

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

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

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-013004- -00008-0000

Fecha: 2011-04-06 16:34:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 12

Re: P1.-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. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 14 de Enero de 2011.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **4279**, con respecto a la Claridad del capítulo reivindicatorio y el Nivel Inventivo de la presente solicitud, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones:

3. **CLARIDAD DEL CAPITULO REIVINDICATORIO.**

En relación al capítulo reivindicatorio presentado actualmente, el señor Examinador afirma que este carece de claridad basado en los siguientes argumentos:

(i) El señor Examinador indica que en el conjunto de reivindicaciones actualmente presentado no son claras las características técnicas que comparten entre si las proteínas reivindicadas, así como los nucleótidos y por ende las composiciones.

A este respecto, me permito señalar que las reivindicaciones actualmente presentadas, producto de las modificaciones expuestas en mi memorial del 23 de Noviembre de 2010, indican que las proteínas reivindicadas comparten la característica técnica de tener actividad lubricante.

Sin embargo, no obstante considerar que la redacción actual de las reivindicaciones presentadas da claridad a las mismas respecto a las características compartidas por las proteínas, me permito resaltar que para una persona versada en la materia sería claro que todas las proteínas reivindicadas comparten la característica técnica de tener actividad lubricante, pues dicha persona versada en la materia

reconocería que la secuencia de aminoácidos de cada una de las proteínas reivindicadas contiene secuencias KEPAPTT, de las cuales depende la actividad lubricante de cada proteína. Un ejemplo de la presencia de dichas secuencias KEPAPTT en las proteínas reivindicadas puede verse en la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 7, en donde es evidente que las secuencias de aminoácidos 379-385, 394-400 y 402-408 entre otras, componen secuencias KEPAPTT que proporcionan la actividad lubricante a dicha proteína reivindicada que comprende la SEQ ID No 7.

En conexión con lo anterior, una explicación detallada de la actividad lubricante de dichas proteínas reivindicadas puede encontrarse en un artículo escrito por los inventores, Flannery et. al., *Prevention of Cartilage Degeneration in a Rat Model of Osteoarthritis by Intraarticular Treatment With Recombinant Lubricin*, *Arthritis Rheum.*, 2009, 60: 840-847, del cual se anexa una copia al presente escrito para su oportuna revisión por parte del señor Examinador.

Finalmente, me permito resaltar que para un versado en la materia sería claro que si las proteínas reivindicadas comparte la característica común de tener actividad lubricante, entonces las composiciones al igual que los polinucleótidos que codifican dichas proteínas también comparten características técnicas entre si.

(ii) Adicionalmente, el señor Examinador indica que algunas reivindicaciones no cumplen con los requisitos de claridad dado que definen la materia sobre la base de características funcionales o resultados a alcanzar, señalando específicamente las reivindicaciones 26, 28, 29 y 30.

Sobre este particular, me permito llamar la atención a ese Despacho en relación a que las reivindicaciones mencionadas por el señor Examinador fueron modificadas como se expuso en mi memorial del 23 de Noviembre de 2010, en donde la reivindicación 26 mencionada por el señor Examinador fue eliminada del capítulo reivindicatorio y las demás reivindicaciones citadas fueron reenumeradas consecuentemente como 27, 28 y 29

Teniendo en cuenta lo anterior, y acatando el señalamiento realizado por el señor Examinador, me permito manifestar que es deseo del solicitante eliminar las reivindicaciones 27, 28 y 29 del capítulo reivindicatorio actualmente presentado.

En conexión con lo anterior, me permito resaltar que las mencionadas modificaciones no constituyen de manera alguna una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está delimitando de forma más precisa el objeto de la invención según lo revelado en la descripción de la solicitud.

Por lo tanto, el capítulo reivindicatorio ahora consta de 29 reivindicaciones las cuales corresponden a las reivindicaciones 1 a 26 y 30 a 32 actualmente presentadas, las cuales han sido reenumeradas y se han ajustado sus dependencias de conformidad con la nueva numeración.

Como consecuencia de lo anterior, el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por **29 reivindicaciones** las cuales describen de manera clara la materia reclamada, superando totalmente las objeciones que en este sentido presentó el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **4279**, y ajustándose así totalmente a lo establecido por el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

4. **NIVEL INVENTIVO.**

Por otra parte, el señor Examinador considera que el capítulo reivindicatorio en estudio carecería de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas del documento **WO 00/64930 (D1)**.

En relación con este documento, el señor Examinador señala que D1 enseña *"un método para suplementar tribonectinas a articulaciones con deficiencias de estas, en las cuales, se involucran moléculas caracterizadas porque comprenden secuencias KEPAPTT y presentan actividad lubricante de la misma forma que las reivindicadas en la solicitud"*, en donde *"tales moléculas se basan en la repetición de 1 a 76 veces dicha secuencia, con fragmentos alternativos degenerados de la misma, provenientes de la estructura natural de la lubricina dependiendo del corte alternativo de exones en el gen del factor estimulador de magacariocitos"*.

Adicionalmente, el señor Examinador indica que la única diferencia entre D1 y la presente solicitud es que *"esta solicitud menciona segmentos específicos determinados por las secuencias 9, 13, 17 y 21, pero dichos segmentos no proporcionan un resultado sorprendente con relación a ellos mismos ni a los reportados por D1"*.

Por ultimo, el señor Examinador afirma que *"el problema técnico planteado en esta solicitud que era de proporcionar composiciones terapéuticas para incrementar la lubricación en articulaciones y contrarrestar la indeseable adherencia entre tejidos se había resuelto previamente mediante el mismo tipo de compuestos ya conocidos"*, y por lo tanto considera que *"las secuencias derivadas de repeticiones de la secuencia KEPAPTT como las reivindicadas son evidentes para una persona medianamente versada en la materia"*.

En relación con lo anterior, me permito señalar que si bien es cierto que las moléculas variantes de Lubricina de la presente solicitud exhiben algunas similitudes con las proteínas descritas en D1, no es cierto que las variantes de Lubricina reveladas por el solicitante no proporcionen resultados sorprendentes, toda vez que estas superan importantes obstáculos técnicos en la producción de Lubricina y permiten la identificación de variantes de Lubricina que presentan características técnicas útiles y sorprendentes tal como se muestra a continuación:

El primer obstáculo técnico enfrentado por los inventores de esta solicitud fue que la proteína de Lubricina de longitud completa 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 esta 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 presente solicitud, 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. En consecuencia, 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.

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 más 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**

2

constituye un alcance tecnológico significativo que supera un obstáculo substancial en el desarrollo de Lubricina como un agente terapéutico potencial.

Ahora bien, teniendo en cuenta la anterior introducción acerca del objeto de la invención, me permito señalar que D1 no enseña o sugiere la expresión de variantes de Lubricina recombinante para proveer una molécula terapéutica y por tanto la invención de la presente solicitud no resulta obvia a la luz de las enseñanzas de D1 por las siguientes razones:

(a) Primero, D1 describe 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).

(b) Adicionalmente, D1 únicamente proporciona un lenguaje estándar de textos de patentes acerca de 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 es su aislamiento de líquidos sinoviales.

Así que, mientras que la producción de una proteína similar a una proteína determinada por tecnología de ingeniería genética rutinaria puede hacer evidente para una persona versada en la materia como hacer una proteína con eliminaciones, sustituciones, etc., ese no es el caso que se presenta en esta solicitud, en donde 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.

(c) 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.** Es por esto que D1 es completamente silencioso sobre cómo lograr la producción de lubricina, o cualquier variante de la misma, y por lo tanto no es una referencia adecuada contra la presente invención.

De esta forma, mientras que hacer eliminaciones, sustituciones o adiciones a una proteína conocida podría ser evidente, ese no es el caso de la presente solicitud, en donde **muchas repeticiones tipo mucina fueron removidas de una proteína cuyas propiedades lubricantes dependen de dichos dominios tipo mucina. 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 líquido sinovial** (y referida en D1 como "tribonectina").

(d) Por otro lado, la única variante de Lubricina producida en D1 fue un fragmento de la proteína que contiene el exón 6 completo (es decir, todas las repeticiones de los dominios tipo mucina), fragmento que a pesar de que contiene todas las repeticiones tipo mucina demostró no tener actividad lubricante (ver en D1 la tabla 7, página 33).

En consecuencia con lo anterior, **era completamente inesperado que una versión corta de Lubricina, de la cual la mayoría de las repeticiones tipo mucina 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.**

Por lo tanto, 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 tipo mucina 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.**

(e) D1, el cual solo muestra la purificación de Lubricina del líquido sinovial, no enseña o sugiere cómo superar las dificultades técnicas de la expresión de esta proteína compleja usando tecnología de ingeniería genética, mucho menos cómo hacerlo preservando al mismo tiempo su actividad lubricante.

(f) Finalmente, D1 no enseña Lubricina de cualquier tipo de longitud que fuera producida genéticamente y que exhibiera que el exón 6 de la proteína producida por una ruptura proteolítica usando quimotripsina carece de habilidad lubricante, por lo que en realidad está lejos de enseñar los sorprendentes resultados revelados en la presente invención, particularmente **que variantes de**

Lubricina que carecen de algunas o incluso la mayoría de las repeticiones tipo mucina tienen actividad lubricante.

Por estas razones, las moléculas de Lubricina descritas en la presente invención no serían evidentes para una persona versada en la materia basado en las enseñanzas de D1.

Adicionalmente, no se puede negar que el resultado de que variantes de Lubricina que carecen de algunos o la mayoría de los dominios tipo mucina tengan actividad lubricante resultaría sorprendente e inesperado para una persona versada en la materia que tomara como base las enseñanzas de D1.

Por ultimo, vale la pena resaltar que aunque los productos de la presente invención y los de D1 solucionan problemas similares, se ha demostrado que las moléculas de Lubricina recombinante de la presente solicitud al tener menor numero de secuencias KEPPTT o tipo KEPPTT 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 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 los dominios tipo mucina (que contienen las secuencias KEPPTT) que no presenta ninguna actividad lubricante, no puede de ninguna manera ser considerado como un documento del cual se pueda partir para obtener las variantes recombinantes de lubricina con actividad lubricante descritas en la presente invención.

5. Anexo me permito presentar:

(a) Copia de las páginas **61 a 64** que corresponde al nuevo capítulo reivindicatorio que consta de **29** reivindicaciones y en el que se han realizado los cambios anteriormente señalados, y

(b) Copia del documento Flannery et. al., "*Prevention of Cartilage Degeneration in a Rat Model of Osteoarthritis by Intraarticular Treatment With Recombinant Lubricin*", *Arthritis Rheum.*, **2009**, 60: 840-847.

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

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

6. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos y presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

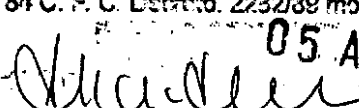
Señor Superintendente,

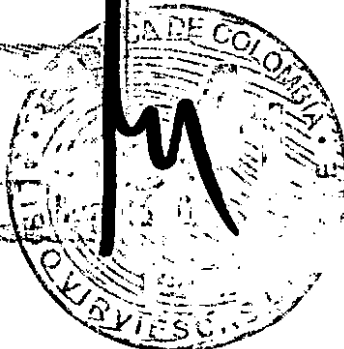

ALICIA LLORED RICAURTE

T. P. 53.215

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

El Notario 41 del Circuito de Bogotá, da fe de que compareció
personalmente a Alicia Lloreda Ricaurte
Identificada (o) con el número 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53715 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2232/89 mod. 36)

05 ABR. 2011

ALICIA LLORED RICAURTE
C.C. No: 39.690.713 de Usaquén



Not. No. 1013
Mons. Riquelme
Jesús Nariño



REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante aislada
caracterizada porque comprende SEQ ID NOS: 9, 13, 17, 21 ó
5 25, en donde la proteína posee actividad lubricante.

2. Una proteína recombinante aislada
caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 26 enlazada a N-2
repeticiones de SEQ ID NO: 27, en donde N es igual a un
entero de 3 a 25, en donde la proteína posee actividad
10 lubricante.

3. La proteína de conformidad con la
reivindicación 2, caracterizada porque N es igual a un
entero de 5 a 25.

4. La proteína de conformidad con la
15 reivindicación 2, caracterizada porque N es igual a un
entero de 10 a 25.

5. Una proteína recombinante aislada
caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 26 más SEQ ID NO:
28 más [N-2 repeticiones de SEQ ID NO: 27] más SEQ ID NO:
20 29, en donde N es igual a un entero de 10 a 25, en donde la
proteína posee actividad lubricante.

6. Un polinucleótido aislado caracterizado porque
comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para
la proteína de conformidad con la reivindicación 1.

25 7. Un polinucleótido aislado caracterizado porque
comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para
la proteína de conformidad con la reivindicación 2.

8. Un polinucleótido aislado caracterizado porque
comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para
30 la proteína de conformidad con la reivindicación 3.

9. Un polinucleótido aislado caracterizado porque comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de conformidad con la reivindicación 4.

10. Un polinucleótido aislado caracterizado porque comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de conformidad con la reivindicación 5.

11. Una proteína recombinante aislada caracterizada porque comprende SEQ ID NOS: 7, 11, 15, 19 ó 23.

12. Un polinucleótido aislado caracterizado porque comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de conformidad con la reivindicación 11.

13. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque comprende SEQ ID NOS: 8, 12, 16, 20 ó 24.

14. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque comprende SEQ ID NOS: 6, 10, 14, 18 ó 22.

15. Un polinucleótido aislado caracterizado porque comprende un polinucleótido que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NOS: 6, 10, 14, 18 ó 22 sobre la longitud completa de la secuencia.

16. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque comprende un polinucleótido que tiene al menos 97% de identidad.

17. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque comprende un

polinucleótido que tiene al menos 98% de identidad.

18. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque comprende un
5 polinucleótido que tiene al menos 99% de identidad.

19. La proteína de conformidad con las reivindicaciones 1, 2 ó 11, caracterizada porque la proteína es O-enlazada con β -(1-3)-Gal-GalNac.

10 20. Una composición caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de conformidad con la reivindicación 19 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. La composición de conformidad con la
15 reivindicación 20, caracterizada porque comprende además hialuronanno o hilano.

22. Un vector de expresión caracterizado porque comprende el polinucleótido de conformidad con las reivindicaciones 6 ó 7 enlazado operablemente a una
20 secuencia de control de expresión.

23. Un método para producir una proteína recombinante, caracterizado porque comprende:

cultivar células transformadas con el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 22 en medio
25 de cultivo líquido y

recoger la proteína recombinante del medio.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque recoger la proteína comprende:

30 concentrar la proteína al filtrar el medio a través de una membrana;

recoger la proteína retenida de la membrana y

solubilizar la proteína colectada en una solución salina de pH regulado que contenga clorhidrato de L-arginina que
5 varía en concentración de 0.1 a 2.0 M.

25. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque la concentración de clorhidrato de L-arginina es de 0.5 M.

26. Una proteína recombinante producida por el
10 método de la reivindicación 23.

27. La composición de la reivindicación 20 ó 21 caracterizada porque la composición comprende además al menos uno de: un anestésico local, una citocina, una linfocina, un factor trombolítico, un factor
15 antitrombolítico, un agente anti-inflamatorio, un antibiótico, y un factor de crecimiento.

28. El método de la reivindicación 23 caracterizado porque las células son células de ovario de hámster chino.

20 29. El método de la reivindicación 28 caracterizado porque las células de ovario de hámster chino son células CHO DUKX.

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.

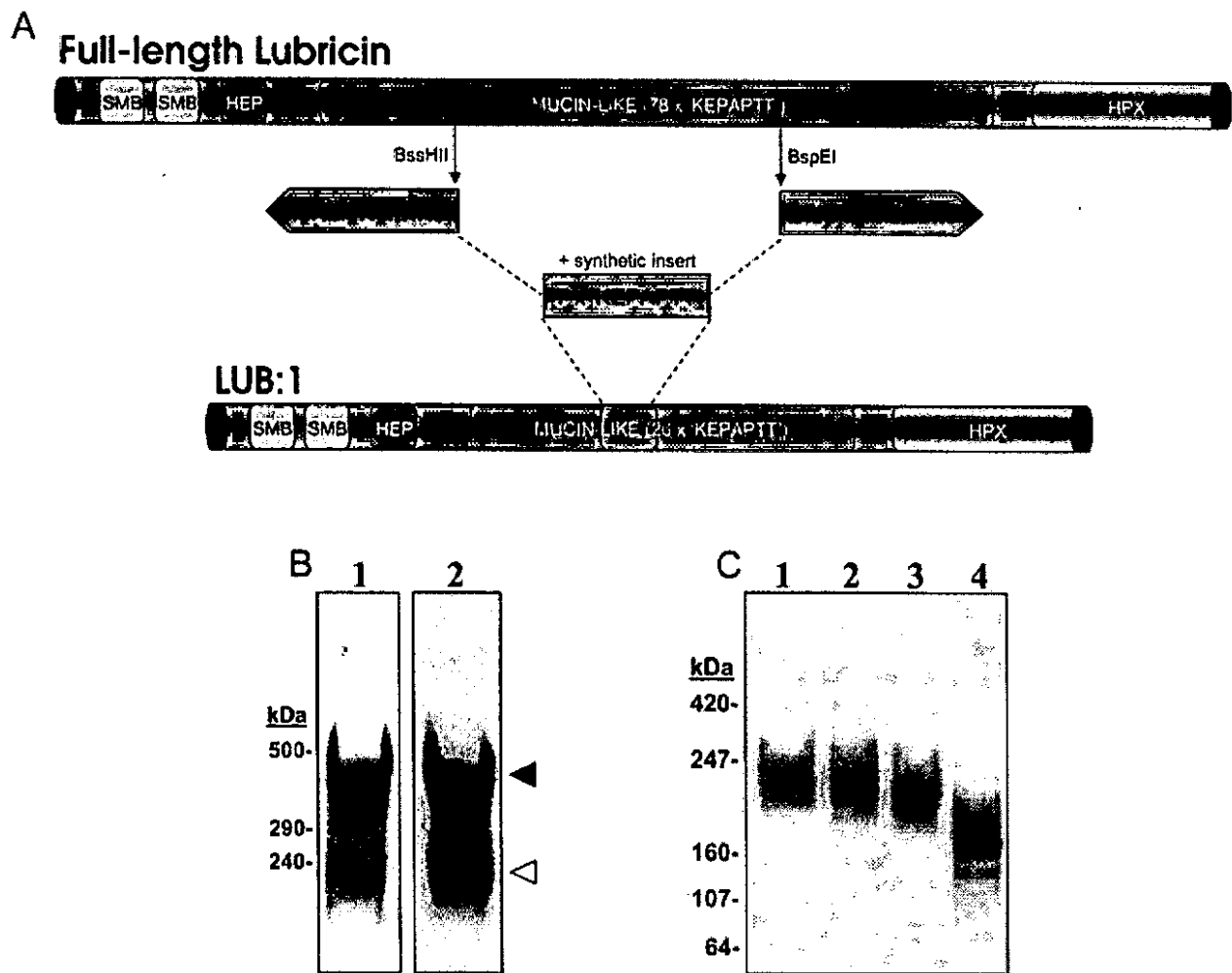


Figure 1. Production and characterization of recombinant lubricin construct LUB:1. **A**, Complementary DNA (cDNA) for human lubricin was subjected to restriction enzyme digestion at unique sites that flank the sequence encoding Ala³⁷⁴ to Pro⁴⁴⁷ (474 amino acids comprising 59 KEPAPTT-like repeat elements). 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

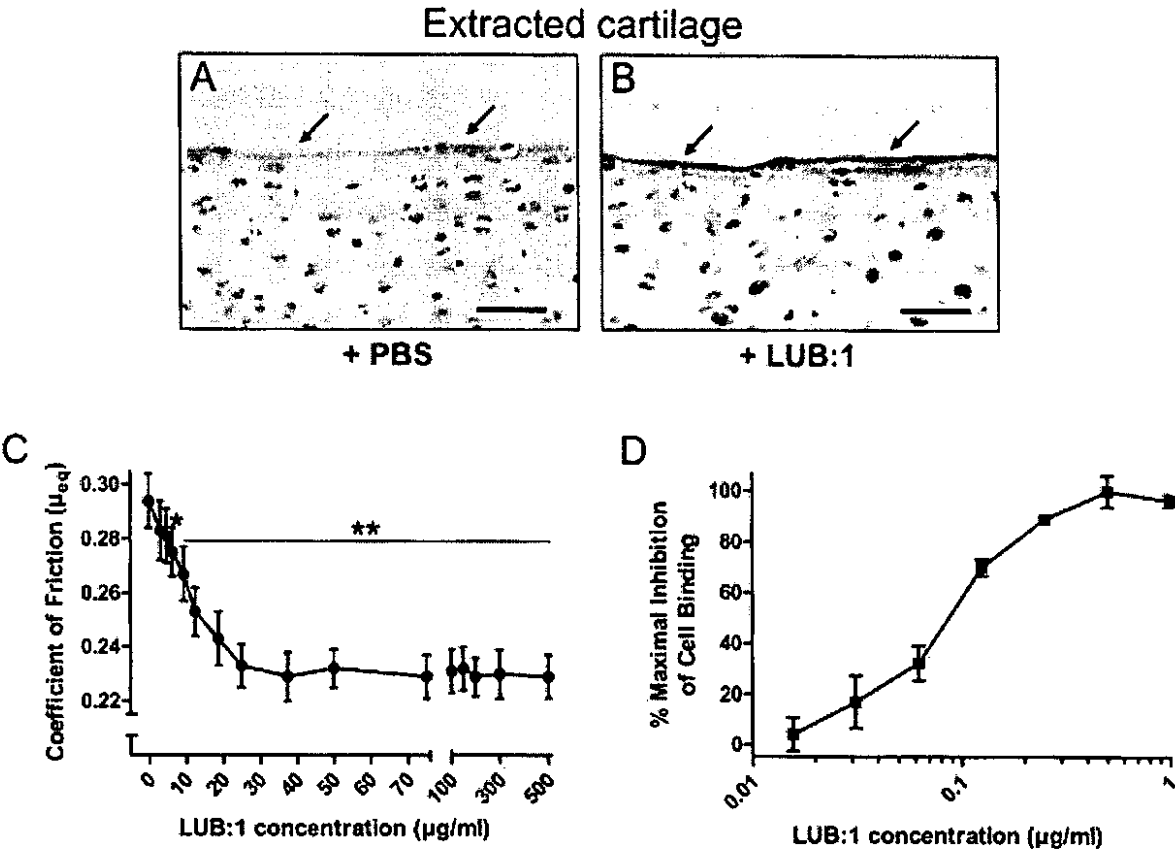


Figure 2. Ex vivo functional characterization of LUB:1. A and B, LUB:1 binds and localizes to cartilage surfaces. Articular cartilage explants were extracted in phosphate buffered saline (PBS) containing 1.5M NaCl, then incubated with PBS (A) or 100 $\mu\text{g/ml}$ LUB:1 (B) and immunostained with antilubricin 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

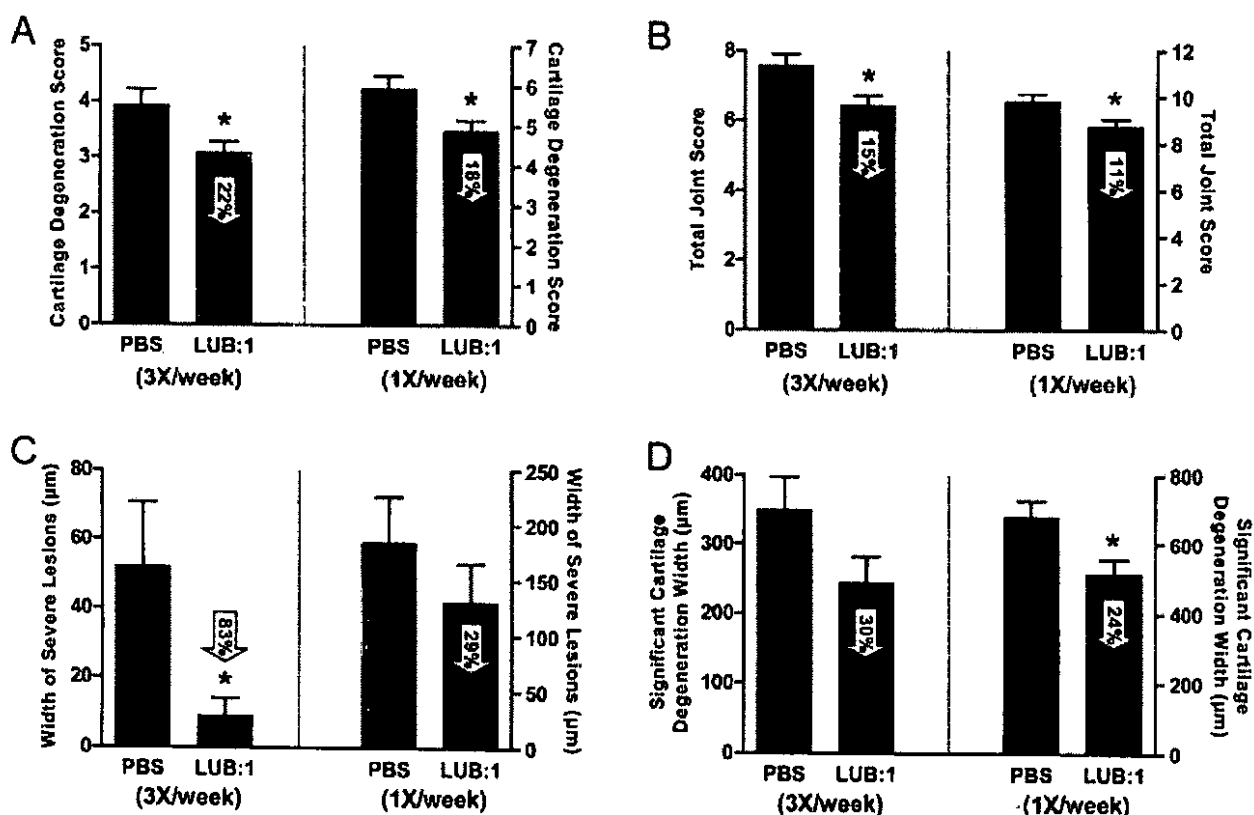


Figure 3. Intraarticular treatment with LUB:1 for 4 weeks significantly decreases multiple parameters of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis (OA). Following surgical induction of OA, knee joints treated either 3 times per week or once per week with LUB:1 (20 µg/40 µl) or with phosphate buffered saline (PBS) vehicle (40 µl) displayed significant reductions in cartilage degeneration scores (A), total joint scores (B), width of severe lesions penetrating ≥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 β(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,

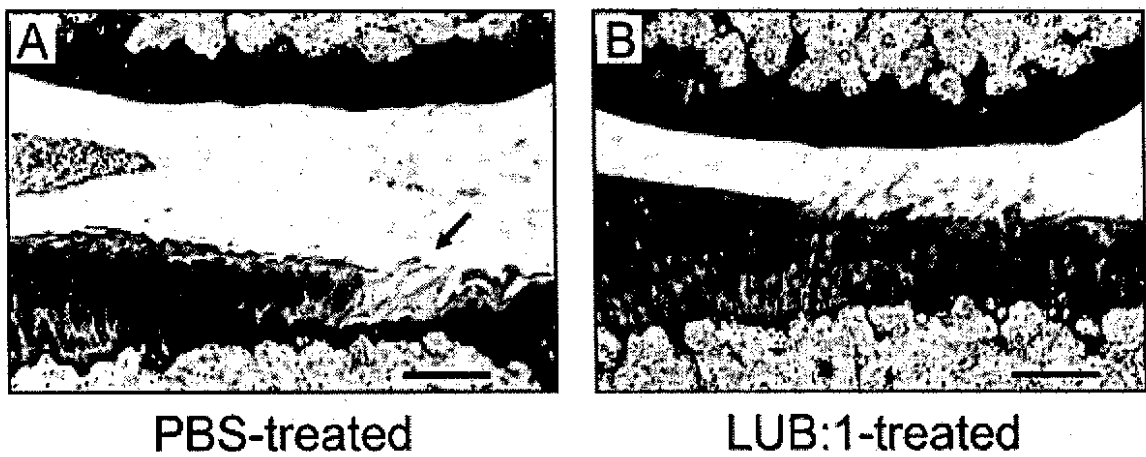


Figure 4. Representative histologic sections from rat joints with surgically induced osteoarthritis. Shown are rat knee joints treated for 4 weeks with phosphate buffered saline (PBS) (A) or LUB:1 (B) administered 3 times per week. Arrow indicates the location of a severe cartilage lesion in the PBS-treated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

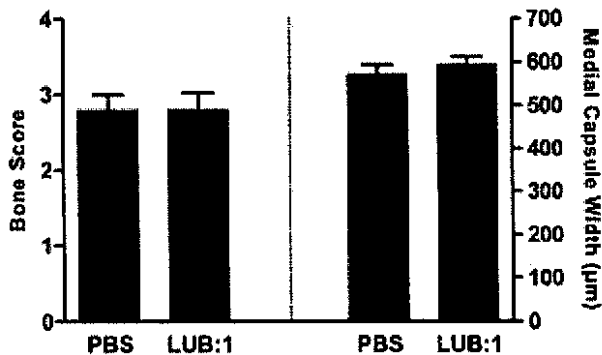


Figure 5. LUB:1 treatment has no effect on joint loading or on the development of fibroplasia. Animals dosed 3 times per week for 4 weeks with LUB:1 (20 µg/40 µl) or phosphate buffered saline (PBS) vehicle (40 µl) displayed no significant differences in bone scores or medial capsule width. Bars show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