

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

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

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-013004-00011-0000

Fecha: 2011-08-30 17:20:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 12

Re: PI.-WYETH.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para
"MOLÉCULAS DE LUBRICINA RECOMBINANTES Y USOS DE LAS
MISMAS".-Clase A61K 38/17; 31/728; 39/395; A61P 19/02; C07K
14/435.-Expediente número 06-013.004.-

1. Yo, **ALICIA LLOREDA RICAURTE**, mayor, vecina de esta ciudad, abogada titulada e identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá, para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **WYETH**, organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada en Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América, atentamente manifiesto a usted que interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución Número **41294**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 29 de Julio de 2011 y notificada por Edicto fijado el 8 de Agosto del mismo año, en la cual se niega el privilegio de patente para la solicitud en referencia.

2. FUNDAMENTOS DE HECHO

(1) El 9 de Febrero de 2006 se presentó ante la División de Nuevas Creaciones de la Superintendencia de Industria y Comercio (en adelante **SIC**), una solicitud de Patente de Invención para "**MOLÉCULAS DE LUBRICINA RECOMBINANTES Y USOS DE LAS MISMAS**", a nombre de **WYETH**, sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, y domiciliada en Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América.

(2) La solicitud mencionada fue admitida a trámite por ese Despacho en vista del cumplimiento de los requisitos establecidos en la ley, siéndole otorgado el número de radicación 06-013.004.

(3) Posteriormente, en virtud del Artículo 38 de la Decisión 486, la SIC expidió el auto de forma notificado por estado de 7 de Abril de 2006 ese Despacho requirió al solicitante la presentación del documento de cesión de los inventores al solicitante.

(4) Mediante memorial de 9 de Mayo de 2006 se allegó al despacho el documento que acredita el traspaso que los autores del invento hicieron de sus derechos a favor de mi representada, así como también se presentaron los documentos completos de Reporte de Búsqueda Internacional y Opinión Escrita.

(5) Posteriormente, el extracto de la solicitud de la referencia apareció publicado en la Gaceta de la Propiedad Industrial No. 579 de fecha 31 de Agosto de 2007, surgiendo para el solicitante la carga de solicitar la realización del examen de patentabilidad de la invención cuya protección se pretende, así como la de pagar la correspondiente tasa administrativa. El solicitante, estando dentro del término previsto, mediante memorial de fecha 28 de Noviembre de 2007 solicitó dicho examen, adjuntando el recibo de pago que acreditaba la cancelación de la tasa administrativa mencionada.

(6) En virtud del Artículo 45 de la Decisión Andina 486 de 2000, la SIC expidió el Concepto Técnico No. 690, notificado por fijación en lista de 12 de Marzo de 2010, mediante el cual le fueron notificadas al solicitante las objeciones formuladas por ese Despacho respecto del cumplimiento de los requisitos de Claridad¹, Unidad de Invención², No es una invención³ y Excepción de Patentabilidad⁴ exigidos para el otorgamiento del privilegio de patente.

(7) El solicitante dio respuesta oportuna a dicho requerimiento el día 1 de Junio de 2010, refiriéndose a cada una de las objeciones expuestas por ese Despacho en su Concepto Técnico No. 690, a través de argumentos técnicos idóneos y suficientes para superar las mismas.

(8) No obstante lo anterior, nuevamente en virtud del Artículo 45 de la Decisión Andina 486 de 2000, la SIC expidió el Concepto Técnico No. 2764, notificado por fijación en lista de Agosto 27 de 2010 mediante el cual le fueron informadas al solicitante las objeciones formuladas nuevamente por ese Despacho respecto del cumplimiento de los requisitos de Claridad de la solicitud, y ahora argumentando una supuesta falta de Novedad⁵ con base en las enseñanzas del documento (D1) WO 00/64930.

(9) El solicitante dio respuesta oportuna al requerimiento previamente mencionado el día 23 de Noviembre de 2010, refiriéndose a cada una de las objeciones expuestas por ese Despacho en su Concepto Técnico No.2764.

(10) Nuevamente en virtud del Artículo 45 de la Decisión Andina 486 de 2000, la SIC expidió el Concepto Técnico No. 4279, notificado por fijación en lista de 14 de Enero de 2011 mediante el cual le fueron informadas al solicitante las objeciones formuladas nuevamente por ese Despacho respecto del cumplimiento de los requisitos de Claridad, y en esta oportunidad argumentando una supuesta falta de Nivel Inventivo⁶ con base en las enseñanzas del documento (D1) WO 00/64930.

¹ Decisión Andina 486 de 2000, Artículo 30.

² Decisión Andina 486 de 2000, Artículo 25.

³ Decisión Andina 486 de 2000, Artículo 15.

⁴ Decisión Andina 486 de 2000, Artículo 20.

⁵ Decisión Andina 486 de 2000, Artículo 16.

⁶ Decisión Andina 486 de 2000, Artículo 18.

(11) El solicitante dio respuesta oportuna al requerimiento previamente mencionado el día 6 de Abril de 2011, refiriéndose a cada una de las objeciones expuestas por ese Despacho en su Concepto Técnico.

(12) Sin embargo, en respuesta a lo anterior la SIC expidió la Resolución número **41294**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio, el 29 de Julio de 2011 y notificada por Edicto fijado el 8 de Agosto de 2011, mediante la cual se negó el privilegio de patente para el objeto reclamado, argumentando falta de Nivel Inventivo de la invención a la luz de las enseñanzas del documento (D1) WO00/64930.

Son los hechos aquí enunciados los que dan lugar al presente recurso de reposición, sustentado en los siguientes:

3. FUNDAMENTOS DE DERECHO

(1) Por medio de la Resolución Número **41294** se ha negado el privilegio de patente solicitado para la invención de la referencia, con base en una supuesta falta de Nivel Inventivo de la solicitud teniendo en cuenta la existencia del documento **WO 00/64930 (D1)**.

(2) De la lectura de la referida Resolución Número **41294** es evidente el análisis erróneo que hace ese Despacho del arte previo citado y la falta de consideración con respecto tanto del aporte que brinda la presente invención como de las características particulares que esta posee, constituyéndose dicha actuación en una violación de los Artículos 14 y 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

(3) Así mismo, de la lectura de la Resolución impugnada, es también claro que ese Despacho no repara en los argumentos presentados en mi memorial de 6 de Abril de 2011, los cuales establecen de forma incontrovertible el nivel inventivo que conlleva la solicitud denegada frente al estado del arte más próximo, y por lo tanto ese Despacho afirma que *"el experto medianamente versado en la materia de conformidad con las enseñanzas de D1 podría llegar a la solución del problema técnico planteado en esta solicitud, que era proporcionar composiciones terapéuticas para incrementar la lubricación en articulaciones y contrarrestar la indeseable adherencia entre tejidos. Además, se considera que las secuencias derivadas de repeticiones de la secuencia KEPAPTT, como las reivindicadas, son evidentes para una persona versada en la materia"*.

Sobre este particular, me permito dirigir la atención de ese Despacho a los siguientes argumentos técnicos, por medio de los cuales se puede afirmar sin lugar a dudas que la materia revelada en la invención denegada, es merecedora del privilegio de patente solicitado ya que, contrario a la posición de esa Oficina, dicha materia sí cumple con el requisito de nivel inventivo tal como es exigido en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, como me permito demostrar a continuación.

4. ARGUMENTOS TECNICOS

(1) **La persona versada en la materia no podría haber obtenido las proteínas variantes de Lubricina reveladas en la presente invención a partir de las enseñanzas de D1.**

En primer lugar, me permito señalar que la solicitud denegada se refiere a nuevas proteínas recombinantes variantes de lubricina en donde se han eliminado buena parte o la mayoría de las repeticiones tipo mucina, las cuales contienen las secuencias KEPAPTT o tipo KEPAPTT de las que dependen las propiedades lubricantes de estas moléculas. Sorprendentemente, los inventores de la solicitud en cuestión han encontrado que dichas moléculas de lubricina recombinante, en donde buena parte o la mayoría de las repeticiones KEPAPTT o tipo KEPAPTT han sido eliminadas, también tienen propiedades lubricantes al igual que la lubricina de longitud completa y por lo tanto permiten incrementar la lubricación en articulaciones y contrarrestar la indeseable adherencia entre tejidos.

Para llegar a la obtención de las moléculas de lubricina recombinante de la solicitud negada, los inventores tuvieron que superar importantes obstáculos técnicos en la producción de Lubricina recombinante tal como se mencionan a continuación:

El primer obstáculo técnico enfrentado por los inventores de la solicitud se asocia con la proteína de Lubricina de longitud completa, la cual contiene repeticiones tipo mucina que hacen que sea difícil de expresar debido a la naturaleza altamente repetitiva de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas repeticiones. Tanto así, que cuando los inventores de la solicitud intentaron expresar Lubricina recombinante **de cadena completa** en células de Ovario de Hámster Chino (CHO por sus siglas en inglés), usando las mismas metodologías y reactivos divulgados en la solicitud denegada en cuestión, no tuvieron éxito.

Sumado a lo anterior, los inventores encontraron que no era posible amplificar el ADN que codifica toda la molécula de Lubricina usando técnicas de PCR. De esta manera, los inventores intentaron expresar la Lubricina de longitud completa por ensamblaje de fragmentos de ADNc que codificaban porciones de la molécula, seguido del empalme de los fragmentos para llegar a una secuencia que codificara la Lubricina de longitud completa. Sin embargo, esta estrategia falló en repetidas ocasiones en el laboratorio, ya que se encontró que los ácidos nucleicos que codifican la molécula de Lubricina de longitud completa se habrían reorganizado cuando fueron transformados dentro de las células de *E. Coli* usadas para la producción a gran escala de ADN, y como consecuencia, en los clones resultantes se encontró que se habían perdido fragmentos de ADN, y por lo general los fragmentos perdidos codificaban repeticiones tipo mucina. En otras palabras, los fragmentos perdidos codificaban las repeticiones que contienen las secuencias KEPAPTT y tipo KEPAPTT.

Por lo tanto, para superar las dificultades técnicas ya mencionadas, asociadas con la clonación y expresión de Lubricina de longitud completa, **los inventores crearon variantes de Lubricina de menor longitud las cuales contenían menos repeticiones de dominios tipo mucina, y por ende contenían menos repeticiones de las secuencias KEPAPTT y tipo KEPAPTT en comparación con la Lubricina de longitud completa.**

De esta forma, **usando cadenas de ácidos nucleicos más pequeñas que codifican las variantes de Lubricina reveladas en la solicitud** (ver por ejemplo la construcción de ADNc PRG4-Lub:1 recombinante (SEQ ID NO: 6) para la obtención de la variante de lubricina recombinante PRG4-Lub:1 en las páginas 18 y 19 del texto de la descripción de la solicitud denegada), **los solicitantes optimizaron la producción de Lubricina recombinante como se describe en esta misma solicitud, y produjeron satisfactoriamente rendimientos sorprendentes de al menos 5-10 mg/ml de la proteína variante de Lubricina purificada por litro del medio acondicionado de CHO. Lo anterior constituye un efecto técnico significativo e inesperado que supera un obstáculo substancial en el desarrollo de Lubricina como un agente terapéutico potencial.**

Por su parte **el documento D1 no enseña o sugiere la expresión de variantes recombinantes de lubricina para proveer una molécula terapéutica.** Por el contrario, el documento **D1 se centra en describir el aislamiento de lubricina de longitud completa del líquido sinovial humano usando las técnicas cromatográficas estándar de purificación de proteínas** (véase en D1 las páginas 19 y 20).

Adicionalmente, D1 únicamente proporciona en un lenguaje estándar de textos de patentes cómo una proteína puede ser clonada y expresada en un sistema basado en células, pero la expresión real de Lubricina de longitud completa o de cualquier tamaño **no** es mostrada o descrita en D1, lo único que se describe en D1 es el aislamiento de lubricina de longitud completa de líquidos sinoviales.

Así las cosas, mientras que la producción de una proteína similar a una proteína determinada por tecnología de ingeniería genética rutinaria, podría ser evidente para una persona versada en la materia, **ese no es el caso que se presenta en esta invención, toda vez que una extensa experimentación fue requerida para producir una proteína altamente compleja,** superando así los problemas técnicos extraordinarios ya mencionados con respecto a la clonación de ácidos nucleicos y expresión de proteínas recombinantes de lubricina.

Asimismo, es evidente que **D1 no hace ninguna referencia a la manera como fueron superadas las dificultades técnicas ya mencionadas para la producción de Lubricina de longitud completa, esto debido a que la producción de la proteína de Lubricina de longitud completa ni siquiera se intentó en D1.**

Por lo tanto, **los problemas técnicos solucionados por la presente solicitud, nunca fueron señalados o identificados, y mucho menos solucionados en D1, razón por la cual la persona versada en la materia no hubiera podido obtener las variantes recombinantes de lubricina objeto de la presente invención a partir de las enseñanzas de ese documento.**

Adicionalmente, suponiendo que la persona versada en la materia pudiera haber tenido algún indicio de los resultados que se obtendrían de hacer eliminaciones, sustituciones o adiciones a una proteína conocida, ese no es el caso de la presente invención, en donde muchas repeticiones tipo mucina fueron removidas de una proteína cuyas propiedades lubricantes dependen de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT contenidas en dichos dominios tipo mucina, lo que conduciría a la persona versada en la materia a que la actividad lubricante de la lubricina se perdería. No obstante, **como se revela en la solicitud en mención, las variantes recombinantes de lubricina en donde algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT fueron eliminadas, de manera sorprendente poseen actividad lubricante al igual que la lubricina de longitud completa que contiene todas las secuencias KEPATT y tipo KEPATT.**

Por lo tanto, **hasta que una variante de Lubricina recombinante de longitud corta, como las que se ejemplifican en la presente invención, no fuera producida, no hubiera sido posible determinar si las versiones cortas de Lubricina que carecen de algunos o la mayoría de los dominios tipo mucina podrían tener las propiedades lubricantes terapéuticas de la proteína natural de longitud completa aislada del liquido sinovial (y referida en D1 como "tribonectina").**

Sumado a lo anterior, aunque el documento D1 señala de manera general que las tribonectinas que tienen actividad lubricante se basan en la repetición de 1 a 76 veces de las secuencias KEPATT (ver líneas 10 a 12 de la página 2 de D1), la única variante de Lubricina producida en D1 fue un fragmento de la proteína que contiene el exón 6 completo, fragmento que a pesar que contiene todas las repeticiones tipo mucina, y por lo tanto contiene todas las secuencias KEPATT y tipo KEPATT de las que depende la propiedad lubricante de la lubricina, demostró no tener actividad lubricante (ver en D1 la tabla 7, página 33). Así, queda demostrado que **D1 no contiene la información suficiente para conducir de manera obvia o evidente a la persona versada en la materia a que hacer eliminaciones de algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT de la lubricina de longitud completa permitiera mantener la actividad lubricante de estas, razón por la cual D1 no es referencia valida contra el nivel inventivo de la presente invención.**

En conexión con lo anterior, para la persona versada en la materia era completamente inesperado que una versión corta de Lubricina de la cual la mayoría de las repeticiones KEPATT y tipo KEPATT habían sido eliminadas, pudiera ser usada para

lubricar articulaciones como se demostró en la solicitud presentada y como se corrobora en el artículo de Flannery et. al 2009.

Igualmente, una persona versada en la materia no podría negar que la expresión recombinante de variantes de Lubricina que carecen de algunas o la mayoría de las repeticiones KEPATT y tipo KEPATT corresponde a una clara actividad inventiva que ha permitido la producción recombinante de Lubricina, la cual, hasta la presente invención, solo había sido purificada en su forma de longitud completa del líquido sinovial como se revela en D1.

Adicional a lo anterior, me permito recalcar que debido a que D1 es completamente silencioso sobre cómo lograr la producción de lubricina recombinante de longitud completa o cualquier variante de la misma que conserve la actividad lubricante de la lubricina de longitud completa, **D1 no es una referencia que pueda afectar el nivel inventivo de la presente invención, toda vez que D1 no da ningún indicio a la persona versada en la materia que lo motive a eliminar algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT de la lubricina de longitud completa, buscando obtener las variantes recombinantes de lubricina objeto de la presente invención, las cuales sorprendentemente poseen actividad lubricante a pesar que algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT, de las que depende la actividad lubricante de la lubricina, fueron eliminadas.**

Finalmente, en vista que D1 no enseña Lubricina de cualquier tipo de longitud que fuera producida genéticamente y que además revela que el exón 6 de la proteína obtenido por una ruptura proteolítica usando quimotripsina carece de habilidad lubricante, es a todas luces evidente que el documento D1 en realidad está lejos de enseñar la sorprendente invención, particularmente en lo referente a las variantes de Lubricina que carecen de algunas o incluso la mayoría de las repeticiones de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT tienen actividad lubricante.

Por estas razones, las proteínas de Lubricina descritas en la solicitud denegada no serían evidentes ni obvias para una persona versada en la materia a partir de las enseñanzas de D1.

Adicionalmente, **no se puede negar que resulta sorprendente e inesperado para una persona versada en la materia que tomara como base las enseñanzas de D1, que variantes de Lubricina que carecen de algunos o la mayoría de los dominios tipo mucina (los cuales contienen las secuencias KEPATT y tipo KEPATT de las que dependen las propiedades lubricantes de la lubricina) tengan actividad lubricante.**

Por ultimo, las variantes de Lubricina recombinante de la solicitud al tener menor número de secuencias KEPATT o tipo KEPATT en comparación con la lubricina de longitud completa, son más fáciles de sintetizar y manipular, lo que se traduce en costos más bajos y tiempos más cortos de producción de dichos agentes terapéuticos,

permitiendo que su producción a gran escala sea más factible que el uso de la Lubricina de longitud completa mostrada en D1, lo que corresponde a un evidente salto cualitativo en la regla técnica conocida hasta antes de la presente solicitud.

En vista de lo anterior, queda demostrado que el documento D1 al revelar principalmente la purificación de lubricina de longitud completa de líquidos sinoviales, al no indicar explícitamente la síntesis de ningún tipo de lubricina recombinante, ni proporcionar la manera de solucionar los obstáculos técnicos presentados al intentar obtener variantes de lubricina usando tecnología de ingeniería genética, y al mostrar solo una variante de Lubricina con todos los dominios tipo mucina (que contienen las secuencias KEPAPTT), la cual no presenta ninguna actividad lubricante, D1 no puede de ninguna manera ser considerado como un documento del cual se pueda partir para obtener las variantes recombinantes de lubricina de la presente invención, que carecen de algunas o la mayoría de las repeticiones de las secuencias KEPAPTT y tipo KEPAPTT y que sorprendentemente conservan la actividad lubricante de la lubricina de longitud completa.

(2) Consideraciones frente a los argumentos establecidos por la SIC en a Resolución Número 41294.

Ahora bien, sobre lo establecido por ese Despacho en la Resolución Número **41294** frente a los argumentos expuestos en mi memorial de 6 de Abril de 2011, me permito presentar las siguientes consideraciones por medio de las cuales se puede evidenciar la interpretación errónea que ese Despacho ha realizado de la materia de la solicitud denegada y de los argumentos presentados en mi memorial de dicha fecha:

(i) En primer lugar, ese Despacho hace referencia a los argumentos presentado en mi memorial de 6 Abril de 2011, los cuales cito a continuación:

"Por lo tanto, para superar las dificultades técnicas ya mencionadas, asociadas con la clonación y expresión de Lubricina de longitud completa, los inventores crearon variantes de Lubricina de menor longitud, las cuales contenían menos repeticiones de dominios tipo mucina en comparación con la lubricina de longitud completa.

De esta forma, usando cadenas de ácidos nucleicos mas pequeñas que codifican las variantes de Lubricina reveladas en la presente solicitud, los solicitantes optimizaron la producción de Lubricina recombinante como se describe en esta misma solicitud, y produjeron satisfactoriamente rendimientos sorprendentes de al menos 5-10 mg/ml de la proteína variante de Lubricina purificada por litro del medio acondicionado de CHO. Lo anterior constituye un alcance tecnológico significativo que supera un obstáculo substancial en el desarrollo de Lubricina como agente terapéutico potencial"

Frente a estos argumentos, ese Despacho señala "que dichos argumentos se refieren a un método para producir variantes de lubricina que supera problemas en la producción de lubricina de forma recombinante, pero dicho método no se

presenta como la solución al problema presentado en la solicitud, el cual se soluciona con las moléculas propiamente dichas y reivindicadas (reivindicación 1).

Es decir, los argumentos no son aceptado debido a que la solicitud debió enfocarse en un método para producir lubricina recombinante y no en dicho compuesto como tal."

En respuesta a estos señalamientos, me permito manifestar a ese Despacho que los argumentos anteriormente mencionados, presentados en mi memorial de 6 de Abril de 2011, son argumentos que señalan la manera como fueron superados los inconvenientes asociados con la clonación y expresión de lubricina, los cuales no podrían haber sido previstos y mucho menos solucionados por una persona versada en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en el documento D1.

Por lo tanto, **estos argumentos establecen cómo las variantes recombinantes de lubricina que son objeto de la solicitud no podrían haber sido obtenidas de manera obvia o evidente por la persona versada en la materia a partir de las revelaciones del documento D1.**

Por otra parte, el segundo argumento señalado, hace referencia también a un resultado sorprendente obtenido con las proteínas variantes de lubricina objeto de la solicitud, ya que el obtener rendimientos sorprendentes de al menos 5-10 mg/ml de la proteína variante de lubricina purificada por litro del medio acondicionado de CHO radica en que las variantes de lubricina propiamente dichas al tener menor número de secuencias KEPATT y tipo KEPATT en comparación con la lubricina de longitud completa, son mas fáciles de sintetizar y manipular, **lo que permite producir a gran escala dichos agentes terapéuticos de manera mas rápida y a costos mas bajos, haciendo mas factible el uso de las variantes de lubricina de la presente invención que el uso de la lubricina de longitud completa mostrada en D1**, lo que corresponde, como se señaló anteriormente, a un evidente salto cualitativo en la regla técnica conocida hasta antes de la presente solicitud, que hace que las proteínas variantes de lubricina objeto de la solicitud sean inventivas frente al documento D1.

En vista de lo anterior, es claro que los argumentos expuestos por mi representada los cuales fueron objetados por ese Despacho, señalan claramente en primer lugar que los problemas asociados con la clonación y expresión de lubricina no podrían haber sido identificados y mucho menos solucionados de manera obvia por una persona versada en la materia a partir de las enseñanzas del estado de la técnica. En segundo lugar que una de las características técnicas de las variantes de lubricina de la solicitud negada, es tener menos dominios tipo mucina en comparación la lubricina de longitud completa; finalmente y para resaltar un resultado sorprendente proporcionado por las variantes de lubricina de la solicitud negada en cuestión; y no como afirma ese Despacho que dichos argumentos se refieran únicamente a las características de un método para producir variantes de lubricina y no a las variantes de lubricina en si.

Por tal razón, ese Despacho debe tener en cuenta los argumentos objetados, los cuales se reiteran dentro del presente escrito, en donde, como se mencionó antes, son argumentos que hacen saltar a la vista el nivel inventivo que conlleva la solicitud negada.

(ii) Adicionalmente, ese Despacho señala que *"si la característica técnica esencial era que las moléculas de lubricina tuvieran menos repeticiones de dominios tipo mucina, esto debió ser reivindicado como se sugirió en los conceptos técnicos anteriores, donde se objetaba para que se especificaran las características técnicas que compartían las moléculas reivindicadas."*

Respecto a este señalamiento, me permito manifestar que las proteínas variantes de lubricina tal como fueron reivindicadas en la presente solicitud brindan información suficiente a la persona versada en la materia para que reconozca de manera evidente que las moléculas variantes de lubricina objeto de la solicitud tienen menos repeticiones de dominios tipo mucina, esto debido a que la secuencia de la proteína de Lubricina de longitud completa (proteína PRG 4) es bien conocida en el estado de la técnica (ver por ejemplo US 6433142, mencionada en la página 2 del texto de la solicitud) y por una simple comparación de esta secuencia con las secuencias de las proteínas variantes de lubricina de la presente invención, la persona versada en la materia notará que los aminoácidos que comprenden varias de las repeticiones tipo mucina, codificadas por el exón 6 del ADN que codifica la molécula de lubricina de longitud completa, fueron eliminados.

Por ejemplo, para la persona versada en la materia, que es la persona a quien va dirigida la invención, será evidente que las repeticiones tipo mucina eliminadas de la proteína variante de lubricina PRG4-Lub:1 de la invención (ver SEQ ID NO:7), corresponden a los aminoácidos A374 a P847 de PRG4 nativo (474 aminoácidos eliminados dentro de los que se encuentran 59 secuencias KEPATT de las aproximadamente 78 secuencias KEPATT que contiene la proteína nativa), los cuales fueron remplazados en la lubricina recombinante PRG4-Lub:1 por 51 aminoácidos que forman cuatro secuencias KEPATT perfectas y aproximadamente tres secuencias KEPATT imperfectas (ver SEQ ID NO: 9). (ver páginas 18 y 19 del texto de la solicitud)

En vista de lo anterior, para la persona versada en la materia es evidente que la característica técnica esencial de las proteínas variantes de lubricina de la invención, es que las mismas tienen menos repeticiones tipo mucina entre los aminoácidos codificados por el exón 6 del ADN que codifica la proteína variante de lubricina recombinante, en comparación con las repeticiones tipo mucina que tiene la proteína de lubricina de longitud completa. En consecuencia, no se hace necesario mencionar textualmente dentro del capítulo reivindicatorio que *"las proteínas variantes de lubricina de la presente invención tienen como característica técnica esencial menos repeticiones tipo mucina en comparación con la proteína de lubricina de longitud completa"* toda vez que dicha expresión es obvia para la persona versada en la materia.

(iii) Adicionalmente, ese Despacho indica que dentro de mi memorial de 6 de Abril de 2011 se menciona que *"la solicitud no es obvia frente al documento D1 por cuanto:*

- a) D1 describe el aislamiento de lubricina de longitud completa del líquido.*
- b) D1 no evidencia la expresión real de lubricina de longitud completa o de cualquier tamaño*
- c) D1 no hace referencia a la manera como fueron superadas las dificultades técnicas ya mencionadas, para producción de lubricina de longitud completa"*

En este sentido, frente al literal a) ese Despacho afirma que *"es de conocimiento en el documento D1, que las características de la lubricina como lubricante natural se basan en la repetición de los aminoácidos determinados, como se vio en el análisis de patentabilidad y, que la secuencias con una cantidad de repeticiones de dicha secuencia, eran potenciales lubricantes, en cadenas mas cortas que la lubricina"*.

En respuesta a este señalamiento, me permito manifestar que tal como lo enuncia el documento D1, las características de la lubricina como lubricante natural se basan en la repetición de los aminoácidos de la secuencia KEPAPTT. Ahora bien, si las propiedades lubricantes de la lubricina radican en la repetición de los aminoácidos de la secuencia KEPAPTT, ¿podría la persona versada en la materia esperar que las proteínas variantes de lubricina en donde buena parte o la mayoría de las secuencias KEPAPTT han sido eliminadas, conservaran las propiedades lubricantes de la proteína de longitud completa, como lo hacen las variantes de lubricina de la presente solicitud?

Frente a esta pregunta, la persona versada en la materia reconocerá que no podría esperar que las proteínas variantes de lubricina en donde buena parte o la mayoría de las secuencias KEPAPTT han sido eliminadas conservarían las propiedades lubricantes, como sorprendentemente lo hacen las variantes de lubricina de la solicitud negada.

Sumado a lo anterior, la persona versada en la materia tendrá que reconocer también, que teniendo en cuenta las enseñanzas del documento D1 tampoco se podría predecir de manera obvia o evidente que dichas variantes de lubricina con menos repeticiones de secuencias KEPAPTT y tipo KEPAPTT conservarían las características lubricantes de la lubricina de longitud completa, toda vez que el documento D1, como se demostró anteriormente, principalmente se centra en el aislamiento de lubricina de longitud completa de líquidos sinoviales, pero la expresión recombinante de la proteína de lubricina de longitud completa o de fragmentos de la misma no es intentada en D1, como en D1 tampoco se intenta la eliminación de secuencias KEPAPTT y tipo KEPAPTT de la proteína de lubricina de longitud completa.

En este sentido, los inventores de la presente invención no lograron conseguir la expresión de la proteína de lubricina de longitud completa, **pero de manera sorprendente encontraron que podían solucionar este problema disminuyendo el número de secuencias KEPAPTT codificadas en el DNA de la proteína y de**

manera aún mas sorprendente, encontraron que dichas variantes de lubricina expresadas recombinantemente de las que algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT habían sido eliminadas conservaban las características lubricantes de la lubricina de longitud completa que contiene todas las secuencias KEPATT.

Por otro lado, frente al literal b) ese despacho afirma que "aunque no se evidencie la expresión de lubricina de longitud completa, dicho proceso es sugerido por D1 mostrando su secuencia, la forma de determinar las repeticiones y su potencial actividad, por cuanto un técnico medio versado en el arte desarrollaría de manera evidente secuencias como las reivindicadas esperando la misma actividad.

Respecto a la anterior afirmación, me permito señalar que un técnico medio versado en la materia no encontraría en D1 ningún indicio que lo motivara a desarrollar variantes de lubricina en donde algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT han sido eliminadas, con la expectativa de conseguir proteínas como las de la presente invención que conservan las características lubricantes de la lubricina de longitud completa, por la siguientes razones:

- Primero, es evidente que en el documento D1 al no haberse intentado la síntesis de lubricina de longitud completa, no se plantean los problemas asociados con la clonación y expresión de esta proteína y por lo tanto D1 no sugeriría al técnico medio versado en el arte la necesidad de desarrollar variantes de longitud corta de la lubricina.
- Si el técnico medio versado en el arte decidiera realizar variantes de lubricina de longitud mas corta, D1 no le sugeriría que pueda contemplar como una opción la eliminación de algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT.
- Ahora bien, si D1 enseña que la actividad lubricante de la proteína de lubricina de longitud completa depende de las secuencias KEPATT contenidas en los dominios tipo mucina, D1 no podría motivar al técnico medio versado en la materia a eliminar algunas o la mayoría de dichas secuencias KEPATT de la proteína de lubricina de longitud completa.

En vista de los anteriores argumentos, **queda claramente establecido que la obtención de las variantes de lubricina objeto de la presente invención no es obvia ni evidente a partir de las enseñanzas de D1 y por lo tanto dichas variantes de lubricina objeto de la invención son inventivas frente a las revelaciones del documento D1.**

Finalmente, frente al literal c) ese despacho asegura que *"si bien es cierto que D1 no hace referencia a dichas dificultades técnicas, la solicitud tampoco define dicha problemática y no se encuentra sustento para evidenciar que fue necesario emplear lubricina con menores dominios tipo mucina, para lograr su producción y que ésta fuera la*

característica esencial del proceso. Lo anterior no se encuentra demostrado en la descripción."

A este respecto, me permito señalar en primer lugar que la problemática referente a las dificultades técnicas asociadas con la expresión de lubricina de longitud completa no se encuentra el texto de la presente solicitud, toda vez que estas dificultades técnicas fueron presentadas en mi memorial de 6 de Abril de 2011 y en el presente recurso de reposición, como argumentos que ponen de manifiesto el nivel inventivo que conlleva la obtención de las proteínas variantes de lubricina objeto de la presente invención frente a las enseñanzas de D1.

Ahora bien, frente a la aseveración *"no se encuentra sustento para evidenciar que fuera necesario emplear lubricina con menores dominios tipo mucina, para lograr su producción y que esta fuera la característica esencial del proceso. Lo anterior no se encuentra demostrado en la descripción."*, me permito manifestar que como se demostró anteriormente, debido a que para la persona versada en la materia es claro de la lectura de la presente solicitud, que las proteínas variantes de lubricina producidas recombinantemente tienen como característica esencial contener menos repeticiones tipo mucina en comparación con la proteína de lubricina de longitud completa, también es claro para esta persona versada en la materia que el método descrito y reclamado en la presente solicitud tiene como característica producir variantes de lubricina que tienen menos repeticiones tipo mucina en comparación con la lubricina de longitud completa (ver ejemplos 1 y 2 contenidos en las páginas 18 a 35 y la reivindicaciones 22 y sus dependientes en el capítulo reivindicatorio de la solicitud), lo que permite que dichas variantes de lubricina puedan ser obtenidas y manipuladas mas fácilmente.

En consecuencia, la persona versada en la materia notará que sí hay sustento dentro del texto de la solicitud para evidenciar que la producción de variantes de lubricina se logra a través de la eliminación de algunos o la mayoría de los dominios tipo mucina, y por lo tanto es claro también que el método usado tiene como característica producir variantes de lubricina que tienen menos repeticiones tipo mucina en comparación con la lubricina de longitud completa.

5. CONCLUSIÓN

En conclusión, me permito señalar a ese Despacho que los hechos discutidos a lo largo del presente escrito, han establecido de forma incontrovertible que la presente solicitud sí cumple con el requisito de **Nivel Inventivo** requerido por el Artículo 18 de la Decisión 486, toda vez que las enseñanzas del arte previo no brindan los elementos suficientes para obtener de manera evidente las proteínas recombinantes variantes de lubricina objeto de dicha solicitud, las cuales sorprendentemente tienen actividad lubricante al igual que la proteína de lubricina de longitud completa a pesar que algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT y tipo KEPATT han sido eliminadas de dichas variantes de lubricina.

En primera instancia, la persona versada en la materia no podría obtener de forma obvia las proteínas recombinantes variantes de lubricina de la invención denegada a partir de las enseñanzas de D1, toda vez que dicho documento se centra en revelar el aislamiento de lubricina de longitud completa de líquidos sinoviales, pero la producción recombinante de lubricina de longitud completa no fue intentada y mucho menos conseguida en D1, por lo tanto D1 no daría ningún indicio a la persona versada en la materia de la necesidad de producir variantes de lubricina de menor longitud dado que D1 no identifica los problemas técnicos asociados con la clonación y expresión de la proteína de lubricina de longitud completa.

Por otro lado, dado que la única variante de lubricina producida en D1 fue un fragmento de la proteína que contiene el exón 6 completo, fragmento que a pesar que contiene todas las secuencias KEPATT y tipo KEPATT de las que depende la propiedad lubricante de la lubricina, demostró no tener actividad lubricante, la persona versada en la materia estaría consciente que D1 no contiene la información suficiente para conducir de manera obvia o evidente a hacer eliminaciones de algunas o la mayoría de las secuencias KEPATT de la lubricina de longitud completa esperando mantener la actividad lubricante de estas, razón por la cual D1 no es referencia válida contra el nivel inventivo de la presente invención.

Finalmente, las variantes de Lubricina recombinante de la solicitud al tener menor número de secuencias KEPATT o tipo KEPATT en comparación con la lubricina de longitud completa, son más fáciles de sintetizar y manipular, lo que se traduce en costos más bajos y tiempos más cortos de producción de dichos agentes terapéuticos, permitiendo que su producción a gran escala sea más factible que el uso de la Lubricina de longitud completa mostrada en D1, **esto corresponde a un evidente salto cualitativo en la regla técnica conocida hasta antes de la presente solicitud, lo que a todas luces hace inventiva la presente solicitud frente al documento D1.**

6. SOLICITUD:

En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y revocar la Resolución impugnada para conceder el privilegio de patente solicitado.

7. ANEXOS:

Anexo me permito presentar Copia del documento Flannery et. al., "*Prevention of Cartilage Degeneration in a Rat Model of Osteoarthritis by Intraarticular Treatment With Recombinant Lubricin*", *Arthritis & Rheumatism*, 2009, Vol. 60: pag. 840-847.

8. PODER:

El documento que acredita mi calidad de Representante Legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad peticionaria fue presentado junto la solicitud el 9 de Febrero de 2006.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

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

9. DOMICILIO

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

Del Señor Superintendente,



ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (o) con C.C. 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53215 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. Decreto. 2282/89 mod. 36)

23 AGO. 2011

Bogotá D.C. Alicia Lloreda Ricaurte
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén
FIRMA DE LA (EL) COMPARECIENTE

Jenny Nelly
Morales Beltrán
C.C. 1.015.393.013
V.Bos. 4



Prevention of Cartilage Degeneration in a Rat Model of Osteoarthritis by Intraarticular Treatment With Recombinant Lubricin

Carl R. Flannery,¹ Richard Zollner,¹ Chris Corcoran,¹ Aled R. Jones,¹ Adam Root,¹ Moisés A. Rivera-Bermúdez,¹ Tracey Blanchet,¹ Jason P. Gleghorn,² Lawrence J. Bonassar,² Alison M. Bendele,³ Elisabeth A. Morris,¹ and Sonya S. Glasson¹

Objective. Lubricin, also referred to as superficial zone protein and PRG4, is a synovial glycoprotein that supplies a friction-resistant, antiadhesive coating to the surfaces of articular cartilage, thereby protecting against arthritis-associated tissue wear and degradation. This study was undertaken to generate and characterize a novel recombinant lubricin protein construct, LUB:1, and to evaluate its therapeutic efficacy following intraarticular delivery in a rat model of osteoarthritis (OA).

Methods. Binding and localization of LUB:1 to cartilage surfaces was assessed by immunohistochemistry. The cartilage-lubricating properties of LUB:1 were determined using a custom friction testing apparatus. A cell-binding assay was performed to quantify the ability of LUB:1 to prevent cell adhesion. Efficacy studies were conducted in a rat meniscal tear model of OA. One week after the surgical induction of OA, LUB:1 or phosphate buffered saline vehicle was administered

by intraarticular injection for 4 weeks, with dosing intervals of either once per week or 3 times per week. OA pathology scores were determined by histologic analysis.

Results. LUB:1 was shown to bind effectively to cartilage surfaces, and facilitated both cartilage boundary lubrication and inhibition of synovial cell adhesion. Treatment of rat knee joints with LUB:1 resulted in significant disease-modifying, chondroprotective effects during the progression of OA, by markedly reducing cartilage degeneration and structural damage.

Conclusion. Our findings demonstrate the potential use of recombinant lubricin molecules in novel biotherapeutic approaches to the treatment of OA and associated cartilage abnormalities.

Osteoarthritis (OA) severely restricts the daily activities, mobility, and overall quality of life of millions of patients worldwide, imposing a high societal burden that reflects the current lack of effective medical therapies. OA is characterized by escalated degeneration and loss of articular cartilage, the specialized connective tissue covering the ends of interfacing bones within joints. To help withstand formidable biomechanical forces and loads, articular cartilage surfaces possess an inherently low coefficient of friction, which is facilitated in part by localization of the boundary lubricant lubricin (1). Lubricin was originally identified as a lubricating glycoprotein present in synovial fluid (2), and it is now recognized to have a major protective role in preventing cartilage wear and synovial cell adhesion and proliferation (3). Lubricin is encoded by the PRG4 gene, and PRG4-nullifying mutations can cause OA-like symptoms in mice and humans (3,4). Lubricin synthesis/localization (and therefore function) is also down-regulated in sheep (5), guinea pig (6), and rat (7) models of OA, further

Supported by Wyeth Research. Dr. Gleghorn is recipient of a Fellowship from the NASA Graduate Student Researchers Program (NNG-04GN57H).

¹Carl R. Flannery, PhD, Richard Zollner, BS, Chris Corcoran, BS, Aled R. Jones, PhD, Adam Root, MS, Moisés A. Rivera-Bermúdez, PhD, Tracey Blanchet, BS, Elisabeth A. Morris, DVM, Sonya S. Glasson, BVSc: Wyeth Research, Cambridge, Massachusetts; ²Jason P. Gleghorn, PhD, Lawrence J. Bonassar, PhD: Cornell University, Ithaca, New York; ³Alison M. Bendele, DVM, PhD: Bolder BioPATH, Inc., Boulder, Colorado.

Dr. Flannery, Mr. Zollner, Mr. Corcoran, Mr. Root, Dr. Rivera-Bermúdez, Ms Blanchet, Dr. Morris, and Ms Glasson own stock or stock options in Wyeth. Dr. Flannery and Mr. Corcoran have applied for a patent for recombinant lubricin molecules and their uses. Dr. Morris holds patents for methods of cartilage repair and treatment of ADAMTS-5-associated diseases.

Address correspondence and reprint requests to Carl R. Flannery, PhD, Wyeth Research, 200 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140. E-mail: cflannery@wyeth.com.

Submitted for publication May 7, 2008; accepted in revised form November 7, 2008.

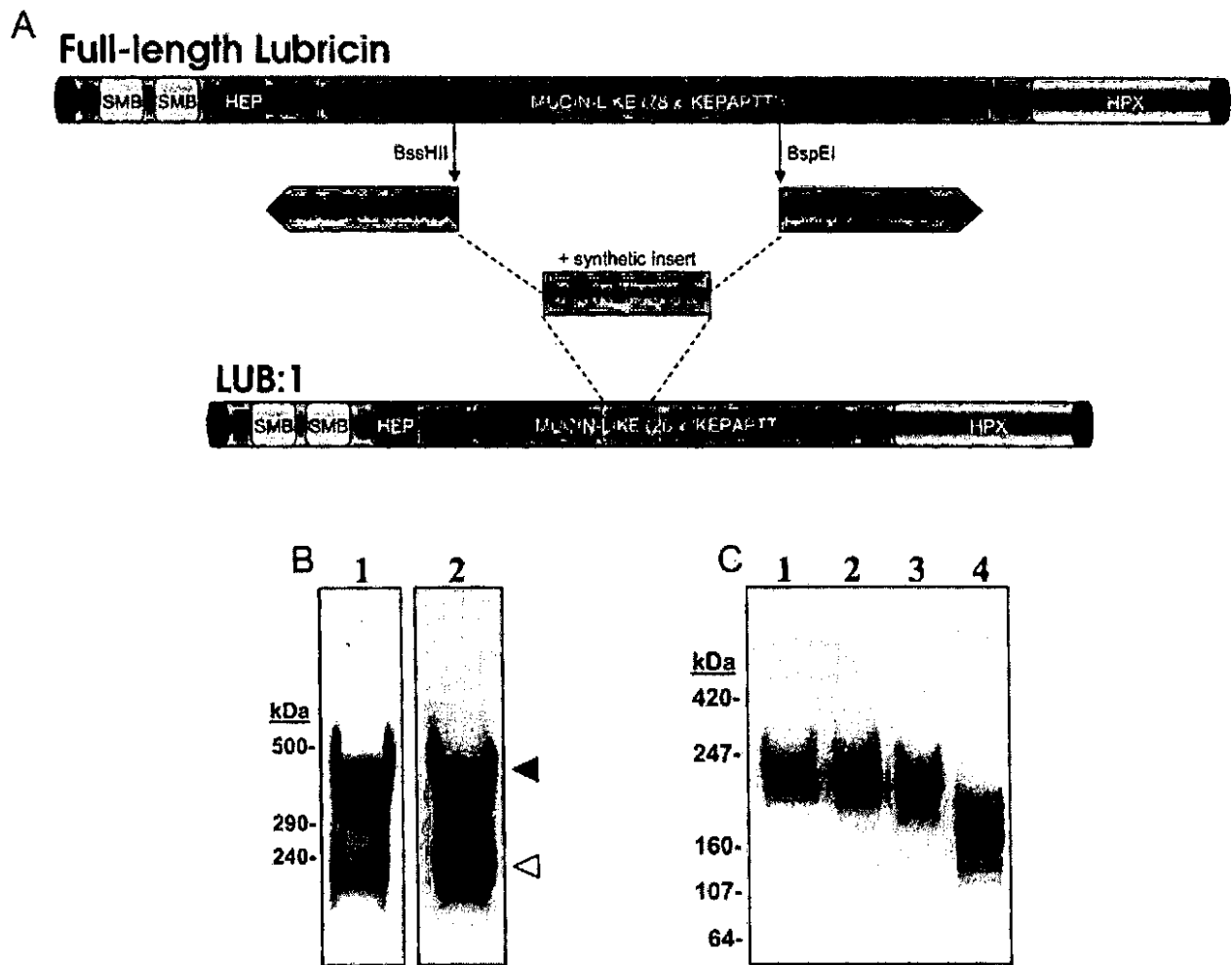


Figure 1. Production and characterization of recombinant lubricin construct LUB:1. **A**, Complementary DNA (cDNA) for human lubricin was subjected to restriction enzyme digestion at unique sites that flank the sequence encoding Ala³⁷⁴ to Pro⁸⁴⁷ (474 amino acids comprising 59 KEPAPTT-like repeat elements). This region was replaced with a synthetic cDNA cassette encoding 51 amino acids, including 7 KEPAPTT-like repeat elements, and the resulting construct, LUB:1, was expressed in stably transfected Chinese hamster ovary cells. SMB = somatomedin B-like; HEP = heparin binding; HPX = hemopexin-like. **B**, LUB:1 was purified from culture media by sequential heparin affinity and size-exclusion chromatography, and analyzed by nonreducing sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and Coomassie blue staining (lane 1) and Western blotting with antilubricin antibody 06A10 (lane 2). The open and solid arrowheads indicate the migration positions of monomeric and dimeric LUB:1, respectively. **C**, The glycosylation status of LUB:1 was assessed following no treatment (lane 1) or treatment with endo-*O*-glycosidase (lane 2), neuraminidase (lane 3), or endo-*O*-glycosidase combined with neuraminidase (lane 4).

suggesting that augmentation of lubricin levels in OA joints could be beneficial as a disease-modifying OA therapy.

The glycosaminoglycan hyaluronan (HA) is another principal component of synovial fluid. HA contributes to hydrodynamic lubrication mechanisms in the joint, and together with lubricin, is important for strain energy dissipation (8). Current clinical strategies for joint supplementation to treat OA involve the use of

purified HA formulations (viscosupplements), although whether there is evidence of an efficacious mechanism of action for such products has been debated (9). In the present study, we therefore tested the effects of treating OA joints with a purified preparation of recombinant lubricin, as assessed by monitoring changes in cartilage degeneration and structural damage.

Lubricin contains an extensive mucin-like region, with multiple repetitive KEPAPTT-like peptide se-

quence elements supporting attachment of lubricating O-linked oligosaccharides (1,10). We optimized the production yields of recombinant human lubricin by replacing most of these repeat sequences with a short synthetic cassette comprising 7 KEPAPTT-like repeat elements (11). The resulting construct, designated LUB:1, maintains the native human lubricin N-terminal and C-terminal domains, and 5' and 3' flanking portions of the wild-type mucin-like domain (Figure 1A). Following *ex vivo* characterization of purified LUB:1, we evaluated its therapeutic efficacy by intraarticular administration in an experimental (meniscal tear-induced) rat model of OA.

MATERIALS AND METHODS

Generation of recombinant lubricin construct LUB:1. Complementary DNA (cDNA) for human lubricin was subjected to restriction enzyme digestion at unique *Bss* HII and *Bsp* EI sites that flank the sequence encoding Ala³⁷⁴ to Pro⁸⁴⁷ within the mucin-like domain (474 amino acids comprising 59 KEPAPTT-like repeat elements). This intervening region was replaced with a synthetic cDNA cassette designed to contain appropriate restriction sites and encoding 51 amino acids, including 7 KEPAPTT-like repeat elements (11). The resulting construct, designated LUB:1, was assembled in the pTMed expression vector and expressed in stably transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells. Relative to full-length lubricin, LUB:1 contains approximately one-third the number of wild-type KEPAPTT-like sequence elements.

Serum-free conditioned medium containing LUB:1 protein was purified by heparin affinity chromatography (Toyopearl Heparin; Tosoh, Montgomeryville, PA) by elution with a linear gradient of 0–1M NaCl in 20 mM Tris (pH 8.6), followed by size-exclusion chromatography on a column of Sephacryl S-400 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and formulation in calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (PBS). LUB:1 protein was analyzed by separation on nonreducing 4–20% Bis-Tris NuPAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stained with Coomassie blue or transferred onto nitrocellulose membranes and visualized by Western blotting with antilubricin antibody 06A10 (10). LUB:1 glycosylation was assessed using an enzymatic protein deglycosylation kit (Sigma, St. Louis, MO). Aliquots of LUB:1 (10 µg) were prepared in 1× reaction buffer and incubated (under native conditions according to the recommendations of the manufacturer) for 16 hours at 37°C in the absence or presence of endo-O-glycosidase, neuraminidase (sialidase A), or endo-O-glycosidase in combination with neuraminidase. Samples were separated on reducing 3–8% Tris acetate NuPAGE SDS-PAGE gels (Invitrogen) and visualized by Coomassie blue staining.

Binding of LUB:1 to cartilage surfaces. Using previously described methods (10), bovine articular cartilage discs were extracted with PBS containing 1.5M NaCl to remove endogenous lubricin, and formalin-fixed tissue sections were incubated for 1 hour at 18°C with PBS alone or with 100 µg/ml of LUB:1 in PBS. After washing, LUB:1 was immunolocalized using antilubricin antibody 06A10.

Friction testing. Boundary lubrication of articular cartilage was measured using a custom friction testing apparatus as described previously (12,13). Bovine cartilage explants were tested in the presence of PBS alone and with increasing concentrations of LUB:1, with the articular surface positioned against a glass counterface (*n* = 6 measurements per test concentration). Boundary mode lubrication was measured using an applied strain of 30% and an entraining velocity of 0.33 mm/second. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Cell adhesion assays. A cell adhesion assay was developed based on the Vybrant assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR) to assess the inhibitory effects of LUB:1 on cell attachment. Individual wells of 96-well Matrix tissue culture plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) were coated for 18 hours with PBS alone or with increasing concentrations of LUB:1 or a noninhibitory control protein (albumin) (*n* = 3 wells per test concentration). The wells were washed with PBS, and a suspension of Calcein AM-labeled SW982 human synovial sarcoma cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) was added (5×10^5 cells/well) and incubated for 2 hours. After further washing, 200 µl of PBS was added to each well, and fluorescence measurements were obtained (excitation at 494 nm; emission at 517 nm).

OA model and dosing protocol. The basic study design and animal use were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Bolder BioPATH. Male Lewis rats weighing ~300 gm were acclimated for 10 days and randomized into groups of 20 rats. Animals were anesthetized with isoflurane, and the right knee area was prepared for surgery. A skin incision was made over the medial aspect of the knee, and the medial collateral ligament was exposed by blunt dissection and then transected. The medial meniscus was cut through the full thickness to simulate a complete tear. Skin and subcutis were closed with 4-0 Vicryl suture. Intraarticular treatment was initiated 1 week after surgery, with dosing performed under anesthesia either 3 times per week (every other weekday) or once per week over 4 consecutive weeks. Treatment groups were dosed with 40 µl of vehicle (PBS) or LUB:1 (500 µg/ml in PBS).

Histologic analysis and OA scoring. Four weeks after the start of dosing, animals were killed and the operated knee joint was trimmed, fixed, and decalcified. Joints were cut into 2 approximately equal halves in the frontal plane and embedded in paraffin. Three sections were cut from each operated knee at ~200-µm steps and stained with toluidine blue. All 3 sections were analyzed microscopically and scored by a board certified veterinary pathologist (AMB) who was blinded with regard to treatment group. Data were peer reviewed and confirmed at Wyeth Research. Statistical analysis of histopathology parameters was performed by comparing group values using Student's unpaired 2-tailed *t*-test.

Cartilage degeneration score. Cartilage degeneration in the tibia was scored for each zone on a scale of 0–5, where 0 = no degeneration; 1 = minimal degeneration involving chondrocyte and proteoglycan loss without fibrillation involving the superficial zone; 2 = mild degeneration involving chondrocyte and proteoglycan loss with fibrillation involving the superficial zone; 3 = moderate degeneration involving chondrocyte and proteoglycan loss with fibrillation extending into the midzone; 4 = marked degeneration involving chondrocyte and proteoglycan loss with fibrillation extending through the midzone but

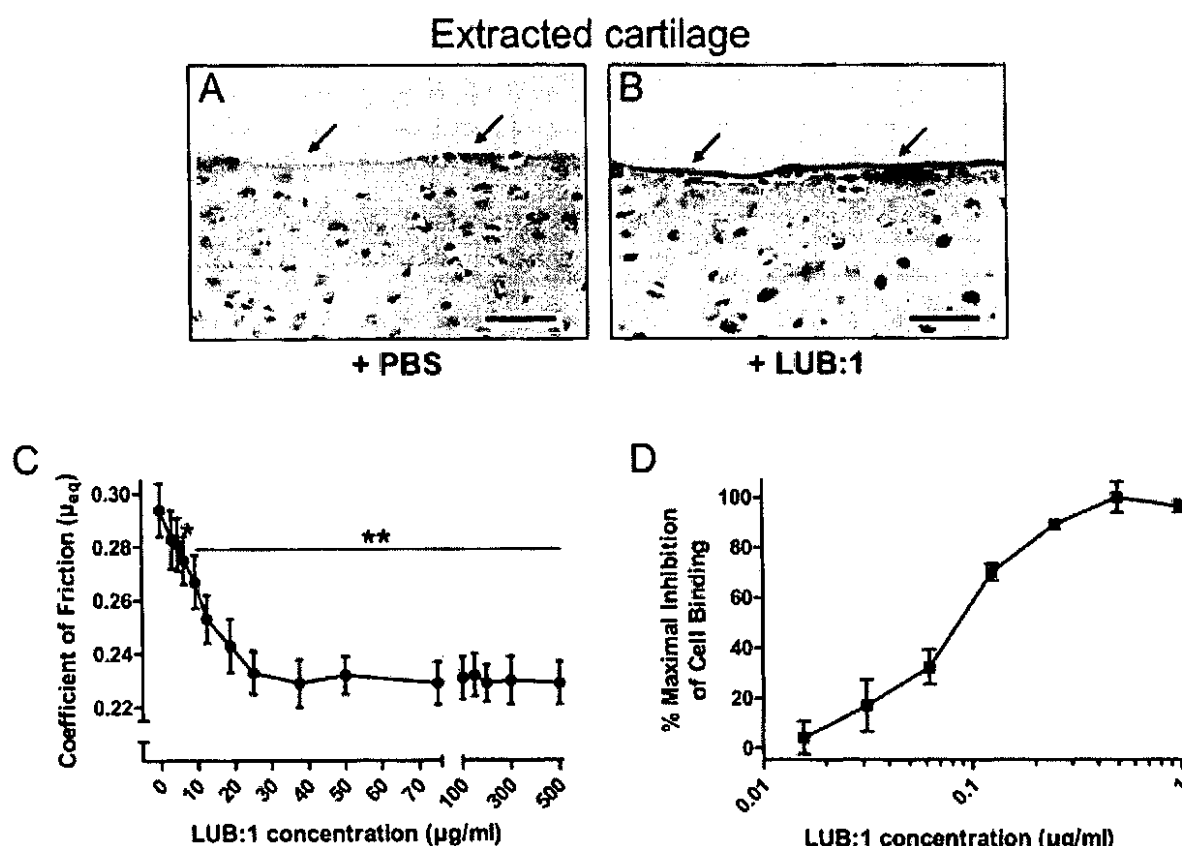


Figure 2. Ex vivo functional characterization of LUB:1. A and B, LUB:1 binds and localizes to cartilage surfaces. Articular cartilage explants were extracted in phosphate buffered saline (PBS) containing 1.5M NaCl, then incubated with PBS (A) or 100 $\mu\text{g/ml}$ LUB:1 (B) and immunostained with antilubricin antibody 06A10. Arrows indicate the cartilage articular surface. Bars = 50 μm . C, LUB:1 is an effective cartilage boundary lubricant. Cartilage explants were subjected to friction testing to assess boundary mode lubrication in the presence of increasing concentrations of LUB:1. Coefficients of friction (μ_{eq}) were significantly lower in the presence of LUB:1 at concentrations ≥ 6.25 $\mu\text{g/ml}$. Values are the mean $\pm$ SD of 6 measurements per test concentration. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$, versus PBS alone. D, LUB:1 inhibits cell adhesion. Tissue culture wells were coated with increasing concentrations of LUB:1, and the binding of Calcein AM-labeled SW982 synovial cells was quantified. Values are the mean $\pm$ SD of 3 wells per test concentration.

without complete loss of chondrocytes or proteoglycan; and 5 = severe degeneration involving matrix loss to the tidemark ($\geq 50\%$ of the zone) or 75–100% overall chondrocyte and proteoglycan loss in the zone.

Total joint score. The 3-zone sum of the tibial cartilage degeneration scores (mean of 3 levels) was added to the mean osteophyte score for each joint, which categorizes osteophyte measurements on a scale of 1–4, where 1 = small (≤ 200 μm), 2 = moderate (300–399 μm), 3 = large (400–499 μm), and 4 = very large (≥ 500 μm).

Width of severe lesions. Micrometer measurements were obtained for areas of tibial cartilage damage in which tissue matrix loss extended through $\geq 50\%$ of the cartilage depth.

Significant cartilage degeneration width. Micrometer measurements were obtained for areas of tibial cartilage degeneration in which both chondrocyte and proteoglycan loss extended to $\geq 50\%$ of the cartilage depth. In general, tissue matrix loss may be mild (25%) or greater for this parameter.

Bone score. Damage to the calcified cartilage layer and subchondral bone was scored using a numerical scale of 0–5, where 0 = no changes and 5 = increased basophilia at the tidemark, increased fragmentation at the tidemark and/or of the calcified cartilage, increased area of marrow mesenchymal changes, and collapse of articular cartilage into the epiphysis.

Medial capsule width. Micrometer measurements of the medial capsule width were obtained for each joint, as an assessment of soft tissue fibroplasia.

RESULTS

Expression and characterization of recombinant lubricin (LUB:1). A novel recombinant lubricin construct, LUB:1, was expressed in CHO cells and isolated at high purity in a vehicle solution of PBS. LUB:1 represents a modified version of human lubricin and

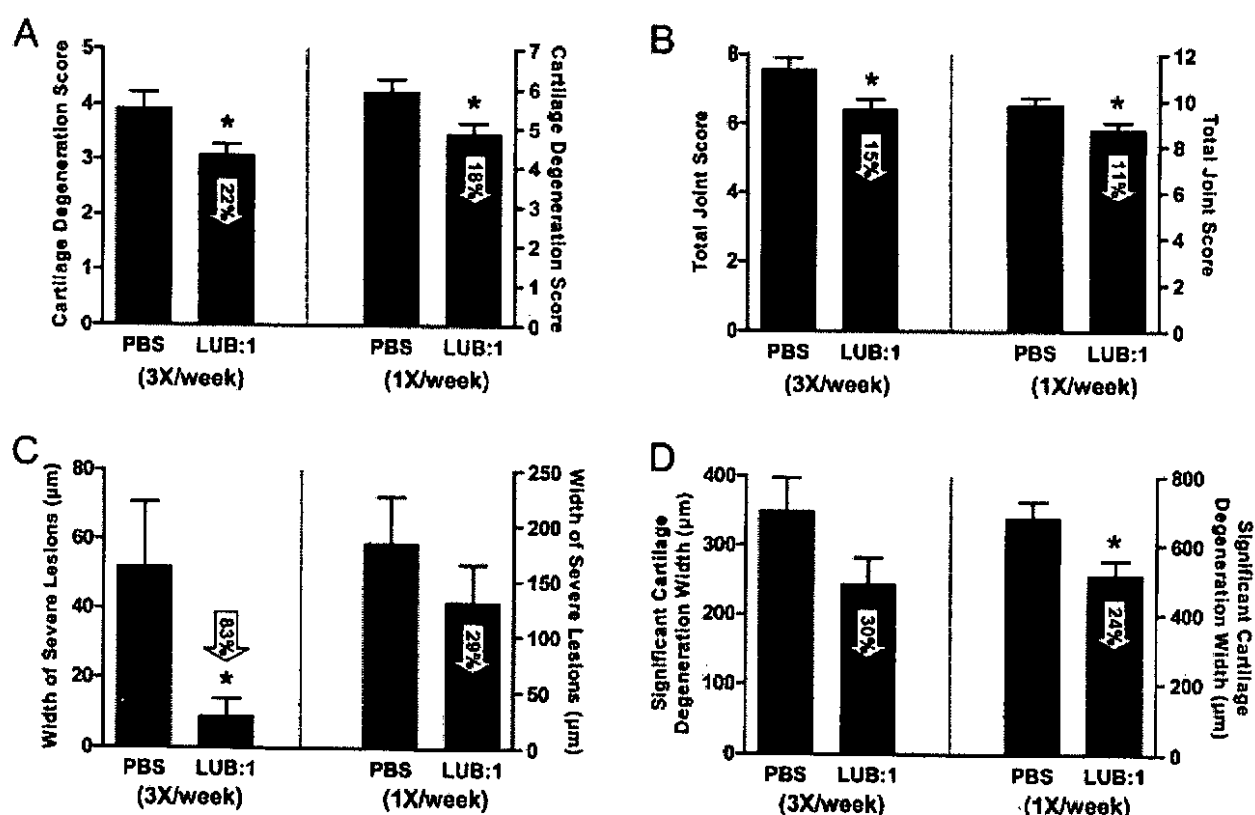


Figure 3. Intraarticular treatment with LUB:1 for 4 weeks significantly decreases multiple parameters of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis (OA). Following surgical induction of OA, knee joints treated either 3 times per week or once per week with LUB:1 (20 µg/40 µl) or with phosphate buffered saline (PBS) vehicle (40 µl) displayed significant reductions in cartilage degeneration scores (A), total joint scores (B), width of severe lesions penetrating $\geq 50\%$ of the tissue depth (C), and significant cartilage degeneration width (D). Values in the arrows are the percentage decreases in OA scores for LUB:1-treated groups relative to PBS-treated groups. Bars show the mean and SEM of 20 animals per treatment group. * = $P < 0.05$ versus the corresponding PBS-treated group.

exhibits ~70% amino acid sequence identity to rat lubricin. Under nonreducing conditions, LUB:1 appeared on SDS-PAGE gels as a predominant dimer (Figure 1B), consistent with the self-association of lubricin N-terminal domains previously described (10). We performed deglycosylation experiments to demonstrate the substitution of LUB:1 with appropriate O-linked oligosaccharides. Treatment with endo-O-glycosidase alone or neuraminidase alone resulted in minor mass reductions, as assessed by nonreducing SDS-PAGE (Figure 1C, lanes 2 and 3). In contrast, combined digestion with both glycosidases resulted in a substantial decrease in the molecular size of LUB:1 (Figure 1C, lane 4), consistent with the occurrence of $\beta(1,3)$ Gal-GalNAc sugar structures capped with NeuAc (14).

In *ex vivo* functional assays, we found that LUB:1 efficiently binds and localizes to articular cartilage sur-

faces (Figures 2A and B), as has previously been described for recombinant full-length lubricin (10). In addition, LUB:1 significantly improved cartilage boundary lubrication in a custom friction testing apparatus (Figure 2C). In this system, maximal lubrication occurred at a LUB:1 concentration similar to that observed for recombinant full-length lubricin (15). LUB:1 was also shown to inhibit the binding/adhesion of synovial sarcoma cells (Figure 2D), similar to the effects observed with full-length lubricin (data not shown).

Prevention of cartilage degeneration in a rat model of OA by intraarticular treatment with LUB:1. We evaluated the therapeutic efficacy of LUB:1 in an experimental model of OA initiated by surgical injury and joint destabilization. Unilateral OA was induced in the knees of rats by transection of the medial collateral ligament and meniscus. Beginning 1 week after surgery,

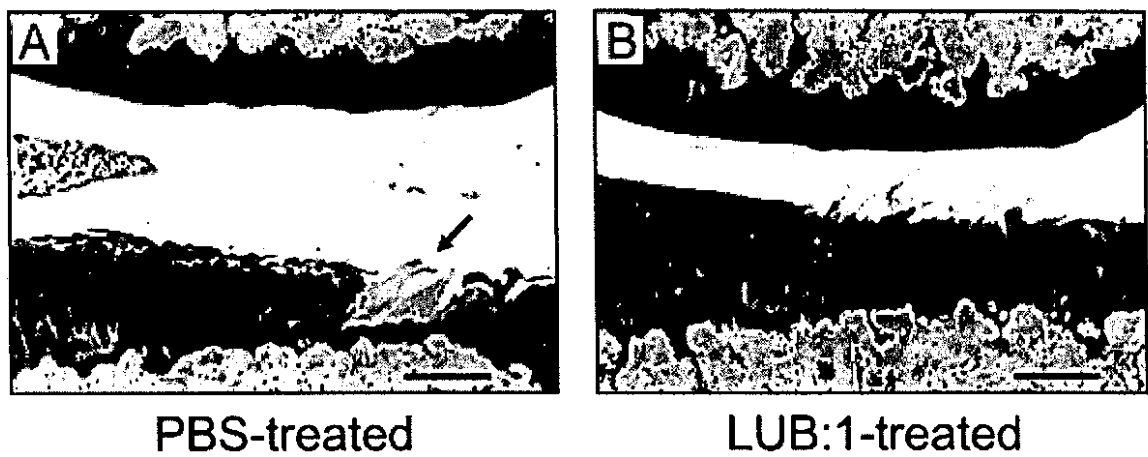


Figure 4. Representative histologic sections from rat joints with surgically induced osteoarthritis. Shown are rat knee joints treated for 4 weeks with phosphate buffered saline (PBS) (A) or LUB:1 (B) administered 3 times per week. Arrow indicates the location of a severe cartilage lesion in the PBS-treated joint. Bars = 100 µm.

LUB:1 or PBS vehicle was administered by intraarticular injection, either 3 times per week or once per week over the subsequent 4 weeks. At the end of the 4-week period, histologic sections of knee joints were analyzed microscopically and assessed for multiple pathologic parameters of OA (16,17). Tibial cartilage degeneration scores, total joint scores, and cartilage lesion and degeneration width measurements were significantly lower in LUB:1-treated animals than in PBS-treated animals (Figure 3). In contrast, the results of treatment with a control protein (50 µg of human serum albumin in 40 µl of PBS vehicle; n = 20 animals per group) were not significantly different from those obtained with PBS

alone (data not shown). Notably, the width of severe cartilage lesions, reflecting areas of tibial cartilage damage in which tissue matrix loss extends through ≥50% of the cartilage depth, was decreased by 83% in response to LUB:1 administered 3 times per week (Figure 3C). For this parameter, the frequency of such severe cartilage lesions was 10 of 20 (50%) for PBS-treated joints and 5 of 20 (25%) for joints treated with LUB:1.

The effects of LUB:1 on the prevention of cartilage degeneration are depicted in Figure 4, illustrating the promotion of overall cartilage structural preservation in response to lubricin supplementation. The corresponding cartilage degeneration scores for these individual joints were 4.00 (Figure 4A) and 3.00 (Figure 4B), relative to group mean ± SEM scores of 3.93 ± 0.29 and 3.08 ± 0.20 for PBS-treated and LUB:1-treated groups, respectively. Subchondral bone scores did not differ between treatment groups (Figure 5, left), suggesting that joint loading was comparable in all animals. In addition, the medial capsule width was equivalent for both PBS- and LUB:1-treated cohorts (Figure 5, right), indicating that LUB:1 did not induce synovial fibroplasia.

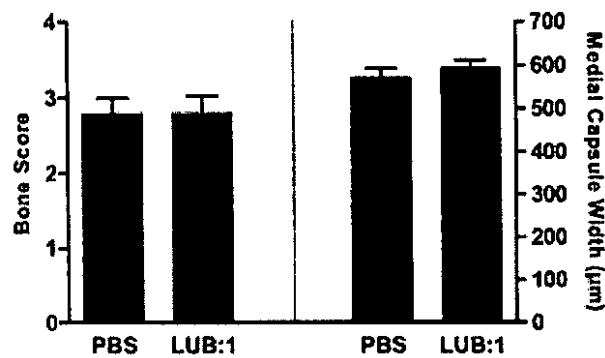


Figure 5. LUB:1 treatment has no effect on joint loading or on the development of fibroplasia. Animals dosed 3 times per week for 4 weeks with LUB:1 (20 µg/40 µl) or phosphate buffered saline (PBS) vehicle (40 µl) displayed no significant differences in bone scores or medial capsule width. Bars show the mean and SEM of 20 animals per treatment group.

DISCUSSION

The need for therapeutic agents for the treatment of cartilage deterioration in OA is a major unmet medical challenge. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase 2 inhibitors, and HA-based injectables are promoted for symptomatic relief of OA,

while strategies for the development of disease-modifying OA drugs have focused mainly on the broad-spectrum targeting of matrix metalloproteinase (i.e., collagenase) activities. Such inhibitors have proven ineffective for clinical use, however, either through lack of efficacy or due to musculoskeletal side effects such as soft tissue fibroplasia (18).

In the present study, we tested the effects of intraarticular lubricin supplementation on disease progression in a rat model of OA. As part of a strategy to optimize production yields of recombinant lubricin (11), we generated a novel lubricin expression construct, LUB:1, which contains approximately one-third the number of wild-type KEPAPTT-like sequence elements located within the mucin-like domain (Figure 1A). LUB:1 contains functional N-terminal domains which facilitate multimerization (Figure 1B), exhibits appropriate O-linked oligosaccharide substitution (Figure 1C), and possesses integral C-terminal domains enabling binding and localization to cartilage surfaces (Figure 2B). LUB:1 was also shown to be an effective cartilage boundary lubricant (Figure 2C), and was able to prevent synovial cell adhesion (Figure 2D).

Local administration of LUB:1 was therapeutically effective in preventing cartilage degeneration during the progression of OA (Figures 3 and 4). Knee joints from rats treated with LUB:1 developed significantly less severe cartilage damage than did PBS (vehicle)-treated animals, and displayed significantly reduced cartilage degeneration scores. Inhibition of loss of viable matrix further indicated beneficial effects of LUB:1 on overall cartilage tissue preservation (chondrocytes, proteoglycan, and collagen). No evidence of fibroplasia was observed in response to LUB:1 treatment (Figure 5), thus supporting a favorable tolerability profile for recombinant lubricin in the treatment of joint diseases.

Prospectively, various considerations relevant to dosing and duration of efficacy may be appreciated. In this regard, we have determined that radiolabeled LUB:1 is detectable in the joints of naive rats at appropriate tissue surfaces (cartilage, synovium, and meniscus) and remains localized for at least 28 days following a single intraarticular injection (Flannery CR, et al: unpublished observations), and it will be important to perform similar evaluations in the surgical OA model. In addition, it will be of interest to further explore the mechanism(s) underlying the chondroprotective effects of lubricin treatment, including, for example, an evaluation of the activities of cartilage-degrading enzymes (i.e. collagenases, aggrecanases).

Interestingly, 2 recent reports highlight a benefi-

cial synergy between lubricin and HA with respect to both boundary lubrication and the mechanical attributes of synovial fluid. Thus, Schmidt et al (19) described the use of a customized cartilage-on-cartilage friction testing system and found that lubricin and HA in combination produced a greater boundary-lubricating effect than either constituent alone. In other studies, Jay et al (8) demonstrated that lubricin can interact with HA in synovial fluid to enhance its chondroprotective properties via the dissipation of shear-induced energy. Evaluation of the therapeutic potential of lubricin and HA in a combined formulation may therefore be warranted. In addition, the synthetic strategy applied for the expression of LUB:1 facilitates iterative expansion of the number of KEPAPTT-like sequences within the mucin-like domain (11). Since the lubricating function of lubricin depends on the occurrence of O-linked oligosaccharides contingently attached to this region (14), characterization of such extended constructs could further aid in optimizing the utility of recombinant lubricin molecules for potential clinical applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The expert contributions of Darren D'Augusta, Jian Li, Diane Peluso, and Qin Wang (Wyeth Research) are gratefully acknowledged.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Flannery had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study design. Flannery, Jones, Rivera-Bermúdez, Bonassar, Morris, Glasson.

Acquisition of data. Jones, Root, Blanchet, Gleghorn, Bendele, Glasson.

Analysis and interpretation of data. Flannery, Jones, Root, Rivera-Bermúdez, Blanchet, Gleghorn, Bonassar, Bendele, Glasson.

Manuscript preparation. Flannery, Zollner, Jones, Rivera-Bermúdez, Bonassar.

Statistical analysis. Blanchet, Bonassar.

Protein production. Zollner.

Generation of reagents. Corcoran.

REFERENCES

1. Jay GD. Lubricin and surfacing of articular joints. *Curr Opin Orthop* 2004;15:355-9.
2. Swann DA, Slayter HS, Silver FH. The molecular structure of lubricating glycoprotein-1, the boundary lubricant for articular cartilage. *J Biol Chem* 1981;256:5921-5.
3. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre L, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* 2005;115:622-31.
4. Marcelino J, Carpten JD, Suwairi WM, Gutierrez OM, Schwartz S, Robbins C, et al. CACP, encoding a secreted proteoglycan, is

- mutated in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Nat Genet* 1999;23:319-22.
5. Young AA, McLennan S, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Read RA, et al. Proteoglycan 4 downregulation in a sheep meniscectomy model of early osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R41.
 6. Teeple E, Elsaid KA, Fleming BC, Jay GD, Aslani K, Crisco JJ, et al. Coefficients of friction, lubricin, and cartilage damage in the anterior cruciate ligament-deficient guinea pig knee. *J Orthop Res* 2008;26:231-7.
 7. Elsaid KA, Fleming BC, Jay GD. Early changes in lubricin levels and its relationship to cartilage damage in an ACL-transection rat model [abstract]. *Trans Orthop Res Soc* 2008;33:186.
 8. Jay GD, Torres JR, Warman ML, Laderer MC, Breuer KS. The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6194-9.
 9. Brandt KD, Smith GN, Simon LS. Intraarticular injection of hyaluronan as treatment for knee osteoarthritis: what is the evidence? [review]. *Arthritis Rheum* 2000;43:1192-203.
 10. Jones AR, Gleghorn JP, Hughes CE, Fitz LJ, Zollner R, Wainwright SD, et al. Binding and localization of recombinant lubricin to articular cartilage surfaces. *J Orthop Res* 2007;25:283-92.
 11. Flannery CR, Corcoran CJ, Freeman BA, Racie LA. Recombinant lubricin molecules and uses thereof. 2005. PCT WO/2005/016130 A2.
 12. Gleghorn JP, Jones AR, Flannery CR, Bonassar LJ. Boundary mode frictional properties of engineered cartilaginous tissues. *Eur Cell Mater* 2007;14:20-8.
 13. Gleghorn JP, Bonassar LJ. Lubrication mode analysis of articular cartilage using Stribeck surfaces. *J Biomech* 2008;41:1910-8.
 14. Jay GD, Harris DA, Cha CJ. Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked $\beta(1-3)$ Gal-GalNAc oligosaccharides. *Glycoconj J* 2002;18:807-15.
 15. Gleghorn JP, Jones AR, Flannery CR, Bonassar LJ. Lubrication of articular cartilage by recombinant lubricin [abstract]. *Trans Orthop Res Soc* 2006;31:1502.
 16. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:363-76.
 17. Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggie KS, Reardon B, et al. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:623-31.
 18. Skotnicki JS, DiGrandi MJ, Levin JJ. Design strategies for the identification of MMP-13 and TACE inhibitors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;6:742-59.
 19. Schmidt TA, Gastelum NS, Nguyen QT, Schumacher BL, Sah RL. Boundary lubrication of articular cartilage: role of synovial fluid constituents. *Arthritis Rheum* 2007;56:882-91.