were compared and differences were checked. It is, however, not possible to be certain that there is no error in the >10,000 nucleotides sequenced.

RESULTS

Fig. 1 shows the nucleotide and predicted amino acid sequences obtained from HA genes of 12 viruses representing the 12 subtypes.

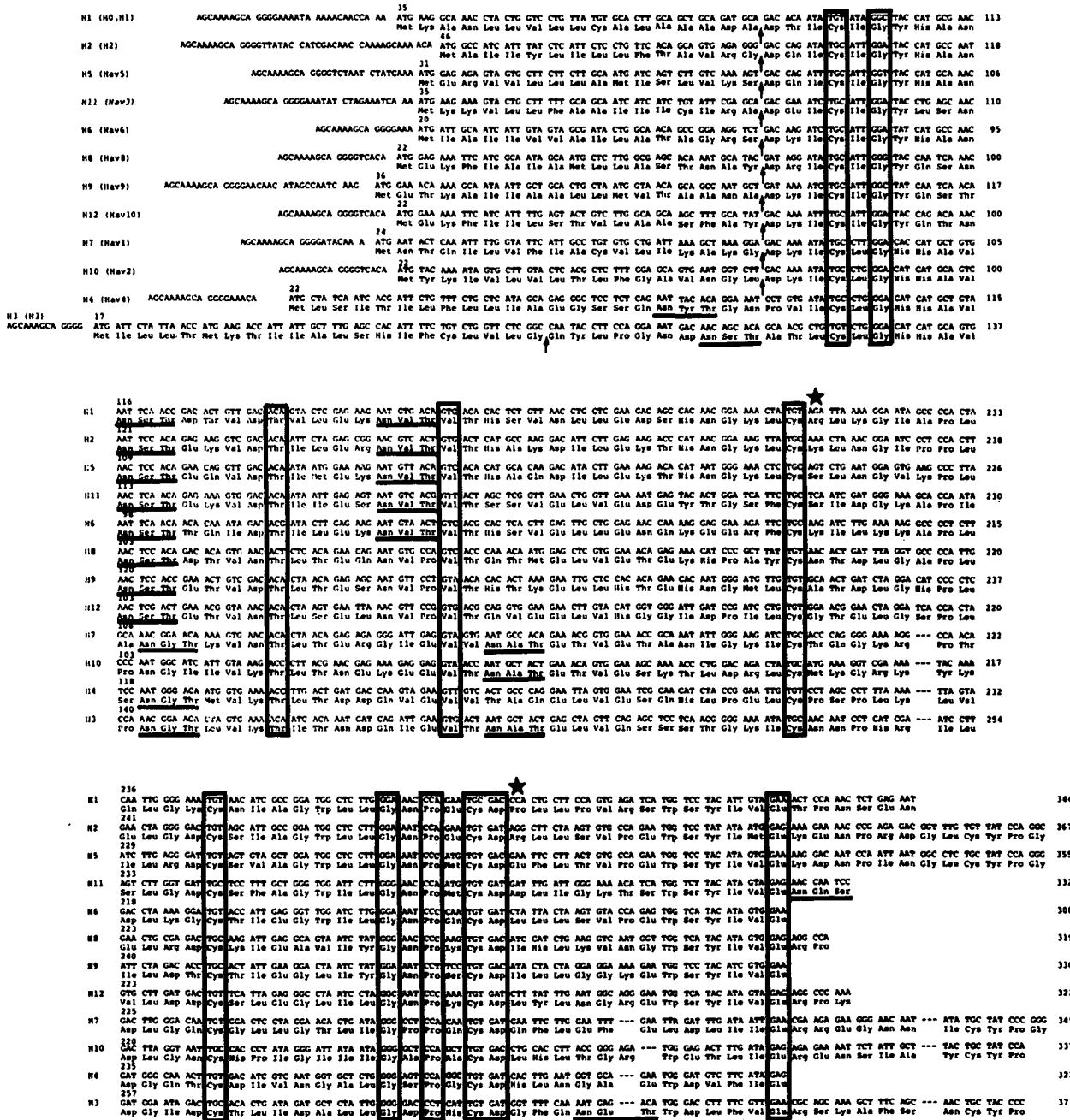


FIG. 1. Sequences of cDNA transcribed from the 3' end of HA genes of viruses representing the 12 HA subtypes and predicted amino acid sequences of the precursor HA. The NH₂-terminal amino acid of HA1 (actual or presumed) is indicated by an arrow, and potential glycosylation sites are underlined. Boxes indicate amino acid residues conserved through all subtypes; *, positions at which most variation is seen. The sequences are aligned at cysteine residues. Those shown are H1, A/PR/8/34; H2, A/R1/5/57; H3, A/Memphis/1/71; H4, A/duck/Alberta/28/76; H5, A/shearwater/Australia/75; H6, A/shearwater/Australia/72; H7, A/turkey/Oregon/71; H8, A/turkey/Ontario/6118/68; H9, A/turkey/Wisconsin/1/66; H10, A/duck/Manitoba/53; H11, A/duck/Memphis/546/76; H12, A/duck/Alberta/60/76.

Table 1. Percentage amino acid sequence identity among the NH₂-terminal regions of HA1 of viruses representing each of the 12 HA subtypes

	H1	H2	H5	H11	H6	H8	H9	H12	H7	H10	H4	H3
H1		69	66	57	62	51	56	49	32	33	29	26
H2			80	54	61	44	56	47	39	35	33	28
H5				56	61	46	53	49	38	36	33	32
H11					61	51	54	49	33	30	29	29
H6						52	56	52	37	35	35	30
H8							65	61	34	31	33	28
H9								67	35	32	35	26
H12									33	34	33	30
H7										49	42	47
H10											44	42
H4												47

The virus strains used are those shown in Fig. 1. Because the signal peptide sequences are so variable, comparisons have been made from the aspartic acid residue at the NH₂-terminus of H1, H2, and H7 (3, 25) and of H5, H11, H6, H8, H9, H10, and H12 (by homology) or from the corresponding amino acid where the NH₂-terminus is longer [H3 (4) and probably H4]. The sequences were compared pairwise by diagonal analysis (21) and percent identity was counted, deletions or insertions being counted as mismatches. A similar analysis of published complete sequences shows that the overall homology between H2 and H7 is 43%, that between H7 and H3 is 49%, and that between H2 and H3 is 42% (5-7).

The Signal Peptides. The amino acid sequences shown in Fig. 1 are those predicted if translation begins at the first ATG of the cDNA sequence (22). Only for the H2 subtype has this ATG been demonstrated to be the start of a signal peptide (23), which is cleaved off at or in the cell membrane during virus maturation. *In vivo*, the mRNA extends beyond the 3' end of the viral strand RNA, having 10-15 nucleotides including the cap spliced on from nonviral mRNAs (14). The sequences of the extra 10-15 nucleotides vary (24) and it is not known what would happen if they contained an AUG sequence. Two inphase ATG sequences are present in several of the cDNA sequences shown in Fig. 1, including one near the start of the H3 (A/Mem/1/71) sequence. In other H3 sequences, only the second ATG is present (7-9), but it is possible that in A/Mem/1/71 the signal peptide is five amino acids longer.

The signal peptide sequences are almost wholly hydrophobic, but little homology is apparent in either nucleotide or amino acid sequences among the different subtypes. There are some amino acid similarities between H5 and H11 and between H8 and H12. The length is variable, as is the position of the first ATG in the cDNA, ranging from nucleotides 15-18 in A/Mem/1/71 (H3) to 44-46 in A/R1/5/57 (H2). There is no set pattern of charged residues before or after the central hydrophobic portion, which is 11-14 residues long.

The NH₂ Terminus of HA1. Viruses of subtypes H1, H2, and H7 have been shown to have aspartic acid at the NH₂ terminus of HA1 (3, 25) and, because all viruses of all subtypes except H3 and H4 have this amino acid at the same position, I have treated this as the NH₂ terminus of the mature HA1. The H3 NH₂ terminus is a cyclized glutamine in A/Mem/102/72 (4), and this is coded by all other H3 strains sequenced, giving an extra 10 amino acids in these strains. The only subtype in which the NH₂ terminus is entirely unknown is H4. Because attempts to directly identify the NH₂-terminal amino acid in this HA1 failed (W. G. Laver, personal communication), a candidate is the glutamine at amino acid 17.

It is clear from Fig. 1 that, although the cysteine residues can be aligned in all subtypes, very few other amino acids are totally conserved. At each of two positions, there are nine different amino acid residues in the 12 sequences, both positions being adjacent to conserved residues. One group of conserved amino acids, Gly-X-Pro-Y-Cys-Asp (Fig. 1), corresponds to a rather tight turn in the three-dimensional structure of Hong Kong (H3) HA derived by Wilson *et al.* (26), and the conservation of these

residues supports their hypothesis that the basic structure of the HA molecule is the same in all subtypes.

Some subtypes are clearly more similar than others; the percentage amino acid identities is shown in Table 1. The relationships are shown as the dendrogram in Fig. 2. The hemagglutinins fall into two main families, the Hong Kong group (H3, H4, H7, and H10) being very different from the rest. The closest pair are H2 and H5 (80% amino acid sequence homology), but no antigenic crossreactivity has been detected between these. One of the three or four putative antigenic areas of the Hong Kong HA1 (12, 26) is present in the 30% of HA1 sequenced and, although what happens in the rest of the molecule does not affect the arguments presented here, it is possible that the partial sequences in Fig. 1 are indeed representative of the whole. Comparisons of complete sequences of H2, H7, and H3 (5-7) show the same relationships as found in the NH₂-terminal regions (Table 1 and Fig. 2).

Sequences Within a Subtype: Genetic (Including Antigenic) Drift. Nucleic acid and peptide analyses have shown that rather large differences in antigenic properties of human viruses within the H3 subtype occur with only about 20 amino acid substitutions, mostly in HA1 (9, 29). Analysis of the cDNA sequences complementary to the 3' end of the HA genes of the H1 subtype of viruses isolated between 1933 and 1957 showed an accumulation of nucleotide changes but very few amino acid

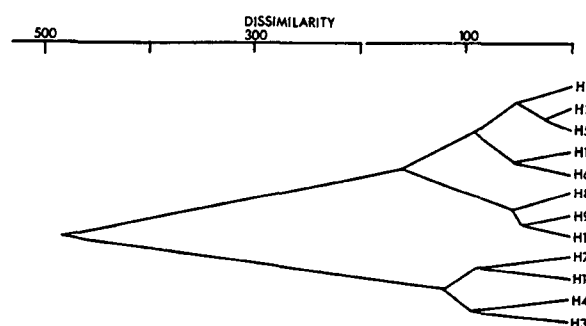


FIG. 2. Sequence relationships among the 12 HA subtypes. "Dissimilarity" was calculated from the amino acid identities shown in Table 1 by the method of Dayhoff (27), which allows for reversions, and then the dendrogram was calculated from these relationships by using the program of Lance and Williams (28) (Euclidean distance, Burr's strategy).

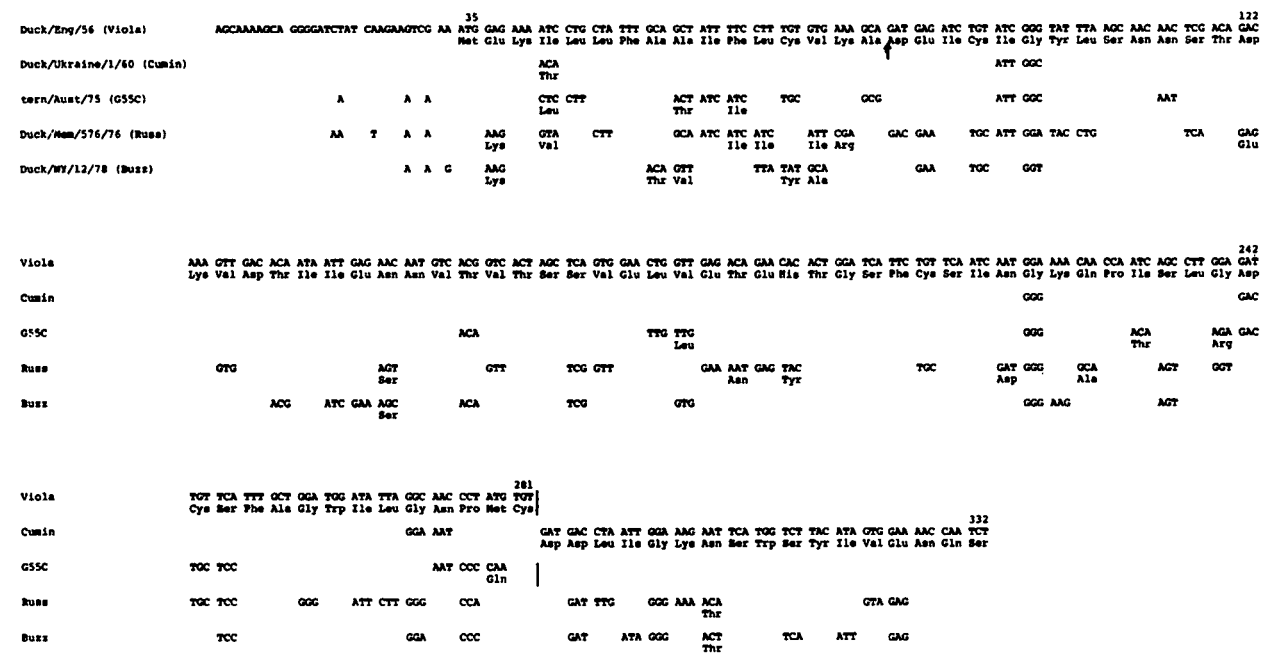


FIG. 3. Genetic drift in the HA gene of the H11 (Hav3) subtype of influenza virus. The nucleotide sequence and predicted amino acid sequence are given for cDNA transcribed from the 3' end of RNA segment 4 of A/duck/England/56. For the other strains, where there is a nucleotide change, the entire codon is shown; if this also involves an amino acid change, the new amino acid is shown. Blank areas therefore indicate regions in which nucleotide and amino acid sequences are identical. Vertical lines indicate the end of data for the strain, and the arrow shows the start of mature HA1.

changes in HA1. Two "swine" strains of this subtype—A/swine/Wisconsin/15/30 and A/New Jersey/11/76—are also highly conserved (30).

Similar sequence analyses of the HA gene of H2 (Asian) strains, isolated from humans in 1957 and at the end of the H2 era (1968), and of three Asian-type strains isolated later from birds (1972 and 1977) showed the same pattern (31). There were many nucleotide changes, but only 6 amino acids changed in the NH₂-terminal 77 amino acids of HA1 through this time. Peptides from HA1 of the late human H2 strains—A/Netherlands/68 and A/Berkeley/68—have been analyzed, and show a similar proportion of changes through the rest of the HA1 polypeptide (unpublished results). The same pattern is seen in subtypes occurring only in birds, such as in H11, shown in Fig. 3. Because these are sporadic isolates from different bird species in different parts of the world, they cannot be considered as an evolutionary series, but the earlier strains are more similar to each other than to later strains and vice versa. There is again high conservation of the amino acid sequence, although there are many nucleotide changes.

Although the numbers of nucleotide changes within a subtype increase with time (30, 31), the vast majority of these are "silent" and do not alter the protein sequence except in the apparently less constrained signal peptides.

DISCUSSION

In the matrix and nonstructural protein genes from human influenza viruses isolated during 1933–1977, we have observed a gradual accumulation of nucleotide (and some amino acid) changes, the rate of change being much the same from 1934 to 1957 (H1) as from 1957 to 1977 (H2 and H3) (32). Genetic drift also appears to occur at a constant rate in the various subtypes of HA. Of particular note is that the H2 (Asian) HA, which underwent antigenic drift in humans from 1957 to 1968, continued to drift in avian hosts at least up to 1977 (31, 33). The rate of amino acid change within a subtype is not significantly

greater than that observed in the neuraminidase gene (19) or in the nonselected genes coding for the matrix and nonstructural proteins, which have also changed with time (32). As new variants of HA appear, the older viruses disappear, but isolations of an old virus are sometimes reported [e.g., Hong Kong/68 from South Australia in 1979 (34)]. In the best documented and most widespread case of reappearance, a 1950-type of H1N1 virus was isolated in 1977 (35). This virus was a relatively late member of the H1 era in humans and, although the subtype disappeared from humans in 1957, the 1977 virus caused major epidemics following its reappearance and has since drifted significantly (36). The close relationship of the A/USSR/90/77 strain to A/FW/1/50 (2 nucleotide differences in 335—adenosine at position 31 and thymidine at 182; see ref. 30) indicates that this virus was not replicating during its disappearance.

Fig. 1 shows that the nucleotide sequence changes between even the closest subtypes are much greater than any changes within subtypes (refs. 30 and 31; Fig. 3). At the amino acid sequence level, the relationships shown in Fig. 2 are clearly seen, but there is still a marked gap between the most dissimilar strains within a subtype (A/duck/England/56 vs. A/duck/Memphis/546/76, H11; Fig. 3) and the most similar pair of subtypes (H2 and H5). In most subtypes in which several strains have been examined [H1 (30), H2 (31), and H3 (9)], there are so few amino acid differences that it is impossible to tell whether the subtype is drifting toward any other. In H11 (Fig. 3), which shows rather more variation, the other viruses of the subtype are no more similar to any other subtype than the example used in Fig. 2.

Three conclusions can be drawn from the sequence data. (i) Drift within HA subtypes has been continuous at an overall rate of 5% nucleotide change per 20 years, with very few observed reversions of nucleotides for at least 27 years (human H1 strains), 45 years (swine H1), 21 years (H2), and 22 years (H11). The H11 subtype shows drift, even though viruses of different bird species from different parts of the world (England,

Ukraine, USA, and Australia) were compared (Fig. 3). The H2 subtype drifted in human hosts for 12 years and, although slightly diversified at the end of its human era (A/Tokyo/3/67, A/Berkeley/68 and A/Netherlands/68), a remarkably similar virus appeared in bird species and continued to drift for at least 9 years more (31). Some host specificity is seen. The H1 subtype in humans drifted between 1933 and 1956. The H1 swine virus, a probable cause of the 1918 human epidemic, is very similar in HA sequence to the human H1 viruses (30), but there are characteristic differences suggesting that it evolved independently of the human strains between 1930 and 1976. However, in the H3 subtype, it is not clear from sequence data whether a 1978 avian virus (A/black duck/Australia/702/78) is derived from duck/Ukraine/1/63 or from later human H3 strains (31).

(ii) The rate of sequence change in the HA gene is not significantly greater than that in the antigenically unselected genes.

(iii) Drift in any HA subtype sequence has not been observed to tend toward any other subtype.

There is a clear distinction between the extent of amino acid variation within subtypes (0–9%) and that between subtypes (20–74%). Although it is obvious that, if drift continued over a long period of time, the sequence variation would easily exceed that between subtypes, but there is currently no evidence that drift can proceed indefinitely; no viruses have been found that are intermediate between subtypes.

The different subtypes of HA are not confined to different species; all subtypes have been grown in embryonated chicken eggs, indicating that HA subtypes are not species specific, although transmission to other species may be relatively rare. Drift occurs in human, bird, and animal hosts, in HA and other genes. As drift proceeds, the earlier strains disappear, except for scattered but perhaps significant reappearances (34). The data presented here give no hint of the mechanisms underlying two extremes of influenza virus evolution—i.e., how a 1950 H1N1 virus reappeared almost unchanged in 1977 or how 12 subtypes that have little recognizable nucleotide sequence homology but various degrees of amino acid sequence homology have evolved.

I thank Dr. Adrian Gibbs for the computer analysis to generate Table 1 and Fig. 2 and Anne Mackenzie, Sally Campbell, and Kathy Fry for expert technical assistance. This work was supported in part by Grant A1 15343 from the National Institutes of Health, and by the Australian Government Poultry Industry Trust Fund.

1. Laver, W. G. & Webster, R. G. (1979) *Br. Med. Bull.* 35, 29–34.
2. World Health Organization (1980) *Memo. Bull. W. H. O.* 58, 585–591.
3. Waterfield, M. D., Espelie, K., Elder, K. & Skehel, J. J. (1979) *Br. Med. Bull.* 35, 57–64.
4. Ward, C. W. & Dopheide, T. A. (1980) in *Structure and Variation in Influenza Virus*, eds. Laver, W. G. & Air, G. M. (Elsevier, Amsterdam), pp. 27–38.
5. Porter, A. G., Barber, C., Carey, N. H., Hallowell, R. A., Threlfall, G. & Emtage, J. S. (1979) *Nature (London)* 282, 471–477.
6. Gething, M. J., Bye, J., Skehel, J. & Waterfield, M. (1980) *Nature (London)* 287, 301–306.
7. Sleight, M. J., Both, G. W., Brownlee, G. G., Bender, V. J. & Moss, B. A. (1980) in *Structure and Variation in Influenza Virus*, eds. Laver, W. G. & Air, G. M. (Elsevier, Amsterdam), pp. 69–80.
8. Min Jou, W., Verhoeven, M., Devos, R., Saman, E., Fang, R., Huylebroeck, D., Fiers, W., Threlfall, G., Barber, C., Carey, N. & Emtage, S. (1980) *Cell* 19, 683–696.
9. Verhoeven, M., Fang, R., Min Jou, W., Devos, R., Huylebroeck, D., Saman, E. & Fiers, W. (1980) *Nature (London)* 286, 771–776.
10. Laver, W. G., Air, G. M., Webster, R. G., Gerhard, W., Ward, C. W. & Dopheide, T. A. (1979) *Virology* 98, 226–237.
11. Yewdell, J., Webster, R. G. & Gerhard, W. (1979) *Nature (London)* 279, 246–248.
12. Webster, R. G. & Laver, W. G. (1980) *Virology* 104, 139–148.
13. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
14. Plotch, S. J., Bouloy, M. & Krug, R. M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1618–1622.
15. Laver, W. G. (1969) in *Fundamental Techniques in Virology*, eds. Habel, K. & Salzman, N. P. (Academic, New York), pp. 82–86.
16. Skehel, J. J. & Hay, A. J. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 1207–1219.
17. Sanger, F. & Coulson, A. R. (1978) *FEBS Lett.* 87, 107–110.
18. Air, G. M. (1979) *Virology* 97, 468–472.
19. Blok, J. & Air, G. M. (1980) *Virology* 107, 50–60.
20. Staden, R. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 2601–2610.
21. Gibbs, A. J. & McIntyre, G. A. (1970) *Eur. J. Biochem.* 16, 1–11.
22. Kozak, M. (1978) *Cell* 15, 1109–1123.
23. Elder, K. T., Bye, J. M., Skehel, J. J., Waterfield, M. D. & Smith, A. E. (1979) *Virology* 95, 343–350.
24. Lai, C. J., Markoff, L. J., Sveda, M., Dhar, R. & Chanock, R. M. (1980) in *Structure and Variation in Influenza Virus*, eds. Laver, W. G. & Air, G. M. (Elsevier, Amsterdam), pp. 115–123.
25. Bucher, D. J., Li, S. S. L., Kehoe, J. M. & Kilbourne, E. D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 238–242.
26. Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1981) *Nature (London)* 289, 366–372.
27. Dayhoff, M. O. (1972) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (Natl. Biomed. Res. Found., Silver Spring, MD), Vol. 5.
28. Lance, G. N. & Williams, W. T. (1967) *Aust. Comput. J.* 1, 15–20.
29. Laver, W. G., Air, G. M., Dopheide, T. A. & Ward, C. W. (1980) *Nature (London)* 283, 454–457.
30. Air, G. M., Blok, J. & Hall, R. M. (1981) in *Replication of Negative Strand Viruses*, eds. Bishop, D. H. L. & Compans, R. W. (Elsevier, Amsterdam), 225–239.
31. Air, G. M. & Hall, R. M. (1981) in *ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, eds. Nayak, D. & Fox, C. F. (Academic, NY), Vol. 22, in press.
32. Hall, R. M. & Air, G. M. (1981) *J. Virol.* 38, 1–7.
33. Hinshaw, V. S., Webster, R. G., Bean, W. J. & Sriram, G. (1980) *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 3, 155–164.
34. Moore, B. W., Webster, R. G., Bean, W. J., van Wyke, K. L., Laver, W. G., Evered, M. G. & Downie, J. C. (1981) *Virology* 109, 219–222.
35. Nakajima, D., Desselberger, U. & Palese, P. (1978) *Nature (London)* 274, 334–339.
36. Young, J. F., Desselberger, W. & Palese, P. (1979) *Cell* 18, 73–83.

Nucleotide

Display Settings: GenBank

Influenza A virus (A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds

GenBank: AF144305.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS	AF144305	1760 bp	cRNA	linear	VRL 10-JUL-2007
DEFINITION	Influenza A virus (A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds.				
ACCESSION	AF144305				
VERSION	AF144305.1 GI:5805286				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Influenza A virus (A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1))				
ORGANISM	Influenza A virus (A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1)) Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae; Influenzavirus A.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1760)				
AUTHORS	Xu,X., Subbarao, Cox,N.J. and Guo,Y.				
TITLE	Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong				
JOURNAL	Virology 261 (1), 15-19 (1999)				
PUBMED	10484749				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1760)				
CONSRTM	World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network				
TITLE	Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia				
JOURNAL	Emerging Infect. Dis. 11 (10), 1515-1521 (2005)				
PUBMED	16318689				
REFERENCE	3 (bases 1 to 1760)				
AUTHORS	Xu,X., Subbarao,K., Cox,N.J. and Guo,Y.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (20-APR-1999) Influenza Branch, Center for Diseases Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1760 /organism="Influenza A virus (A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1))" /mol_type="viral cRNA" /strain="A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)" /db_xref="taxon:93838"				
gene	22..1728 /gene="HA"				
CDS	22..1728 /gene="HA" /codon_start=1 /product="hemagglutinin" /protein_id="A051927.1" /db_xref="GI:5805287" /translation="MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVT AQQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMDEFINVPWSYIVEKASPA NDLCYPGDFNDYEEKHLLSRTNHFEKIQIIPKSSWSNHDASSGVSSACPYHGRSSFF RNVVWLKKNSAYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYSVGT STLNQRLVPEIATRPKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKSRLVLATGLR NTPQRRRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAID GVTNKVNSIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKQMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPQY SEEARLNREEISGVKLESMTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNGLQCRIC I"				
misc_feature	76..1725 /gene="HA" /note="Haemagglutinin; Region: Hemagglutinin; pfam00509" /db_xref="CDD:249917"				
ORIGIN	1 gcaggggtat aatctgtcaa aatggagaaa atagtgttc ttcttgcaat agtcagtctt 61 gtcaaaagtg atcagatttg cattggttac catgcaaaca actcgacaga gcaggttgac 121 acaataatgg aaaagaacgt tactgttaca catgccaag acatactgga aaagacacac 181 aatgggaagc tctgcgatct aaatggagtg aagcctctca ttttgagaga ttgtagtgtg 241 gctggatggc tcctcgaaa ccctatgtgt gacgaattca tcaatgtgcc ggaatggtct 301 tacatagtgg agaaggccag tccagccaat gacctctgtt acccagggga tttcaacgac				

361 tatgaagaac tgaaacacct attgagcaga acaaaccatt ttgagaaaat tcagatcatc
421 cccaaaagt cttggtccaa tcatgatgcc tcatcagggg tgagctcagc atgtccatac
481 catgggaggt cctccttttt cagaaatgtg gtatggctta tcaaaaagaa cagtgcatac
541 ccaacaataa agaggagcta caataatacc aaccaagaag atcttttagt actgtggggg
601 attcaccatc ctaatgatgc ggcagagcag acaaagctct atcaaaaccc aaccacttac
661 atttcctgtg gaacatcaac actgaaccag agattggttc cagaaatagc tactagacct
721 aaagtaaacg ggcaaatggg aagaatggag ttcttctgga caatttttaa gccgaatgat
781 gccatcaatt tcgagagtaa tggaaatttc attgctccag aatatgcata caaaattgtc
841 aagaagggg actcagcaat tatgaaaagt gaattggaat atggtaactg caacaccaag
901 tgtcaaaact caatgggggc gataaactct agtatgccat tccacaacat acacccctc
961 accatcgggg aatgccccaa atatgtgaaa tcaaacagat tagtccttgc gactggactc
1021 agaaataccc ctcaagagaga gagaagaaga aaaaagagag gactatttgg agctatagca
1081 ggttttatag agggaggatg gcagggaatg gtagatggtt ggtatgggta ccaccatagc
1141 aatgagcagg ggagtggata cgctgcagac aaagaatcca ctcaaaaggc aatagatgga
1201 gtcaccaata aggtcaactc gatcattgac aaaatgaaca ctcagtttga ggccgttgga
1261 agggaattta ataacttga aaggaggata gagaatttaa acaagcagat ggaagacgga
1321 ttcttagatg tctggactta taatgctgaa cttctggttc tcatggaaaa tgagagaact
1381 ctagactttc atgactcaaa tgtcaagaac ctttatgaca aggtccgact acagcttagg
1441 gataatgcaa aggagctggg taatggttgt ttcgagttct atcacaatg tgataatgaa
1501 tgtatggaaa gtgtaaaaaa cggaaactat gactaccgcg agtattcaga agaagcaaga
1561 ctaaacagag aggaataaag tggagtataa ttggaatcaa tgggaactta ccaataactg
1621 tcaattttatt caacagtggc gagttcccta gcactggcaa tcatggtagc tggcttatct
1681 ttatggatgt gctccaatgg atcggtacaa tgcagaattt gcattttaat ttgtgagttc
1741 agattgtagt taaaaacacc

//



US007871626B2

(12) **United States Patent**
Hoffmann et al.

(10) **Patent No.:** **US 7,871,626 B2**
(45) **Date of Patent:** **Jan. 18, 2011**

(54) **MODIFIED INFLUENZA VIRUS FOR MONITORING AND IMPROVING VACCINE EFFICIENCY**

(75) Inventors: **Erich Hoffmann**, Memphis, TN (US);
Aleksandr S. Lipatov, Bartlett, TN (US); **Richard J. Webby**, Memphis, TN (US); **Elena A. Govorkova**, Cordova, TN (US); **Robert G. Webster**, Memphis, TN (US)

(73) Assignee: **St. Jude Children's Research Hospital**, Memphis, TN (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **11/460,584**

(22) Filed: **Jul. 27, 2006**

(65) **Prior Publication Data**
US 2007/0031453 A1 Feb. 8, 2007

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/705,808, filed on Aug. 4, 2005.

(51) **Int. Cl.**
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.** **424/206.1; 424/205.1; 424/199.1; 424/186.1; 424/185.1; 424/209.1; 424/93.6; 435/5; 435/69.1; 530/350**

(58) **Field of Classification Search** **None**
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**
U.S. PATENT DOCUMENTS

6,719,979 B2 4/2004 Peeters et al.
6,740,325 B1 5/2004 Arnon et al.

OTHER PUBLICATIONS

Hien et al., Avian Influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam, 2004, New England Journal of Medicine, vol. 350, No. 12, pp. 1179-1188.*
Li et al., Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia, 2004, Nature, vol. 430, pp. 209-213.*
Stephenson et al., Cross-Reactivity to Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses after Vaccination with Nonadjuvanted and MF59-Adjuvanted Influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) Vaccine: A Potential Priming Strategy, 2005, Journal of Infectious Diseases, vol. 191, pp. 1210-1215.*

Glaser et al., A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity, 2005, Journal of Virology, vol. 79, No. 17, pp. 11533-11536.*

Lee et al., Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilizations of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza, 2004, Vaccine, vol. 22, pp. 3175-3181.*

Hatta et al., Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses, 2001, Science, vol. 293, pp. 1840-1842.*

Martin et al., Studies of the Binding Properties of Influenza Hemagglutinin Receptor-Site Mutants, 1998, Virology, vol. 241, pp. 101-111.*

Both, et al., 1983. "Hemagglutinin of Swine Influenza Virus: A Single Amino Acid Change Pleiotropically Affects Viral Antigenicity and Replication". PNAS 80: 6996-7000.

Gambaryan, et al., 2005. "Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain". Virology 334: 276-283.

Hoffman, et al., 2000. "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids". PNAS 97: 6108-6113.

Govorkova, et al., 2005. "Lethality of Ferrets of H5N1 Influenza Viruses Isolated from Humans and Poultry in 2004". Journal of Virology 79: 2191-2198.

Hague et al., Confronting Potential Influenza A (H5N1) Pandemic with Better Vaccines, Emerging Infectious Diseases, 2007, 13 (10):1512-1518.

Hoffmann et al., Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2005, 102 (36):12915-12920.

Neumann and Kawaoka, Host Range Restriction and Pathogenicity in the Context of Influenza Pandemic, Emerging Infectious Diseases, 2006, 12 (6):881-886.

Takahashi et al., Protective Immunity Afforded by Inactivated H5N1 (NIBRG-14) Vaccine Requires Antibodies against Both Hemagglutinin and Neuraminidase in Mice, The Journal of Infectious Diseases, 2009, 199 (11):1629-1637.

Y. Guan, et al., "H5N1 influenza: A protean pandemic threat", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004, 101(21):8156-8161.

B. Lewin, "Genes VII", Oxford Univ. Press, 2000, p. 778.

* cited by examiner

Primary Examiner—Zachariah Lucas
Assistant Examiner—Benjamin P Blumel
(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Fish & Richardson P.C.

(57) **ABSTRACT**

The immunogenicity of the influenza virus hemagglutinin (HA) molecule may be increased by substitutions of amino acids in the HA sequence. The substitution of specific HA residues, such as asparagine at position 223 of H5 HA, increase the sensitivity of the hemagglutinin inhibition (HI) assay by altering receptor specificity and/or antibody-antigen binding. HA molecules containing such substitutions will be useful in the development of diagnostic reference viruses and improved influenza vaccines.

21 Claims, 3 Drawing Sheets



(12) **United States Patent**
Hoffmann et al.

(10) **Patent No.:** **US 8,293,247 B2**
(45) **Date of Patent:** **Oct. 23, 2012**

- (54) **MODIFIED INFLUENZA VIRUS FOR MONITORING AND IMPROVING VACCINE EFFICIENCY**
- (75) Inventors: **Erich Hoffmann**, Galveston, TX (US); **Aleksandr S. Lipatov**, Atlanta, GA (US); **Richard J. Webby**, Memphis, TN (US); **Elena A. Govorkova**, Cordova, TN (US); **Robert G. Webster**, Memphis, TN (US)
- (73) Assignee: **St. Jude Children's Research Hospital**, Memphis, TN (US)
- (*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

- (21) Appl. No.: **12/964,491**
- (22) Filed: **Dec. 9, 2010**
- (65) **Prior Publication Data**
US 2011/0104202 A1 May 5, 2011

- Related U.S. Application Data**
- (62) Division of application No. 11/460,584, filed on Jul. 27, 2006, now Pat. No. 7,871,626.
- (60) Provisional application No. 60/705,808, filed on Aug. 4, 2005.
- (51) **Int. Cl.**
A61K 39/145 (2006.01)
- (52) **U.S. Cl.** **424/206.1; 424/205.1; 424/199.1; 424/188.1; 424/185.1; 424/209.1; 424/93.6; 435/5; 435/69.1; 530/350**
- (58) **Field of Classification Search** None
See application file for complete search history.

- (56) **References Cited**
- U.S. PATENT DOCUMENTS**
- 6,719,979 B2 4/2004 Peeters et al.
6,740,325 B1 5/2004 Amon et al.
2005/0003349 A1* 1/2005 Kawaoka 435/5

- OTHER PUBLICATIONS**
- Lipatov et al., Efficacy of H5 Influenza Vaccines Produced by Reverse Genetics in a Lethal Mouse Model, Mar. 14th, 2005, Journal of Infectious Disease, vol. 191, pp. 1216-1220.*
Genbank Accession: AAT39066, hemagglutinin [Influenza A virus (A/hk/213/03 (H5N1))], 2004.*
Sanofi-Pasteur, 271/371 Fluzone, 372 Fluzone High-Dose, 390 Fluzone Intradermal, 2011, Vaccine Package Insert, pp. 1-34.*
Guan et al., "H5N1 influenza: A protein pandemic threat", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004, 101 (21), pp. 8156-8161.
Lewin, "Genes VII", Oxford Univ. Press, 2000, p. 778.
Haque et al., "Confronting Potential Influenza A (H5N1) Pandemic with Better Vaccines", Emerging Infectious Diseases, 2007, 13 (10), pp. 1512-1518.
Hoffman et al., "Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2005, 102 (36), pp. 12915-12920.

- Neumann and Kawaoka, "Host Range Restriction and Pathogenicity in the Context of Influenza Pandemic", Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6), pp. 881-886.
Takahashi et al., "Protective Immunity Afforded by Inactivated H5N1 (NIBRG-14) Vaccine Requires Antibodies against both Hemagglutinin and Neuraminidase in Mice", The Journal of Infectious Diseases, 2009, 199(11), pp. 1629-1637.
Hatta et al., "Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses", Science, 2001, 293, pp. 1840-1842.
Martin et al., "Studies of the Binding Properties of Influenza Hemagglutinin Receptor-Site Mutants", Virology, 1998, 241, pp. 101-111.
Both et al., "Hemagglutinin of Swine Influenza Virus: A Single Amino Acid Change Pleiotropically Affects Viral Antigenicity and Replication", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1983, 80, pp. 6996-7000.
Gambrayan et al., "Receptor Specificity of influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of inner fragments of the carbohydrate chain", Virology, 2005, 334, pp. 276-283.
Hoffman et al., "A DNA Transfection System for Generation of Influenza A virus from eight plasmids", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2000, 97, pp. 6108-6113.
Govorlova et al. "Lethality of Ferris of H5N1 Influenza Viruses Isolated from Humans and Poultry in 2004", Journal of Virology, 2005, 79, pp. 2191-2198.
Lee et al., "Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza", Vaccine, 2004, 22, pp. 3175-3181.
Hein et al., "Avian Influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam", New England Journal of Medicine, 2004, 350(12), pp. 1179-1188.
Li et al., "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia", Nature, 2004, 430, pp. 209-213.
Stephenson et al., "Cross-Reactivity to Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses after Vaccination with Nonadjuvanted and MF59-Adjuvanted Influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) Vaccine: A Potential Priming Strategy", Journal of Infectious Diseases, 2005, 191, pp. 1210-1215.
Glaser et al., "A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity", Journal of Virology, 2005, 79(17), pp. 11533-11536.
GenBank accession: ABW90135.1, hemagglutinin [Influenza A virus (A/VietNam/1203/2004(H5N1))], 2007. Kilbourne, Edwin D., "Genetic dimorphism in influenza viruses: Characterization of stably associated hemagglutinin mutants differing in antigenicity and biological properties", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, pp. 6258-6262, 1978.
Ha, Ya, et al., "H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes", EMBO J., vol. 21, pp. 865-875, 2002.

- * cited by examiner
- Primary Examiner** — Benjamin P Blumel
(74) **Attorney, Agent, or Firm** — Fish & Richardson P.C.

- (57) **ABSTRACT**
- The immunogenicity of the influenza virus hemagglutinin (HA) molecule may be increased by substitutions of amino acids in the HA sequence. The substitution of specific HA residues, such as asparagine at position 223 of H5 HA, increase the sensitivity of the hemagglutinin inhibition (HI) assay by altering receptor specificity and/or antibody-antigen binding. HA molecules containing such substitutions will be useful in the development of diagnostic reference viruses and improved influenza vaccines.

19 Claims, 3 Drawing Sheets



(12) **United States Patent**
Hoffmann et al.

(10) **Patent No.:** **US 8,574,592 B2**
(45) **Date of Patent:** ***Nov. 5, 2013**

- (54) **MODIFIED INFLUENZA VIRUS FOR MONITORING AND IMPROVING VACCINE EFFICIENCY**
- (75) **Inventors:** **Erich Hoffmann**, Galveston, TX (US); **Aleksandr S. Lipatov**, Atlanta, GA (US); **Richard J. Webby**, Memphis, TN (US); **Elena A. Govorkova**, Cordova, TN (US); **Robert G. Webster**, Memphis, TN (US)
- (73) **Assignee:** **St. Jude Children’s Research Hospital**, Memphis, TN (US)
- (*) **Notice:** Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.
This patent is subject to a terminal disclaimer.
- (21) **Appl. No.:** **13/614,835**
- (22) **Filed:** **Sep. 13, 2012**
- (65) **Prior Publication Data**
US 2013/0017216 A1 Jan. 17, 2013
- Related U.S. Application Data**
- (62) Division of application No. 12/964,491, filed on Dec. 9, 2010, now Pat. No. 8,293,247, which is a division of application No. 11/460,584, filed on Jul. 27, 2006, now Pat. No. 7,871,626.
- (60) Provisional application No. 60/705,808, filed on Aug. 4, 2005.
- (51) **Int. Cl.**
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
- (52) **U.S. Cl.**
USPC **424/206.1; 424/205.1; 424/199.1; 424/186.1; 424/185.1; 424/209.1; 424/93.6; 435/5; 435/69.1; 530/350**
- (58) **Field of Classification Search**
None
See application file for complete search history.

- (56) **References Cited**
U.S. PATENT DOCUMENTS
6,719,979 B2 4/2004 Peeters et al.
6,740,325 B1 5/2004 Arnon et al.
7,871,626 B2 * 1/2011 Hoffmann et al. 424/206.1
2005/0003349 A1 1/2005 Kawaoka

OTHER PUBLICATIONS
GenBank Accession# ABP51975, hemagglutinin [Influenza A virus (A/Hong Kong/213/2003 (H5N1))], Apr. 21, 2007.*
Both et al., “Hemagglutinin of SWine Influenza Virus: A Single Amino Acid Change Pleiotropically Affects Viral Antigenicity and

Replication”, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1983, vol. 80, pp. 6996-7000.
Gambrayan et al., “Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain”, Virology, 2005, vol. 334, pp. 276-283.
Genbank Accession: AAT39066, hemagglutinin [Influenza A virus (A/HK/213/03 (H5N1))], 2004.
Genbank Accession: ABW90135.1, hemagglutinin [Influenza A virus (A/VietNam/1203/2004(H5N1))], 2007.
Glaser et al., “A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity”, Journal of Virology, 2005, vol. 79, pp. 11533-11536.
Govorkova et al., “Lethality of Ferrets of H5N1 Influenza Viruses Isolated from Humans and Poultry in 2004”, Journal of Virology, 2005, vol. 79, pp. 2191-2198.
Guan et al., “H5N1 influenza: A protean pandemic threat”, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004, vol. 101, pp. 8156-8161.
Ha et al., “H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes”, The EMBO Journal, vol. 2, pp. 865-875, 2002.
Haque et al., “Confronting Potential Influenza A (H5N1) Pandemic with Better Vaccines”, Emerging Infectious Diseases, 2007, vol. 13, pp. 1512-1518.
Hatta et al., “Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses”, Science, 2001, vol. 293, pp. 1840-1842.
Hien et al., “Avian Influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam”, New England Journal of Medicine, 2004, vol. 350, pp. 1179-1188.
Hoffmann et al., “Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines”, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2005, vol. 102, pp. 12915-12920.
Hoffmann, et al., “A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids”, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2000, vol. 97, pp. 6108-6113.
Kilbourne, “Genetic dimorphism in influenza viruses: Characterization of stably associated hemagglutinin mutants differing in antigenicity and biological properties”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, pp. 6258-6262, 1978.
Lee et al., “Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilizations of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza”, Vaccine, 2004, vol. 22, pp. 3175-3181.
Lewin, G., “Genes VII”, Oxford Univ. Press, 2000, p. 778.
Li et al., “Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia”, Nature, 2004, vol. 430, pp. 209-213.
Lipatov et al., “Efficacy of H5 Influenza Vaccines Produced by Reverse Genetics in a Lethal Mouse Model”, Journal of Infectious Disease, 2005, vol. 191, pp. 1216-1220.
Martin et al., “Studies of the Binding Properties of Influenza Hemagglutinin Receptor-Site Mutants”, Virology, 1998, vol. 241, pp. 101-111.
Neumann and Kawaoka, “Host Range Restriction and Pathogenicity in the Context of Influenza Pandemic”, Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6), pp. 881-886.

(Continued)
Primary Examiner — Benjamin P Blumel
(74) **Attorney, Agent, or Firm** — Troutman Sanders LLP

(57) **ABSTRACT**
The immunogenicity of the influenza virus hemagglutinin (HA) molecule may be increased by substitutions of amino acids in the HA sequence. The substitution of specific HA residues, such as asparagine at position 223 of H5 HA, increase the sensitivity of the hemagglutinin inhibition (HI) assay by altering receptor specificity and/or antibody-antigen binding. HA molecules containing such substitutions will be useful in the development of diagnostic reference viruses and improved influenza vaccines.

20 Claims, 3 Drawing Sheets

Parent

(21) 2008107875/10

(51) IPC

C07K 14/11 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/44 (2006.01)

(57)

1. A recombinant influenza-A-virus H5-subtype hemagglutinin (H5 HA) molecule having reactivity with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus or influenza vaccine and comprising an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA, wherein the HA molecule does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03.
2. A recombinant HA molecule of claim 1, characterised in that it comprises one or more amino acid substitution as compared to a corresponding wild-type HA molecule; wherein said recombinant HA molecule comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA; wherein said wild-type HA molecule comprises an amino acid other than asparagine at an amino acid position corresponding to said amino acid position 223.
3. The recombinant influenza virus HA molecule of claim 1, characterised in that the amino acid substitution alters a glycosylation site.
4. The recombinant influenza virus HA molecule of claim 1, characterised in that the influenza virus is a human influenza A virus.
5. The recombinant influenza virus HA molecule of claim 4, characterised in that the human influenza A virus is a member of the H5 subtype.
6. The recombinant influenza virus HA molecule of claim 4, characterised in that the human influenza A virus is A/Vietnam/1203/04 (H5N1) virus.

7. A recombinant influenza-A-virus H5-subtype for the detection of anti-influenza antibodies in an animal exposed to an influenza virus or influenza vaccine comprising the recombinant influenza-A-virus H5-subtype hemagglutinin (HA) of claim 1.
8. An vaccine influenza-A-virus H5-subtype, having immunogenic activity and comprising a recombinant influenza-A-virus H5-subtype hemagglutinin (H5 HA) molecule wherein said recombinant HA molecule comprises one or more amino acid substitution as compared to a corresponding wild-type HA molecule, wherein said recombinant HA molecule comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA; wherein said wild-type HA molecule comprises an amino acid other than asparagine at an amino acid position corresponding to said amino acid position 223.
9. An influenza vaccine virus comprising a recombinant hemagglutinin (HA) molecule of influenza-A-virus H5 subtype according to claim 1.

(56)

BOTH G.W. et al., "Hemagglutinin of swine influenza virus: a single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication", Proc Natl Acad Sci USA. 1983

Nov;80(22):6996-7000.

GAMBARYAN A. et al., "Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain", Virology. 2005

Apr 10;334(2):276-83.

US 6719979 B2, 13.04.2004.

For the publication of the given patent there will be used the specification as originally filed by the Applicant with original drawings.

Enclosure: Abstract adapted by the Examiner, 1 page, 1 copy.

Deputy Head of the Department
for Biotechnology

(signature)

O.V. Skorodumova

(21) 2011 103 648/10

(51) IPC

C07K 14/11 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

(57)

1. A method for preventing influenza A of subtype H5 viral infection in a subject comprising administering to the subject an effective amount of an immunogenic composition comprising an influenza virus H5 hemagglutinin (HA) molecule, wherein the HA molecule comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA.
2. The method of claim 1, wherein the HA molecule is a recombinant HA molecule that comprises one or more amino acid sequence changes as compared to a naturally occurring HA molecule that comprises an amino acid other than asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA.
3. The method of claim 2, wherein the HA molecule results in an increased immunogenicity of the immunogenic composition as compared to the naturally occurring HA molecule.
4. The method of claim 1, wherein the immunogenic composition further comprises an adjuvant.
5. The method of claim 1, wherein the immunogenic composition further comprises an immunostimulatory molecule.
6. The method of claim 1, wherein the immunogenic composition further comprises microcapsules and/or an immunopotentiating membranous carrier.
7. The method of claim 1, wherein the immunogenic composition further comprises red blood cells (rbc), rbc ghosts, or blue tongue antigen.
8. The method of claim 1, wherein the immunogenic composition is administered intramuscularly, orally or mucosally.

9. The method of claim 1, wherein the influenza viral infection is caused by an H5N1 influenza virus.
10. The method of claim 2, wherein the one or more amino acid sequence changes alter a glycosylation site.
11. The method of claim 2, wherein the naturally occurring HA molecule is from a human influenza A virus.
12. The method of claim 2, wherein the naturally occurring HA molecule is from an avian influenza virus.
13. The method of claim 2, wherein the asparagine at amino acid position 223 of the HA molecule alters specificity for sialic acid receptors.
14. The method of claim 2, wherein the naturally occurring HA molecule comprises a serine at an amino acid position equivalent to the amino acid position 223.
15. The method of claim 1, wherein the HA molecule is part of a recombinant or attenuated virus.
16. The method of claim 1, wherein the subject is a human.
17. The method of claim 1, wherein the subject is a mammal or a bird.
18. A method for determining the efficacy of an influenza A of subtype H5 virus vaccine in a subject, which method comprises reacting antisera derived from the vaccinated subject with an influenza virus comprising a H5 hemagglutinin (HA) molecule, wherein the HA molecule comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA, to further determine the efficacy of the vaccine according to the antibody titers.
19. The method of claim 18, wherein the influenza virus is a recombinant virus.
20. The method of claim 18, wherein the HA molecule is a recombinant HA molecule that comprises one or more amino acid sequence changes as compared to a naturally occurring HA molecule that comprises an amino acid other than asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA.

21. The method of claim 20, wherein the HA molecule has an increased reactivity with antisera derived from a subject exposed to an H5 influenza virus or an H5 influenza vaccine as compared to the naturally occurring HA molecule.

22. A method for determining whether a subject has been exposed to an influenza virus A of subtype H5, which method comprises reacting antisera derived from the subject with an influenza virus comprising a H5 hemagglutinin (HA) molecule, wherein the HA molecule comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA, to further determine whether the subject is infected according to the antibody titers.

23. The method of claim 22, wherein the influenza virus is a recombinant virus.

24. The method of claim 22, wherein the HA molecule is a recombinant HA molecule that comprises one or more amino acid sequence changes as compared to a naturally occurring HA molecule that comprises an amino acid other than asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA.

(56) DOTH G.W. et al., "Hemagglutinin of swine influenza virus: a single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication", Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Nov;80(22):6996-7000.

GAMBARYAN A. et al., "Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain", Virology. 2005 Apr 10;334(2):276-83.

US 6719979 B2, 08.05.2004.

RU 97121580 A (MGPMC, LLC.), 27.10.1999

Remark: When publishing the information as to the grant of the patent, the specification in the original applicant's version will be used.

Enclosure: 1. Abstract corrected by the examiner on 1 p. in 1 ex.

Leading State Examiner for Intellectual Property
of the Department for Biochemistry of FIPS

(signature)

W.E. Kulikov

Currently pending claims

Claim 1: An influenza virus hemagglutinin (H5 HA) molecule of influenza virus H5 comprising the amino acid asparagine at the position 223 of the H5 HA1 sequence, wherein the asparagine at the position 223 of the H5 HA1 sequence substitutes a serine and results in an increased sensitivity of hemagglutinin inhibition assay, as compared to a wild-type molecule having no asparagine at the position 223 of the H5 HA1 sequence, and wherein the H5 HA molecule is not and does not originate with human H5 isolate A/HK/213/03.

Claim 2: A recombinant influenza virus comprising the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 3: A reverse genetics system for making a virus containing the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 4: The recombinant influenza virus of claim 2, wherein the influenza virus H5 HA molecule is derived from H5N1 influenza virus in the genetic background of an influenza A virus.

Claim 5: A method for making a virus containing the H5 HA molecule of claim 1, which method comprises introducing a recombinant vector that expresses the influenza virus H5 HA molecule of claim 1 in a reverse genetics system.

Claim 6: A method for examining whether an animal has been exposed to an influenza virus, which method comprises reacting antisera derived from the animal with a diagnostic reference virus, and wherein the diagnostic reference virus comprises the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 7: An influenza vaccine virus comprising the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 8: An isolated nucleic acid encoding the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 9: Use of an influenza virus H5 HA molecule of claim 1 in the manufacture of a medicament for treatment of an influenza virus infection.

Claim 10: Use of a recombinant influenza virus comprising the influenza virus H5 HA molecule of claim 1 in the manufacture of a medicament for treatment of an influenza virus infection.

Claim 11: A pharmaceutical composition for the treatment of an influenza virus infection comprising an influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 12: A pharmaceutical composition for the treatment of an influenza virus infection comprising a recombinant influenza virus comprising the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

Claim 13: Use of the influenza virus H5 HA molecule of claim 1 in a hemagglutinin inhibition assay.

English Translation of the Granted Claims

1. A recombinant influenza virus H5 hemagglutinin (HA) molecule, wherein said recombinant H5 HA molecule (i) comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA; and (ii) is not A/HK/213/03 HA molecule.
2. The recombinant influenza virus H5 hemagglutinin (HA) molecule of claim 1, wherein said recombinant H5 HA molecule has an increased reactivity with antisera derived from an animal exposed to an H5 influenza virus or an H5 influenza vaccine as compared to a naturally occurring H5 HA molecule that comprises an amino acid other than asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA.
3. The recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.
4. (Deleted)
5. The recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1, wherein said H5 HA molecule is from an avian influenza virus.
6. A recombinant influenza virus comprising a recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1.
7. An influenza vaccine virus comprising a recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1.
8. The recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1, wherein the asparagine at amino acid position 223 alters specificity for sialic acid receptors.
9. The recombinant influenza virus of claim 6, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.
10. (Deleted)
11. The recombinant influenza virus of claim 6, wherein said molecule is from an avian influenza virus.
12. The recombinant influenza virus of claim 6, wherein the asparagine at amino acid position 223 alters specificity for sialic acid receptors.

13. The influenza vaccine virus of claim 7, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.

14. (Deleted)

15. The influenza vaccine virus of claim 7, wherein said H5 HA molecule is from an avian influenza virus.

16. The influenza vaccine virus of claim 7, wherein the asparagine at amino acid position 223 alters specificity for sialic acid receptors.

17. The recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 2, wherein said naturally occurring H5 HA molecule comprises a serine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA.

18. A method for determining the efficacy of an influenza virus vaccine in an animal excluding human beings, which method comprises reacting antisera derived from a vaccinated animal with an influenza virus H5 hemagglutinin (HA) molecule wherein said H5 HA molecule (i) comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA; and (ii) is not A/HK/213/03 HA molecule.

19. A method for increasing the sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay, which method comprises reacting antisera derived from the vaccinated or infected animal excluding human beings with an influenza virus H5 hemagglutinin (HA) molecule, wherein said H5 HA molecule (i) comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA; and (ii) is not A/HK/213/03 HA molecule.

20. The method of claim 19, which results in at least a 2-fold increase in sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay.

21. The method of claim 19, which results in at least a 4-fold increase in sensitivity of a hemagglutinin inhibition (HI) assay.

22. A method of detecting the association between a diagnostic reference virus and erythrocytes into complexes for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus, comprising reacting antisera derived from the animal with the reference virus, and after a set incubation period, adding erythrocytes thereto, wherein the reference virus is derived from the influenza virus in question but comprises an influenza virus H5 hemagglutinin (HA) molecule, wherein said H5 HA molecule (i)

comprises an asparagine at an amino acid position corresponding to amino acid position 223 in H5 HA; and (ii) is not A/HK/213/03 HA molecule.

23. A method of detecting the association between a diagnostic reference virus and erythrocytes into complexes for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus, comprising reacting antisera derived from the animal with the reference virus, and after a set incubation period, adding erythrocytes thereto, wherein the reference virus is derived from the influenza virus in question but comprises an influenza virus H5 HA molecule comprising the amino acid asparagine at the position corresponding to position 223 in H5 HA, wherein the inclusion of asparagine results in an increased reactivity of the reference virus with antisera derived from an animal exposed to an influenza virus with a wild-type H5 HA molecule.

24. A method of detecting the association between a diagnostic reference virus and erythrocytes into complexes for determining whether an animal has been exposed to an influenza virus, comprising reacting antisera derived from the animal with the reference virus, and after a set incubation period, adding erythrocytes thereto, wherein the reference virus is derived from the influenza virus in question but comprises the influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

25. The method of any one of claims 18, 19, 22, 23 or 24, wherein the animal is a ferret.

26. The method of any one of claims 22, 23 or 24, wherein the animal is a human.

27. A recombinant influenza virus H5 HA molecule according to claim 1, for use as a medicament in the treatment or prevention of an influenza virus infection.

28. A recombinant influenza virus H5 HA molecule according to claim 1, for use as a medicament in the treatment or prevention of an influenza virus infection, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.

29. A recombinant influenza virus H5 HA molecule according to claim 1, for use as a medicament in the treatment or prevention of an influenza virus infection, wherein said H5 HA molecule is from an avian influenza virus.

30. A recombinant influenza virus comprising a recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1, for use as a medicament in the treatment or prevention of an influenza virus infection, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.

31. A recombinant influenza virus comprising a recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1, for use as a medicament in the treatment or prevention of an

influenza virus infection, wherein said H5 HA molecule is from an avian influenza A virus.

32. A pharmaceutical composition for the treatment or prevention of an influenza virus infection, comprising a recombinant influenza virus H5 HA molecule according to claim 1.

33. The pharmaceutical composition of claim 32, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.

34. The pharmaceutical composition of claim 32, wherein said H5 HA molecule is from an avian influenza virus.

35. A pharmaceutical composition for the treatment or prevention of an influenza virus infection, comprising a recombinant influenza virus comprising a recombinant influenza virus H5 HA molecule of claim 1.

36. The pharmaceutical composition of claim 35, wherein said H5 HA molecule is from a human influenza A virus.

37. The pharmaceutical composition of claim 35, wherein said H5 HA molecule is from an avian influenza A virus.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0099373

Bogotá D.C., Septiembre 17 de 2014 - 11:39:07

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	636834354	17/09/2014	11.230.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	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
				\$128.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-023024-00015-0000

Fecha: 2014-09-19 17:05:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 58

Colo: 16331-841-001-2

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

Septiembre 17 de 2014 - 11:39:27