

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. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-013004-00006-0000

Fecha: 2010-11-23 17:09:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 13

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 27 de Agosto de 2010.

2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **2764**, en relación con la Claridad del Capítulo Reivindicatorio y el cumplimiento del requisito de Novedad, 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 CAPÍTULO REIVINDICATORIO**

En vista de las objeciones presentadas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **2764** con respecto a la Claridad del Capítulo Reivindicatorio de la presente solicitud, me permito manifestar a ese Despacho que es deseo del solicitante modificar el capítulo reivindicatorio actualmente presentado, de forma tal que no se amplía el alcance de la presente solicitud y se superan todas las objeciones presentadas con respecto a la claridad del mismo.

(i) Manifiesta el señor Examinador en su Concepto Técnico que:

"De la lectura de las reivindicaciones no son claras las características técnicas que comparten las proteínas reivindicadas entre si, así como los polinucleótidos y por ende las composiciones."

Frente a este particular, me permito dirigir la atención del señor Examinador al nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta como anexo al presente memorial, en donde se han incluido características técnicas adicionales en las reivindicaciones 1, 2

y 5, relacionadas con el poder lubricante que presentan las proteínas recombinantes reivindicadas por el solicitante.

En este sentido, además de los números de las secuencias de aminoácidos característicos de la invención, se ha **incluido el texto "donde la proteína posee actividad lubricante"**, de conformidad con lo indicado en la memoria descriptiva de la presente solicitud, donde se señala que:

*"La presente invención se refiere a **nuevas moléculas de lubricina recombinantes y a su uso como lubricantes, agentes antiadhesivos y/o suplementos intra-articulares.**"*¹ (Resaltado fuera del texto)

Y más adelante enseña que:

*"La localización de la proteína de lubricina fuera del tejido de articulaciones no se ha descrito previamente. Una capa superficial de lubricina se demostró claramente sobre pleura pulmonar, pericardio y peritoneo. **La lubricina tiene la reputación de tener una función lubricante dentro de la articulación sinovial, pero puede jugar varios papeles incluyendo, pero no limitados a, funciones de lubricación y anti-adherencia en otros tejidos.** La suplementación de estos otros tejidos con lubricina es una bioterapia abarcada dentro de esta invención."*² (Resaltado fuera del texto)

Visto lo anterior, es claro que los números de secuencia de las reivindicaciones objetadas por el señor Examinador, son los **que permiten identificar inequívocamente los aminoácidos que conforman dichas proteínas**. Por lo tanto, es evidente que las reivindicaciones tal como están presentadas son suficientemente claras para la persona medianamente versada en la materia.

Sin embargo, la mención relacionada con el hecho que dicha proteína posee actividad lubricante se constituye como información adicional que resulta útil aún para la persona no versada en la materia, toda vez que permite reconocer que la materia de la solicitud **tiene propiedades lubricantes**, aún sin conocer estructuralmente las variantes de lubricina reivindicadas.

Sumado a lo anterior, me permito señalar a ese Despacho que con la finalidad de definir de forma más concisa la materia objeto de patentabilidad, el solicitante ha decidido modificar las reivindicaciones 15, 16 y 17 que se encuentran presentadas actualmente ante esa oficina. En este sentido, se ha limitado la materia **sólo a aquellos polinucleótidos que presentan como mínimo un 95% de identidad**

¹ Solicitud de Patente Colombiana 06-013.004. Pág. 3. Líneas 11-13

² Solicitud de Patente Colombiana 06-013.004. Pág. 39. Líneas 3-12

con las Seq IDs No. 6, 10, 14, 18 o 22. Dicha modificación limita aún más la materia objeto de la solicitud, toda vez que el rango de proteínas aceptadas de acuerdo a la similitud con las secuencias seleccionadas es mucho menor.

En vista de todo lo anterior, me permito dirigir la atención del señor Examinador a las enseñanzas del Manual Andino de Patentes que con relación a la claridad de las reivindicaciones señala que:

*"El significado y alcance de las palabras en las reivindicaciones debe ser el que normalmente se les da en el área técnica de la solicitud, y tiene que ser claro para la persona versada en la materia con la sola lectura de las reivindicaciones. Si la palabra tiene un significado especial dado por una definición en la descripción, esta definición deberá incluirse en la reivindicación, siempre que esto sea factible."*³ (Resaltado fuera del texto)

Por lo tanto, la objeción presentada por el señor Examinador se entiende plenamente superada, toda vez que para la persona medianamente versada en la materia **es suficiente la caracterización por medio de la secuencia de aminoácidos para la comprensión de la materia de la solicitud en trámite**, toda vez que es dicha secuencia la que permite identificar inequívocamente la materia objeto de la invención.

(ii) De otra parte, el señor Examinador considera que el capítulo reivindicatorio de la presente invención carece de claridad al afirmar que:

"Además de lo anterior, se han introducido nuevas reivindicaciones que no cumplen con los requisitos de claridad dado que definen la materia sobre la base de características funcionales y resultados a alcanzar. (p.e. Reivindicaciones 26, 28, 29, 30)."

Sobre dicha objeción, es preciso señalar que **el solicitante ha decidido cancelar la reivindicación 26 que se encuentra presentada actualmente ante ese Despacho**, por lo tanto la objeción relacionada con dicha reivindicación ya no es procedente.

Ahora bien, con relación a las reivindicaciones 28 a 30 es preciso señalar que las composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas recombinantes de la presente solicitud pueden prepararse para su administración a través de diferentes vías (parenteral, oral, tópica, encapsulado, etc.).

³ Secretaría General De La Comunidad Andina. "Manual para el examen de solicitudes de patentes de invención en las oficinas de propiedad industrial de los países de la Comunidad Andina"; Lima, 2004; página 39.

En este orden de ideas, es preciso señalar que la referencia a composiciones para administración inyectable, al igual que para una composición encapsulada corresponden en efecto a características técnicas de dichas composiciones que están definidas en la memoria descriptiva de la solicitud que se encuentra actualmente bajo evaluación, específicamente desde la página 45 (línea 16) hasta la página 47 (línea 20) para las formulaciones inyectables y desde la página 47 (línea 21) hasta la página 49 (línea 17).

Así las cosas, una composición farmacéutica de las proteínas de la presente solicitud que sea adecuada para administración inyectable debe cumplir ciertas características de tipo técnico como: pH, isotonicidad, estabilidad, esterilidad, presencia de estabilizantes, conservantes y un vehículo adecuado, **que de ninguna manera se constituye en un resultado a alcanzar sino que por el contrario corresponde a una característica técnica de dicha composición.**

De igual manera ocurre con la composición farmacéutica que comprende las proteínas recombinantes de la presente invención formuladas para administración como encapsulado, las cuales cumplen con ciertos parámetros técnicos como son: biocompatibilidad, viscosidad, biodegradabilidad, apariencia cosmética, esterilidad, estabilidad, entre otros, **que corresponden a características técnicas esenciales de la formulación farmacéutica, toda vez que es la combinación específica de los diferentes componentes que se describen en la memoria descriptiva de la presente solicitud** los que permiten alcanzar los resultados sorprendentes mostrados.

En consecuencia, la objeción presentada por el señor Examinador se entiende plenamente superada, toda vez que las composiciones farmacéuticas objeto de las reivindicaciones 28 a 30 no están caracterizadas mediante un resultado a alcanzar sino que por el contrario al estar definidas de conformidad con lo señalado en la memoria descriptiva de la presente invención para las composiciones inyectables y encapsuladas, **manifiestan expresamente los componentes que hacen parte de dichas composiciones para que la persona medianamente versada en la materia pueda reproducirlas inequívocamente.**

Consecuentemente, el capítulo reivindicatorio modificado es claro y conciso al reclamar las proteínas recombinantes que poseen actividad lubricante y las composiciones farmacéuticas que las contienen que son objeto de la presente solicitud, y por lo tanto cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

4. **OBJECCIÓN DE FALTA DE NOVEDAD**

Ahora bien, el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **2764** manifiesta que el objeto de la presente solicitud carece de novedad con base en las enseñanzas del documento WO 00/64930 (D1) "Tribonectins".

Acerca de dicho documento expresa que:

"La reivindicación 1 y sus dependientes divulgan una proteína recombinante aislada caracterizada porque comprende SEQ ID NOS: 9, 13, 17, 21.

Para el análisis de novedad es necesario tener en cuenta que las características técnicas esenciales que comprenden las proteínas recombinantes definidas en las reivindicaciones, se remiten a la repetición de la secuencia KEPATT y presentan actividad lubricante, tal como ha sido, además, argumentado por el solicitante en su respuesta del 01/06/2010.

D1 enseña (ver folios: 200 a 222) un método para suplementar tribonectinas a articulaciones con deficiencias de éstas, en las cuales, se involucran moléculas caracterizadas porque comprenden secuencias KEPATT y presentan actividad lubricante de la misma forma que las reivindicadas en la solicitud. Tales moléculas se basan en la repetición de 1 a 76 veces dicha secuencia (página 2, línea 10-12), 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 megacariocitos (Tablas 1, 3 y 4).

Los elementos característicos de los péptidos reivindicados ya eran conocidos, como se evidencia en D1, así como la forma de realizar dichas moléculas de lubricina, las posibles sustituciones y los resultados esperados. Por tal razón, los compuestos reivindicados no pueden ser considerados novedosos.

De esta forma se establece que las reivindicaciones 1 a 33 no cumplen con el requisito de Novedad."

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar el inequívoco carácter novedoso de la materia revelada en la presente invención frente al citado documento D1, a continuación me permito presentar un análisis técnico comparativo entre las enseñanzas de dichas anterioridades y la materia revelada en la presente invención:

4.1 Consideraciones relativas al documento WO 00/64930 (D1)

En términos generales, la anterioridad D1 citada está relacionada con tribonectinas y con un método de tribosuplementación llevado a cabo a través de la administración de dichas tribonectinas directamente en una articulación artrítica o lesionada. En este sentido, los autores de dicha anterioridad señalan que:

*"La invención caracteriza un nuevo tratamiento para la osteoartritis y otras enfermedades degenerativas de las articulaciones a través de la tribosuplementación. Dicha tribosuplementación se lleva a cabo por medio de la administración de polipéptidos lubricantes directamente en la articulación artrítica o lesionada. A diferencia se la viscosuplementación, la tribosuplementación no incrementa de forma sustancial la viscosidad de la solución, por ejemplo, al fluido sinovial, al cual esta es adicionada. La viscosidad de una solución a la cual se le adiciona tribonectina se incrementa en no más de un 10%, preferiblemente en no más de un 5%, más preferiblemente en no más de un 2%, más preferiblemente en no más de un 1%. Mucho más preferiblemente, la viscosidad de la solución a la cual se le adiciona la tribonectina no se altera o disminuye."*⁴ (Resaltado fuera del texto)

En este orden de ideas, es preciso señalar con respecto a la objeción presentada por el señor Examinador que no existe ninguna información o sugerencia dentro de las enseñanzas de la anterioridad citada **que revele específicamente las variantes de lubricina reclamadas por el solicitante**. En este sentido, considero importante manifestar que el citado documento D1 **únicamente revela la secuencia de aminoácidos completa de una "tribonectina" (SEQ ID NO:1) así como también las secuencias KEPPTT (SEQ ID NO:3) y XXTTTX (SEQ ID NO:4) que se encontró que se repiten en dicha tribonectina**. Adicionalmente, aunque la anterioridad D1 citada afirma superficialmente que las tribonectinas incluyen proteínas que tienen menos de 76 repeticiones de dicha secuencia, es evidente que la referencia no proporciona ninguna información relacionada con las secuencias de dichas tribonectinas.

Siguiendo la misma línea de argumentación, es claro que cuando la persona medianamente versada en la materia estudia cuidadosamente la información contenida en la anterioridad D1 citada, comprenderá que **dicho documento considera el exón 6 como esencial para la actividad lubricante**. Tan es así que D1 enseña diferentes variantes de tribonectinas, de las cuales todas contienen en el exón 6 el fragmento KEPPTT repetido (ver aminoácidos 200-1140 de la SEQ ID NO:1 y los nucleótidos 631-3453 de la SEQ ID NO: 2 del documento D1).

⁴ Documento WO 00/64930. Pág. 1. Líneas 17-24.

En este orden de ideas, es preciso señalar que el citado documento D1 enseña que **para producir péptidos recombinantes que contengan el exón 6 (nucleótidos 631-3453 de SEQ ID NO:2) de la proteína MSF (o lubricina) el vector de expresión debe ser transfectado en una célula.** Igualmente, la anterioridad citada enseña que **la expresión del exón 6 de MSF (o lubricina) es fundamental para la actividad lubricante.** En este sentido, el documento D1 señala que:

*"La expresión del exón 6 de la proteína MSF es requerido para la actividad lubricante; la actividad lubricante óptima probablemente requiere la expresión de un dominio expresado por al menos un exón adicional de MSF, por ejemplo, el exón 1."*⁵ (Resaltado fuera del texto)

De otra parte, considero de gran importancia manifestar que el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud **está dirigido a reclamar secuencias específicas derivadas de la lubricina que no están reveladas ni extraídas de forma obvia del documento D1 citado**, y en particular reivindica variantes de lubricina en las que se excluyen grandes fragmentos codificados por el exón 6. En este orden de ideas, a la persona medianamente versada en la materia le resultaría notable y sorprendente que dichas variantes de lubricina presenten alguna actividad lubricante, en vista de los sustanciales cambios realizados con relación a la proteína original.

De conformidad con lo anterior, es evidente que **la exclusión de grandes fragmentos del exón 6**, tal como se realiza en la materia objeto de la presente solicitud, **va en contravía a las enseñanzas de la anterioridad D1 citada**, toda vez que **dicha anterioridad considera que dicho exón es fundamental para la actividad lubricante.**

Para ilustrar un poco más lo anterior, me permito dirigir la atención del señor Examinador a las enseñanzas del documento *Flannery, C., et.al. "Prevention of Cartilage Degeneration in a Rat Model of Osteoarthritis by Intraarticular Treatment With Recombinant Lubricin"* que se presenta como anexo al presente memorial, y en donde se demuestra que **las variantes de lubricina que presentan una supresión significativa de una porción que codifica para el exón 6 se enlazan efectivamente a las superficies de los cartílagos, y por lo tanto facilitan la lubricación en las uniones de los cartílagos e inhiben la adhesión de las células sinoviales.** En este caso, el tratamiento de las articulaciones de rodilla de rata con dichas variantes de lubricina mostraron como resultado una modificación significativa en la enfermedad, relacionada con el aumento en los efectos condroprotectivos durante la progresión de la osteoartritis, dada la notoria disminución en la degeneración del cartílago y el daño estructural.

⁵ Documento WO 00/64930. Pág. 37. Líneas 10-12.

En vista de todo lo anterior, me permito dirigir ahora la atención del señor Examinador a las enseñanzas del Manual Andino de Patentes que con relación a la evaluación de la novedad señala que:

*"Si todas las características técnicas de la reivindicación independiente se encuentran descritas en un mismo antecedente y además se encuentran íntimamente relacionadas, el objeto de dicha reivindicación carece de novedad. Si una característica, aunque sea banal, no se encuentra contenida en el antecedente, la reivindicación es nueva."*⁶ (Resaltado fuera del texto)

Por lo tanto, en vista de las grandes diferencias existentes entre la información revelada por el citado documento D1 y la materia objeto de la solicitud en cuestión, es claro que la presente invención presenta un incuestionable carácter novedoso, razón por la cual cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 16 de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. CONCLUSIÓN

En primer lugar, es necesario resaltar que a través de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, se hace completamente claro cual es el alcance de la materia reclamada en la presente solicitud, razón por la cual se superan las objeciones presentadas a este respecto por el señor Examinador.

De otra parte, a través de los argumentos presentados se demostró que la materia objeto de la presente solicitud es novedosa a la luz de las enseñanzas del documento WO 00/64930 (D1).

6. Anexo me permito presentar:

- (a) Copia de las páginas 61 a 64 que corresponden al nuevo Capítulo Reivindicatorio que consta de 32 nuevas reivindicaciones, **que reemplaza al actualmente presentado** y en el cual se han realizado las modificaciones expuestas anteriormente; y
- (b) Copia del documento **Flannery, C., et.al.**, "Prevention of Cartilage Degeneration in a Rat Model of Osteoarthritis by Intraarticular Treatment With Recombinant Lubricin", Arthritis & Rheumatism, Vol. 60, No. 3, March 2009, pp 840-847.

⁶ Secretaría General De La Comunidad Andina. "Manual para el examen de solicitudes de patentes de invención en las oficinas de propiedad industrial de los países de la Comunidad Andina"; Lima, 2004; página 66.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

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

7. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y argumentaciones presentadas y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,


ALICIA FLOREDA RICAURTE

ALICIA LLOREDA 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 (e) con el número 39.690.713 y tarjeta profesional de abogado No. 53.215 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.

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

Alicia Lloreda Ricaurte 17 NOV. 2010
ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén

Notario 41 del círculo de Bogotá
Alfaro Virviesca



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.

15 21. La composición de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque comprende además hialuronano 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:

25 cultivar células transformadas con el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 22 en medio 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 es formulada para inyección.

28. La composición de la reivindicación 20 ó 21
15 caracterizada porque la composición es encapsulada.

29. La composición de la reivindicación 28, caracterizada porque la composición es encapsulada en una matriz implantable de liberación de medicamentos.

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

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

32. El método de la reivindicación 31
30 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.

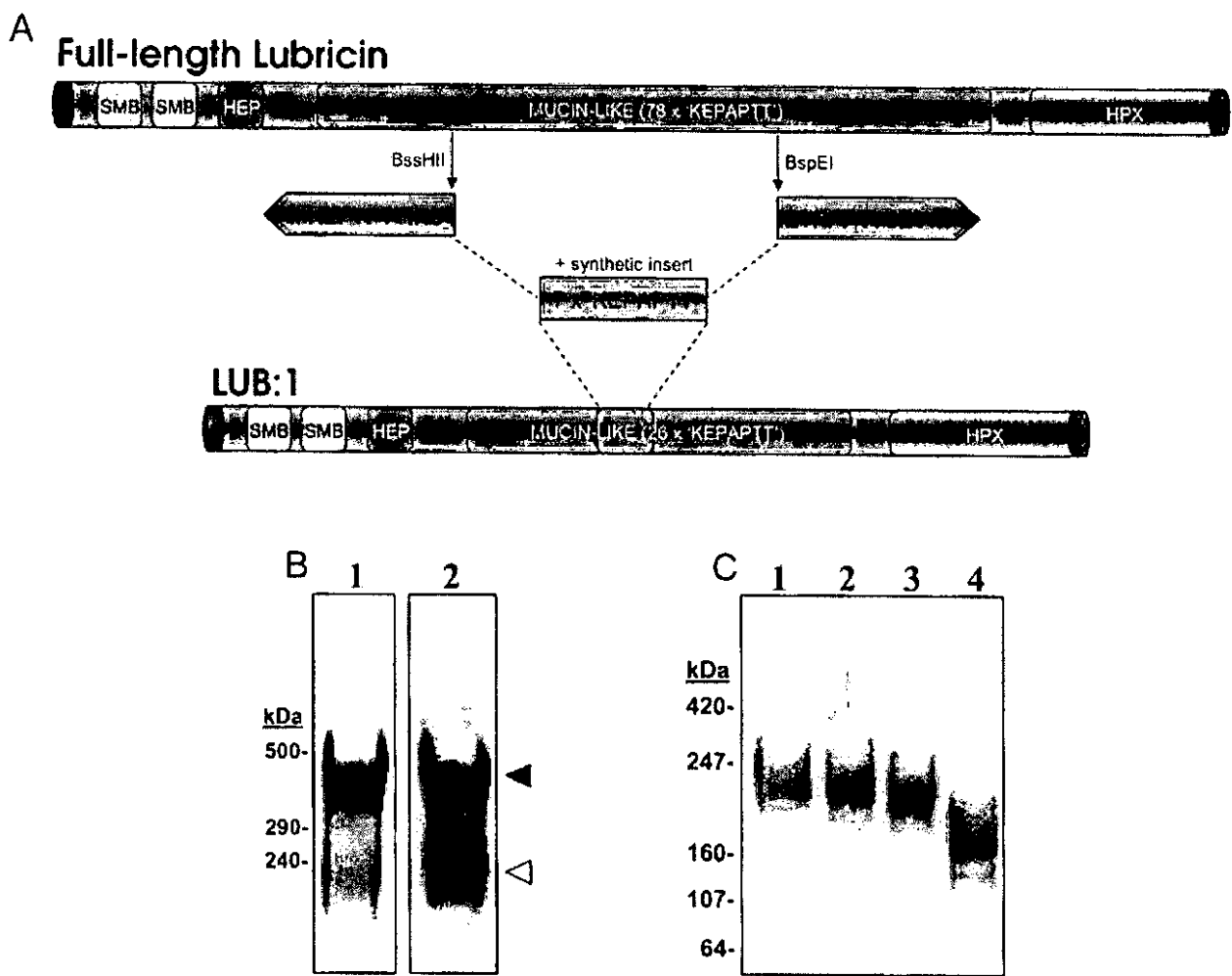


Figure 1. Production and characterization of recombinant lubricin construct LUB:1. **A**, Complementary DNA (cDNA) for human lubricin was subjected to restriction enzyme digestion at unique sites that flank the sequence encoding Ala³⁷⁴ to Pro⁸⁴⁷ (474 amino acids comprising 59 KEPAPTT-like repeat elements). 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

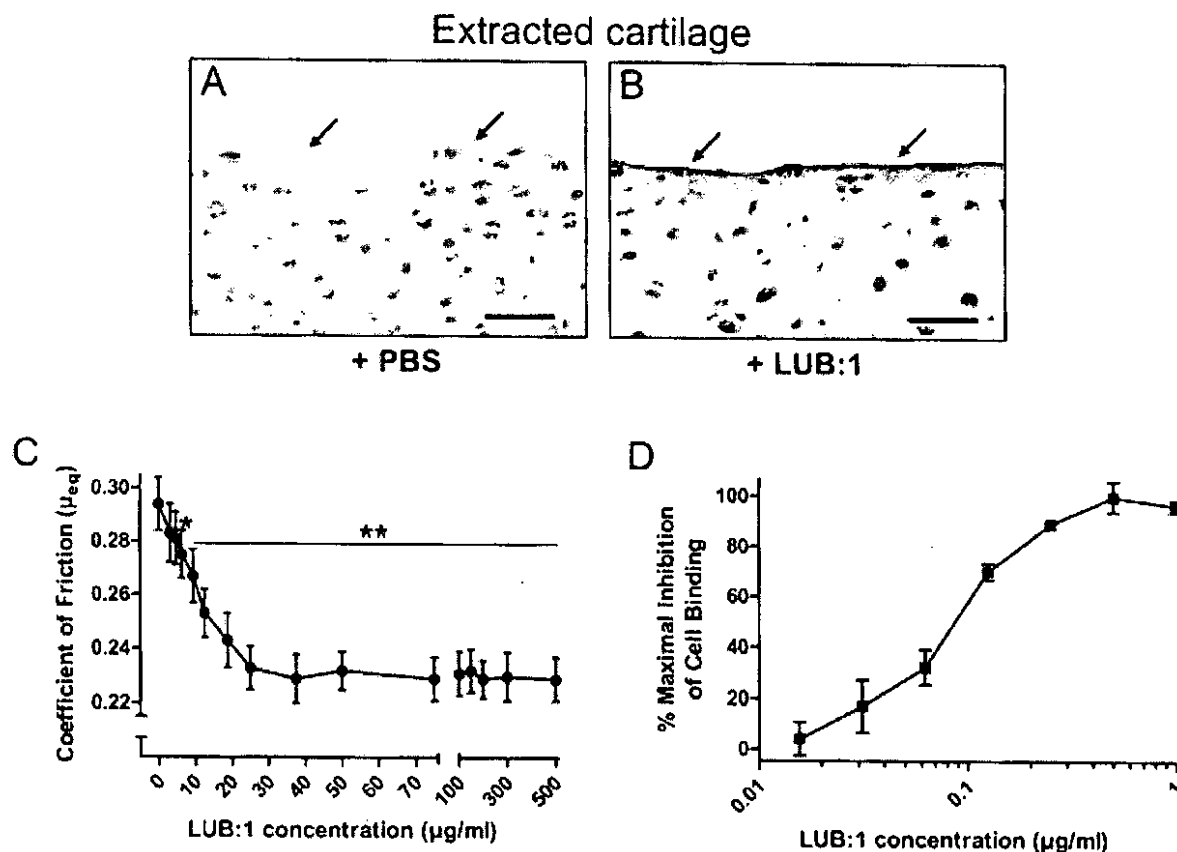


Figure 2. Ex vivo functional characterization of LUB:1. A and B, LUB:1 binds and localizes to cartilage surfaces. Articular cartilage explants were extracted in phosphate buffered saline (PBS) containing 1.5M NaCl, then incubated with PBS (A) or 100 $\mu\text{g/ml}$ LUB:1 (B) and immunostained with antilubricin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

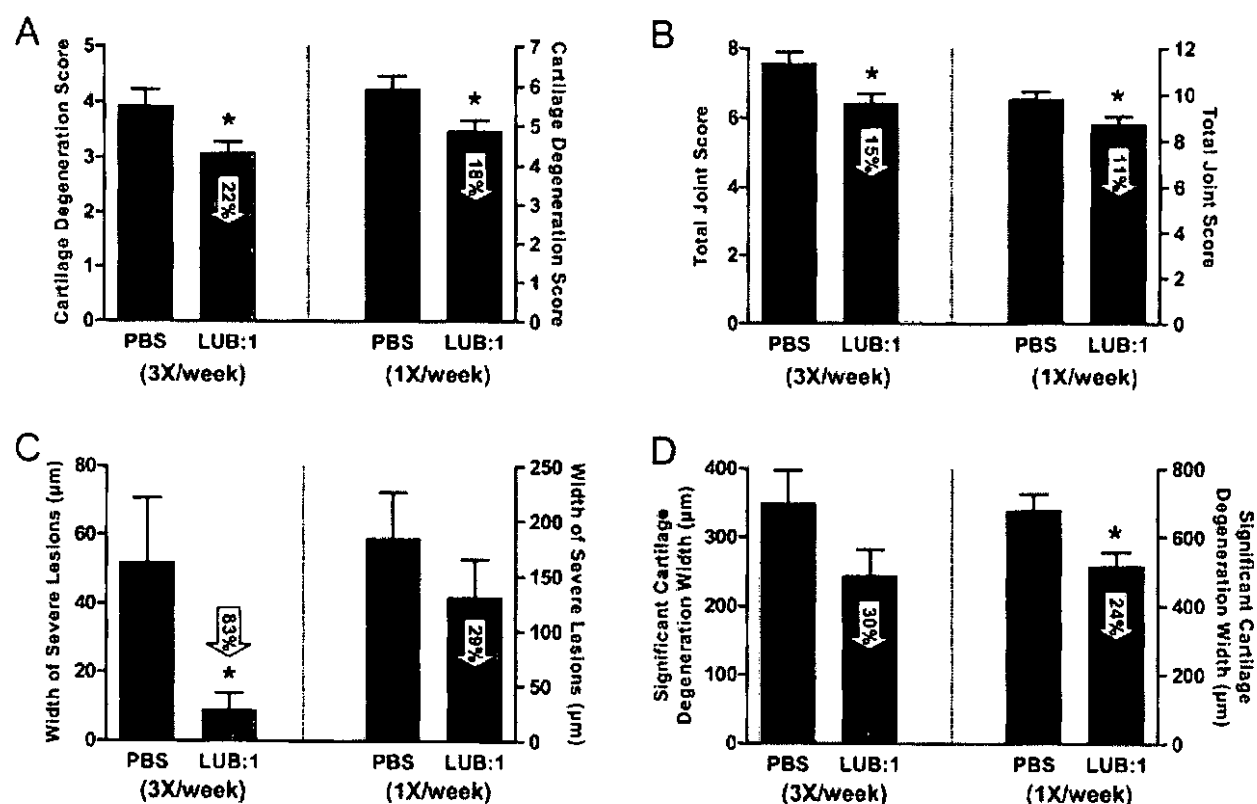


Figure 3. Intraarticular treatment with LUB:1 for 4 weeks significantly decreases multiple parameters of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis (OA). Following surgical induction of OA, knee joints treated either 3 times per week or once per week with LUB:1 (20 μ g/40 μ l) or with phosphate buffered saline (PBS) vehicle (40 μ l) 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 $\sim 70\%$ 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,

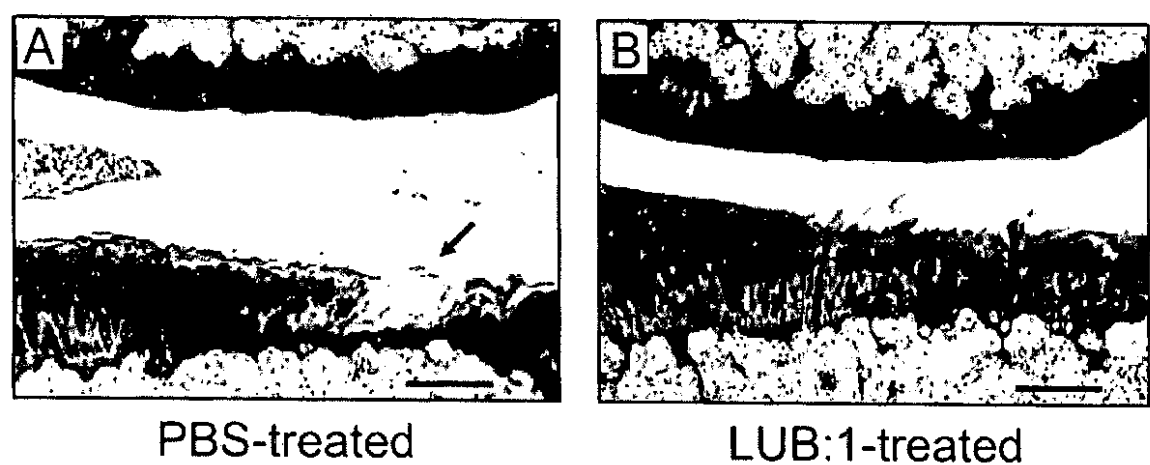


Figure 4. Representative histologic sections from rat joints with surgically induced osteoarthritis. Shown are rat knee joints treated for 4 weeks with phosphate buffered saline (PBS) (A) or LUB:1 (B) administered 3 times per week. Arrow indicates the location of a severe cartilage lesion in the PBS-treated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

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 μ g of human serum albumin in 40 μ l 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 $\geq 50\%$ 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 $\pm$ 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.

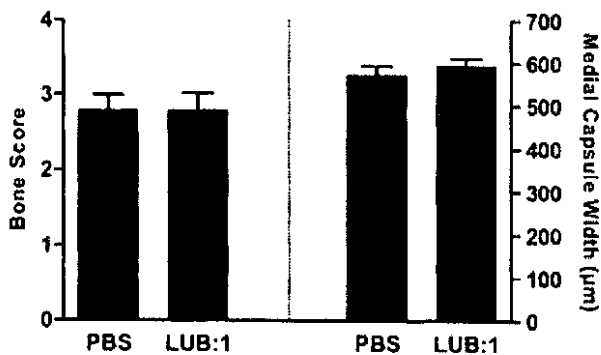


Figure 5. LUB:1 treatment has no effect on joint loading or on the development of fibroplasia. Animals dosed 3 times per week for 4 weeks with LUB:1 (20 μ g/40 μ l) or phosphate buffered saline (PBS) vehicle (40 μ l) displayed no significant differences in bone scores or medial capsule width. Bars show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