

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-153702- -00008-0000

Fecha: 2014-07-01 14:45:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 24

Señor

PABLO FELIPE ROBLEDO DEL CASTILLO
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

Ref: Expediente No. **12-153702**
Patente de Invención: **"FORMULACION ESTABLE DE MIA/CD-RAP"**
Solicitud Internacional: **PCT/US2011/056622**
Titular: **SCIL Technology GMBH**

RECURSO DE REPOSICIÓN CONTRA LA
RESOLUCIÓN NO. 31530 DE 14 DE MAYO DE 2014,
NOTIFICADA POR FIJACION EN LISTA DE 20 DE
MAYO DE 2014, DESFIJADA EL 20 DE JUNIO DE 2014.

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., con la Oficina 506 de la Carrera 7 No. 74-64 de ésta ciudad, Abogado en Ejercicio, portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de apoderado de la sociedad **SCIL Technology GMBH**, domiciliada en Fraunhoferstrasse 5, 82152 Martinsried, Alemania; reconocido por su despacho y encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal, por medio del presente escrito interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución No. 31530 de 14 de mayo de 2014, notificada por fijación en lista el 20 de mayo de 2014 y desfijada el 20 de junio de 2014; con el propósito que sea revocada y en su lugar proferir otra, en que se **OTORGUE** el privilegio de la Patente de Invención denominada: **"FORMULACION ESTABLE DE MIA/CD-RAP"**, conforme a lo siguiente:

1. MOTIVOS DE INCONFORMIDAD.

Base de la Negativa

- 1.1.** Mediante la Resolución objeto del presente recurso, se deniega el privilegio de patente de invención denominada: **"FORMULACION ESTABLE DE MIA/CD-RAP"** solicitado por mí representada la

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposicion

Solicitud No. 12-153702

sociedad **SCIL Technology GMBH**, al considerar que no cumple con los requisitos dispuestos en la legislación comunitaria vigente.

1.2. La División de Nuevas Creaciones decidió negar el derecho de patente de invención por no cumplir con el requisito de nivel inventivo. Se puede establecer con la simple lectura de la Resolución que esa división de ninguna manera considera la inversión, la importancia y el alcance del objeto de la presente solicitud y a pesar de tener novedad y nivel inventivo decide negarla, haciéndose una interpretación equivocada.

1.3. La Resolución refiere que realizado el examen de fondo de la solicitud mediante Oficio N° 23161, notificado por fijación en lista el 24 de diciembre de 2013, se requirió a la solicitante en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina para que presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico, relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión para la concesión de la patente.

Que la solicitante mediante escrito radicado bajo el N° 12-153702-00005-0000 del 21 de febrero de 2014, respondió oportunamente el requerimiento formulado y presentó nueva(s) reivindicación(es) 1 a 13 que reemplaza(n) las originalmente presentadas, atendiendo de esta manera las observaciones efectuadas en el examen de fondo aceptándose desde el punto de vista formal el nuevo capítulo reivindicatorio presentado.

Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de la Comunidad Andina "*Los países miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial*", la Resolución concluye que las reivindicaciones 1 a 13, no cumplen con el requisito de nivel inventivo.

1.4. En efecto la Resolución 31530 no considero de ninguna manera el problema técnico solucionado por la presente invención, el cual fue claramente definido en los antecedentes, en donde se señaló la

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposición

Solicitud No. 12-153702

necesidad existente en el estado de la técnica de proporcionar una formulación acuosa estable que comprende entre 5 y 30 mg/mL de CD-RAP y un aminoácido cargado seleccionado a partir del grupo que consiste de glicina, arginina, lisina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico, y sales de los mismos, donde la proteína CD-RAP se disuelve directamente en la fase acuosa de la formulación, un beneficio a partir de la administración del compuesto de la presente invención.

En la misma Resolución, se señala que el documento D1 divulga una composición farmacéutica que comprende liposomas multilamelares que contienen proteínas de carácter hidrofílicas (Pág. 1 Línea 1-3) como la CD-RAP y variables de la misma (Pág. 21 -22).

El documento D2 por su parte enseña formulaciones liofilizadas para reconstitución que contienen anticuerpos hidrofílicos para administración subcutánea. (Pág. 1 Párr. [0001]).

El documento D3 enseña formulaciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos solubles (Párr. 0029) como el Etanercept (Párr. [0050]) en combinación con inhibidores de la agregación como la arginina (Párr. [0044]).

En conclusión, teniendo en cuenta que los argumentos de la solicitante no desvirtúan de manera alguna las objeciones a la patentabilidad ya sustentadas, la Resolución concluye con la denegación de la patente de invención objeto de análisis.

- 1.5. No compartimos la interpretación realizada por el examinador con respecto a los documentos citados, en los cuales se fundamentó el rechazo de la presente solicitud, interpretación equivocada teniendo en cuenta los siguientes argumentos adicionales:

La Resolución cita el documento D1 (WO 2008 040 556 A1) como el documento más cercano de la técnica anterior.

El documento antes mencionado describe composiciones de vesículas secas reconstituidas y formulaciones basadas en agua de las mismas, que contienen la proteína CD-RAP.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposición

Solicitud No. 12-153702

La presente solicitud bajo análisis se refiere a una formulación acuosa estable que comprende al menos 5 mg/ml de la proteína CD-RAP y un aminoácido cargado definido, en la cual la proteína CD-RAP se disuelve directamente en la fase acuosa.

- Diferencias técnicas entre la invención reivindicada y los documentos de la técnica anterior citados en la Resolución:

La invención reivindicada en la presente solicitud se diferencia de la enseñanza del documento **D1** de la técnica anterior en las siguientes características:

i. Formación de liposomas multilaminares, cuyos liposomas encapsulan al agente activo.

Debe notarse que el documento **D1** está dirigido a la provisión de una composición seca que comprende la proteína CD-RAP liofilizada, un lípido y un agente promotor de la fusión. Después de la reconstitución, se forman liposomas multilaminares que encapsulan el agente activo (pág. 7, líneas 1-4). Este documento describe, además, que el uso de liposomas liofilizados resuelve los problemas de estabilidad, tales como la agregación de la proteína CD-RAP (pág. 8, líneas 10-13).

En contraste, la presente solicitud proporciona una formulación acuosa estable, en la cual la proteína CD-RAP se disuelve directamente con un aminoácido cargado definido (pág. 7, líneas 28-31; pág. 19, líneas 17-18). El término "se disuelve" en el sentido de la presente invención incluye que la proteína CD-RAP está esencialmente no encapsulada y/o atrapada (pág. 7, líneas 28-31).

ii. Concentración de CD-RAP en la composición/formulación

La proteína CD-RAP en **D1** se utiliza en los ejemplos en concentraciones que van desde 0,3 mg/ml a 3mg/ml (pág. 33, líneas 6, 21; pág. 35, línea 32; pág. 36, líneas 26 -27; pág. 38, línea 33; pág. 40, líneas 15-16; pág. 42, línea 17). Además, la cantidad de proteína en la composición descrita en **D1** parece estar en función de la cantidad de lípido liposómico (pág. 25, línea 24-26).

La concentración de proteína CD-RAP de la presente invención, sin embargo, se describe que está a 5mg/ml como mínimo (pág. 42, líneas 6-8). Esta es otra gran diferencia entre el documento D1 y la presente invención.

iii. Adición de aminoácidos

En el documento D1 se afirma que los "aminoácidos alcalinos no protegen las vesículas durante la liofilización, sino que sorprendentemente, promueven el proceso de fusión esencial para la obtención de vesículas multilamelares [...]. Además de este efecto, el uso de estos aminoácidos sorprendentemente apoya la estabilidad de la proteína formulada durante la liofilización" (pág. 10, línea 31 hasta pág. 11 líneas 1-3).

Como resultado de ello, la idea subyacente a la invención descrita en D1 tiene por objeto una composición que contiene vesículas, e implica aminoácidos alcalinos a saber, lisina, arginina e histidina, como promotores de la fusión con el fin de obtener estas vesículas, así como estabilizadores de la proteína formulada. Una proteína formulada de acuerdo con D1, sin embargo, se refiere a una formulación que comprende la proteína CD-RAP, lípidos/vesículas y un promotor de fusión. En resumen, el uso de aminoácidos alcalinos usados en D1 está vinculado exclusivamente a la presencia de lípidos/vesículas.

Sin embargo, la presente invención proporciona una solución acuosa estable virtualmente carente de tales vesículas, y da a conocer aminoácidos polares ácidos y alcalinos cargados presentes en esa solución. Por lo tanto, en comparación con D1, en la presente invención se utiliza una mayor variedad de aminoácidos.

iv. Problema técnico

Teniendo en cuenta las diferencias técnicas entre el documento D1 y la presente solicitud, el problema técnico objetivo podría verse como la provisión de una formulación de CD-RAP estable alternativa que comprende altas concentraciones de proteína CD-RAP.

Evaluación de la actividad inventiva

Consideraciones generales

Como ya se ha subrayado en la presente solicitud, una variedad de factores puede afectar la estabilidad de las proteínas, incluyendo la fuerza iónica, el pH, la temperatura, los ciclos de congelación/descongelación, las fuerzas de cizallamiento, la congelación, el secado, la agitación y la reconstitución. La inestabilidad de las proteínas puede ser causada por la degradación física (por ejemplo, desnaturalización, agregación o precipitación) o degradación química (por ejemplo, desamidación, oxidación o hidrólisis).

Por consiguiente, las prácticas típicas para mejorar la estabilidad de los polipéptidos pueden abordarse mediante la variación de la concentración de elementos con la formulación, o añadiendo excipientes para modificar la formulación. El documento US 5,580,856 es una solicitud prototipo de agentes que podrían añadirse para estabilizar una proteína liofilizada durante o después de la rehidratación, tales como polímeros naturales, agentes tensioactivos, polisacáridos sulfatados, proteínas y tampones. Sin embargo, aparte de muchas opciones, la patente de US 5,580,856 no enseña que debe añadirse un estabilizador de rehidratación a dicha proteína.

En consecuencia, aun cuando el lector experto estuviera consciente de esas muchas opciones, él o ella tendrían que averiguar para su proteína las mejores condiciones, entre las muchas opciones que se describen en US 5,580,856, las cuales solo podrían determinarse con experimentación adicional, y en modo alguno podrían considerarse obviamente derivadas de lo divulgado en la técnica anterior.

El documento **D2** describe soluciones acuosas reconstituidas del anticuerpo rhuMAb HER2 pre-liofilizado, en cuales el tampón de histidina se utiliza por sus propiedades lioprotectores (párrafo [0013]). Los lioprotectores, a modo de ejemplo en **D2**, incluyen azúcares tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina; una sal liotrópica; etc. El lioprotector preferido es un azúcar no reductor, tal como trehalosa o

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposicion

Solicitud No. 12-153702

sacarosa (párrafo [0052]). Por lo tanto, **D2** usa histidina como una de muchas más opciones para reducir la inestabilidad química y/o física del anticuerpo luego de la liofilización. Sin embargo, se prefieren la trehalosa o la sacarosa (ejemplo 1 de **D2**; párrafo [0052]) y bajo ciertas circunstancias la trehalosa parece ser el estabilizador primario (párrafo [0134]). Por lo tanto, la enseñanza de **D2** más bien apunta al uso del manitol y/o la sacarosa como un inhibidor de la agregación de rhuMAb HER2.

Además, **D2** se refiere a un anticuerpo y por lo tanto a una proteína diferente de CD-RAP. Sin embargo, es conocido para el experto en el campo técnico en cuestión que lo que se aplica a una proteína no necesariamente es práctico para otra proteína, mientras que estos estabilizadores pueden ser útiles para al menos un anticuerpo específico, no pueden extrapolarse a otras proteínas.

Por lo tanto, no existe ningún incentivo en **D2**, además en combinación con el uso de aminoácidos como promotores de la fusión, con el objetivo de obtener vesículas como se describe en D1 para el uso de los aminoácidos de la reivindicación 1 en una formulación acuosa estable que comprende la proteína CD-RAP.

El documento **D3** por su parte, describe una formulación acuosa estable que comprende un polipéptido que contiene un dominio Fc, así como un inhibidor de la agregación tal como L-arginina o la L-cisteína. Más aún, en la opinión escrita se refiere a una composición preferida que comprende TNFR: Fc 25mg/ml; 25 mM de L-arginina; 25 mM de fosfato de sodio; 98 mM de cloruro de sodio y 1% de sacarosa, con un pH de 6,2 (párrafo [0050]). En el párrafo [0044] se afirma explícitamente que los aminoácidos L-arginina y L-cisteína actúan para reducir la agregación del polipéptido que contiene el dominio Fc en una formulación. Sin embargo, la presente invención se refiere a una proteína diferente, a saber, la proteína CD-RAP.

D3, por lo tanto, de manera similar a **D2**, describe una solución estable de una proteína similar a inmunoglobulina, es decir, una proteína que contiene un dominio Fc. El estabilizador puede ser fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio o de potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tampón Tris, acetato, dietaloamina, histidina, lisina o cisteína. Entre estos estabilizadores, químicamente

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposicion

Solicitud No. 12-153702

distintos que podrían ser elegidos por el experto, la lisina resultó ser adecuada.

Sin embargo al igual que en D2, el estabilizador específico es meramente apropiado para una proteína específica, aquí una proteína que contiene un dominio Fc, y no puede por sí mismo extrapolarse a otra proteína. En consecuencia, el uso de aditivos no se puede extrapolar a partir de una proteína específica a otra proteína no relacionada.

De hecho, el uso de aditivos - al tiempo que mejora el almacenamiento - puede aún dar lugar a polipéptidos inactivos. Además, en el caso de la liofilización, la etapa de rehidratación puede introducir condiciones que dan como resultado la inactivación del polipéptido mediante, por ejemplo, su agregación o desnaturalización.

En la evaluación de la actividad inventiva, lo que tiene que analizarse es si el experto tuvo o no un incentivo o una motivación para combinar la formulación de la proteína CD-RAP conocida en la técnica anterior a partir de D1, con las enseñanzas de D2 y D3 para generar una formulación acuosa estable que comprende al menos 5 mg/ml de CD-RAP. La pregunta **no** es si el experto "podría" haber llegado a la invención mediante la adaptación o modificación de la técnica más próxima, si no si él hubiera hecho eso debido a que el estado de la técnica lo incitó a que lo hiciera con la esperanza de resolver el problema técnico objetivo, o esperando con ello alguna mejora o ventaja.

Como ya se ha señalado anteriormente, los polipéptidos utilizados en D2 y D3 son totalmente diferentes a la proteína CD-RAP utilizada en las formulaciones de la presente solicitud. D2 proporciona una formulación que contiene el anticuerpo rhuMAb HER2 y D3 describe formulaciones que comprenden un polipéptido que contiene un dominio Fc.

La descripción de D2 define, además que, una "proteína" en el sentido de la solicitud, tiene que tener un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD (preferiblemente al menos 20 kD) (párrafo [0041] de D2). No obstante CD-RAP tiene un peso molecular de 11 kD (ver: Celular, Molecular y Biología del Tumor 63: Biomarkes for Tumor Progression; Abstract # 3314; adjunto). Por lo tanto un lector experto

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposicion

Solicitud No. 12-153702

en la materia no tendría en cuenta el documento D2 que está claramente dirigido a las proteínas con un peso molecular superior al del CD-RAP, en particular a anticuerpos (ver las reivindicaciones de D2) en las cuales el rango del peso normal de anticuerpos es de aproximadamente 150-160 kD.

Lo mismo se aplica para los polipéptidos en D3, ya que estos polipéptidos tienen que ser polipéptidos que contienen un dominio Fc. En particular, el etanercept se divulga que tiene un peso molecular de 150 kD que se encuentra en el rango normal de los anticuerpos (=polipéptidos que contienen el dominio Fc) (150-160kD). No se conocen polipéptidos que contiene el dominio Fc con un peso molecular en el intervalo de 11 kD (tal como la proteína CD-RAP), ya que el dominio Fc por sí mismo ya tiene un peso molecular de 50 kD (IgG) (véase la página 24 del capítulo 4: antibody structure II; adjunto). Por lo tanto una persona experta en la técnica no consideraría una formulación para estabilizar un polipéptido que contiene un dominio Fc con aproximadamente 150 kD obviamente adecuado para estabilizar una formulación que contiene una proteína de bajo peso molecular como CD-RAP.

En vista de lo anterior, enfatizamos que no es posible extrapolar automáticamente la influencia de aminoácidos específicos para la estabilización de anticuerpos con un peso molecular de aproximadamente 150 kD (como en D2 y D3) a sus propiedades en vista de la estabilización de cualquier otra proteína hidrófila, por ejemplo, pequeñas proteínas globulares de un solo dominio como CD-RAP.

Si la persona experta en la materia tuviera la intención de comenzar con un nuevo sistema tampón conceptualmente, tendría que considerar muchas opciones diferentes, como se describe en la técnica anterior (por ejemplo, en el documento US 5,580,856) que apunta a muchas posibilidades diferentes y que parecen ser diferentes para diferentes proteínas. SE puede concluir entonces que la presente invención no es evidente para una persona experta en la técnica, ni a partir de D1, ni de las combinaciones de D1 con los documentos D2 o D3.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposición

Solicitud No. 12-153702

Por lo tanto, se demuestra que la presente invención involucra una actividad inventiva sobre D1 y también sobre D1 en combinación con D2-D3.

Considerando lo anterior, se debe notar que la persona experta en la técnica habría tenido muchas opciones cuando se apunta a estabilizar la proteína CD-RAP; véase por ejemplo la Figura 1 de la presente solicitud. Por lo tanto, no habría sido evidente utilizar uno de los aminoácidos reivindicados en la reivindicación 1 pendiente. Por otra parte, la persona experta en la técnica no podría saber de antemano qué opción habría sido exitosa específicamente para preparar una formulación acuosa estable de CD-RAP sin haber realizado la experimentación correspondiente, algo en lo que se ha basado incorrectamente la Resolución, aparentemente haciendo uso indebido de la retrospectiva en el análisis, una vez conocida la presente invención.

III. CONCLUSIÓN

La presente invención es patentable según lo establecido en la Decisión Andina 486, ya que todas las referencias citadas en la Resolución impugnada han sido analizadas y los argumentos en contra de la patentabilidad de la solicitud se han refutado.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, consideramos que la decisión contenida en la resolución, motivo de la actual impugnación, resulta equivocada e injusta, como se ha demostrado con los argumentos anteriores lo que permite concluir, que la presente solicitud cumple con lo estipulado en los Artículo 14 y 18 de la Decisión 486, y se refiere a una invención patentable a la luz de lo dispuesto por la mencionada norma comunitaria. Pues todo lo aquí demostrado nos está indicando que la presente solicitud cumple con los presupuestos señalados en la Decisión 486 de la Comunidad Andina, para que sea otorgada como Patente de Privilegio de Invención.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposición

Solicitud No. 12-153702

- 1.6. Todo lo aquí demostrado nos está indicando que la presente solicitud cumple con los presupuestos señalados en la Decisión 486 de la Comunidad Andina, para que sea otorgada como Patente de Privilegio de Invención.

2. PETICIONES.

a) Pretensión Principal.

De acuerdo a lo señalado en el transcurso de este recurso, solicito respetuosamente a su despacho, tener en cuenta los argumentos anteriormente propuestos y el nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta y con base a ello, proceder con la concesión total de la Patente de Privilegio de Invención, **“FORMULACION ESTABLE DE MIA/CD-RAP”**.

b) Pretensiones Subsidiarias.

- 1). **REVOCAR** la Resolución No. 31530 de 14 de mayo de 2014, y en su lugar proferir otra en la que otorguen en forma parcial las reivindicaciones solicitadas, todo de conformidad con los documentos que hacen parte esencial del trámite.
- 2). **REVOCAR** la Resolución No. 31530 de 14 de mayo de 2014, y en su lugar proferir otra en la que si su Despacho, no obstante la claridad de la invención, considera que es necesaria alguna precisión, se requiera a mi representada con las explicaciones pertinentes, pues reiteramos que la invención solicitada encaja dentro de las normas vigentes, por lo tanto en aras de los principios de equidad y justicia deberá ser otorgada total o parcialmente, como respetuosamente lo solicito.

3. PRUEBAS.

- 3.1. Todos y cada uno de los documentos que reposan en el expediente citado en la referencia.
- 3.2. Resolución No. 31530 de 14 de mayo de 2014.
- 3.3. La actuación surtida.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Recurso Reposicion

Solicitud No. 12-153702

4. ANEXOS.

4.1. Documento Chapter 4 ANTIBODY STRUCTURE II

4.2. Cellular Molecular and Tumor Biology 63 Biomarkers for Tumor Progression

5. FUNDAMENTOS DE DERECHO.

Las disposiciones legales que invoco como fundamento para promover el presente recurso los artículos 14, 16, 18, y 34 y demás aplicables de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, en las normas aplicables del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo Ley 1437 de 2011 y en las demás disposiciones vigentes.

5- OPORTUNIDAD.

La Resolución recurrida fue notificada por fijación en lista de 20 de mayo de 2014, desfijada el 20 de junio de 2014, por lo tanto me encuentro dentro de la debida oportunidad legal, consagrada en el Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo.

6.- NOTIFICACIONES.

Mí representada y el suscrito recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi Oficina de Abogado, situada en la Carrera 7 No. 74-64 de Bogotá.

Atentamente,



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de la Judicatura

COD. 4134

CHAPTER 4

ANTIBODY STRUCTURE II

See APPENDIX: (4) AFFINITY CHROMATOGRAPHY; (5) RADIOIMMUNOASSAY

The "IgG-like" subunit of all human antibodies consists of two identical LIGHT CHAINS and two identical HEAVY CHAINS, and proteolytic digestion can be used to establish the different functions of distinct portions of antibody molecules. The nine different CLASSES and subclasses (ISOTYPES) of human immunoglobulins exhibit different physical and biological properties, determined by the amino acid sequence of the CONSTANT REGION of the heavy chains. On the other hand, the VARIABLE REGION of heavy and light chains together form the ANTIGEN-BINDING SITES of antibodies.

The DOMAIN organization of antibodies, and an understanding of the COVALENT and NON-COVALENT interactions involved in their structure and in their interaction with antigen, form the basis for understanding their distinct roles in PRIMARY and SECONDARY IMMUNE RESPONSES, and the key features of IMMUNOLOGICAL MEMORY.

ANTIBODY HEAVY AND LIGHT CHAINS: PROTEOLYTIC FRAGMENTS

In order to examine the structure of antibodies, we will again start with a "typical" IgG molecule, such as the rabbit antibody we discussed at in the last chapter. A schematic diagram of an IgG molecule, together with its proteolytic fragments, is shown below:

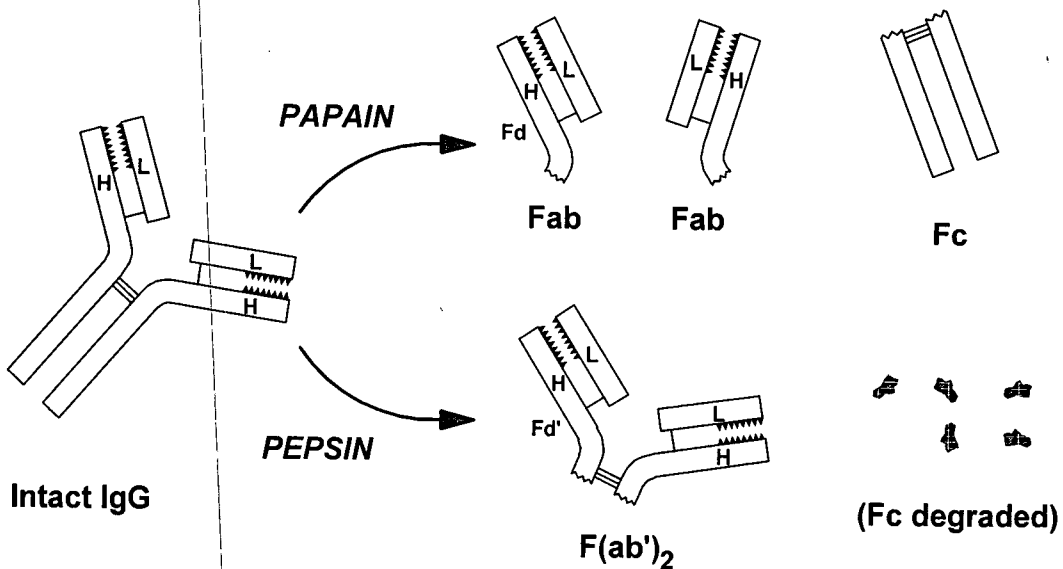


Figure 4-1

- Intact IgG has a molecular weight of ~150,000.
- Each IgG molecule consists of **two identical heavy chains** (*mol.wt.~50,000*) and **two identical light chains** (*mol.wt.~25,000*). The two heavy chains are linked to each other by one or more disulfide bonds (shown as lines in the diagram), and each light chain is linked to one heavy chain by a single disulfide bond. Immunoglobulin heavy and light chains, as we will see later, are encoded by evolutionarily related members of a large *multigene family*.

This molecule can be broken down into smaller fragments by a wide variety of enzymatic and chemical treatments. Of particular importance has been the use of *two proteolytic enzymes, papain, and pepsin*. Treatment with papain yields two kinds of fragments, a pair of F(ab) fragments, and one Fc fragment. Treatment with pepsin yields a single fragment, the F(ab')₂ (the Fc region is degraded by this enzyme).

If we begin with an antibody molecule of known antigen specificity, we can study the fragments generated in this way not only with respect to their physical properties, but also for their ability to interact with antigen and complement. Their properties are as follows:

Fab	size ~50,000 Da binds antigen (ab = antigen-binding) does <i>not</i> show precipitation or agglutination will <i>not</i> fix complement or opsonize
F(ab')₂	size ~100,000 Da binds antigen <i>can</i> show precipitation and agglutination will <i>not</i> fix complement or opsonize
Fc	size ~50,000 Da <i>cannot</i> bind antigen is crystallizable does not fix complement (except very poorly)
[Fd	that portion of the <i>heavy</i> chain which is included in the Fab fragment]

Thus we see that proteolytic cleavage can separate IgG into fragments with *different functional properties*. The F(ab) and F(ab')₂ fragments are capable of binding antigen (they contain the antigen binding sites), but only the F(ab')₂ can exhibit agglutination or precipitation; this is because these functions require *bivalent binding for cross-linking*. Each F(ab) fragment has *one* antigen-combining site that requires the presence of both the heavy chain and the light chain. In addition, we see that *without the Fc piece, complement fixation does not take place*.

The Fc piece, on the other hand, does *not* bind antigen; and while it is required for complement fixation, it cannot significantly bind complement on its own. The fact that it can be made to form *crystals* was recognized very early as a striking property of the Fc (hence its name). Antibodies in general do *not* form crystals, as a result of their characteristic heterogeneity. The Fc fragment does not share the major source of this *heterogeneity* (variation in the antigen combining site) since it does not contain a binding site.

IMMUNOGLOBULIN CLASS (ISOTYPE) IS DETERMINED BY THE HEAVY CHAIN

So far we have discussed the properties only of a "typical" rabbit IgG molecule. If we look at human immunoglobulins, we see that a variety of different forms exist, and this variety is typical of mammals in general. Five major **classes** of immunoglobulin are known, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE; in addition, there are four **subclasses** of IgG, namely IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, and two subclasses of IgA, namely IgA1 and IgA2, yielding a total of nine different classes and subclasses ("isotypes"; see Chapter 6) of human immunoglobulin.

PROPERTIES OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS

Class	sub-classes	serum conc. mg/ml	sedim. coeff.	size	# binding sites	H-chain class	Biological properties
IgG	4	12	7S	150 KDa	2	γ ($\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$)	C-fixing, placental X-fer
IgM	-	1	19S	900 KDa	10	μ	C-fixing, B-cell surface Ig
IgA	2	2	7,9,11S	(160 KDa) _n	2,4,6	α ($\alpha 1, \alpha 2$)	secretory Ig
IgD	-	0.03	7S	180 KDa	2	δ	B-cell surface Ig
IgE	-	0.0003	8S	200 KDa	2	ϵ	"reaginic" Ig

The **class** (and **subclass**) of an immunoglobulin is determined by the kind of heavy chain it bears. Nine different heavy chains define the nine classes and subclasses (**isotypes**) of human Ig.

All immunoglobulins share the same pool of light chains; there are two types of light chains, kappa and lambda. Thus, an IgG1 molecule has two gamma-1 heavy chains, and may have. Likewise for an IgM molecule which has μ heavy chains, and may have *either* kappa or lambda light chains, but not both...etc.

All immunoglobulins share the same basic "IgG-like" structure consisting of two linked heavy chains and two light chains. IgG, IgD and IgE have precisely this structure, and differences in their molecular masses (seen in the table above) are due to differences in the size of the heavy chain polypeptides and their carbohydrate content.

We can represent this basic structure by the general empirical formula, H_2L_2 . Thus, a particular IgG1 molecule may be represented as either $\gamma 1_2 \kappa_2$, or $\gamma 1_2 \lambda_2$, depending on whether it contains kappa or lambda chains.

IgM and some IgA consist of multiple "IgG-like subunits". IgM consists of a pentamer of five such subunits, each of which consists of two μ chains and two light chains (either kappa or lambda); it therefore contains *ten* antigen combining sites, and is the largest of the immunoglobulins. IgA can exist either as a monomer or dimer (rarely a trimer) of

the basic H_2L_2 subunit, and therefore can bear two, four or six combining sites. IgM and polymeric IgA have an additional polypeptide associated with them, the *J-chain* (for "joining"). The J-chain is thought to participate in the process of polymerization of these molecules. (See also Chapter 9, Ig BIOSYNTHESIS)

DIFFERENT Ig ISOTYPES HAVE DIFFERENT BIOLOGICAL FUNCTIONS

The structures of the different immunoglobulin heavy chains are quite different from one another, in amino acid sequence, in chain length and in carbohydrate content. These differences result in marked differences in biological properties of the different **isotypes** (classes and subclasses) of Ig.

- IgM** Most efficient Ig at *complement fixation*.
Produced *early* in immune responses.
Serum IgM bears an additional polypeptide, the *J-piece* (for "joining"), as does polymeric IgA.
Serve as *membrane receptors* of B-cells (as "IgMs", an "IgG-like" monomer).
- IgG** *Most abundant* serum Ig.
Various subclasses can all *fix complement* (via classical or alternate pathway).
Can be *transferred across the placenta* into the fetal circulation.
Produced *late* in immune responses.
Opsonizing activity via Fc receptors present on macrophages and PMNs.
- IgA** While IgA is the second-most abundant serum Ig, it is most characteristically a secretory immunoglobulin, and is the most abundant Ig in *exocrine secretions* (saliva, bile, mucus of the gut and respiratory tract, milk, etc.).
IgA in serum is mostly an α_2L_2 monomer; IgA in secretions is *polymeric* (mostly dimer, *i.e.* $[\alpha_2L_2]_2$, with some trimer), includes an *S-piece* (for "secretory"), and like IgM also bears the *J-piece*.
- IgD** Antigen-binding *receptor on B-cells* (together with IgMs).
Rare in serum; no other known biological function.
- IgE** Extremely low levels in serum.
Reaginic" antibody, responsible for *allergic reactions* following binding to surface of tissue mast cells (see Chapter 21).
While antibodies are generally very stable, IgE is an exception and is characteristically *heat labile*.

HOMOGENEOUS IMMUNOGLOBULINS: MYELOMA PROTEINS

We have already noted that *heterogeneity* is one of the most striking features of antibodies; this is understandable in that the primary function of antibodies is to bind to a wide variety of epitopes. This heterogeneity, however, makes it difficult to carry out conventional structural studies on these molecules, particularly by amino acid sequencing or crystallization, which both require a homogeneous protein.

Our understanding of immunoglobulin structure resulted largely from the existence of MYELOMA PROTEINS, homogeneous forms of immunoglobulins produced by tumors of antibody-forming plasma cells. Since the tumors are monoclonal in origin, so are their protein products; in any particular patient, the monoclonal protein (also referred to as "M-component") is of a *single* heavy chain class and bears a *single* kind of combining site. One

reflection of their homogeneity is the fact that myeloma proteins are often *crystallizable*, unlike conventional Ig. In some cases the homogeneous protein consists of free light chain without an associated heavy chain; these free light chains are rapidly cleared by the kidneys and appear in the urine as BENCE-JONES PROTEINS. In other cases a tumor might produce only heavy chains which accumulate in serum, with no associated light chain.

A *variety* of pathological conditions can result in the presence of monoclonal Ig in serum, collectively referred to as **Monoclonal Gammopathies**. While some of these conditions are benign, many represent malignant tumors (cancers) of antibody-forming cells. Depending on their clinical presentation, these malignancies may be termed Multiple Myeloma, Plasmacytoma, Immunocytoma, Waldenstrom's Macroglobulinemia, Heavy Chain Disease or Light Chain Disease. We will use the general term "*myeloma protein*" to refer to *any* such monoclonal immunoglobulin.

IMMUNOGLOBULIN HEAVY AND LIGHT CHAINS HAVE VARIABLE AND CONSTANT REGIONS

Amino acid sequencing studies of Bence-Jones Proteins first showed that *light chains consist of a variable region and a constant region*. If several kappa-type B-J proteins (each from a different patient), are subjected to amino acid sequencing, one finds that the amino terminal half of the polypeptide (about 110 amino acids) shows substantial variation from one protein to another, while the carboxy-terminal half is essentially constant (except for *allelic variants* discussed in Chapter 6). Similarly, the heavy chains of different myeloma proteins have an amino-terminal variable region (also about 110 amino acids long), while the remainder of the polypeptide remains constant *within a given isotype*.

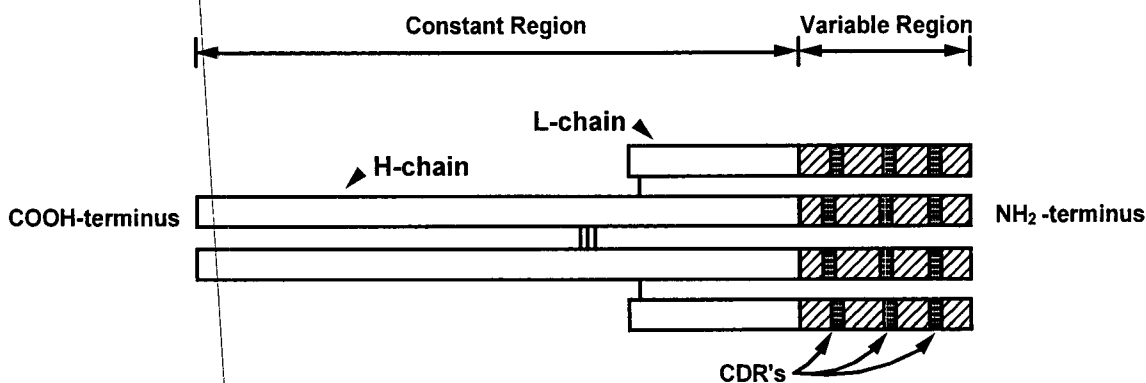


Figure 4-2

The antigen combining site of an antibody is made up of the variable regions of one light chain and one heavy chain. As can be seen in the diagram above, the two variable regions (V_H and V_L) are located in the F(ab) regions, precisely where we would expect them to be if they are responsible for antigen binding.

Within the variable regions, typically comprising 105-110 amino acids, some positions show more sequence variation than others. The highest degree of variability between different monoclonal proteins exists in three small sub-regions within the entire V-region, which were named the *Hypervariable Regions*; the four segments outside these hypervariable regions are termed "framework" regions, and show considerably less diversity (although they are still "variable"). *The hypervariable regions form the antibody combining site in the native three-*

dimensional structure of the antibody, and are now commonly known by the more descriptive name of COMPLEMENTARITY-DETERMINING REGIONS (CDRs)

THREE FAMILIES OF V-REGIONS EXIST, one for *kappa* light chains, one for *lambda* light chains, and the third for *heavy* chains. In spite of their variable nature, one can readily determine from its amino acid sequence (even from the first few N-terminal residues) to which of these three families a given V-region belongs, kappa, lambda or heavy chain. However, in the case of V_H regions, one cannot predict which of the heavy chain isotypes it will be associated with; *all* heavy chains, regardless of class or subclass, draw from a *single pool* of V_H -regions. We will examine the cellular and genetic basis for this phenomenon in later chapters.

IMMUNOGLOBULIN HEAVY AND LIGHT CHAINS CONSIST OF GLOBULAR "DOMAINS"

Up to now we have diagrammed Ig molecules as consisting simply of linear polypeptides connected to one another by disulfide bonds. However, the polypeptides making up Ig molecules (and proteins in general) are not normally stretched out like pieces of spaghetti, but are folded into complex three-dimensional structures. In the case of a light chain, the V-region and C-region are each folded into separate, compact globular DOMAINS, the two of which are connected to each other by a short stretch of extended polypeptide chain. The heavy chain likewise has a single V-region domain, but has *several* C-region domains, a total of three in the case of IgG. The diagram in Figure 4-3 incorporates this more sophisticated view of immunoglobulin:

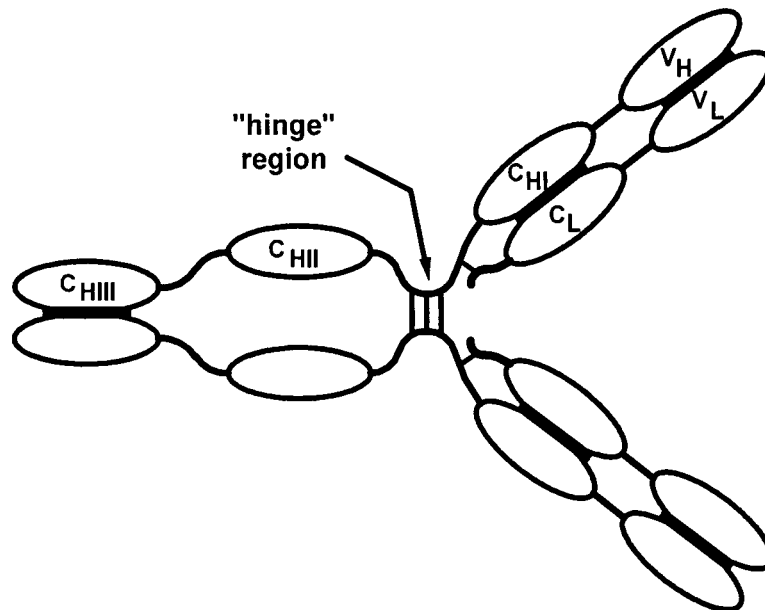


Figure 4-3

Every heavy or light chain is made up of one V-region domain and one or more C-region domains. In the case of light chains these are named V_L and C_L (V_κ and C_κ for kappa chains, *etc.*). In the case of heavy chains, these are termed V_H for the variable domain, and C_{H1} , C_{H2} *etc.* for the constant domains; for a particular heavy chain, *mu* for instance, the constant domains become $C_{\mu1}$, $C_{\mu2}$, *etc.*

Light chains have a single constant domain, heavy chains have three (IgG, IgD, IgA) or four (IgM, IgE) constant domains.

Each domain consists of a compact globular unit, and they are linked to one another by short stretches of extended polypeptide chain.

Different domains share varying degrees of amino acid sequence similarity and a high degree of similarity in their three dimensional structures. These patterns of similarity indicates that the different domains, and the three different immunoglobulin gene families (encoding the heavy, kappa and lambda chains), are all the product of a series of gene duplications of a primordial gene resembling a single domain.

Heavy chains have a stretch of extended polypeptide chain which is not part of any domain, between the C_{HI} and C_{HII} domains. This segment is known as the HINGE REGION, and is the region containing the cysteine residues involved in the H-H and H-L disulfide linkages.

COVALENT AND NON-COVALENT FORCES STABILIZE ANTIBODY STRUCTURE

Many kinds of molecular interactions contribute to the extraordinary stability of antibody structure. We have already seen that the chain structure is held together by a series of *covalent disulfide linkages* between the two heavy chains, and between each light chain and one heavy chain.

In addition, *powerful non-covalent interactions exist between various adjacent pairs of domains*, specifically between V_L and V_H, between C_L and C_{HI}, and between the two C_{HII} domains; these are indicated by heavy lines between these regions in Figure 4-3. Thus, *even if all the disulfide bonds holding the chains together are broken, the overall structure of the Ig molecule will generally be maintained.*

Each domain forms an extremely stable globular structure, held together by powerful non-covalent forces as well as a single internal disulfide bond. The compactness of these structures confers a degree of resistance to proteolytic cleavage; it is for this reason that *much proteolytic cleavage* of immunoglobulins (as for instance with papain) takes place in the extended chains between domains.

ANTIBODIES BIND ANTIGENS BY POWERFUL NON-COVALENT FORCES

The basis of antibody-antigen binding is steric complementarity between the combining site and the epitope or antigenic determinant ("lock and key" concept). The combining site itself is made up by both V_L and V_H, most directly involving the hypervariable regions or CDRs ("complementarity determining regions") of both.

A variety of *non-covalent forces* are involved in this binding:

- 1) **Van der Waals interactions.** These are very weak and extremely short-range forces (they decrease with the seventh power of the distance), but they become important when many such interactions over the large area of an interactive surface are added together.
- 2) **Hydrophobic interactions.** Exclusion of water molecules between hydrophobic surfaces can also be a major contributor to antigen-antibody binding.

- 3) **Hydrogen bonds and ionic interactions** can also provide considerable stabilization of antibody-antigen binding, in those cases where the epitope is capable of participating in such interactions.

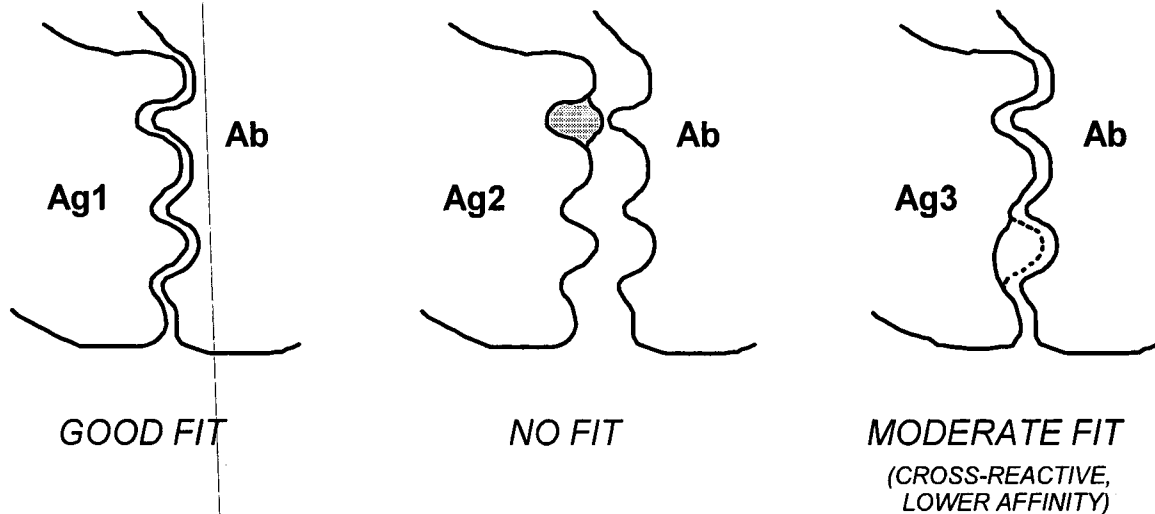


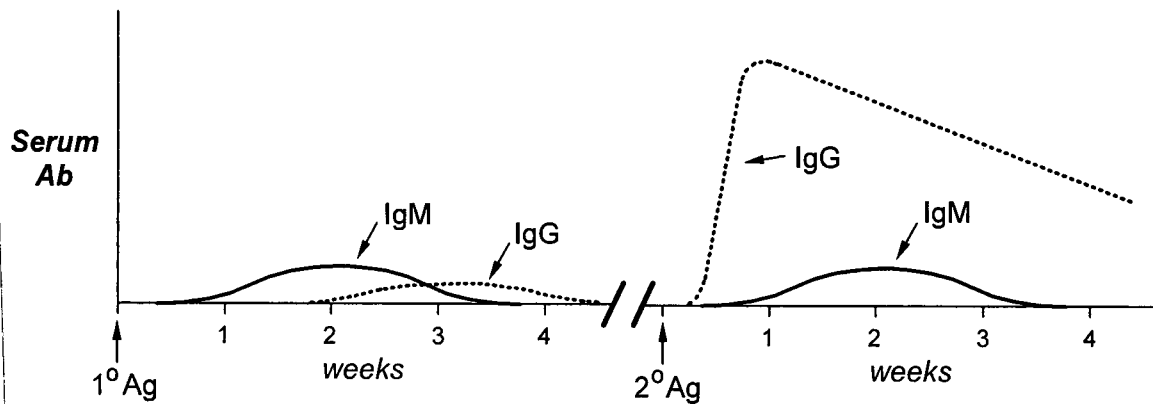
Figure 4-4

The single most critical factor in the strength of binding between antibodies and their antigens is the *degree of complementarity* ("goodness of fit") between the antibody combining site and the epitope (Fig. 4-4, left). A very slight change in the shape of either one can turn extremely strong binding into *no binding at all* (Fig. 4-4, center). Alternatively, a different kind of shape variation might turn strong binding into weaker binding, without eliminating it altogether; this is part of the basis of **cross-reactivity** between different but related antigens (Fig. 4-4, right).

IMMUNOLOGICAL MEMORY: PRIMARY *VERSUS* SECONDARY RESPONSES

One of the hallmarks of immune responses is their ability to display **memory**; the immune system in some way "remembers" what antigens it has seen previously, and responds *more effectively* the second time around. This is the basis, for instance, of acquired resistance to smallpox - having once recovered from the disease (or having been vaccinated), a person's immune system responds more rapidly the next time it is exposed to the virus, and eliminates it before the disease process can be initiated.

Having discussed the variety of known Ig *isotypes* and the concept of *affinity*, we can now identify several of the key features of immunological memory, illustrated in Figure 4-5 below, which shows the results of immunizing an animal with a "typical" antigen. The graph on the left represents the results of a *primary* immunization; plotted on the X-axis is the time after immunization in weeks, while the Y-axis represents a measure of the amount of antibody in the serum (which could be determined by any of the techniques we have described, agglutination, precipitation, ELISA, *etc.*). In the graph on the right we see the results following re-immunizing the same animal with the *same antigen* at some later date, termed a *secondary* immunization. The differences between the two graphs represent the features which define *immunological memory*.



PRIMARY AND SECONDARY HUMORAL RESPONSES

Figure 4-5

Outlined in the table below are the most important features which distinguish primary and secondary humoral immune responses.

PRIMARY RESPONSE	SECONDARY RESPONSE
• SLOW • LOW Ab LEVELS • SHORT-LIVED	• FAST • HIGH Ab LEVELS • LONG-LIVED
• MAINLY IgM • LOW AFFINITY	• MAINLY IgG • HIGH AFFINITY

(kinetics of clonal selection)

(Ig structure)

The first three features are a consequence of the cellular events in immune responses, while the last two relate to the physical properties of the antibodies produced.

- 1) **Speed.** In a "typical" primary response we see a lag of about 4 days, followed by a slow rise of antibody to a peak at about two weeks. In the secondary, the lag is only two days, and antibody levels rise very rapidly to a peak within 4-6 days.
- 2) **Antibody levels.** The secondary response reaches peak antibody levels which are very much higher than in the primary.
- 3) **Duration.** Primary responses not only appear more slowly, they disappear fairly rapidly. Antibody titers in secondary responses remain at high levels for longer periods of time, and in humans may persist for many years.
- 4) **Ig class.** The majority of the antibody in a primary response is IgM, with some IgG appearing later in the response; in a secondary, IgG is the predominant antibody throughout the response. IgM also appears during a secondary response, but at levels

and with a time course comparable to the primary and is therefore swamped out by the higher levels of IgG. *IgM does not exhibit immunological memory*: it does not appear more rapidly or at higher levels in secondary responses, and does not undergo significant affinity maturation.

- 5) **Affinity.** The average affinity of antibody in a secondary response is higher than in a primary response. Even during the course of a particular secondary response, it can be shown that the affinity of "late" antibody is higher than that of "early" antibody. This progressive increase in the average affinity of antibody is known as AFFINITY MATURATION.

The net result of immunological memory is an immune response of greatly increased effectiveness. The antibody is made *more rapidly*, it is made in *higher amounts*, it *lasts longer*, and it is made with *higher affinity* so that it binds more effectively to its target. The mechanisms involved in all of these phenomena will become clearer when we have discussed the CLONAL SELECTION THEORY (see Chapter 7).

NOTE: It is important to keep in mind that immune responses vary greatly in their time course, intensity and persistence. While the figure above illustrates the antibody responses to a "typical" antigen in a "typical" organism, any particular response may be very different in many of its features. One antigen may result in a much slower or more rapid response than another, or may be unable to produce a secondary response at all. Nevertheless, the fundamental differences between primary and secondary responses are important and instructive generalizations.

CHAPTER 4, STUDY QUESTIONS:

1. Describe the structure and biological properties of the pepsin- and papain-generated PROTEOLYTIC FRAGMENTS of antibodies.
2. What are the distinguishing *structural* and *biological* features of each of the five CLASSES of human Ig?
3. What are the common structural features of *all* antibodies?
4. Why did the discovery of VARIABLE and CONSTANT regions of immunoglobulin heavy and light chains pose such a serious puzzle for molecular biologists?
5. How do the globular DOMAINS of immunoglobulins contribute to the remarkable stability of antibodies?
6. What features of SECONDARY antibody responses make them more effective than PRIMARY responses?

AACR Meeting Abstracts Online

HOME HELP FEEDBACK HOW TO CITE ABSTRACTS ARCHIVE CME INFORMATION SEARCH

Cancer Research
Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention
Molecular Cancer Research
Cancer Prevention Journals Portal
Annual Meeting Education Book

Clinical Cancer Research
Molecular Cancer Therapeutics
Cancer Prevention Research
Cancer Reviews Online
Meeting Abstracts Online

QUICK SEARCH: [advanced]

Go Author: Keyword(s):

[Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 45, 2004]

This Article

Cellular, Molecular, and Tumor Biology 63: Biomarkers for Tumor Progression Abstract #3314

Expression of melanoma inhibitory activity (MIA) is correlated to expression of TGF- β 1 and structure of the extracellular matrix in high-grade glioma.

Peter Hau, Anett Doerfelt, Petra Ruemmele, Christian Bauhuf, Adolf Mueller, Ulrich Bogdahn and Anja-Katrin Bosserhoff

University of Regensburg, Regensburg, Germany and Krankenhaus der Barmherzigen Brueder, Regensburg, Germany

Introduction: MIA/CD-RAP, a 11 kD protein, is related to invasion and metastasis of melanoma. An alternative splice product termed MIA(splice), a 7 kD protein lacking exon 2 of the original MIA, was described recently. As expression of both proteins was detected in about 30% of high-grade gliomas, we speculate that it might be crucial for dissemination or progression. TGF- β 1 is known to be an important enhancer of tumor progression in high-grade glioma, in part by promoting glioma cell motility and regulating extracellular matrix turnover. Consistent with this, we observed modulation of the differential expression of MIA and MIA(splice) within 96 hours under treatment with TGF- β 1 in vitro. **Methods:** In a series of 24 operative specimen of high-grade gliomas (glioblastoma, n=19; anaplastic tumors, n=5), we examined correlations of expression levels of MIA and MIA(splice) with TGF- β 1, both on the level of RNA (quantitative PCR) as well as protein (ELISA, Western Blot; immunohistochemistry) using the Spearman correlation coefficient. In addition, we correlated the expression of all three proteins to morphological markers of migration (multifocal occurrence, gliomatosis, metastasis, and invasive growth) and early progression (defined as progression earlier than median time to progression). **Results:** MIA and MIA(splice) expression are strongly correlated to each other (n=15; CC 0.593; p=0.019). The level of expression of MIA protein, but not of MIA(splice), correlates to the percentage of expression (n=22; CC=0.411; p=0.057) and the intensity of cytoplasmatic staining for TGF- β 1 (n=22; CC= 0.445; p= 0.038). Correlations were even enhanced concerning MIA mRNA. Interestingly, we see no correlation to the amount of TGF- β 1 protein in the extracellular matrix. In addition, density of fibers in the extracellular matrix, but not the morphological factors mentioned above, correlated significantly (p<0.05) with the expression of MIA and TGF- β 1. Patients with early tumor progression had no higher expression levels of all three proteins than late progressors. **Discussion:** Expression levels of MIA, but not MIA(splice), correlate to the expression of TGF- β 1 and to a high density of fibers in the extracellular matrix of high-grade gliomas. We hypothesize that the expression of MIA is modulated by TGF- β 1, and that the modulation of MIA may modify, in conjunction with TGF- β 1, the structure of the extracellular matrix in high-grade glioma, with potential clinical implications awaiting further clarification. This fits well with data that MIA plays an important role in

Services

- ▶ [Similar articles in this journal](#)
- ▶ [Download to citation manager](#)

Citing Articles

- ▶ [Citing Articles via Google Scholar](#)

Google Scholar

- ▶ [Articles by Hau, P.](#)
- ▶ [Articles by Bosserhoff, A.-K.](#)
- ▶ [Search for Related Content](#)

PubMed

- ▶ [Articles by Hau, P.](#)
- ▶ [Articles by Bosserhoff, A.-K.](#)

invasive malignant melanoma. However, it is unclear at this point, why the expression levels of MIA(splice) do not correlate with the factors tested here, an observation which may be explained by differential regulation processes of the splice product seeking further investigation.

[HOME](#) [HELP](#) [FEEDBACK](#) [HOW TO CITE ABSTRACTS](#) [ARCHIVE](#) [CME INFORMATION](#) [SEARCH](#)

[Cancer Research](#)

[Clinical Cancer Research](#)

[Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention](#)

[Molecular Cancer Therapeutics](#)

[Molecular Cancer Research](#)

[Cancer Prevention Research](#)

[Cancer Prevention Journals Portal](#)

[Cancer Reviews Online](#)

[Annual Meeting Education Book](#)

[Meeting Abstracts Online](#)

[Copyright © 2004 by the American Association for Cancer Research.](#)