TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark	Marcas
Patent	Patentes
Health Permit	Registros Sanitarios
Software	Soporte Lógico
Commercial Name	Nombres Comerciales
Design	Diseños

1/330

186

Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 05015803 00062002 Folios: 338
Fecha (AMD): 2005-04-21 13:38:22
Tramite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 444 REFUERZO
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF: EXPEDIENTE: 05-015803
PATENTE DE INVENCION PCT: "FACTOR DERIVADO DE LAS CELULAS ESTROMAL QUE MEDIO DE LA ALBERGA..."

Estimados señores:

Damos alcance a la solicitud de patente PCT Fase nacional, presentada ante su Despacho y radicada el día 21 de febrero del año en curso según expediente citado en la referencia, con el fin de presentar copias de los siguientes documentos expedidos según el Tratado en Materia de Cooperación de Patentes:

1. Copia del recibo de presentación del Acta 10/426.712. Con su traducción al español.
2. Copia simple del acta de cesión de los inventores, con su traducción al español.
3. Copia del formulario de notificación sobre la presentación o transmisión del documento de prioridad, con su traducción al español, Formulario PCT/IB/304.
4. Copia del formulario de Notificación para informar al solicitante sobre la comunicación de la solicitud internacional a las oficinas designadas, con su traducción al español, Formulario PCT/IB/308.
5. Copia del formulario de acuse de recibo de copia de archivo de presentación de la solicitud internacional, Formulario PCT/ib/301
6. Copia del formulario de notificación concerniente al pago de los aranceles previstos (PCT, Normas 14,15 y 16 e instrucciones administrativas), Formulario PCT/RO/102.

Carrera 13 A No. 28-38 Mz 2 Bufette 245 Parque Central Bavaria
PBX (57 1) 341 9841 - FAX (57 1) 336 8592 - Cel. (315) 317 1181
E-malls: tmcarlos@etb.net.co , trademarks1@hotmail.com
Bogotá D.C., COLOMBIA, S.A.

TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark	Marcas
Patent	Patentes
Health Permit	Registros Sanitarios
Software	Soporte Lógico
Commercial Name	Nombres Comerciales
Design	Diseños

7. Copia del Formulario de transmisión de informe de búsqueda internacional o declaración, con su traducción al español, formulario PCT/ISA/220.

8. Carta remisoria y formulario de solicitud internacional PCT, con su traducción al español.

9. Copia de la publicación internacional No. WO 2004/017978 A1 de la patente PCT/US2003/026013, con su respectiva traducción al español.

En con secuencia, ruego a usted tener en cuenta los anteriores documentos y una vez finiquitado esta diligencia, ordenar lo pertinente para que el expediente siga su curso normal.

Del señor Jefe,

CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ
No.17.117.818 expedida en Bogotá,
T.P No. 17.402 del C.S.J.

Carrera 13 A No. 28-38 Mz 2 Bufette 245 Parque Central Bavaria
PBX (57 1) 341 9841 - FAX (57 1) 336 8592 - Cel. (315) 317 1181
E-mails: tmcarlos@etb.net.co , trademarks1@hotmail.com
Bogotá D.C., COLOMBIA, S.A.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

1/9 14 1988 3 188

APPLICATION NUMBER	FILING DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY.DOCKET.NO	DRAWINGS	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
10/426,712	04/30/2003	1645	402	CCF-6288NP	6	23	2

RECEIVED
JUN 30 2003
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.

CONFIRMATION NO. 5671

TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.
SUITE 1111
526 SUPERIOR AVENUE
CLEVELAND, OH 44114-1400

ENTERED

CCF-6288NP
RSW

FILING RECEIPT

OC000000010344106

Date Mailed: 06/25/2003

Receipt is acknowledged of this regular Patent Application. It will be considered in its order and you will be notified as to the results of the examination. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. **If an error is noted on this Filing Receipt, please write to the Office of Initial Patent Examination's Filing Receipt Corrections, facsimile number 703-746-9195. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).**

Applicant(s)

Marc S. Penn, Shaker Heights, OH;
Arman T. Askari, University Heights, OH;
Matthew Kiedrowski, Lorain, OH;

Assignment For Published Patent Application

The Cleveland Clinic Foundation;

Domestic Priority data as claimed by applicant

This appln claims benefit of 60/405,274 08/22/2002

Foreign Applications

If Required, Foreign Filing License Granted: 06/24/2003

Projected Publication Date: 02/26/2004

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

** SMALL ENTITY **

Title

Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration in ischemic cardiomyopathy

4

Preliminary Class

435

- 189

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER
Title 35, United States Code, Section 184
Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15

GRANTED

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Office of Export Administration, Department of Commerce (15 CFR 370.10 (j)); the Office of Foreign Assets Control, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

[Sello] Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos. Estados Unidos de América

[Sello] RECIBIDO. 30 de junio de 2003. Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS. Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos. Domicilio: COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS. Casilla de Correo 1450. Aloxandria, Virginia 22313-1450. www.uspto.gov

Solicitud de Patente Número: 10/426.712.

Fecha de Presentación: 30/04/2003

Unidad del Arte del Grupo: 1645

Arancel de Presentación Recibido: 402

Archivo de Apoderado N° CCF-6288NP

Dibujos: 6

Reivindicaciones Totales: 23

Reivindicaciones Independientes: 2

Confirmación N° 5671

Recibo de Presentación [Código de Barras]

TOROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO LLP

Oficina 1111

526 Superior Avenue

Cleveland, Ohio 44114-1400

Fecha de Envío: 25/06/2003

Se acusa recibo de esta Solicitud de Patente normal. Será considerada a su turno y se le notificará en cuanto a los resultados del examen. Asegúrese de proporcionar el NÚMERO DE SOLICITUD DE PATENTE ESTADOUNIDENSE, la FECHA DE PRESENTACIÓN, el NOMBRE DEL SOLICITANTE, y el TÍTULO DE LA INVENCIÓN cuando pregunte acerca de esta solicitud. Los aranceles remitidos por cheque o giro están sujetos a cobro. Rogamos controlar la precisión de los datos presentados en este recibo. Si se advierte un error en este Recibo de Presentación, rogamos escribir a la Oficina de Correcciones de Recibos de Presentación del Examen Inicial de Patentes, fax número 703-746-9195. Rogamos proporcionar una copia de este Recibo de Presentación con los cambios indicados en él. Si usted recibió una "Notificación para Presentar Partes Faltantes" para esta solicitud, rogamos presentar todas las correcciones en este Recibo de Presentación con su respuesta a la Notificación. Cuando la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos procesa la respuesta a la Notificación, la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos generará otro Recibo de

Presentación que incorporará las correcciones solicitadas (si corresponde).

Solicitante(s): Marc S. Penn, Shaker Heights, Ohio;

Arman T. Askari, University Heights, Ohio;

Matthew Kiedrowski, Lorain, Ohio;

Cesión para la Solicitud de Patente Publicada

The Cleveland Clinic Foundation

Datos de la Prioridad Nacional reivindicada por el solicitante

Esta solicitud reivindica prioridad de 60/405.274, 22/08/2002

Solicitudes Extranjeras

Si se requiere, Licencia para Presentaciones en el Exterior

Otorgada: 24/06/2003

Fecha de Publicación Proyectada: 26/02/2004

Pedido de No Publicación: no

Pedido de Publicación Anterior: No

PEQUEÑA EMPRESA

Título

Factor derivado de la célula estromal que media la alberga la célula madre y la regeneración de tejidos en la cardiomiopatía isquémica

Clase Preliminar

435

LICENCIA PARA PRESENTACIÓN EN EL EXTERIOR CONFORME a Título 35, Artículo 184 del Código de Estados Unidos Título 37, Artículos 5.11 y 5.15 del Código de Normas Federales

OTORGADA

Se ha otorgado al solicitante una licencia conforme al Título 35, artículo 184 del Código de Estados Unidos, si la frase "SI SE REQUIERE, LICENCIA PARA PRESENTACIONES EN EL EXTERIOR OTORGADA" seguida por una fecha aparece en este formulario. Esas licencias se emiten en todas las solicitudes en las cuales se han cumplido las condiciones para la emisión de una licencia, sin tener en cuenta si se puede o no requerir una licencia como se establece en el Título 37, artículo 5.15 del Código de Normas Federales. El alcance y las limitaciones de esta licencia se exponen en el Título 37, artículo 5.15(a) del Código de Normas Federales a menos que se haya emitido una licencia anterior conforme al Título 37, artículo 5.15(b) del Código de Normas Federales. La licencia está sujeta a revocación al notificarse por escrito. La fecha indicada es la fecha de entrada en vigencia de la licencia, a menos que se haya otorgado una licencia anterior con un alcance similar conforme al Titulo 37, artículo 5.13 o 5.14 del Código de Normas Federales.

Esta licencia deberá ser retenida por el licenciatario y podrá utilizarse en cualquier momento en la fecha de entrada en vigencia o con posterioridad a ella a menos que se revoque. Esta licencia se transfiere automáticamente a todas las solicitudes relacionadas presentadas conforme al Titulo 37, artículo 1.53(d) del Código de Normas Federales. Esta licencia no es retroactiva.

El otorgamiento de una licencia de ninguna manera disminuye la responsabilidad de un licenciatario por la seguridad del objeto impuesta por todos los contratos celebrados con el Gobierno o las disposiciones de leyes vigentes relacionadas con el espionaje y la seguridad nacional o la exportación de datos técnicos. Los licenciatarios deberán informarse de las normas actuales especialmente con respecto a ciertos países, de otras reparticiones, particularmente la Oficina de Controles de Comercio de Defensa, el Departamento de Estado (con respecto a Armas, Municiones e Implementos de Guerra (Título 22, artículos 121-128 del Código de Normas Federales); la Oficina de Administración de Exportaciones, el Departamento de Comercio (Título 15, artículo 370.10 (j) del Código de Normas Federales); la Oficina de Control de Bienes en el Exterior, el Departamento del Tesoro (Título 31, Partes 500+ del Código de Normas Federales) y el Departamento de Energía.

NO OTORGADA

No se ha otorgado ninguna licencia conforme al Título 35, artículo 1184 del Código de Estados Unidos en este momento, si la frase "SI SE REQUIERE, LICENCIA PARA PRESENTACIONES EN EL EXTERIOR OTORGADA" NO aparece en este formulario. El solicitante podrá aún solicitar una licencia conforme al Título 37, artículo 5.12 del Código de Normas Federales, si se desea una licencia con anterioridad a la fecha de vencimiento de 6 meses desde la fecha de presentación de la solicitud de patente. Si han transcurrido 6 meses desde la fecha de presentación de esta solicitud de patente y el licenciatario no ha recibido ninguna indicación de una orden de secreto conforme al Titulo 35, artículo 181 del Código de Estados Unidos, el licenciatario podrá presentar en el exterior la solicitud de patente conforme al Título 37, artículo 5.15(b) del Código de Normas Federales.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

CF-6288NP RSW

Under Secretary of Commerce For Intellectual Property and
Director of the United States Patent and Trademark Office
Washington, DC 20231
www.uspto.gov

OCTOBER 08, 2003

PTAS

TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO LLP
RICHARD S. WESORICK
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OHIO 44114-1400

RECEIVED
OCT 14 2003
TAROLLI, SUNDHEIM,

102442957A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 04/30/2003 REEL/FRAME: 014032/0475
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
PENN, MARC S. DOC DATE: 04/29/2003

ASSIGNOR:
ASKARI, ARMAN T. DOC DATE: 04/29/2003

ASSIGNOR:
KIEDROWSKI, MATTHEW DOC DATE: 04/29/2003

ASSIGNEE:
CLEVELAND CLINIC FOUNDATION, THE
9500 EUCLID AVENUE
CLEVELAND, OHIO 44195

SERIAL NUMBER: 10426712 FILING DATE: 04/30/2003
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:

MARCUS KIRK, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

ASSIGNMENT

198 B

WHEREAS, we, Marc S. Penn, Arman T. Askari, and Matthew Kiedrowski, of Shaker Heights, County of Cuyahoga, and State of Ohio; of University Heights, County of Cuyahoga, and State of Ohio; and of Lorain, County of Lorain, and State of Ohio respectively, have made new and useful improvements in **STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 MEDIATES STEM CELL HOMING AND TISSUE REGENERATION IN ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY** (generally referred to as CCF Project No. 02-333);

WHEREAS, The Cleveland Clinic Foundation (hereinafter "CCF"), a tax-exempt organization duly organized and existing under the laws of the State of Ohio, having a place of business at Cleveland, County of Cuyahoga, State of Ohio, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to the said improvements and all patents therefor to be obtained in the United States of America and countries foreign to the United States;

NOW THEREFORE, BE IT KNOWN that, pursuant to CCF's Invention and Discovery Policy as specified in the CCF "Yellow Book" as of this date and for valuable considerations to us paid, the receipt whereof is hereby acknowledged, we, the said Marc S. Penn, Arman T. Askari, and Matthew Kiedrowski do hereby assign, sell and set over unto the said CCF, its successors or assigns, the entire right, title and interest in and to the said improvements and any and all inventions pertaining thereto, the application for United States patent executed by us respectively on the 29th day of April 2003, 29th day of April 2003, and the 29th day of April 2003, all patents therefor in the United States of America and elsewhere, and the right to apply for patents therefor in all countries foreign to the United States and to claim for such applications the priority of United States applications, and we hereby request the Commissioner of Patents of the United States, and any official of any country or countries foreign to the United States whose duty it is to issue patents, to issue such patents to the said CCF, its successors or assigns; and we further agree to execute such other applications and other instruments and do all other acts as may be deemed necessary by the said CCF, its successors or assigns in order to fully secure, protect and preserve its rights to the said improvements and to obtain patents therefor in the United States of America and all countries foreign to the United States, all without further consideration but at the expense of the said CCF, its successors or assigns.

Signed at
County of Cuyahoga and State of Ohio
This 29th day of April, 2003

Marc S. Penn

STATE OF Ohio)
)
COUNTY OF Cuyahoga)

On this 29th day of April, 2003
Personally appeared before me Marc S. Penn to me known to be the person named in and who executed the above instrument, and acknowledged to me that he executed the same for the uses and the purposes therein mentioned.

THEODORE C. THEOFRASTOUS, Attorney At Law
Notary Public, State of Ohio

Signed at
County of Cuyahoga and State of Ohio
This 29th day of April, 2003

Arman T. Askari

STATE OF Ohio)
)
COUNTY OF Cuyahoga)

On this 29th day of April, 2003
Personally appeared before me Arman T. Askari to me known to be the person named in and who executed the above instrument, and acknowledged to me that he executed the same for the uses and the purposes therein mentioned.

THEODORE C. THEOFRASTOUS, Attorney At Law
Notary Public, State of Ohio
My commission has no expiration date.
Section 147.03 O.R.C.

Notary Public

Signed at
County of Cuyahoga and State of Ohio
This 29th day of April, 2003.

Matthew Kiedrowski

STATE OF Ohio)
)
COUNTY OF Cuyahoga)

On this 29th day of April, 2003
Personally appeared before me Matthew Kiedrowski to me known to be the person named in and who executed the above instrument, and acknowledged to he that he executed the same for the uses and the purposes therein mentioned.

THEODORE C. THEOFRASTOUS, Attorney At Law
Notary Public, State of Ohio
My commission has no expiration date.
Section 147.03 O.R.C.

Notary Public

2845

[Sello] RECIBIDO. 14 de octubre de 2003. Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS
Subsecretario de Comisario para la Propiedad Intelectual y Comisario de la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos
Washington, DC 20231
www.uspto.gov

8 de octubre de 2003
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO LLP
RICHARD S. WESORICK
526 SUPERIOR AVENUE, OFICINA 1111
CLEVELAND, OHIO 44114-1400

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACIÓN DE INSCRIPCIÓN DE DOCUMENTO DE CESIÓN

El documento adjunto ha sido inscripto por la Sección de Cesiones de la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos. Existe una copia fiel microfilmada completa en la oficina de búsqueda de cesiones en el número de rodillo y casillero referidos al pie.

Rogamos revisar toda la información contenida en esta Notificación. La información contenida en esta Notificación de Inscripción refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Patentes y Marcas. Si usted encontrara algún error o tuviera preguntas referidas a esta Notificación, podrá comunicarse con el empleado cuyo nombre aparece en esta Notificación al 703-308-9723. Rogamos enviar el pedido de corrección a: Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos, Sección de Cesiones, Casillero de Cesiones, CG-4, 1213 Jefferson Davis Hwy., Suite 320, Washington, DC 20231.

Fecha de Inscripción: 30/4/2003 Rodillo/Casillero: 014032/0475

Número de páginas: 3

Escrito: Cesión de los Derechos del Cedente (Ver el Documento para hallar detalles)

CEDENTE:

PENN, Marc S. Fecha del Documento: 29/04/2003

CEDENTE:

ASKARI, Arman T. Fecha del Documento: 29/04/2003

CEDENTE:

KIEDROWSKI, Matthew Fecha del Documento: 29/04/2003

CESIONARIO:

CLEVELAND CLINC FOUNDATION, THE

9500 EUCLID AVENUE

CLEVELAND, OHIO 44195

Acta Número: 10426712 Fecha de presentación: 30/04/2003

Patente Número: Fecha de concesión:

014032/0475 Página 2

Marcus Kirk, Examinador

Oficina de Inscripción de Documentos Públicos.

CESIÓN

POR CUANTO nosotros, Marc S. Penn, Arman T. Askari, y Matthew Kiedrowski, de Shaker Heights, Condado de Cuyahoga, y Estado de Ohio; de University Heights, Condado de Cuyahoga, y Estado de Ohio; y de Lorain, Condado de Lorain, y Estado de Ohio, respectivamente, hemos hecho mejoras nuevas y útiles en FACTOR DERIVADO DE LA CÉLULA ESTROMÁL QUE MEDIA LA ALBERGA LA CÉLULA MADRE Y LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS EN LA CARDIOMIOPATÍA ISQUÉMICA (generalmente citado como Proyecto de CCF N° 02-333);

POR CUANTO, The Cleveland Clinic Foundation (en adelante "CCF"), una organización exenta del pago de impuestos debidamente constituida y con existencia legal conforme a las

leyes del Estado de Ohio, que tiene sede social en Cleveland, Condado de Cuyahoga, Estado de Ohio, desea adquirir la totalidad de los derechos reales y personales sobre las mejoras mencionadas y sobre todas las patentes para ellas que se concedan en Estados Unidos y en países extranjeros a Estados Unidos;

POR LO TANTO, CONSTE POR LA PRESENTE que, de acuerdo con la Política de Invenciones y Descubrimientos de la CCF especificada en el "Libro Amarillo" de la CCF en la fecha y por contraprestaciones susceptibles de valor pecuniario abonadas a nosotros, cuya recepción se certifica por la presente, nosotros, los nombrados Marc S. Penn, Arman T. Askari y Matthew Kiedrowski por la presente cedemos, vendemos y transferimos a la nombrada CCF, sus sucesores y derechohabientes, la totalidad de los derechos reales y personales sobre las mejoras mencionadas y sobre todas y cada una de las invenciones pertenecen a ellas, la solicitud de patente estadounidense otorgada por nosotros respectivamente el 29 de abril de 2003, el 29 de abril de 2003 y el 29 de abril de 2003, todas las patentes para ellas en Estados Unidos y en otros lugares, y el derecho de presentar solicitudes de patente para ellas en todos los países extranjeros a Estados Unidos y de reivindicar para esas solicitudes de patente la prioridad de las solicitudes de patente estadounidenses, y por la presente solicitamos al Comisario de Patentes de Estados

19

204

Unidos, y a todos los funcionarios de todos los países o de países extranjeros a Estados Unidos cuya obligación es conceder patentes, que conceda esas patentes a la nombrada CCF, sus sucesores o derechohabientes; y acordamos que otorgaremos aquellas otras solicitudes y otros documentos y realizaremos todos los demás actos que CCF, sus sucesores o derechohabientes consideren necesarios para obtener, proteger y preservar sus derechos sobre las mejoras mencionadas y para obtener patentes para ellas en Estados Unidos y en todos los países extranjeros a Estados Unidos, todo sin ninguna contraprestación pero a expensas de la nombrada CCF, sus sucesores o derechohabientes.

Firmó en el Condado de Cuyahoga y Estado de Ohio a los 29 días del mes de abril del año 2003

[Aparece una firma ilegible y una aclaración de firma que reza:] Marc S. Penn

ESTADO DE OHIO. CONDADO DE CUYAHOGA

A los 29 días del mes de abril del año 2003, compareció por ante mí Marc S. Penn a quien reconozco como la persona nombrada y que otorgó el instrumento precedente, y certificó ante mí que otorgó el mismo para los usos y los propósitos mencionados en él.

[Aparece una firma ilegible y debajo reza:] Escribano Público.

[Aparece un sello que reza:] Theodore C. Theofraustous, Apoderado, Escribano Público, Estado de Ohio. Mi mandato no tiene fecha de vencimiento conforme al Artículo 147.03 del Código de Estados Unidos.

Firmó en el Condado de Cuyahoga y Estado de Ohio a los 29 días del mes de abril del año 2003

[Aparece una firma ilegible y una aclaración de firma que reza:] Arman T. Askari

ESTADO DE OHIO. CONDADO DE CUYAHOGA

A los 29 días del mes de abril del año 2003, compareció por ante mí Arman T. Askari a quien reconozco como la persona nombrada y que otorgó el instrumento precedente, y certificó ante mí que otorgó el mismo para los usos y los propósitos mencionados en él.

[Aparece una firma ilegible y debajo reza:] Escribano Público.

[Aparece un sello que reza:] Theodore C. Theofraustous, Apoderado, Escribano Público, Estado de Ohio. Mi mandato no tiene fecha de vencimiento conforme al Artículo 147.03 del Código de Estados Unidos.

Firmó en el Condado de Cuyahoga y Estado de Ohio a los 29 días del mes de abril del año 2003

[Aparece una firma ilegible y una aclaración de firma que reza:] Matthew Kiedrowski

ESTADO DE OHIO. CONDADO DE CUYAHOGA

A los 29 días del mes de abril del año 2003, compareció por ante mí Matthew Kiedrowski a quien reconozco como la persona nombrada y que otorgó el instrumento precedente, y certificó ante mí que otorgó el mismo para los usos y los propósitos mencionados en él.

[Aparece una firma ilegible y debajo reza:] Escribano Público.

[Aparece un sello que reza:] Theodore C. Theofraustous, Apoderado, Escribano Público, Estado de Ohio. Mi mandato no tiene fecha de vencimiento conforme al Artículo 147.03 del Código de Estados Unidos.

RECEIVED
NOV 1 0 2003
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.

PATENT COOPERATION TREATY

207

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WESORICK, Richard, S.
Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino L.L.P.
Suite 1111
526 Superior Avenue
Cleveland, OH 44114
United States of America

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 28 October 2003 (28.10.03)	
Applicant's or agent's file reference CCF-6288PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US03/26013	International filing date (day/month/year) 21 August 2003 (21.08.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 22 August 2002 (22.08.02)
Applicant THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.

3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
22 Augu 2002 (22.08.02)	60/405,274	US	14 Octo 2003 (14.10.03)
30 Apri 2003 (30.04.03)	10/426,712	US	20 Octo 2003 (20.10.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.85

Authorized officer
Alexandre BOUVIER (Fax 338-8995)

Telephone No. (41-22) 338 8765

PCT/US03/26013

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT. NOTIFICACIÓN SOBRE PRESENTACIÓN O REMISIÓN DE DOCUMENTOS DE PRIORIDAD

(Instrucciones Administrativas del PCT, Artículo 411)

De la OFICINA INTERNACIONAL

Para: WESORICK, Richard S.

Torolli, Sundheim, Coveell & Tummino LLP

Oficina 1111

526 Superior Avenue

Cleveland, Ohio 44114

Estados Unidos

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Fecha de envío (día/mes/año): 28 de octubre de 2003 (28-10-03)

Referencia de archivo del Solicitante o Agente: CCF-6288PCT

Solicitud Internacional No.: PCT/US 03/26013

Fecha de Presentación Internacional: 21 de agosto de 2003 (21-08-2003)

Fecha de Publicación Internacional: Aún no publicada

Fecha de Prioridad: 22 de agosto de 2002 (22-08-2002)

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. El solicitante por la presente queda notificado de la fecha de recepción (excepto cuando las letras "NR" aparezcan en la columna de la derecha) por la Oficina Internacional del(os) documento(s) de prioridad referentes a la(s) siguiente(s) solicitud(es) indicada al pie. A menos que se indique lo contrario con un asterisco que aparece junto a la fecha de recepción, o con las letras "NR", en la columna de la derecha, el documento de prioridad referido se presentó o remitió a la Oficina Internacional en cumplimiento de la Norma 17.1(a) o (b).

2. La presente actualiza y reemplaza cualquier notificación emitida previamente concerniente a la presentación o remisión de documentos de prioridad.

3. Un asterisco(*) que aparece junto a la fecha de recepción, en la columna de la derecha, indica un documento de prioridad presentado o remitido a la Oficina Internacional pero no en cumplimiento de la Norma 17.1(a) o (b). En tal caso, se llama la atención del solicitante a la Norma 17.1(c) que dispone que ninguna Oficina designada podrá pasar por alto la reivindicación de prioridad referida antes de dar al Solicitante la oportunidad, al entrar en la fase nacional, de presentar el documento de prioridad dentro de un plazo que sea razonable en las circunstancias.

3. Las letras "NR" que aparecen en la columna de la derecha indican un documento de prioridad que no ha sido recibido por la Oficina Internacional o que el solicitante no solicitó a la Oficina receptora que prepare y remita a la Oficina Internacional, como lo establece la Norma 17.1(a) o (b), respectivamente. En tal caso, se llama la atención del solicitante hacia la Norma 17.1(c) que establece que ninguna Oficina designada podrá pasar por alto la reivindicación de prioridad referida antes de dar al solicitante la oportunidad, al entrar en la fase nacional, de presentar el documento de prioridad dentro de un plazo que sea razonable en las circunstancias.

Fecha de la solicitud: 22 de agosto de 2002 (22-08-02)

Solicitud de Prioridad N°: 60/405.274

País u Oficina Regional u Oficina receptora de PCT: Estados Unidos

Fecha de recepción del documento de prioridad: 14 de octubre de 2003 (14-10-03)

Fecha de la solicitud: 30 de abril de 2003 (30-04-03)

Solicitud de Prioridad N°: 10/426.712

País u Oficina Regional u Oficina receptora de PCT: Estados Unidos

Fecha de recepción del documento de prioridad: 20 de octubre de 2003 (20-10-03)

16

211

La Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin des Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza. Fax: (41-22) 338.89.95

Funcionario autorizado: Alexandre BOUVIER (Fax 338-8995)

Teléfono N° (41-22) 338-8765

Formulario PCT/IB/304 (julio 1998)

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

WESORICK, Richard, S.
Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino L.L.P.
Suite 1111
526 Superior Avenue
Cleveland, OH 44114
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
MAR 15 2004
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.

Date of mailing *(day/month/year)* 04 March 2004 (04.03.2004)	
Applicant's or agent's file reference CCF-6288PCT	IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2003/026013	21 August 2003 (21.08.2003)	22 August 2002 (22.08.2002)

Applicant

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

   AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DZ, EP, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM

   In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

   AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

   The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-*bis*)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 March 2004 (04.03.2004) under No. WO 2004/017978

4. **TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase**

   The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

   In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

   It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Gijsbertus Beijer - Carlos Roy
Facsimile No.(41-22) 740.14.35	Telephone No.(41-22) 338.91.11

PCT/US2003/26013

PCT. NOTIFICACIÓN PARA INFORMAR AL SOLICITANTE SOBRE LA COMUNICACIÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL A LAS OFICINAS DESIGNADAS

(Norma PCT 47.1(c), primera oración)

De la OFICINA INTERNACIONAL

Para: WESORICK, Richard S.

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

Oficina 1111

526 Superior Avenue

Cleveland, Ohio 44114

ESTADOS UNIDOS

Fecha de envío (día, mes, año): 4 de marzo de 2004 (4/03/04)

Referencia de archivo del Solicitante o agente: CCF-6288PCT

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional N° PCT/US2003/26013

Fecha de Presentación internacional (día, mes, año): 21 de agosto de 2003 (21-08-2003)

Fecha de Prioridad (día, mes, año): 22 de agosto de 2002 (22-08-2002)

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. Por la presente se notifica que la Oficina Internacional ha comunicado, conforme al Artículo 20, la solicitud

internacional a las siguientes oficinas designadas en la fecha indicada más arriba como la fecha de envío de esta Notificación:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DZ, EP, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM

Conforme a la Norma 47.01(c), tercera oración, cada Oficina designada aceptará esta Notificación como prueba definitiva de que la comunicación de la solicitud internacional se ha realizado debidamente en la fecha de envío indicada más arriba y que no es necesario que el solicitante presente copia de la solicitud internacional ante las Oficinas designadas.

2. Las siguientes Oficinas designadas han renunciado al requisito de dicha comunicación a esta fecha:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

La comunicación se remitirá a esas Oficinas sólo a su pedido. Más aún, esas Oficinas no exigen al solicitante que presenten copia de la solicitud internacional (Norma 49.1(a-bis)).

3. Se adjunta a esta Notificación, copia de la solicitud internacional publicada por la Oficina Internacional el 4 de marzo de 2004 (4-03-2004) como WO 2004/017978

4. PLAZOS para presentar un pedido de examen preliminar internacional y para el ingreso en la fase nacional.

El plazo aplicable para ingresar en la fase nacional, conforme a las disposiciones del siguiente párrafo, será de 30 MESES desde la fecha de prioridad, no solamente con respecto a la Oficina elegida si el pedido de examen preliminar se presenta con anterioridad al vencimiento del plazo de 19 meses desde la fecha de prioridad, sino también con respecto a la Oficina designada, en ausencia de la presentación de ese pedido, donde la Cláusula 22(1) y sus modificaciones con vigencia a partir del 1 de abril de 2002 es aplicable con respecto a esa Oficina designada. Para mayores detalles, véase el Boletín de PCT N° 44/2001 del 1 de noviembre de 2001, páginas 19926, 19932, y 19934, así como el Boletín de PCT, publicaciones de octubre y noviembre de 2001 y febrero de 2002.

En la práctica, los plazos excepto el plazo de 30 meses seguirán siendo aplicables, durante diferentes periodos de tiempo, con respecto a ciertas Oficinas designadas o elegidas. Para actualizaciones regulares de los plazos aplicables (20, 21, 30 o 31 meses, u otro plazo), Oficina por Oficina, vea el Boletín de PCT, el Boletín de PCT y la Guía del Solicitante de

PCT, Volumen II, Capítulos Nacionales, todos disponibles en el sitio de Internet de la WIPO, en http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

Para la presentación de un pedido de examen preliminar internacional, véase la Guía del Solicitante de PCT, Volumen I/A, Capítulo IX. Solamente un solicitante que es nativo o residente de un Estado Firmante del PCT que está obligado por el Capítulo II tendrá derecho a presentar un pedido de examen preliminar internacional (en la actualidad, todos los Estados Firmantes del PCT están obligados por el Capítulo II).

Es la responsabilidad del solicitante controlar todos estos plazos.

La Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin des Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza, Fax: (41-22)740.14.35.
Funcionario Autorizado: Gijsbertus Beijer.
Tel. (41-22)338.91.11

Formulario PCT/IB/308 (abril de 2002)

5/9

PCT/US03/2

PATENT COOPERATION TREATY 217

RECEIVED
NOV 1 0 2003
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

CCF-6288PCT
RSW

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WESORICK, Richard, S.
Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino L.L.P.
Suite 1111
526 Superior Avenue
Cleveland, OH 44114
United States of America

Date of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTIFICATION
28 October 2003 (28.10.03)	
Applicant's or agent's file reference	**International application No.**
CCF-6288PCT	PCT/US03/26013

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION(all designated States)

International filing date	:	21 August 2003 (21.08.03)
Priority date(s) claimed	:	22 August 2002 (22.08.02) 30 April 2003 (30.04.03)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	13 October 2003 (13.10.03)
List of designated Offices	:	

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP :AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU, LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ, TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- [X] time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- [X] confirmation of precautionary designations (if applicable)
- [ ] requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Alexandre BOUVIER (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.89.95	Telephone No. (41-22) 338 8785

Form PCT/IB/301 (April 2002)

INFORMATION IN TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office where a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date (this time limit may not be extended). If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. The Notice of confirmation and payment must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

ACUSE DE RECIBO DE COPIA DE ARCHIVO DE PRESENTACIÓN

(PCT, Norma 24.2(a))

[Sello] RECIBIDO. 10 de noviembre de 2003. Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

De: Oficina Internacional

Para: WESORICK, Richard S.
Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP
Oficina 1111
526 Superior Avenue
Cleveland, Ohio 44114
Estados Unidos

Fecha de envío (día,mes,año): 28 de octubre de 2003 (28-10-03)

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Referencia de archivo de Solicitante o agente: CCF-6288PCT

Solicitud Internacional No: PCT/US03/26013

Por la presente se notifica al solicitante que la Oficina Internacional ha recibido la copia del registro de presentación de la solicitud internacional según el siguiente detalle.

Nombre(s) del(os) Solicitante(s):

THE CLEVELAND CLILNIC FOUNDATION (para todos los Estados designados)

Fecha de presentación internacional: 21 de agosto de 2003 (21-08-03)

Fecha de Prioridad reivindicada: 22 de agosto de 2002 (22-08-02); 30 de abril de 2003 (30-04-03)

Fecha de recepción de la copia del registro de presentación por la Oficina Internacional: 13 de octubre de 2003 (13-10-03)

Lista de Oficinas designadas:

AP: GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW

EA: AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP: AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR

OA: BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

Nacional: AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

ATENCIÓN:

El solicitante deberá verificar cuidadosamente los datos que figuran en esta notificación. En caso de discrepancia, entre estos datos y los señalados en la solicitud internacional, el

solicitante deberá informar a la brevedad a la Oficina Internacional.

Asimismo, se llama la atención del solicitante sobre la información contenida en el Anexo, referida a:

[X] plazos para el ingreso en fase nacional - véase la información importante actualizada (a abril de 2002)

[x] ratificación de las designaciones precautorias (si corresponde)

[] requisitos en cuanto a documentos de prioridad (si corresponde)

Se remitirá una copia de esta Notificación a la Oficina receptora y a la Autoridad de Búsqueda Internacional.

La Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin des Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza. Fax (41-22)338-89.95

Funcionario autorizado: Alexandre BOUVIER (Fax 338-8995)

Tel.(41-22)338-8765

Formulario PCT/IB/301 (abril de 2002)

ANEXO AL FORMULARIO PCT/IB/301

Solicitud Internacional N° PCT/US03/26013

INFORMACIÓN ACERCA DE LOS PLAZOS PARA INGRESAR EN LA FASE NACIONAL

Se recuerda al Solicitante que se deberá ingresar en la "fase nacional" ante cada una de las Oficinas designadas indicadas en la carátula de esta Notificación abonando los aranceles nacionales y presentando traducciones, como lo establecen las Cláusulas 22 y 39 y las leyes nacionales aplicables. Asimismo, el solicitante también puede tener que cumplir con otros requisitos extraordinarios aplicables en ciertas Oficinas. Es responsabilidad garantizar que se ejecutan los pasos necesarios para ingresar en la fase nacional en forma oportuna. La mayor parte de las Oficinas no emiten recordatorios a solicitantes en relación con el ingreso en la fase nacional.

El plazo para ingresar en la fase nacional será, conforme al párrafo siguiente, de **30 MESES** desde la fecha de la prioridad, no solamente con respecto a cualquier Oficina elegida en donde un el pedido de examen preliminar internacional se presenta con anterioridad al vencimiento del plazo de 19 meses desde la fecha de prioridad (véase la Cláusula 39(1)), sino también

con respecto a cualquier Oficina designada, en la ausencia de la presentación de ese pedido, donde la Cláusula 22(1) y sus modificaciones con vigencia a partir del 1 de abril de 2002 es aplicable con respecto a la Oficina designada. Para mayores detalles, véase el Boletín PCT N° 44/2001 del 1 de noviembre de 2001, páginas 19926, 19932 y 19934, así como el Boletín de PCT, publicaciones de Octubre y Noviembre de 2001 y Febrero de 2002.

En la práctica, los plazos excepto el plazo de 30 meses seguirán siendo aplicables, durante diferentes períodos de tiempo, con respecto a ciertas Oficinas designadas o elegidas. Para actualizaciones regulares de los plazos aplicables (20, 21, 30 o 31 meses, u otro plazo), Oficina por Oficina, vea el Boletín de PCT (parte "Sección IV" publicada en forma semanal), el Boletín de PCT (mensual) y los Capítulos Nacionales relevantes en Volumen II de la Guía del Solicitante de PCT (cuya versión en papel se actualiza habitualmente dos veces por año y cuya versión de internet se actualiza generalmente en forma semanal). Finalmente, una tabla acumulativa de todos los plazos para ingresar en la fase nacional está disponible en el de Internet de la WIPO, a través de los links de diferentes páginas, el sitio incluye aquellos del Boletín y la Guía, en http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

La información acerca de los requisitos para la presentación de un pedido de examen preliminar internacional se expone en la Guía del Solicitante de PCT, Volumen I/A, Capítulo IX. Obsérvese que solamente un solicitante que es nativo o residente de un Estado Firmante del PCT que está obligado por el Capítulo II tendrá derecho a presentar un pedido de examen preliminar internacional (en la actualidad, todos los Estados Firmantes del PCT están obligados por el Capítulo II).

RATIFICACIÓN DE DESIGNACIONES PRECAUTORIAS

Esta notificación enumera solamente designaciones específicas hechas conforme a la Norma 4.9(a) en el pedido. Es importante verificar que estas designaciones sean correctas. Los errores en las designaciones pueden corregirse cuando se hayan hecho designaciones precautorias conforme a la Norma 4.9(b). Por la presente se recuerda al solicitante que se puede ratificar cualquier designación precautoria de acuerdo con la Norma 4.9(c) con anterioridad al vencimiento de 15 meses desde la fecha de prioridad (este plazo no será prorrogable). Si ésta no se ratifica, se considerará automáticamente como retirada por el solicitante. No habrá ningún recordatorio ni invitación. La ratificación de una designación consiste en la presentación de una notificación que especifica el Estado designado en cuestión (con una indicación del tipo de

protección o tratamiento deseado) y el pago de los aranceles de designación y ratificación. La ratificación deberá llegar a la Oficina receptora dentro del plazo de 15 meses.

REQUISITOS CON RESPECTO A LOS DOCUMENTOS DE PRIORIDAD

Para los solicitantes que aún no han cumplido con los requisitos con respecto a los documentos de prioridad, se recuerda lo siguiente.

Cuando se reivindique prioridad de una solicitud nacional, regional o internacional anterior, el solicitante deberá presentar una copia de la solicitud anterior mencionada, certificada por la autoridad ante la cual se presentó ("el documento de prioridad") ante la Oficina receptora (que la remitirá a la Oficina Internacional) o directamente a la Oficina Internacional, con anterioridad al vencimiento de 16 meses desde la fecha de prioridad, siempre que ningún documento de prioridad pueda aún ser presentado ante la Oficina Internacional con anterioridad a la fecha de publicación internacional, en cuyo caso el documento se considerará recibido por la Oficina Internacional el último día del plazo de 16 meses (Norma 17.1(a)).

Cuando el documento de prioridad sea emitido por la Oficina receptora, el solicitante podrá, en lugar de presentar el documento de prioridad, solicitar a la Oficina receptora que prepare y remita el documento de prioridad a la Oficina Internacional. Tal pedido deberá hacerse con anterioridad al vencimiento del plazo de 16 meses y podrá ser sometido por la Oficina receptora al pago de un arancel (Norma 17.1(b)).

Si el documento de prioridad referido no se presenta ante la Oficina Internacional o si no se ha realizado el pedido a la Oficina receptora de preparar y remitir el documento de prioridad (y no se ha pagado el arancel correspondiente, si correspondiera) dentro del plazo aplicable indicado conforme a los párrafos precedentes, cualquier Estado designado podrá pasar por alto la reivindicación de prioridad, siempre que ninguna Oficina designada pase por alto la reivindicación prioridad citada anteriormente dando al solicitante la oportunidad de presentar el documento de prioridad dentro de un plazo que sea razonable en esas circunstancias.

Cuando se reivindiquen varias prioridades, la fecha de la prioridad que se considerará para los propósitos de computar el plazo de 16 meses será la fecha de presentación de la solicitud más antigua cuya prioridad se reivindica.

RECEIVED
OCT 13 2003
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.

6/9 227

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
RICHARD S. WESORICK
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OHIO 44114

CCF-6288PCT

PCT

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 14, 15 and 16 and Administrative Instructions, Sections 102*bis*(c), 304(a) and (b), 323(b), 707(b) and 803)

Date of mailing *(day/month/year)*	07 Oct 2003
Applicant's or agent's file reference: CCF-6288PCT	PAYMENT DUE: see item 3 for time limits

International application No.	International filing date/Date of receipt *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US03/26013	21 Aug 2003	22 Aug 2002

Applicant: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:

☒ the payment of all the prescribed fees, and ☐ an overpayment, which will be refunded in due course.

☐ no or insufficient payment of the prescribed fees and the applicant is hereby invited to pay the balance due, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. Fees and payment calculation:

2,530.00	-	2,530.00	=	0.00
Total fees payable		Amount paid		Balance

☐ The details of the calculation are given in the Annex.

3. Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.4 and 16.1(f)):

☐ within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (for the transmittal fee (if any), the search fee, the basic fee and the designation fee). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.

☐ within ONE YEAR from the priority date (only for the designation fee and only if this time limit expires later than the above time limit).
— If the designation fee is paid within one month from the date of receipt of the international application, the amount payable is the amount applicable on that date of receipt.
— If the designation fee is paid within one year from the priority date but later than one month from the date of receipt of the international application, the amount payable is the amount applicable on the date of payment. The receiving Office should be consulted for the applicable amount.

☐ within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations *(if necessary)*:

☐ The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Catherine Williams
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703-305-3677

Form PCT/RO/102 (January 2003)

ANNEX TO FORM PCT/RO/102
CALCULATION OF THE PRESCRIBED FEES

International application No.
PCT/US03/26013

[T] Transmittal Fee

Prescribed amount:		240.00 [T]	
Amount paid:	–	240.00	[x] correct amount
Balance:	=	0.00	[ ] overpayment
			[ ] balance due

[S] Search Fee

Prescribed amount:		450.00 [S]	
Amount paid:	–	450.00	[x] correct amount
Balance:	=	0.00	[ ] overpayment
			[ ] balance due

[I] International Fee

[B] Basic Fee

Fixed amount for first 30 sheets: 476.00 [b1]

67 (Number of sheets in excess of 30) x 12.00 (Fee per sheet) = 804.00 [b2]

Additional component: 400 x 0.00 (Fee per sheet) = 0.00 [b3]

Prescribed amount (b1 + b2 + b3) = 1,280.00 [B]

[D] Designation Fee

Amount of designation fee: 104.00

Number of designation fees payable (maximum 5): x 5

Prescribed amount = 520.00 [D]

[R] Reduction where PCT-EASY software is used or where the international application is filed in electronic form *(See the PCT Applicant's Guide, Volume I, General Part, for details on the availability of this reduction)*: – 0 [R]

Sub-total (B+D–R): = 1,800.00 [B+D–R]

Prescribed total amount *(The amount to be entered at I is the sub-total entered at (B+D–R), except where the applicant is (or all applicants are) entitled to a reduction of 75%, in which case the amount to be entered at I is 25% of the sub-total (B+D–R); certain applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee; see Notes to the Fee Calculation Sheet as annexed to the Request Form, PCT/RO/101, for details)*:

	=	1,800.00 [I]	
Amount paid:	–	1,800.00	[x] correct amount
Balance:	=	0.00	[ ] overpayment
			[ ] balance due

[P] Fee for priority document

Prescribed amount:		40.00 [P]	
Amount paid:	–	40.00	[x] correct amount
Balance:	=	0.00	[ ] overpayment
			[ ] balance due

Additional observations *(if necessary)*:

[ ] The amount paid for the designation fee covers the following designations: _____

[ ] Other *(specify)*:

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
RICHARD S. WESORICK
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OHIO 44114

PCT

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER AND OF THE INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.5(c))

Date of mailing *(day/month/year)*	07 Oct 2003
Applicant's or agent's file reference: CCF-6288PCT	IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US03/26013	21 Aug 2003	22 Aug 2002

Applicant: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

Title of the invention: STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 MEDIATES STEM CELL HOMING AND TISSUE REGENERATION IN ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:

☒ was transmitted to the International Bureau on 07 Oct 2003.

☐ has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:

☐ because the necessary national security clearance has not yet been obtained.

☐ because *(reasons to be specified)*:

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION — Completed by: CW

☐ Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.

☐ License for foreign transmittal not required. 37 CFR 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(b).

☒ Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 02 Oct 2003 (date):

☒ 37 CFR 5.15(a) ☐ 37 CFR 5.15(b)

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Catherine Williams
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703-305-3677 CW

Form PCT/RO/105 (July 1992)

45

230

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
RICHARD S. WESORICK
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO
L.L.P.
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OHIO 44114

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF SEARCH COPY

(PCT Rule 25.1)

Date of mailing (day/month/year)	07 Oct 2003
Applicant's or agent's file reference: CCF-6288PCT	IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/US03/26013	21 Aug 2003	22 Aug 2002

Applicant

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. **Where the International Searching Authority and the receiving Office are not the same Office:**
The applicant is hereby notified that the search copy of the international application was received by this International Searching Authority on the date indicated below.

Where the International Searching Authority and the receiving Office are the same Office:
The applicant is hereby notified that the search copy of the international application was received on the date indicated below.

07 Oct 2003 *(date of receipt).*

2. ☐ The search copy was accompanied by a nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form.

3. **Time limit for establishment of International search report**
The applicant is informed that the time limit for establishing the international search report is 3 months from the date of receipt indicated above or 9 months from the priority date, whichever time limit expires later.

4. A copy of this notification has been sent to the International Bureau and, where the first sentence of paragraph 1 applies, to the receiving Office.

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Catherine Williams
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703-305-3677

Form PCT/ISA/ 202 (July 1998)

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
RICHARD S. WESORICK
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OHIO 44114

PCT

NOTIFICATION REGARDING CERTAIN CORRECTIONS MADE *EX OFFICIO*

(PCT Administrative Instructions, Section 327)

	Date of mailing *(day/month/year)*: 07 Oct 2003
Applicant's or agent's file reference: CCF-6288PCT	REPLY DUE: NONE. However, see paragraph 3 below
International application No.: PCT/US03/26013	International filing date *(day/month/year)*: 21 Aug 2003
Applicant: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION	

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has corrected formal defects in the international application *ex officio*, as shown on the attached copy of:

   - [x] the request, sheet No.: 3
   - [ ] the description, sheet No.: _____
   - [ ] the claims, sheet No.: _____
   - [ ] the drawings, sheet No.: _____
   - [ ] other *(specify)*: _____

2. If the applicant agrees with these corrections, no further action is required in this regard.

3. In case of disagreement with these corrections, the applicant should promply inform this receiving Office accordingly.

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-3230	Authorized officer Catherine Williams Telephone No. 703-305-3677

Form PCT/RO/146 (July 1992)

Box No. V DESIGNATION OF STATES *Mark the applicable check-boxes below: at least one must be marked.*

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT *(If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, HU Hungary, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, RO Romania, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

National Patent *(If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*:

☒ AE United Arab Emirates	☒ HR Croatia	☒ OM Oman
☒ AG Antigua and Barbuda	☒ HU Hungary	☒ PG Papua New Guinea
☒ AL Albania	☒ ID Indonesia	☒ PH Philippines
☒ AM Armenia	☒ IL Israel	☒ PL Poland
☒ AT Austria	☒ IN India	☒ PT Portugal
☒ AU Australia	☒ IS Iceland	☒ RO Romania
☒ AZ Azerbaijan	☒ JP Japan	☒ RU Russian Federation
☒ BA Bosnia and Herzegovina	☒ KE Kenya	
☒ BB Barbados	☒ KG Kyrgyzstan	☒ SC Seychelles
☒ BG Bulgaria	☒ KP Democratic People's Republic of Korea	☒ SD Sudan
☒ BR Brazil		☒ SE Sweden
☒ BY Belarus	☒ KR Republic of Korea	☒ SG Singapore
☒ BZ Belize	☒ KZ Kazakhstan	☒ SK Slovakia
☒ CA Canada	☒ LC Saint Lucia	☒ SL Sierra Leone
☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein	☒ LK Sri Lanka	☒ SY Syrian Arab Republic
☒ CN China	☒ LR Liberia	☒ TJ Tajikistan
☒ CO Colombia	☒ LS Lesotho	☒ TM Turkmenistan
☒ CR Costa Rica	☒ LT Lithuania	☒ TN Tunisia
☒ CU Cuba	☒ LU Luxembourg	☒ TR Turkey
☒ CZ Czech Republic	☒ LV Latvia	☒ TT Trinidad and Tobago
☒ DE Germany	☒ MA Morocco	
☒ DK Denmark	☒ MD Republic of Moldova	☒ TZ United Republic of Tanzania
☒ DM Dominica		☒ UA Ukraine
☒ DZ Algeria	☒ MG Madagascar	☒ UG Uganda
☒ EC Ecuador	☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	☐ US United States of America
☒ EE Estonia		
☒ ES Spain	☒ MN Mongolia	☒ UZ Uzbekistan
☒ FI Finland	☒ MW Malawi	☒ VC Saint Vincent and the Grenadines
☒ GB United Kingdom	☒ MX Mexico	☒ VN Viet Nam
☒ GD Grenada	☒ MZ Mozambique	☒ YU Serbia and Montenegro
☒ GE Georgia	☒ NI Nicaragua	☒ ZA South Africa
☒ GH Ghana	☒ NO Norway	☒ ZM Zambia
☒ GM Gambia	☒ NZ New Zealand	☒ ZW Zimbabwe

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒ EG Egypt ☐ ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

TRATADO DE COOPERACIÓN SOBRE PATENTES

PCT

NOTIFICACIÓN CONCERNIENTE AL PAGO DE LOS ARANCELES PREVISTOS

(PCT, Normas 14, 15, y 16 e Instrucciones Administrativas, Artículos 102bis(c), 304(a) y (b), 323(b), 707(b) y 803)

[Sello] RECIBIDO. 13 de octubre de 2003. Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

De: Oficina Receptora

Para: Richard S. Wesorick. Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP. 526 Superior Avenue, Oficina 1111, Cleveland, Ohio 44114

Fecha de remisión (día/mes/año): 7 de octubre de 2003

Referencia de archivo del solicitante o agente: CCF-6288PCT

PLAZO DE PAGO VENCIDO: Ver el punto 3 para los plazos

Solicitud Internacional No.: PCT/US03/26013

Fecha de presentación internacional (día/mes/año): 21 de agosto de 2003

Fecha de prioridad (día/mes/año): 22 de agosto de 2002

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. Por la presente se notifica al solicitante que esta Oficina receptora ha recibido:

[X] **el pago** de la totalidad de los aranceles; y

[ ] **un importe excedente** que se reembolsará oportunamente

[ ] **ningún pago o un pago insuficiente** de los aranceles previstos y por la presente se **invita al solicitante a pagar el saldo adeudado**, según la síntesis del punto 2, dentro del(os) plazo(s) indicados en el punto 3.

2. **Cálculo de Aranceles y pagos:**

2.530,00	-	2.530	=	0,00
Total Aranceles a pagar		Importe abonado		Saldo

[ ] Los detalles del cálculo se dan en el Anexo

3. Plazos para el pago de aranceles previstos (Normas 14.1, 15.4 y 16.1(f)):

[ ] dentro de UN MES desde la fecha de recepción de la solicitud internacional (para el arancel de transmisión (si lo hubiere), el arancel de búsqueda, el arancel básico y el arancel de designación). El importe a pagar para cada arancel es el importe aplicable en la fecha de recepción de la solicitud internacional.

[ ] dentro de los UN AÑO desde la fecha de prioridad (sólo para el arancel de designación y sólo si este plazo vence con posterioridad al plazo anterior)

- Si el arancel de designación se paga dentro de un mes desde la fecha de recepción de la solicitud

internacional, el arancel a pagar es el arancel aplicable en esa fecha de recepción.

- Si el arancel de designación se paga dentro de un año desde la fecha de prioridad pero con posterioridad mayor a un mes desde la fecha de recepción de la solicitud internacional, el importe a pagar será el importe aplicable en la fecha de pago. La Oficina receptora deberá ser consultada sobre el importe aplicable.

[ ] dentro de los 16 MESES desde la fecha de prioridad (sólo para el arancel por documento de prioridad). Se atrae la atención del solicitante sobre el hecho de que el pedido hecho por el solicitante conforme a la Norma 17.1(b) no se dará por efectuado a menos que el arancel se abone dentro de ese plazo).

4. Observaciones adicionales (si fueran necesarias):

[ ] La copia de la búsqueda no se transmitirá a la Autoridad de Búsqueda Internacional hasta que no se haya abonado el arancel de búsqueda (en consecuencia el inicio de la búsqueda internacional quedará demorado) (Norma 23.1(a) y (b)).

Nombre y domicilio de la Oficina receptora: Casilla de PCT, Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. Fax 703-305-3230.

Funcionario Autorizado: Catherine Williams. Tel.703-305-3677

ANEXO AL FOMULARIO PCT/RO/102

CÁLCULO DE LOS ARANCELES PREVISTOS

Solicitud Internacional N° PCT/US03/26013

[T] Arancel de Remisión

Importe Previsto	240,00 [T]	
Importe Abonado	240,00	[x] importe correcto
Saldo	0,00	[] pago excedente
		[] saldo deudor

[S] Arancel por Búsqueda

Importe Previsto	450,00 [S]	
Importe Abonado	450,00	[x] importe correcto
Saldo	0,00	[] pago excedente
		[] saldo deudor

[I] Arancel Internacional

[B] Arancel Básico

Arancel fijo para primeras 30 páginas 476,00 [b1]

67 (Número de Páginas que Superan 30) x 12,00 (Arancel por página) = 804,00 [b2]

Componente Adicional ... 400 x 0,00 (Arancel por página) = 0,00 [b3]

Importe Previsto (b1 + b2 + b3) = 1.280,00 [B]

[D] Arancel por Designaciones

Importe del arancel por designaciones 104,00

Cantidad de aranceles por

Designaciones a pagar (máximo 5) x 5

Arancel previsto 520,00 [D]

[R] Descuento cuando se usa el software PCT-EASY o cuando la solicitud internacional se presenta en forma electrónica (Véase la Guía para el Solicitante del PCT, Volumen I, Parte General, para ver detalles acerca de la disponibilidad de este descuento) 0 [R]

Subtotal 1800,00 [B+D-R]

Importe total previsto (El importe que se debe ingresar en I es el subtotal ingresado en (B+D-R), excepto cuando el solicitante (o todos los solicitantes) tenga derecho a un descuento del 75%, en cuyo caso el importe que debe ingresarse en I es el 25% del subtotal (B+D-R); ciertos solicitantes de ciertos Estados tienen derecho a un descuento del 75% del arancel internacional; véase las Notas a la Planilla de Cálculos adjunta al Formulario de Pedido, PCT/RO/101, para encontrar detalles): 1.800,00 [I]

Importe Abonado 1.800,00 [x] importe correcto

Saldo 0,00 [] pago excedente

[] saldo deudor

[P] Arancel por documento de prioridad

Importe Previsto	40,00 [T]	
Importe Abonado	40,00	[x] importe correcto
Saldo	0,00	[] pago excedente
		[] saldo deudor

Observaciones Adicionales (si es necesario):

[] El importe abonado por el arancel por designaciones cubre las siguientes designaciones: _____

[] Otro (especificar):

Formulario PCT/RO/102 (Anexo) (enero de 2003)

TRATADO DE COOPERACIÓN SOBRE PATENTES

PCT

NOTIFICACIÓN DEL NUMERO DE SOLICITUD INTERNACIONAL Y FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL

(PCT, Norma 20.5(c))

De la Oficina Receptora

Para: Richard S. Wesorick

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

526 Superior Avenue, Oficina 1111

Cleveland, Ohio 44114

Fecha de Remisión (día/mes/año): 7 de octubre de 2003

Referencia de archivo del solicitante o agente: CCF-6288PCT

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.: PCT/US03/26013

Fecha de presentación (día/mes/año): 21 de agosto de 2003

Fecha de prioridad (día/mes/año): 22 de agosto de 2002

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

Título de la Invención: FACTOR DERIVADO DE LA CÉLULA ESTROMAL QUE MEDIA LA ALBERGA LA CÉLULA MADRE Y LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS EN LA CARDIOMIOPATÍA ISQUÉMICA

240

1. Por la presente se notifica al solicitante que se ha asignado a la solicitud internacional el número y fecha de presentación indicados más arriba.

2. Asimismo se notifica al solicitante que la copia del registro de presentación de la solicitud internacional:

[X] se transmitió a la Oficina Internacional el 17 de octubre de 2003

[ ] aun no se ha transmitido la solicitud internacional a la Oficina Internacional por la razón indicada más abajo y que se ha remitido copia de esta notificación a la Oficina Internacional*

[ ] debido a que no se ha obtenido aún el permiso de presentación en fase nacional necesario

[ ] debido a (deberán especificarse los motivos):

* La Oficina Internacional verifica la transmisión de la copia del registro de presentación por la Oficina Receptora y acusará recibo de él al solicitante (mediante el Formulario PCT/IB/301). Si la copia del registro de presentación no hubiera sido recibida a la fecha de vencimiento del plazo de 14 meses desde la fecha de prioridad, la Oficina Internacional notificará al solicitante (Norma 22.1(c)).

3. INFORMACIÓN SOBRE LICENCIA PARA PRESENTACIÓN EN EL EXTERIOR

Completado por: CW

[ ] No se requiere licencia adicional para la presentación en el extranjero. Este objeto está cubierto por una licencia ya

otorgada en la solicitud nacional de Estados Unidos equivalente. Recurra a esa licencia para información referida a su alcance.

[ ] No se requiere licencia para presentación en el exterior. Título 37, artículo 5.11(e)(1) o Título 37, artículo 5.11(e)(2) del Código de Normas Federales. Sin embargo, puede ser necesaria la licencia para proteger un objeto adicional. Véase Título 37, artículo 5.15(b) del Código de Normas Federales.

[x] Licencia para presentación en el exterior otorgada. Título 35, artículo 184 del Código de Estados Unidos; Título 37, artículo 5.11 del Código de Normas Federales, el (fecha) 2 de octubre de 2003

[x] Título 37, Artículo 5.15(a) del Código de Normas Federales

[ ] Título 37, artículo 5.15(b) del Código de Normas Federales

Nombre y domicilio de la Oficina receptora:

Casillero de PCT, Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Fax N° 703-305-3230

Funcionario Autorizado: Catherine Williams. Tel: 703-305-3677

Formulario PCT/RO/105 (julio de 1992)

TRATADO DE COOPERACIÓN SOBRE PATENTES

PCT

ACUSE DE RECIBO DE COPIA DE BÚSQUEDA

(PCT, Norma 25.1)

De: Autoridad de Búsqueda Internacional

Para: Richard S. Wesorick

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

526 Superior Avenue, Oficina 1111

Cleveland, Ohio 44114

Fecha de remisión (día/mes/año): 7 de octubre de 2003

Referencia de archivo del Solicitante o agente: CCF-6288PCT

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional No: PCT/US03/26013

Fecha de presentación internacional(día/mes/año): 21 de agosto de 2003

Fecha de prioridad (día/mes/año): 22 de agosto de 2002

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. Cuando la Autoridad de Búsqueda Internacional y la Oficina Receptora no sean la misma Oficina:

Por la presente se notifica al solicitante que la copia de búsqueda de la solicitud internacional fue recibida por esta

Autoridad de Búsqueda Internacional en la fecha indicada abajo.

Cuando la Autoridad de Búsqueda Internacional y la Oficina receptora son la misma Oficina:

Por la presente se notifica al solicitante que la copia de búsqueda de la solicitud internacional fue recibida en la fecha indicada abajo:

7 de octubre de 2003 (*fecha de recepción*)

2. [ ] La copia de búsqueda estaba acompañada por un listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma legible por computadora.

3. Plazo para la ratificación del Informe de Búsqueda Internacional:

Se informa al solicitante que el plazo para ratificar el Informe de Búsqueda Internacional es de 3 meses a partir de la fecha de recepción indicada más arriba ó 9 meses desde la fecha de prioridad, el plazo que venza más tarde.

4. Se ha remitido una copia de esta notificación a la Oficina Internacional y, cuando sea aplicable la primera parte del párrafo 1, a la Oficina Receptora.

05-15803 [12]

(2da Parte) 244 59

Nombre y domicilio para correspondencia de la Autoridad de Búsqueda Internacional:

Casilla de PCT, Comisario de Patentes. Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Fax N° 703-305-3230

Funcionario Autorizado: Catherine Williams. Teléfono N° 703-305-3677

Formulario PCT/ISA/202 (julio 1998)

TRATADO DE COOPERACIÓN SOBRE PATENTES

PCT

NOTIFICACIÓN SOBRE CIERTAS CORRECCIONES HECHAS *EX OFFICIO*

(Instrucciones Administrativas PCT, Artículo 327)

De: Oficina Receptora

Para: Richard S. Wesorick

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

526 Superior Avenue, Oficina 1111

Cleveland, Ohio 441114

Fecha de remisión: (día/mes/año): 7 de octubre de 2003

Referencia de archivo del solicitante o agente: CCF-6288PCT

PLAZO DE RESPUESTA VENCIDO: NINGUNO. Sin embargo, ver párrafo 3, más abajo.

Solicitud Internacional No.: PCT/US03/26013

Fecha de presentación internacional (día/mes/año): 21 de agosto de 2003

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. Por la presente se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha corregido defectos de forma en la solicitud internacional, *ex officio*, según se observa en la copia adjunta de:

[X] el pedido, página No.: 3

[ ] la memoria descriptiva, pág.No.:

[ ] las reivindicaciones, página No.:

[ ] las figuras, página No.:

[ ] otro (especifique):

2. Si el solicitante aprueba estas correcciones, no se requerirán más trámites al respecto.

3. En caso de desacuerdo con estas correcciones, el solicitante deberá informar a la brevedad a esta Oficina Receptora.

Nombre y domicilio de la Oficina receptora: Casillero PCT, Comisario de Patentes. Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. Fax N° 703-305-3230

Funcionario autorizado: Catherine Williams. Tel. 703-305-3677

Formulario PCT/RO/146 (julio de 1992)

Página N° 3

Casillero N°V DESIGNACIÓN DE ESTADOS

Marque los casilleros de verificación que correspondan a continuación; deberá marcar al menos uno.

Las siguientes designaciones se efectúan conforme a la Norma 4.9(a):

Patente Regional

[x] AP Patente ARIPO: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudán, SL Sierra Leona, SZ Suazilandia, TZ República Unida de Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe y cualquier otro Estado Firmante del Protocolo de Harare y del PCT *(si desea otro tipo de protección o tratamiento, especifíquelo en la línea de puntos).....*

[x] EA Patente de Eurasia: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Bielorrusia, KG, Kyrgyzstan, KZ Kazakstan, MD República de Moldavia, RU Federación Rusa, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan y todo otro Estado Firmante de la Convención de Patentes de Eurasia y del PCT.

[x] EP Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, BG Bulgaria, CH y LI Suiza y Liechtenstein, CY Chipre, CZ República Checa, DE Alemania, DK Dinamarca, EE Estonia, ES España, FI Finlandia, FR Francia, GB Reino Unido, GR Grecia, HU Hungría, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Países Bajos, PT Portugal, RO Rumania, SE Suecia, SI Eslovenia, SK

Eslovaquia, TR Turquía y cualquier otro Estado Firmante de la Convención de Patentes Europeas y el PCT.

[x] OA Patente OAPI: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF República Centroafricana, CG Congo, CI Costa de Marfil, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, GQ Guinea Ecuatorial, GW Guinea-Bissau, ML Malí, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo y cualquier otro Estado miembro de la OAPI y Firmante del PCT (*si desea otro tipo de protección o tratamiento, especifíquela en la línea de puntos*).....

Patente Nacional (*si desea otro tipo de protección o tratamiento, especifíquela en la línea de puntos*):

[X] AE Emiratos Árabes Unidos
[x] AG Antigua y Barbuda
[x] AL Albania
[x] AM Armenia
[x] AT Austria
[x] AU Australia
[x] AZ Azerbaijan
[x] BA Bosnia y Herzegovina
[x] BB Barbados
[x] BG Bulgaria
[x] BR Brasil
[x] BY Bielorrusia
[x] BZ Belize
[x] LC Santa Lucía
[x] LK Sri Lanka
[x] LR Liberia
[x] LS Lesotho
[x] LT Lituania
[x] LU Luxemburgo
[x] LV Letonia
[x] MA Marruecos
[x] MD República de Moldavia
[x] MG Madagascar
[x] MK Ex Rep. Yugoslava de de Macedonia
[x] MN Mongolia
[x] MW Malawi

[x] CA Canadá

[x] CH y LI Suiza y Liechtenstein

[x] CN China

[x] CO Colombia

[x] CR Costa Rica

[x] CU Cuba

[x] CZ República Checa

[x] DE Alemania

[x] DK Dinamarca

[x] DM Dominica

[x] DZ Argelia

[x] EC Ecuador

[x] EE Estonia

[x] ES España

[x] FI Finlandia

[x] GB Reino Unido

[x] GD Grenada

[x] GE Georgia

[x] GH Ghana

[x] GM Gambia

[x] HR Croacia

[x] HU Hungría

[x] ID Indonesia

[x] IL Israel

[x] IN India

[x] MX Méjico

[x] MZ Mozambique

[x] NI Nicaragua

[x] NO Noruega

[x] NZ Nueva Zelanda

[x] OM Omán

[x] PG Papúa Nueva Guinea

[x] PH Filipinas

[x] PL Polonia

[x] PT Portugal

[x] RO Rumania

[x] RU Federación Rusa

[x] SC Seychelles

[x] SD Sudán

[x] SE Suecia

[x] SG Singapur

[x] SK Eslovaquia

[x] SL Sierra Leona

[x] SY República Árabe Siria

[x] TJ Tajikistan

[x] TM Turkmenistan

[x] TN Túnez

[x] TR Turquía

[x] TT Trinidad y Tobago

[x] TZ Rep.Unida de Tanzania

[x] IS Islandia
[x] JP Japón
[x] KE Kenia
[x] KG Kyrgyzstan
[x] KP República Democrática del Pueblo de Corea
[x] KR República de Corea
[x] KZ Kazakhstan
[x] UA Ucrania
[x] UG Uganda
[x] US Estados Unidos
[x] UZ Uzbekistan
[x] VC San Vicente y los Grenadinos
[x] VN Vietnam
[x] YU Serbia y Montenegro
[x] ZA Sudáfrica
[x] ZM Zambia
[x] ZW Zimbabwe

Los casilleros de verificación siguientes e stán reservados para designar Estados que han firmado el PCT con posterioridad a la emisión de esta página:

[ ] ---- [] ------- [] ------

Declaración Precautoria sobre Designaciones: Además de las designaciones efectuadas anteriormente, el solicitante también efectúa conforme a la Norma 4.9(b) todas las demás designaciones que están permitidas conforme al PCT salvo cualquier designación indicada en el Casillero Suplementario como excluida del alcance de esta declaración. El solicitante declara que aquellas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación que no se confirme con anterioridad al vencimiento de los 15 meses desde la fecha

de prioridad se considerará retirada por el solicitante al vencimiento de ese plazo. (*La confirmación (incluyendo los aranceles) deberá llegar a la Oficina receptora dentro del plazo de 15 meses.*)

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED
DEC 15 2003
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
RICHARD S. WESORICK
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OH 44114

CCF-6288PCT

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference CCF-6288PCT RSW	Date of Mailing (*day/month/year*)
	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/26013	International filing date (*day/month/year*) 21 August 2003 (21.08.2003)
Applicant THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

   Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 *bis*.1 and 90 *bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer: Quang Nguyen, Ph.D. Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/220 (April 2002) *(See notes on accompanying sheet)*

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
RICHARD S. WESORICK
TAROLLI, SUNDHEIM, COVELL & TUMMINO L.L.P.
526 SUPERIOR AVENUE, SUITE 1111
CLEVELAND, OH 44114

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference CCF-6288PCT	Date of Mailing (*day/month/year*) 12 DEC 2003 FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/26013	International filing date (*day/month/year*) 21 August 2003 (21.08.2003)
Applicant THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

   Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 *bis*.1 and 90 *bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer: Alicia D. Roberts for Quang Nguyen, Ph.D. Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/220 (April 2002) *(See notes on accompanying sheet)*

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CCF-628PCT	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/26013	International filing date (*day/month/year*) 21 August 2003 (21.08.2003)	(Earliest) Priority Date (*day/month/year*) 22 August 2002 (22.08.2002)
Applicant THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
   ☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:
   ☐ contained in the international application in written form.
   ☐ filed together with the international application in computer readable form.
   ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
   ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
   ☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
   ☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).
3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).
4. With regard to the title,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
   ☒ as suggested by the applicant. ☐ None of the figures
   ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
   ☐ because this figure better characterizes the invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/26013

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
APS, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS
Search terms: SDF-1, stem cell, homing, myocardial, cardiomyopathy, infarcted, vector, mobilization

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/26013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 31/70, 48/00, 45/00; A01N 63/00; C12N 15/63, 5/00, 5/08
US CL : 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/45775 A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER) 16 September 1999 (16.09.1999), see the entire document, particularly pages 4-12 and page 15, lines 1-10.	1-23
X	US 2002/0061587 A1 (ANVERSA) 23 May 2002 (23.05.2002), see the entire document, particularly pages 4 and 10-13.	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 November 2003 (04.11.2003)	12 DEC 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Qúang Nguyen, Ph.D. Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the International application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

(i) the claim is unchanged;
(ii) the claim is cancelled;
(iii) the claim is new;
(iv) the claim replaces one or more claims as filed;
(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIAL DE PATENTES

PCT

NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DE INFORME BÚSQUEDA INTERNACIONAL O DECLARACIÓN

(PCT, Norma 44.1)

De la: AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: Richard S. Wesorick

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

526 Superior Avenue, Oficina 1111

Cleveland, Ohio 44114

Fecha de envío: --

Referencia de archivo del Solicitante o Agente: CCF-6288PCT

PARA OTROS TRAMITES: ver párrafos 1 y 4, más abajo

Solicitud Internacional No. PCT/US03/26013

Fecha de Presentación internacional (día, mes, año): 21 de agosto de 2003 (21-08-2003)

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. [x] Por la presente se notifica al solicitante que el informe de búsqueda internacional se ha establecido y transmitido con la presente:

Presentación de modificaciones y alegato conforme a la Cláusula 19.

405
260 75

El solicitante tiene derecho, si lo desea, de modificar las reivindicaciones de la solicitud internacional (véase la Norma 46):

¿Cuándo? El plazo para presentar dichas modificaciones es normalmente de 2 meses desde la fecha de transmisión del Informe de Búsqueda Internacional; sin embargo, para obtener más detalles, véanse las notas en la página adjunta.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin de Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza, Fax: (41-22)740.14.35

Para obtener instrucciones más detalladas, véanse las notas en la página adjunta.

2. [] Por la presente se notifica al solicitante que no se establecerá informe de búsqueda internacional y que la declaración conforme al Artículo 17(2)(a) a tal efecto se transmite con la presente.

3. [] Con respecto la protesta contra el pago de (un) arancel(es) adicionales conforme a la Norma 40.2, se notifica al solicitante que:

[] la protesta así como la resolución sobre ella ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con el pedido del

solicitante de remitir los textos de la protesta y de la resolución sobre ella a las Oficinas designadas.

[] aún no ha habido resolución sobre la protesta; el solicitante será notificado en cuanto haya una resolución.

4. Recordatorios:

Poco después de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante desea impedir o postergar la publicación, un escrito de retiro de la solicitud internacional, o de la reivindicación de prioridad, deberán ser presentados ante la Oficina Internacional según lo previsto en las Normas 90bis.1 y 90bis.3, respectivamente, antes de la finalización de los preparativos técnicos para la publicación internacional.

Dentro de los **19 meses** desde la fecha de prioridad, deberá presentarse un pedido de examen preliminar internacional si el solicitante desea postergar el ingreso en la fase nacional hasta los 30 meses desde la fecha de prioridad (en algunas Oficinas más); de lo contrario el solicitante deberá, dentro de los 20 meses, realizar los trámites previstos para el ingreso en la fase nacional ante aquellas Oficinas designadas.

Con respecto a las demás Oficinas designadas, el plazo de 30 meses (o con posterioridad) será aplicable aún cuando no se presente ningún pedido dentro de los 19 meses.

Véase el Anexo al Formulario PCT/IB/301 y, para detalles acerca de los plazos aplicables, Oficina por Oficina, véase la Guía del Solicitante de PCT, Volumen II, Sedes Nacionales y el sitio de Internet de la WIPO.

Nombre y domicilio para correspondencia de la Autoridad de Búsqueda Internacional
Casillero de PCT, Atención: ISA/US, Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Fax: (703) 305-3230
Funcionario Autorizado: [firma] Quang Nguyen, Doctor en Filosofía. Teléfono N° (703) 308-1235

Formulario PCT/ISA/220 (abril de 2002)
Véanse las notas en la página adjunta)

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIAL DE PATENTES

PCT

NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DE INFORME BÚSQUEDA INTERNACIONAL O DECLARACIÓN

(PCT, Norma 44.1)

De la: AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: Richard S. Wesorick

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

526 Superior Avenue, Oficina 1111

Cleveland, Ohio 44114

Fecha de envío: 12 de diciembre de e2003

Referencia de archivo del Solicitante o Agente: CCF-6288PCT

PARA OTROS TRAMITES: ver párrafos 1 y 4, más abajo

Solicitud Internacional No. PCT/US03/26013

Fecha de Presentación internacional (dia, mes, año): 21 de agosto de 2003 (21-08-2003)

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

1. [x] Por la presente se notifica al solicitante que el informe de búsqueda internacional se ha establecido y transmitido con la presente:

Presentación de modificaciones y alegato conforme a la Cláusula 19.

El solicitante tiene derecho, si lo desea, de modificar las reivindicaciones de la solicitud internacional (véase la Norma 46):

¿Cuándo? El plazo para presentar dichas modificaciones es normalmente de 2 meses desde la fecha de transmisión del Informe de Búsqueda Internacional; sin embargo, para obtener más detalles, véanse las notas en la página adjunta.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin de Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza, Fax: (41-22)740.14.35

Para obtener instrucciones más detalladas, véanse las notas en la página adjunta.

2. [] Por la presente se notifica al solicitante que no se establecerá informe de búsqueda internacional y que la declaración conforme al Artículo 17(2)(a) a tal efecto se transmite con la presente.

3. [] Con respecto la protesta contra el pago de (un) arancel(es) adicionales conforme a la Norma 40.2, se notifica al solicitante que:

[] la protesta así como la resolución sobre ella ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con el pedido del

solicitante de remitir los textos de la protesta y de la resolución sobre ella a las Oficinas designadas.

[] aún no ha habido resolución sobre la protesta; el solicitante será notificado en cuanto haya una resolución.

4. Recordatorios:

Poco después de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante desea impedir o postergar la publicación, un escrito de retiro de la solicitud internacional, o de la reivindicación de prioridad, deberán ser presentados ante la Oficina Internacional según lo previsto en las Normas 90bis.1 y 90bis.3, respectivamente, antes de la finalización de los preparativos técnicos para la publicación internacional.

Dentro de los **19 meses** desde la fecha de prioridad, deberá presentarse un pedido de examen preliminar internacional si el solicitante desea postergar el ingreso en la fase nacional hasta los 30 meses desde la fecha de prioridad (en algunas Oficinas más); de lo contrario el solicitante deberá, dentro de los 20 meses, realizar los trámites previstos para el ingreso en la fase nacional ante aquellas Oficinas designadas.

Con respecto a las demás Oficinas designadas, el plazo de 30 meses (o con posterioridad) será aplicable aún cuando no se presente ningún pedido dentro de los 19 meses.

Véase el Anexo al Formulario PCT/IB/301 y, para detalles acerca de los plazos aplicables, Oficina por Oficina, véase la Guía del Solicitante de PCT, Volumen II, Sedes Nacionales y el sitio de Internet de la WIPO.

Nombre y domicilio para correspondencia de la Autoridad de Búsqueda Internacional
Casillero de PCT, Atención: ISA/US, Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Fax: (703) 305-3230
Funcionario Autorizado: [firma] Quang Nguyen, Doctor en Filosofía. Teléfono N° (703) 308-1235

Formulario PCT/ISA/220 (abril de 2002)
Véanse las notas en la página adjunta)

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Cláusula 18 y Normas 43 y 44 del PCT)

Referencia de Archivo del Solicitante o agente: CCF-6288PCT

PARA REALIZAR OTROS TRAMITES: Véase Notificación de Transmisión de Informe de Búsqueda Internacional (Formulario PCT/ISA/220) y, si fuere aplicable, del punto 5 más abajo.

Solicitud Internacional No: PCT/US03/26013

Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año): 21 de agosto de 2003 (21-08-2003)

Fecha de Prioridad (Más antigua) (día/mes/año): 22 de agosto de 2002 (22-08-2002)

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

Este informe de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante conforme al Artículo 18. Se transmite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional consta de 3 páginas.

[x] Está acompañado asimismo de una copia de cada documento de arte previo citado en el informe

1. Fundamento de Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se llevó a cabo basada en la solicitud internacional en el idioma en que ésta se presentó, a menos que en este punto se indique lo contrario.

[ ] la búsqueda internacional se llevó a cabo basada en una traducción de la solicitud internacional provista a esta Autoridad (Norma 23.1(b)).

b. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo basada en el listado de secuencias:

[ ] contenido en la solicitud internacional en forma escrita

[ ] presentado junto con la solicitud internacional en forma legible por computadora

[ ] presentado con posterioridad ante esta Autoridad en forma escrita

[ ] presentado con posterioridad ante esta Autoridad en forma legible por computadora

[ ] se ha presentado una declaración jurada de que el listado de secuencias presentado con posterioridad no va más allá de la invención de la solicitud internacional presentada

[ ] se ha presentado una declaración jurada de que la información grabada en forma legible por computadora es idéntica al listado de secuencias escrito

2. [] Ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Véase Casillero I)

3. [] Falta Unidad de Invención (Véase Casillero II).

4. Con respecto al título:

[x] el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante

[] el texto ha sido establecido por esta Autoridad como sigue:

5. Con respecto al resumen:

[x] el texto es aprobado como lo presentó el solicitante

[x] el texto ha sido establecido, conforme a la Norma 38.2(b), por esta Autoridad como aparece en el Casillero III. El Solicitante puede, dentro de un mes desde la fecha de remisión de este informe de búsqueda internacional, presentar comentarios ante esta Autoridad.

6. La Lámina de dibujos que se publicará con el resumen es: Figura No. 1 .

[x] tal como lo sugirió el Solicitante

[ ] debido a que el Solicitante no sugirió una Figura.

[] debido a que ésta es la figura que mejor caracteriza a la invención

[] Ninguna de las Figuras

270 85

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N° PCT/US03/26013

Continuación de B. CAMPOS DE BÚSQUEDA Punto 3:

APS, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Términos buscados: SDF-1, célula madre, alojamiento, miocardio, cardiomiopatía, infartado, vector, movilización

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/US03/26013

A. Clasificación de la Materia:

IPC(7) A61K 31/70, 48/00, 45/00; A01N 63/00; C12N 15/63, 5/00, 5/08

CLASE INTERNACIONAL: 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o con la clasificación nacional e IPC.

B. Campos de Búsqueda:

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación)

Estados Unidos: 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

Documentación buscada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos están incluidos en los campos de búsqueda:

--

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda usados):

--

C. Documentos Considerados Relevantes

Categoría*	Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
X	WO 99/45775 A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER) 16 de septiembre de 1999 (16-09-1999), véase el documento completo, particularmente las páginas 4-12 y la página 15, líneas 1-10	1-23
X	US 2002/0061587 A1 (ANVERSA) 23 de mayo de 2002 (23-05-2002), véase el documento completo, particularmente las páginas 4 y 10-13	1-23

[] Se mencionan otros documentos en la continuación del Casillero C.

[] Véase el anexo de familia de patentes

* Categorías especiales de documentos citados:

"A": documento que define el estado general del arte que no se considera de particular relevancia

"E": documento anterior pero publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a ella.

"L": documento que puede arrojar dudas sobre la reivindicación de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita o por otra razón especial (especificada).

"O": documento que refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otro medio.

"P": documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T": documento posterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o a la fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para comprender un principio o teoría que sustenta la invención.

"X": documento de particular relevancia: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implica un paso inventivo cuando el documento se toma solo.

"Y": documento de particular relevancia: la invención reivindicada no puede considerarse que implica un paso inventivo cuando el documento se combina con otro u otros documentos, siendo dicha combinación obvia para un experto en el arte.

"&": documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la finalización efectiva de la búsqueda internacional: 4 de noviembre de 2003 (11-04-2003)

Fecha de envío del informe de búsqueda internacional: 12 de diciembre de 2003

Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/US:

Casillero de PCT, Atención: ISA/US. Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Fax N° (703)305-3230

Funcionario autorizado: Quang Nguyen, Doctor en Filosofía

Teléfono N° (703) 308-1235

Formulario PCT/ISA/210 (página dos) (julio de 1998)

NOTAS AL FORMULARIO PCT/ISA/220

Estas Notas están destinadas a dar las instrucciones básicas para la presentación de enmiendas conforme a la Cláusula 19. Las Notas están basadas en los requisitos del Tratado de Cooperación sobre Patentes, las Reglamentaciones e Instrucciones Administrativas conforme a ese Tratado. En caso de discrepancia entre estas Notas y aquellos requisitos, se aplicarán los últimos. Para obtener información más precisa, vea la Guía del Solicitante de PCT, una publicación de la WIPO.

En estas Notas, "Cláusula", "Norma", y "Artículo" se refieren a las disposiciones del PCT, las Reglamentaciones del PCT y las Instrucciones Administrativas, respectivamente.

INSTRUCCIONES CONCERNIENTES A ENMIENDAS CONFORME A LA CLÁUSULA 19

El solicitante tiene, con posterioridad a la recepción del informe de búsqueda internacional, una oportunidad de enmendar las reivindicaciones de la solicitud internacional. Sin embargo, se debe enfatizar que, dado que todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, memoria descriptiva y dibujos), pueden ser enmendados durante el procedimiento de examen preliminar internacional,

habitualmente no hay necesidad de presentar enmiendas a las reivindicaciones conforme a la Cláusula 19 salvo cuando, por ejemplo, el solicitante desea que estas últimas se publiquen para los propósitos de protección provisional o tiene otra razón para enmendar las reivindicaciones con anterioridad a la publicación internacional. Asimismo, debe enfatizarse que la protección provisional está disponible solamente en algunos Estados.

¿Qué partes de la solicitud internacional pueden enmendarse? Conforme a la Cláusula 19, se pueden enmendar solamente las reivindicaciones.

Durante la fase internacional, las reivindicaciones también pueden enmendarse (o enmendarse nuevamente) conforme a la Cláusula 34 ante la Autoridad del Examen Preliminar Internacional. La memoria descriptiva y los dibujos podrán enmendarse solamente conforme a la Cláusula 34 ante la Autoridad del Examen preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, todas las partes de la solicitud internacional podrán enmendarse conforme a la Cláusula 28 o, cuando corresponda, la Cláusula 41.

¿Cuándo?

Dentro de los 2 meses desde la fecha de envío del informe de búsqueda internacional o de los 16 meses desde la fecha de prioridad, el plazo que venza más tarde. Debe hacerse notar, sin embargo, que las enmiendas se considerarán como recibidas en fecha si son recibidas por la Oficina Internacional con posterioridad a la fecha de vencimiento del plazo aplicable pero con anterioridad a las preparaciones técnicas para la publicación internacional (Norma 46.1)

¿Dónde no deben presentarse enmiendas?

Las enmiendas pueden presentarse solamente ante la Oficina Internacional y no ante la Oficina receptora o la Autoridad de Búsqueda Internacional (Norma 46.2)

Cuando se presente / se haya presentado un pedido de examen preliminar internacional, ver abajo.

¿Cómo?

Cancelando una o más reivindicaciones completas, agregando una o más reivindicaciones o enmendando el texto de una o más de las reivindicaciones presentadas.

Deberá presentarse una página de reemplazo para cada página de las reivindicaciones que, debido a una enmienda o enmiendas, difiera de la página presentada originalmente.

Todas las reivindicaciones que aparecen en la página de reemplazo deberán estar numeradas en números arábigos. Cuando se cancele una reivindicación, no se requiere que se numeren nuevamente las demás reivindicaciones. En todos los casos en que se numeren nuevamente reivindicaciones, éstas deberán ser numeradas nuevamente en forma consecutiva (Instrucciones Administrativas, Artículo 205(b))

Las enmiendas deberán realizarse en el idioma en el cual se debe publicar la solicitud internacional.

¿Qué documentos deben/pueden adjuntarse a las enmiendas?

Carta (Artículo 205(b)):

Las enmiendas deberán presentarse con una carta.

La carta no será publicada con la solicitud internacional y las reivindicaciones enmendadas. No deberá confundirse con la "Declaración conforme a la Cláusula 19(1)" (ver abajo, en "Declaración conforme a la Cláusula 19(1)").

La carta deberá estar en inglés o francés, a elección del solicitante. Sin embargo, si el idioma de la solicitud internacional es el inglés, la carta deberá estar en inglés; si el idioma de la solicitud internacional es el francés, la carta deberá estar en francés.

4/5
29-9-94

NOTAS AL FORMULARIO PCT/ISA/220 (continuación)

La carta deberá indicar las diferencias entre las reivindicaciones presentadas y las reivindicaciones enmendadas. Deberá, en particular, indicar, en relación con cada reivindicación que aparece en la solicitud internacional (entendiéndose que las indicaciones idénticas referidas a varias reivindicaciones pueden agruparse), si

(i) la reivindicación no cambia;

(ii) la reivindicación se cancela;

(iii) la reivindicación es nueva;

(iv) la reivindicación reemplaza a una o más reivindicaciones presentadas;

(v) la reivindicación es el resultado de la división de una reivindicación presentada

Los siguientes ejemplos ilustran la forma en que deben explicarse las enmiendas en la carta que se acompaña:

1. [Cuando originalmente había 48 reivindicaciones y después de la enmienda de algunas reiviindicaciones hay 51]:

"Las reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 reemplazadas por las reivinidicaciones enmendadas que llevan los mismos números; las reivindicaciones 30, 33 y 36 quedan sin cambios; se agregan las nuevas reivindicaciones 49 a 51".

2. [Cuando originalmente había 15 reivindicaciones y después de la enmienda de todas las reivindicaciones hay 11]:
"Las reivindicaciones 1 a 11 reemplazadas por las reivindicaciones enmendadas 1 a 11".

3. [Cuando originalmente había 14 reivindicaciones y las enmiendas consisten en cancelar algunas reivindicaciones y agregar nuevas reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 6 y 14 quedan sin cambios; las reivindicaciones 7 a 13 se cancelan; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17" o
"Las reivindicaciones 7 a 13 se cancelan; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17; todas las demás reivindicaciones quedan sin cambios".

4. [Cuando se realizan diversos tipos de enmiendas]:
"Las reivindicaciones 1-10 quedan sin cambios; se cancelan las reivindicaciones 11 a 13, 18 y 19; las reivindicaicones 14, 15 y 16 son reemplazadas por la reivindicación 14; la reivindicación 17 se subdivide en las reivindicaciones enmendadas 15, 16 y 17; se agregan nuevas reivindicaciones 20 y 21".

"Declaración conforme a la Cláusula 19(1)" (Norma 46.4)

Las enmiendas pueden estar acompañadas por una declaración donde se explican las enmiendas y se indica cualquier impacto que tales enmiendas podrían tener en la memoria descriptiva y los dibujos (que no pueden ser enmendados conforme a la Cláusula 19(1)).

La declaración se publicará con la solicitud internacional y las reivindicaciones enmendadas.

Deberá estar en el idioma en el cual se ha de publicar la solicitud internacional.

Deberá ser breve, no excediendo las 500 palabras si está en inglés o se traduce al inglés.

No deberá confundirse con y no reemplaza a la carta donde se indican las diferencias entre las reivindicaciones presentadas y las enmendadas. Deberá ser presentada en hoja aparte y deberá ser identificada como tal con un encabezamiento, preferentemente usando las palabras "Declaración conforme a la Cláusula 19(1)".

No podrá contener ningún comentario que desacrediten el informe de búsqueda internacional o la relevancia de las citas contenidas en ese informe. La referencia a citas, relevantes para una reivindicación, contenidas en el informe de búsqueda internacional pueden efectuarse solamente en relación con una enmienda de esa reivindicación.

Consecuencia si ya se ha presentado un pedido de examen preliminar internacional

Si, a la fecha de presentar enmiendas y declaraciones adjuntas, conforme a la Cláusula 19, ya se ha presentado un pedido de examen preliminar internacional, el solicitante deberá preferentemente, en el momento de la presentación de las enmiendas (y toda declaración) ante la Oficina Internacional, presentar también ante la Autoridad del Examen Preliminar Internacional una copia de esas enmiendas (y de las declaraciones adjuntas) y, cuando se requiera, una traducción de esas declaraciones para el procedimiento ante esa Autoridad (ver las Normas 55.3(a) y 62.2, inciso primero). Para más información, ver las Notas al formulario de pedido (PCT/IPEA/401).

Consecuencia con respecto a la traducción de la solicitud internacional para el ingreso en la fase nacional

Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que, al ingresar en la fase nacional, puede tener que presentar una traducción de las reivindicaciones enmendadas conforme a la Cláusula 19 ante las Oficinas designadas/elegidas, en lugar de, o además de, la traducción de las reivindicaciones presentadas.

Para obtener más detalles sobre los requisitos de cada Oficina designada/elegida, ver Volumen II de la Guía del Solicitante de PCT.

TRANSMITTAL LETTER TO THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

Date	21 August 2003
International Application No.	
Attorney Docket No.	CCF-6288PCT

I. Certification under 37 CFR 1.10 (If applicable)

EU-712716551US	21 August 2003
Express Mail mailing number	Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Mail Stop PCT, Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

	Anita J. Galo
Signature of person mailing correspondence	Typed or printed name of person mailing correspondence

II. ☒ New International Application

TITLE	STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 MEDIATES STEM CELL HOMING AND TISSUE REGENERATION IN ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY	Earliest priority date (Day/Month/Year): 22 Aug 2002 (22.08.02)

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied. (Note: check as many boxes as apply):

A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States.

B. ☐ There is no prior U.S. application relating to this invention.

C. ☒ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. *(NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority.)*

application no.	60/405,274	filed on	22 August 2002 (22.08.02)
application no.	10/426,712	filed on	30 April 2003 (30.04.03)

D. ☐ The present international application contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C. above. The additional subject matter is found on pages ____

and ☐ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

III. ☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is (are) enclosed:

A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response

B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)

C. ☐ Replacement pages:

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

D. ☐ Submission of Priority Documents

Priority document		Priority document	

E. ☐ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

V. ☐ Other (please specify):

The person signing this form is the:	☐	Applicant	Richard S. Wesorick Typed name of signer
	☒	Attorney/Agent (Reg. No.) 40,871	
	☐	Common Representative	Signature

285 100

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

.ving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* CCF-6288PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION

STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 MEDIATES STEM CELL HOMING AND TISSUE REGENERATION IN ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION
9500 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44195
United States of America

Telephone No.: 216-621-2234
Facsimile No.: 216-621-4072
Teleprinter No.:
Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☒ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

PENN, Marc S.
26091 Shaker Boulevard
Shaker Heights, Ohio 44122
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☒ inventor only (If *this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

WESORICK, Richard S.
Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino L.L.P.
526 Superior Avenue, Suite 1111
Cleveland, Ohio 44114
United States of America

Telephone No.: 216-621-2234
Facsimile No.: 216-621-4072
Teleprinter No.:
Agent's registration No. with the Office: 40,871

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)
ASKARI, Arman T.
2421 Traymore Road
University Heights, Ohio 44118
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [X] inventor only (*If this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office

State (*that is, country*) of nationality:

State (*that is, country*) of residence:

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [ ] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)
KIEDROWSKI, Matthew
5924 N. Mayflower Drive
Lorain, Ohio 44053
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [X] inventor only (*If this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office

State (*that is, country*) of nationality:

State (*that is, country*) of residence:

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [ ] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only (*If this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office

State (*that is, country*) of nationality:

State (*that is, country*) of residence:

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [ ] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only (If *this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office

State (*that is, country*) of nationality:

State (*that is, country*) of residence:

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [ ] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

[ ] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES *Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.*

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

☒ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

☒ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, HU Hungary, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, RO Romania, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☒ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*:

☒ AE United Arab Emirates	☒ HR Croatia	☒ OM Oman
☒ AG Antigua and Barbuda	☒ HU Hungary	☒ PG Papua New Guinea
☒ AL Albania	☒ ID Indonesia	☒ PH Philippines
☒ AM Armenia	☒ IL Israel	☒ PL Poland
☒ AT Austria	☒ IN India	☒ PT Portugal
☒ AU Australia	☒ IS Iceland	☒ RO Romania
☒ AZ Azerbaijan	☒ JP Japan	☒ RU Russian Federation
☒ BA Bosnia and Herzegovina	☒ KE Kenya	
☒ BB Barbados	☒ KG Kyrgyzstan	☒ SC Seychelles
☒ BG Bulgaria	☒ KP Democratic People's Republic of Korea	☒ SD Sudan
☒ BR Brazil		☒ SE Sweden
☒ BY Belarus	☒ KR Republic of Korea	☒ SG Singapore
☒ BZ Belize	☒ KZ Kazakhstan	☒ SK Slovakia
☒ CA Canada	☒ LC Saint Lucia	☒ SL Sierra Leone
☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein	☒ LK Sri Lanka	☒ SY Syrian Arab Republic
☒ CN China	☒ LR Liberia	☒ TJ Tajikistan
☒ CO Colombia	☒ LS Lesotho	☒ TM Turkmenistan
☒ CR Costa Rica	☒ LT Lithuania	☒ TN Tunisia
☒ CU Cuba	☒ LU Luxembourg	☒ TR Turkey
☒ CZ Czech Republic	☒ LV Latvia	☒ TT Trinidad and Tobago
☒ DE Germany	☒ MA Morocco	
☒ DK Denmark	☒ MD Republic of Moldova	☒ TZ United Republic of Tanzania
☒ DM Dominica		☒ UA Ukraine
☒ DZ Algeria	☒ MG Madagascar	☒ UG Uganda
☒ EC Ecuador	☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	☐ US United States of America
☒ EE Estonia		
☒ ES Spain	☒ MN Mongolia	☒ UZ Uzbekistan
☒ FI Finland	☒ MW Malawi	☒ VC Saint Vincent and the Grenadines
☒ GB United Kingdom	☒ MX Mexico	☒ VN Viet Nam
☒ GD Grenada	☒ MZ Mozambique	☒ YU Serbia and Montenegro
☒ GE Georgia	☒ NI Nicaragua	☒ ZA South Africa
☒ GH Ghana	☒ NO Norway	☒ ZM Zambia
☒ GM Gambia	☒ NZ New Zealand	☒ ZW Zimbabwe

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒ EG Egypt ☐ ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 22 August 2002 (22.08.02)	60/405,274	US		
item (2) 30 April 2003 (30.04.03)	10/426,712	US		
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

* *Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* ....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / US

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)*	Number	Country *(or regional Office)*
30 April 2003 (30.04.03)	10/426,712	US

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:

		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) **In paper form, the following number of sheets :**

request (including declaration sheets)	:	5 sheets
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	:	78 sheets
claims	:	7 sheets
abstract	:	1 sheets
drawings	:	6 sheets
Sub-total number of sheets	:	97
sequence listings	:	
tables related thereto	:	
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	97

(b) ☐ **only in computer readable form (Section 801(a)(i))**
- (i) ☐ sequence listings
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ **also in computer readable form (Section 801(a)(ii))**
- (i) ☐ sequence listings
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listings: . . . . . .
- ☐ tables related thereto: . . . . . .

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — **Number of items**

1. ☒ fee calculation sheet : 1
2. ☒ original separate power of attorney : 1
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: . . . . . :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): . . . . . :
7. ☐ translation of international application into *(language)*: . . . . . :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☐ sequence listings in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application) :
   - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter* :
   - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column :
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☐ other *(specify)*: . . . . . :

Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the document).

Richard S. Wes rick, Agent
Reg. No. 40,871

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

This sheet i... ...rt of and does not count as a sheet of the i... ...tional application. 290 105

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

For receiving Office use only

International Application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's file reference: CCF-6288PCT

Applicant: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE . . . . . 240.00 T

2. SEARCH FEE . . . . . 450.00 S

International search to be carried out by US

(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

Where item (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets
Where item (b) and (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets } 97

b1 first 30 sheets 476.00 b1

b2 67 (number of sheets in excess of 30) x 12.00 (fee per sheet) = 804.00 b2

b3 additional component (only if sequence listings and/or tables related thereto are filed in computer readable form under Section 801 (a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii)):

400 x _____ (fee per sheet) = _____ b3

Add amounts entered at b1, b2 and b3 and enter total at B . . . . 1,280.00 B

Designation Fees

The international application contains 97 designations.

5 (number of designation fees payable *(maximum 5)*) x 104.00 (amount of designation fee) = 520.00 D

Add amounts entered at B and D and enter total at I . . . . . 1,800.00 I

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the sum of the amounts entered at B and D.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT *(if applicable)* . . . . . 40.00 P

5. TOTAL FEES PAYABLE . . . . . USD 2,530.00 TOTAL

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

☐ The designation fees are not paid at this time.

MODE OF PAYMENT

☐ authorization to charge deposit account (see below) ☐ postal money order ☐ cash ☐ coupons

☒ cheque ☐ bank draft ☐ revenue stamps ☐ other *(specify):*

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT

(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

Receiving Office: RO/ US

Deposit Account No.: 20-0090

Date: 21 August 2003

Name: Richard S. Wesorick

Signature:

☐ Authorization to charge the total fees indicated above.

☒ *(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit)* Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.

☐ Authorization to charge the fee for priority document.

CARTA DE REMISIÓN A LA OFICINA RECEPTORA DE ESTADOS UNIDOS

Fecha: 21 de agosto de 2003

Solicitud Internacional N°:

Número de Archivo de Apoderado: CCF-6288PCT

I. Certificación conforme al Título 37, artículo 1.10 del Código de Normas Federales (si fuera aplicable)

Etiqueta de remisión por "Correo Expreso" No. EU-712716551US

Fecha del depósito: 21 de agosto de 2003

Por la presente certifico que la solicitud/correspondencia adjunta a la presente se deposita en el servicio de "Correo Expreso al Destinatario" del Servicio Postal de Estados Unidos conforme al Título 37, artículo 1.10 del Código de Normas Federales en la fecha indicada más arriba y que está destinado a: Casillero de PCT, Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450..

[En blanco] (Firma del remitente de la correspondencia)

Anita J. Gallo (Aclaración de Firma del remitente de la correspondencia)

II. [x] Nueva Solicitud Internacional

TÍTULO: FACTOR DERIVADO DE LA CÉLULA ESTROMAL QUE MEDIA LA ALBERGA LA CÉLULA MADRE Y LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS EN LA CARDIOMIOPATÍA ISQUÉMICA

Fecha de la prioridad más antigua (día/mes/año): 22 de agosto de 2002 (22-08-02)

EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN DE LA INVENCIÓN: Para colaborar con la evaluación de la solicitud internacional que se adjunta con el propósito de determinar si se debe y puede otorgar una licencia para la remisión al extranjero y con otros propósitos, se proporciona la siguiente información. (Nota: marque todos los casilleros que correspondan):

A. [ ] La invención revelada no se hizo en Estados Unidos

B. [ ] No hay ninguna solicitud estadounidense anterior relacionada con esta invención.

C. [x] La siguiente solicitud(es) anteriores de Estados Unidos contienen un objeto que está relacionado con la invención revelada en la solicitud internacional que se adjunta. (NOTA: la prioridad de estas solicitudes puede o no ser reivindicada en el formulario PCT/RO/101 (Pedido) y este listado no constituye reivindicación de prioridad).

Solicitud: 60/405.274 presentada el 22 de agosto de 2002 (22-08-02)

Solicitud: 10/426.712 presentada el 30 de abril de 2003 (30-04-03)

D. [] La presente solicitud internacional [ ] contiene una materia adicional que no se halla en la solicitud(es) de Estados Unidos anterior identificada en el párrafo C precedente. La materia adicional se halla en las páginas ----

y [] NO ALTERA [ ] PODRÍA CONSIDERARSE QUE ALTERA la naturaleza general de la invención en una forma que exigiría que la solicitud de Estados Unidos ha estado disponible para su revisión por las agencias de defensa apropiadas conforme al Título 35, artículo 181 del Código de Estados Unidos y al Título 37, artículo 5.1 del Código de Normas Federales y al Título 37, artículo 5.15 del Código de Normas Federales.

III. [ ] Respuesta a la Invitación de la RO/US. Se adjunta(n) el/los siguiente(s) documento(s):

A. [ ] Pedido de Prórroga del Plazo para Presentar una Respuesta

B. [ ] Poder (General)

C. [ ] Páginas de Reemplazo:

páginas -- del pedido (PCT/RO/101)

páginas -- de la memoria descriptiva

páginas -- de las reivindicaciones

páginas -- de las figuras

páginas -- del resumen

294

D. [ ] Presentación de Documentos de Prioridad

Documento de Prioridad: -- Documento de Prioridad: --

E. [] Aranceles establecidos en la Planilla de Cálculos adjunta, formulario PCT/RO/101, anexo

IV. [ ] Pedido de Rectificación conforme a PCT 91

[ ] Pedido [ ] Diskette de Listados de Secuencias

V. [ ] Otros (especifique):

La persona firmante de este formulario es:

[ ] Solicitante

[x] Apoderado/Agente (Mat. N°) 40.871

[ ] Representante

Richard S. Woserick

Aclaración de firma

[firma ilegible]

Firma

PTO-1382

Departamento de Comercio de Estados Unidos; Oficina de Patentes y Marcas

PCT. PEDIDO

El que suscribe solicita que esta solicitud internacional siga el proceso de acuerdo con el Tratado de Cooperación sobre Patentes.

Para uso exclusivo de la Oficina receptora

Solicitud Internacional N°

Fecha de Presentación Internacional

Nombre de la Oficina Receptora y "Solicitud Internacional PCT"

Referencia de Archivo del Solicitante o Agente: CCF-6288PCT

(Si se desea) (máximo: 12 caracteres)

Casillero N°I: TITULO DE LA INVENCIÓN

FACTOR DERIVADO DE LA CÉLULA ESTROMAL QUE MEDIA LA ALBERGA LA CÉLULA MADRE Y LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS EN LA CARDIOMIOPATÍA ISQUÉMICA

Casillero N°II: SOLICITANTE

[] Esta persona es también inventor

Nombre y domicilio: (*Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)*

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

9500 Euclid Avenue

Cleveland, Ohio 44114

Estados Unidos de América

N° telefónico: 216-621-2234

N° de fax: 216-621-4072

N° de télex: --

Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:

Estado (*es decir, país)* de nacionalidad: ESTADOS UNIDOS

Estado (*es decir, país*) de domicilio: ESTADOS UNIDOS

Esta persona es solicitante para los propósitos de:

[] todos los Estados designados [X] todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América [ ] sólo Estados Unidos de América

[] los Estados indicados en el casillero complementario

Casillero N°III: OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES):

Nombre y domicilio: (***Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)***

PENN, Marc S.

26091 Shaker Boulevard

Shaker Heights, Ohio 44122

Estados Unidos

Esta persona: [] sólo solicitante [] solicitante e inventor

[x] sólo inventor. (*Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)*

Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:--

Estado (*es decir, país*) de nacionalidad: --

Estado (*es decir, país*) de residencia: --

Esta persona es solicitante para los propósitos de:

[ ] todos los Estados designados [] todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América [x] sólo Estados Unidos de América

[] los Estados indicados en el casillero complementario

[x] Se indican otros solicitantes y/o (otros) inventores en una página continuación

Casillero N°IV: AGENTE O REPRESENTANTE; O DOMICILIO PARA CORRESPONDENCIA

La persona identificada a continuación ha sido designada/es designada por la presente para que actúe en nombre del(os) solicitante(s) ante las Autoridades Internacionales competentes, como: [x] agente [] representante

Nombre y domicilio: *(Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y nombre del país)*

WESORICK, Richard S.

Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP

526 Superior Avenue, Oficina 1111

Cleveland, Ohio 44114

Estados Unidos

N° telefónico: 216-621-2234

N° de fax: 216-621-472

N° de télex: -----

Número de Inscripción del Agente ante la Oficina: 40.871

[] Domicilio para Correspondencia: Marque este casillero si no se ha designado ningún agente o representante y si el espacio de precedente ha sido usado en cambio para indicar un domicilio especial al cual ha de enviarse correspondencia.

Formulario PCT/RO/101 (página uno) (marzo de 2001; reimpreso en enero de 2003)

Ver *Notas al formulario de pedido*

Página N° 2

Continuación del Casillero N° III. OTROS SOLICITANTES Y/O (OTROS) INVENTORES

Si no se usa ninguno de los siguientes subcasilleros, esta página no deberá incluirse en el pedido.

Nombre y domicilio: (*Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)*

ASKARI, Arman T.

2421 Traymore Road

University Heights, Ohio 44118

Estados Unidos

Esta persona: [] sólo solicitante [] solicitante e inventor

[x] sólo inventor. (*Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)*

Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:--

Estado (*es decir, país*) de nacionalidad: --

Estado (*es decir, país*) de residencia: --

Esta persona es solicitante para los propósitos de:

[ ] todos los Estados designados [] todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América [] sólo Estados Unidos de América

[ ] los Estados indicados en el casillero complementario

Nombre y domicilio: (*Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)*

KIEDROWSKI, Matthew

5924 N. Mayflower Drive

Lorain, Ohio 44053

Estados Unidos

Esta persona: [] sólo solicitante [] solicitante e inventor

[x] sólo inventor. (*Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)*

Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:--

Estado (*es decir, país*) de nacionalidad:

Estado (*es decir, país*) de residencia:

Esta persona es solicitante para los propósitos de:

[ ] todos los Estados designados [] todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América [] sólo Estados Unidos de América

[ ] los Estados indicados en el casillero complementario

Nombre y domicilio: (*Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)*

--

Esta persona: [] sólo solicitante [] solicitante e inventor [ ] sólo inventor. (*Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)*

Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:--

Estado (*es decir, país*) de nacionalidad:

Estado (*es decir, país*) de residencia:

Esta persona es solicitante para los propósitos de:

[ ] todos los Estados designados [] todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América [] sólo Estados Unidos de América

[ ] los Estados indicados en el casillero complementario

Nombre y domicilio: (*Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)*

Esta persona: [] sólo solicitante [] solicitante e inventor [ ] sólo inventor. (*Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)*

Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:--

Estado (*es decir, país*) de nacionalidad:

Estado (*es decir, país*) de residencia:

Esta persona es solicitante para los propósitos de:

[ ] todos los Estados designados [] todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América [] sólo Estados Unidos de América

[ ] los Estados indicados en el casillero complementario

[] Se indican otros solicitantes y/o (otros) inventores en una página continuación

Página N° 3

Casillero N°V DESIGNACIÓN DE ESTADOS

Marque los casilleros de verificación que correspondan a continuación; deberá marcar al menos uno.

Las siguientes designaciones se efectúan conforme a la Norma 4.9(a):

Patente Regional

[x] AP Patente ARIPO: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudán, SL Sierra Leona, SZ Suazilandia, TZ República Unida de Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe y cualquier otro Estado Firmante del Protocolo de Harare y del PCT *(si desea otro tipo de protección o tratamiento, especifíquelo en la línea de puntos).....*

[x] EA Patente de Eurasia: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Bielorrusia, KG, Kyrgyzstan, KZ Kazakstan, MD República de Moldavia, RU Federación Rusa, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan y

todo otro Estado Firmante de la Convención de Patentes de Eurasia y del PCT.

[x] EP Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, BG Bulgaria, CH y LI Suiza y Liechtenstein, CY Chipre, CZ República Checa, DE Alemania, DK Dinamarca, EE Estonia, ES España, FI Finlandia, FR Francia, GB Reino Unido, GR Grecia, HU Hungría, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Países Bajos, PT Portugal, RO Rumania, SE Suecia, SI Eslovenia, SK Eslovaquia, TR Turquía y cualquier otro Estado Firmante de la Convención de Patentes Europeas y el PCT.

[x] OA Patente OAPI: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF República Centroafricana, CG Congo, CI Costa de Marfil, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, GQ Guinea Ecuatorial, GW Guinea-Bissau, ML Malí, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo y cualquier otro Estado miembro de la OAPI y Firmante del PCT (*si desea otro tipo de protección o tratamiento, especifíquela en la línea de puntos)*.....

Patente Nacional (*si desea otro tipo de protección o tratamiento, especifíquela en la línea de puntos)*:

[X] AE Emiratos Árabes Unidos

[x] AG Antigua y Barbuda

[x] AL Albania

[x] AM Armenia

[x] AT Austria

[x] AU Australia

[x] LC Santa Lucía

[x] LK Sri Lanka

[x] LR Liberia

[x] LS Lesotho

[x] LT Lituania

[x] LU Luxemburgo

[x] AZ Azerbaijan

[x] BA Bosnia y Herzegovina

[x] BB Barbados

[x] BG Bulgaria

[x] BR Brasil

[x] BY Bielorrusia

[x] BZ Belize

[x] CA Canadá

[x] CH y LI Suiza y Liechtenstein

[x] CN China

[x] CO Colombia

[x] CR Costa Rica

[x] CU Cuba

[x] CZ República Checa

[x] DE Alemania

[x] DK Dinamarca

[x] DM Dominica

[x] DZ Argelia

[x] EC Ecuador

[x] EE Estonia

[x] ES España

[x] FI Finlandia

[x] GB Reino Unido

[x] GD Grenada

[x] LV Letonia

[x] MA Marruecos

[x] MD República de Moldavia

[x] MG Madagascar

[x] MK Ex Rep. Yugoslava de de Macedonia

[x] MN Mongolia

[x] MW Malawi

[x] MX Méjico

[x] MZ Mozambique

[x] NI Nicaragua

[x] NO Noruega

[x] NZ Nueva Zelanda

[x] OM Omán

[x] PG Papúa Nueva Guinea

[x] PH Filipinas

[x] PL Polonia

[x] PT Portugal

[x] RO Rumania

[x] RU Federación Rusa

[x] SC Seychelles

[x] SD Sudán

[x] SE Suecia

[x] SG Singapur

[x] SK Eslovaquia

[x] GE Georgia
[x] GH Ghana
[x] GM Gambia
[x] HR Croacia
[x] HU Hungría
[x] ID Indonesia
[x] IL Israel
[x] IN India
[x] IS Islandia
[x] JP Japón
[x] KE Kenia
[x] KG Kyrgyzstan
[x] KP República Democrática del Pueblo de Corea
[x] KR República de Corea
[x] KZ Kazakhstan
[x] SL Sierra Leona
[x] SY República Árabe Siria
[x] TJ Tajikistan
[x] TM Turkmenistan
[x] TN Túnez
[x] TR Turquía
[x] TT Trinidad y Tobago
[x] TZ Rep.Unida de Tanzania
[x] UA Ucrania
[x] UG Uganda
[x] US Estados Unidos
[x] UZ Uzbekistan
[x] VC San Vicente y los Grenadinos
[x] VN Vietnam
[x] YU Serbia y Montenegro
[x] ZA Sudáfrica
[x] ZM Zambia
[x] ZW Zimbabwe

Los casilleros de verificación siguientes e stán reservados para designar Estados que han firmado el PCT con posterioridad a la emisión de esta página:

[x] EG Egipto [] ------- [] ------

Declaración Precautoria sobre Designaciones: Además de las designaciones efectuadas anteriormente, el solicitante también efectúa conforme a la Norma 4.9(b) todas las demás designaciones que están permitidas conforme al PCT salvo cualquier designación indicada en el Casillero Suplementario como excluida del alcance de esta declaración. El solicitante declara que aquellas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación que no se confirme con anterioridad al vencimiento de los 15 meses desde la fecha de prioridad se considerará retirada por el solicitante al vencimiento de ese plazo. (*La confirmación (incluyendo los aranceles) deberá llegar a la Oficina receptora dentro del plazo de 15 meses.*)

Página N° 4

Casillero N°VI REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Por la presente se reivindica prioridad de la siguiente solicitud(es) anterior:

Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año)	Número de la solicitud anterior	Cuando la solicitud anterior es:		
		solicitud nacional: país o Miembro de WTO	solicitud regional:* Oficina regional	solicitud internacional: Oficina receptora
ítem (1) 22 de agosto de 2002 (22-08-2002)	60/405.274	Estados Unidos		
ítem (2) 30 de abril de 2003 (30-04-03)	10/426.712	Estados Unidos		
ítem (3)				
ítem (4)				
ítem (5)				

[ ] Se indican otras reivindicaciones de prioridad en el Casillero Complementario

Se solicita a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia autenticada de la solicitud(es) anterior (*solamente si la solicitud anterior se presentó ante la Oficina que para los propósitos de la presente solicitud internacional es la Oficina receptora*) identificada anteriormente como:

[x] todos los items [] item (1) [] item (2) [] item (3)

[] item (4) [] item (5) [] otro, ver Casillero Suplementario

* *Cuando la solicitud anterior sea una solicitud ARIPO, es obligatorio indicar en el Casillero Suplementario al menos un país miembro de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial para el cual se presentó la solicitud anterior (Norma 4.10(b)(ii))*.

Casillero N°VII AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Autoridad de Búsqueda Internacional (ISA) (*si dos o más Autoridades de Búsqueda Internacional son competentes para realizar la búsqueda internacional, indique la Autoridad elegida; puede usarse un código de dos letras*): ISA/US

Pedido de uso de los resultados de una búsqueda anterior; referencia a esa búsqueda (si se ha realizado una búsqueda anterior o si ésta ha sido solicitada a la Autoridad de Búsqueda Internacional):

Fecha (día/mes/año)	Número	País (u Oficina regional):
30 de abril de 2003 (30/04/03)	10/426.712	Estados Unidos

Casillero N°VIII DECLARACIONES JURADAS

Las siguientes declaraciones juradas están contenidas en los Casilleros VIII(i) a (v) (*marcar los casilleros de verificación aplicables siguientes e indicar en la columna de la derecha el número de cada tipo de declaración*):		Número de declaraciones
[]Casillero N°VIII(i)	Declaración sobre la identidad del inventor	
[]Casillero N°VIII(ii)	Declaraciones sobre derecho del solicitante, a la fecha de presentación internacional, de presentar solicitudes y que se le conceda una patente	
[]Casillero N°VIII(iii)	Declaración sobre el derecho del	

310

125

	Solicitante, a la fecha de presentación internacional, de reivindicar prioridad de la solicitud anterior
[] Caillero N°VIII (iv)	Declaración de carácter de inventor (solamente para los propósitos de la designación de Estados Unidos)
[] Casillero N°VIII (v)	Declaración sobre revelaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad

Casillero IX. LISTA DE VERIFICACIÓN: IDIOMA DE LA PRESENTACIÓN

Esta solicitud internacional contiene:

(a) el siguiente número de páginas en la forma de papel:

pedido (incluyendo páginas de declaración)	5 páginas
memoria descriptiva (excluyendo la parte	

del listado de secuencias): 78 páginas

reivindicaciones 7 páginas

resumen 1 página

dibujos 6 páginas

Subtotal de número de páginas 97

Listado de secuencias

Tablas relacionadas con él

(para ambos, número real de

páginas si se presentan en

forma de papel, sean o no

presentadas también en

forma legible por

computadora; ver (b) abajo) _____

Número total de páginas 97

(b) solamente en forma legible por computadora

(Artículo 801(a)(i))

(i) [] listado de secuencias

(ii) [] tablas relacionadas con él

Escribir y numerar los portadores (diskette, CD-ROM, CD-R u otro) en los cuales están contenidos

[ ] listado de secuencias

[] tablas relacionadas con él

(las copias adicionales deben indicarse en los items 9(ii) y/o 10(ii), en la columna de la derecha)

Esta solicitud internacional está acompañada por el siguiente item(s) (marcar los casilleros de verificación e indicar en la columna de la derecha el número de cada item):

Número de Items

1. [x] planilla de cálculo de aranceles 1
2. [x] poder original por separado
3. [] poder general original
4. [] copia del poder general;

número de referencia, si hubiera:

5. [ ] declaración de explicación de falta de firma
6. [ ] documento(s) de prioridad identificado(s) en el Casillero N°VI como item(s): --
7. [ ] traducción de la solicitud internacional al (idioma):
8. [] indicaciones por separado concernientes a microorganismos u otro material biológico depositado
9. [] listado de secuencias de nuleótidos y/o aminoácidos en forma legible por computadora (indicar también el tipo y número de portadores (diskette, CD-ROM, CD-R u otro))

(i) [ ] copia presentada para los propósitos de la búsqueda internacional conforme a la Norma 13ter solamente (y no como parte de la solicitud internacional)

(ii) [] (solamente cuando ser marcó el casillero (b)(i) o (b)(ii) en la columna de la izquierda) copias adicionales que

incluyen, cuando corresponde, la copia para los propósitos de la búsqueda internacional conforme a la Norma 13ter.

(iii) [] junto con la declaración relevante en cuanto a la identidad de la copia o copias con la parte de listado de secuencias mencionada en la columna de la izquierda

10. [] tablas en forma legible por computadora relacionadas con los listados de secuencias (indicar tipo y número de portaedores)

(i) [] copia presentada con los propósitos de la búsqueda internacional conforme al Artículo 802(b-cuater) solamente (y no como parte de la solicitud internacional)

(ii) [] (solamente cuando se marca el casillero de verificación (b)(ii) o (c)(ii) en la columna de la izquierda) copias adicionales que incluyen, cuando corresponde, la copia para los propósitos de la búsqueda internacional conforme al Artículo 802(b-cuater)

(iii) [] junto con la declaración relevante en cuanto la identidad de la copia o copias con las tablas mencionadas en la columna de la izquierda

11. [ ] otros (*especifique*):

Figura de los dibujos que deberá acompañar al resumen: 1

Idioma de presentación de la solicitud internacional: INGLÉS

Casillero N°X FIRMA DEL SOLICITANTE, AGENTE O REPRESENTANTE

Junto a la firma, indique el nombre del firmante y el carácter con el que firma (*si el mismo no se deduce de la lectura de la solicitud*): [firma ilegible] Richard S. Wesorick. Agente. Mat. N° 40.871

---------Para uso exclusivo de la Oficina Receptora--------

1. Fecha de recepción real de solicitud internacional:___

2. Dibujos: [] recibidos [] no recibidos

3. Corrección de fecha de recepción real debido a la recepción posterior pero en plazo de documentos o dibujos que completan la solicitud internacional: ----

4. Fecha de recepción en plazo de las correcciones solicitadas conforme a la Cláusula II(2) del PCT: ---

5. Autoridad de Búsqueda Internacional (si dos o más son competentes): ISA/--

6. [] Remisión de copia de búsqueda demorada hasta que se efectúe el pago del arancel de búsqueda

----------Para uso exclusivo de la Oficina Internacional---

Fecha de recepción de la copia del registro por la Oficina Internacional:---

---

Formulario PCT/RO/101 (última página) (enero de 2003; reimpreso en julio de 2003).

Ver notas al formulario de Pedido

Esta página no forma parte ni se cuenta como una página de la solicitud internacional

PCT. PLANILLA DE CALCULO DE ARANCELES

Anexo al Pedido

Para uso exclusivo de la Oficina Receptora

Solicitud Internacional N°

Timbre Fechador de la Oficina receptora

Referencia de Archivo del Solicitante o agente: CCF-6288PCT

Solicitante: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

CALCULO DE ARANCELES ESTABLECIDOS

1. Arancel de Remisión---------- 240 [T]

2. Arancel de Búsqueda---------- 450 [S]

Búsqueda internacional para ser realizada por EE.UU

(Si dos o más Autoridades de Búsqueda Internacional son competentes con respecto a la solicitud internacional, indique el nombre de la Autoridad elegida para realizar la búsqueda internacional)

3. Arancel Internacional

Arancel Básico

Cuando el punto (b) del Casillero N°IX es aplicable, ingresar el Subtotal del número de páginas

Cuando el punto (b) del Casillero N°IX es aplicable, ingresar el Total del número de páginas: 97

[b1] primeras 30 páginas----------476 [b_1]

[b2] 67 x 12,00 = 804 [b_2]

Número de páginas que exceden 30 — arancel por página

[b3] componente adicional (solamente si se presenta una parte de listado de secuencias de la memoria descriptiva en forma legible por computadora conforme al Artículo 801(a)(i), o tanto en esa forma como en papel, conforme al Artículo 801(a)(ii)):

400 x _____ = [b3]

Sume los importes ingresados en b_1, b_2 y b_3

e ingrese el importe en B---------- 1280 [B]

Arancel de Designaciones

La solicitud internacional contiene 97 designaciones

5 x 104,00 = 520 [D]

número de aranceles de designaciones a pagar (máximo: 6) — importe del arancel designaciones

Sume los importes de B y D

e ingrese el total en I---------- 1.800 [I]

(Los solicitantes de ciertos Estados gozan de un descuento del 75% del arancel internacional. Cuando a los solicitantes (o a todos los solicitantes) les corresponda este descuento, el total que debe ingresarse en I es el 25% de la suma de las cantidades ingresadas en B y D.)

4. Arancel por Documento de Prioridad---------- 40 [P]

(si corresponde)

5. TOTAL DE ARANCELES A PAGAR

Sume los importes de T,S,I y P

e ingrese el total en el casillero TOTAL---- 2.530

[TOTAL]

[] El arancel de designación no se paga en este momento.

FORMA DE PAGO

[] autorización para debitar de cuenta de depósito

(véase abajo)

[ ] orden de pago postal [] efectivo [] cupones

[x] cheque [] giro bancario [] estampillas de ganancias

[] otros (especifique): --

AUTORIZACIÓN PARA CUENTAS DE DEPOSITO *(esta forma de pago puede no estar disponible en la Oficina Receptora)*

[] Autorización para debitar los aranceles totales indicados anteriormente.

[x] (Este *casillero se puede marcar solamente si las condiciones para las cuentas de depósito de la Oficina receptora así lo permiten*) Autorización para debitar el importe faltante o acreditar el pago sobrante en los aranceles totales indicados anteriormente.

[ ] Autorización para debitar el arancel del documento de prioridad

Oficina Receptora RO/US

Cuenta de Depósito N°: 20-0090

Fecha: 21 de agosto de 2003

Nombre: Richard S. Wesorick

Firma: [firma ilegible]

Formulario PCT/RO/101 (Anexo) (enero de 2002; reimpreso en enero de 2003)

Ver Notas a la planilla de cálculo de aranceles

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 March 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/017978 A1

(51) International Patent Classification[7]: A61K 31/70, 48/00, 45/00, A01N 63/00, C12N 15/63, 5/00, 5/08

(21) International Application Number: PCT/US2003/026013

(22) International Filing Date: 21 August 2003 (21.08.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/405,274 22 August 2002 (22.08.2002) US
10/426,712 30 April 2003 (30.04.2003) US

(71) Applicant: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION [US/US]; 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195 (US).

(72) Inventors: PENN, Marc, S.; 26091 Shaker Boulevard, Shaker Heights, OH 44122 (US). ASKARI, Arman, T.; 2421 Traymore Road, University Heights, OH 44118 (US). KIEDROWSKI, Matthew; 5924 N. Mayflower Drive, Lorain, OH 44053 (US).

(74) Agent: WEBORICK, Richard, S.; Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino L.L.P., Suite 1111, 526 Superior Avenue, Cleveland, OH 44114 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Continued on next page]

(54) Title: STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 MEDIATES STEM CELL HOMING AND TISSUE REGENERATION IN ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY



(57) Abstract: method of treating infarcted myocardial tissue includes, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue. The concentration of stem cells in the peripheral blood of the infarcted tissue is also increased. The number of stem cells in the peripheral blood is increased while the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue is increased.

WO 2004/017978 A1

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— *with international search report*

STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 MEDIATES STEM CELL HOMING AND TISSUE REGENERATION IN ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY

Field of the Invention

The present invention relates to a method of tissue regeneration in ischemic cardiomyopathy and particularly relates to a method of treating ischemic cardiomyopathy at a time remote (i.e., weeks) from myocardial infarction.

Background of the Invention

Acute myocardial infarction (MI) remains the leading cause of morbidity and mortality in western society. Despite recent therapeutic advances predominantly targeted at restoring antegrade perfusion in the infarct-related artery, a "ceiling" of benefit appears to exist. Topol, E.J. *Lancet* 357, 1905-1914 (2001). A substantial proportion of patients who

experience an acute myocardial infarction (MI) ultimately develop congestive heart failure (CHF) largely as a result of left ventricular (LV) remodeling, a process involving myocardial thinning, dilation, decreased function, ultimately leading to death. Robbins, M.A. & O'Connell, J.B., pp. 3-13 (Lippincott-Raven, Philadelphia,1998). Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J. & Braunwald, E. *Am. J. Physiol* 260, H1406-H1414 (1991). Pfeffer, M.A. & Braunwald, E. *Circulation* 81, 1161-1172 (1990).

One method to treat this process following myocardial infarction involves cell therapy. Penn, M.S. *et al. Prog. Cardiovasc. Dis.* 45, 21-32 (2002). Transplantation has focused on using a variety of cell types including differentiated cells, such as skeletal myoblasts, cardiac myocytes, smooth muscle cells, and fibroblasts, or bone marrow derived cells. Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H. & Field, L.J. *J. Clin. Invest* 92, 1548-1554 (1993). Taylor, D.A. *et al. Nat. Med.* 4, 929-933 (1998). Jain, M. *et al. Circulation* 103, 1920-1927 (2001). Li, R.K. *et al. Ann. Thorac. Surg.* 62, 654-660 (1996). Etzion, S. *et al. J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1321-1330 (2001). Li, R.K., Jia, Z.Q., Weisel, R.D., Merante, F. &

Mickle, D.A. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 513-522 (1999). Yoo, K.J. *et al. Yonsei Med. J.* 43, 296-303 (2002). Sakai, T. *et al. Ann. Thorac. Surg.* 68, 2074-2080 (1999). Sakai, T. *et al. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118, 715-724 (1999). Orlic, D. *et al. Nature* 410, 701-705 (2001). Tomita, S. *et al. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 123, 1132-1140 (2002).

A growing body of literature suggests that stem cell mobilization to the heart and differentiation into cardiac myocytes is a naturally occurring process. Jackson, K.A. *et al. J. Clin. Invest* 107, 1395-1402 (2001). Quaini, F. *et al. N. Engl. J. Med.* 346, 5-15 (2002). This process occurs at a rate insufficient to result in meaningful recovery of left ventricular function following myocardial infarction. *Id.* Recently, studies have demonstrated the possibility of regenerating damaged myocardium either through the direct injection of stem cells into the blood stream, or via chemical mobilization of stem cells from the bone marrow prior to the myocardial infarction. These studies have demonstrated the ability of stem cells to home to the infarct zone in the peri-infarct period, as well as for these cells to then differentiate into cardiac myocytes. Kocher, A.A. *et al. Nat. Med.* 7,

430-436 (2001). Orlic, D. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10344-10349 (2001). Peled, A. *et al. Blood* 95, 3289-3296 (2000). Yong, K. *et al. Br. J. Haematol.* 107, 441-449 (1999). To date, all the studies have focused on the ability of stem cells to regenerate myocardium within 48 hours after myocardial infarction.

Summary of the Invention

One aspect of the present invention relates to a method of treating infarcted myocardial tissue. The infarcted tissue includes a first concentration of SDF-1 protein. Peripheral blood of the infarcted tissue includes a first concentration of stem cells. In the method, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue can be increased from the first concentration to a second concentration. The concentration of stem cells in the peripheral blood of the infarcted tissue can be increased from the first concentration to a second concentration. The concentration of stem cells in the peripheral blood can be increased while the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue is increased.

In accordance with another aspect of the present invention, the number of stem cells can be increased by

either administering an agent that causes stem cells to mobilize from bone marrow to the peripheral blood or injecting stem cells into the peripheral blood. In a preferred aspect of the present invention, the agent that causes the stem cells to mobilize from the bone marrow to the peripheral blood can be selected from the group consisting of cytokines, chemokines, and chematherapeutic agents. In a more preferred aspect of the present invention, the agent comprises granulocyte colony stimulating factor (G-CSF).

In accordance with another aspect of present invention, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue can be increased by introducing an expression vector into the infarcted tissue. The expression vector includes a nucleic acid encoding for SDF-1 protein. Optionally, the expression vector can include a tissue specific promoter directed to myocardial tissue and, preferably, cardiomyocytes.

In accordance with yet another aspect of the present invention, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue can be increased by introducing cells into the infracted tissue that have been cultured ex vivo. The cells that have been cultured ex vivo can

comprise autologous cells that have been harvested from the subject to be treated.

In another aspect of the present invention, the cells that are introduced into the infarcted tissue can be transfected with an expression vector prior to being introduced into the infarcted tissue. The expression vector can include a nucleic acid encoding for SDF-1 protein.

In yet another aspect of the present invention, the infarcted tissue has a first concentration of VEGF. The concentration of VEGF in the infarcted tissue can be increased from the first concentration to a second concentration. The concentration of VEGF in the infarcted tissue can be increased while the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue is increased.

In one aspect, the concentration of VEGF in the infarcted tissue can be increased by introducing into the infracted tissue an expression vector, which encodes for VEGF. Optionally, the expression vector can include a tissue specific promoter directed to myocardial tissue and, preferably, cardiomyocytes.

In another aspect, the concentration of VEGF in the infarcted tissue can be increased by introducing

into the infracted tissue cells that are transfected with an expression vector. The expression vector can include a nucleic acid encoding for VEGF. The cells transfected with an expression vector including a nucleic acid encoding for VEGF can be the same cells introduced into the infarcted tissue to increase the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue.

Another aspect of the present invention relates to a method of treating infarcted myocardial tissue at a time remote from the myocardial infarction. The infarcted tissue can include a first concentration of SDF-1 protein and a first concentration of VEGF. In the method, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue can be increased from the first concentration to a second concentration substantially greater than the first concentration. The concentration of VEGF in the infarcted tissue can be increased from the first concentration to a second concentration substantially greater than the first concentration. An agent can be administered that mobilizes stem cells from bone marrow to peripheral blood of the infarcted tissue. The stem cells can be mobilized from the bone marrow to the peripheral blood while the concentrations

of SDF-1 and VEGF in the infarcted tissue are increased.

In one aspect, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue can be increased by introducing into the infarcted tissue cells that have been cultured ex vivo. The cells introduced into the infarcted tissue can be transfected with an expression vector prior to being introduced into the infarcted tissue. The expression vector includes a nucleic acid encoding for SDF-1 protein.

In another aspect, the concentration of VEGF in the infarcted tissue can be increased by introducing cells into the infarcted tissue. The cells can be transfected with an expression vector prior to being introduced into the infarcted tissue. The expression vector can include a nucleic acid encoding for VEGF. The cells transfected with an expression vector encoding for VEGF can be the same cells introduced into the infarcted tissue to increase the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue.

Brief Description of the Drawings

Further features of the present invention will become apparent to those skilled in the art to which the present invention relates from reading the

following description of the invention with reference to the accompanying drawings in which:

Figs. 1(a and b) are graphs showing, respectively, the number BrdU-positive cells within infarct zone (a) and shortening fraction (b) 4 weeks following administration of saline or G-CSF (12 weeks following LAD ligation).

Figs. 2(a and b) are graphs showing the effect of skeletal myoblast (SKMB) transplantation on BrdU+ cell counts within the infarct zone 4 weeks following cell transplantation (12 weeks following LAD ligation).

Figs. 3(a and b) are photographs showing (a) bone marrow stained for BrdU and (b) untreated myocardium after 5 days of BrdU administration.

Fig. 3c is a graph showing the increased BrdU+ cells within the infarct zone assessed with the therapy in accordance with the present invention.

Fig. 4 is a photograph showing RT-PCR revealing stromal derived factor-1 (SDF-1) expression as a function of time following myocardial infarction.

Figs. 5(a and b) are graphs showing the number of (a) BrdU+ cells and (b) CD117+ cells within the infarct zone 4 weeks following transplantation of cardiac fibroblasts stably transfected with or without

SDF-1 expression vector with or without G-CSF administration for 5 days following cardiac fibroblast transplantation.

Fig. 5c is a photograph from a SDF-1/G-CSF treated animal stained CD117+.

Figs. 6(a and b) are photographs showing the immunohistochemistry of the infarct zone revealing both BrdU+ cells and cardiac myosin-expressing cells 12 weeks following LAD ligation with cell transplantation of (a) SKMB or (b) VEGF-expressing SKMB followed by stem cell mobilization using G-CSF.

Fig. 6c is a graph showing improvement in left ventricle function relative to cell therapy without VEGF over-expression.

Description of the Embodiments

Unless otherwise defined, all technical terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Commonly understood definitions of molecular biology terms can be found in, for example, Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.

Methods involving conventional molecular biology techniques are described herein. Such techniques are generally known in the art and are described in detail in methodology treatises, such as Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; and Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (with periodic updates). Methods for chemical synthesis of nucleic acids are discussed, for example, in Beaucage and Carruthers, Tetra. Letts. 22:1859-1862, 1981, and Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981. Chemical synthesis of nucleic acids can be performed, for example, on commercial automated oligonucleotide synthesizers. Immunological methods (e.g., preparation of antigen-specific antibodies, immunoprecipitation, and immunoblotting) are described, e.g., in Current Protocols in Immunology, ed. Coligan et al., John Wiley & Sons, New York, 1991; and Methods of Immunological Analysis, ed. Masseyeff et al., John Wiley & Sons, New York, 1992. Conventional methods of gene transfer and gene therapy can also be adapted for use in the present invention. See, e.g., Gene Therapy:

Principles and Applications, ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), ed. P. D. Robbins, Humana Press, 1997; and Retro-vectors for Human Gene Therapy, ed. C. P. Hodgson, Springer Verlag, 1996.

The present invention relates to a method of myocardium regeneration in ischemic regions of the heart (or skeletal muscle in the case of peripheral vascular tissue). The method of the present invention can be used to treat ischemic cardiomyopathy at a time remote (i.e., weeks) from myocardial infarction.

The method includes mobilizing and directing migration of pluripotent stem cells to infarcted myocardium within a mammalian subject. Mammalian subjects can include any mammal, such as human beings, rats, mice, cats, dogs, goats, sheep, horses, monkeys, apes, rabbits, cattle, etc. The mammalian subject can be in any stage of development including adults, young animals, and neonates. Mammalian subjects can also include those in a fetal stage of development.

The infarcted myocardium can include the infarcted myocardial tissue, the myocardial tissue about the periphery of the infarcted myocardial tissue, and both

the infarcted myocardial tissue and myocardial tissue about the periphery of the infarcted myocardial tissue.

At a time remote from myocardial infarction, a first number of pluripotent stem cells traffic the infarcted myocardium. This first number of stem cells can be increased so that a greater number of stem cells traffic the infarcted myocardium. By increasing the number of stem cells that traffic the infarcted myocardium, the infarcted myocardial tissue can be regenerated because there will be a greater number of pluripotent stem cells in the infarcted myocardium that can differentiate into cells, which can repopulate (i.e., engraft) and partially or wholly restore the normal function of the infarcted myocardium.

In accordance with one aspect of the present invention, the method includes a step of inducing pluripotent stem cells to home to infarcted myocardium to regenerate infarcted myocardium. Pluripotent stem cells described in the invention are any cells that can be induced to differentiate into another cell type. One example includes hematopoietic stem cells that can differentiate into cardiomyocyte cells.

The pluripotent stem cells can be homed to the infarcted myocardium by increasing the concentration

SDF-1 protein within the infarcted myocardium from a first concentration to a second concentration. The first concentration of SDF-1 protein can be the concentration of SDF-1 protein typically found in an infarcted myocardium at a time remote (i.e., weeks) from the myocardial infarction. The second concentration of SDF-1 protein can be substantially greater than the first concentration of SDF-1 protein. The concentration of SDF-1 protein can be increased in the infarcted myocardium by up-regulating the expression of SDF-1 protein within the infarcted myocardium from the amount of SDF-1 protein typically expressed in the infarcted myocardium at a time remote from the myocardial infarction.

The method of the present invention further includes a step of increasing the concentration (i.e., number) of stems cells in the peripheral blood from a first concentration to a second concentration substantially greater than the first concentration. The first concentration of stem cells can be the concentration of stem cells typically found in the peripheral blood at a time remote from the myocardial infarction. The concentration of stem cells in the peripheral blood can be increased while the

concentration of SDF-1 protein in the infarcted myocardium is increased. The concentration of stem cells in the peripheral blood can be increased either before or after the SDF-1 protein expression is up-regulated in the infarcted myocardium.

The SDF-1 protein expressed by the infarcted myocardium induces the stem cells in the peripheral blood to the infarcted myocardium. The stems cells induced to the infarcted myocardium facilitate myocardial regeneration and provide a substantial increase in left ventricular function.

In accordance with another aspect of the present invention, the method can further include the step of increasing the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the infarcted myocardium of the peripheral blood from a first concentration to a second concentration substantially greater than the first concentration. The first concentration of VEGF in the infarcted myocardium is the concentration of stem cells typically found in the infarcted myocardium at a time remote from the myocardial infarction. The concentration of VEGF can be increased in the infarcted myocardium by up-regulating the expression VEGF protein within the infarcted myocardium from the amount of VEGF

typically expressed in the infarcted myocardium at time remote from the myocardial infarction.

The concentration of VEGF in the infarcted myocardium can be increased while the concentration of SDF-1 protein in infarcted myocardium is increased and the concentration of stem cell in the peripheral blood is increased. Increasing the concentration of vascular endothelial growth factor in the infarcted myocardium in combination with increasing the concentration of SDF-1 protein in the infarcted myocardium and increasing the concentration of stem cell in the peripheral blood increases vascular density within the infarcted myocardium compared to saline controls. Furthermore, this combination led to the repopulating of the infarcted myocardium with cardiac myosin expressing cells as well as an increase in left ventriclular function as measured by shortening fraction.

SDF-1 protein

In accordance with one aspect of the present invention, the SDF-1 protein (or SDF-1 polypeptide) that is expressed in the infarcted myocardium can be an expression product of an SDF-1 gene. The amino acid sequence of a number or different mammalian SDF-1

proteins are known including, human, rat, mouse, and cat. The SDF-1 protein can have an amino acid sequence identical to one of the foregoing native mammalian SDF-1 proteins.

The SDF-1 protein of the present invention can also be a variant of mammalian SDF-1 protein, such as a fragment, analog and derivative of mammalian SDF-1 protein. Such variants include, for example, a polypeptide encoded by a naturally occurring allelic variant of native SDF-1 gene (i.e., a naturally occurring nucleic acid that encodes a naturally occurring mammalian SDF-1 protein), a polypeptide encoded by an alternative splice form of a native SDF-1 gene, a polypeptide encoded by a homolog of a native SDF-1 gene, and a polypeptide encoded by a non-naturally occurring variant of a native SDF-1 gene.

SDF-1 protein variants have a peptide sequence that differs from a native SDF-1 protein in one or more amino acids. The peptide sequence of such variants can feature a deletion, addition, or substitution of one or more amino acids of a SDF-1 protein. Amino acid insertions are preferably of about 1 to 4 contiguous amino acids, and deletions are preferably of about 1 to 10 contiguous amino acids. Variant SDF-1 proteins

substantially maintain a native SDF-1 protein functional activity. Preferred SDF-1 protein variants can be made by expressing nucleic acid molecules within the invention that feature silent or conservative changes.

SDF-1 protein fragments corresponding to one or more particular motifs and/or domains or to arbitrary sizes, are within the scope of the present invention. Isolated peptidyl portions of SDF-1 proteins can be obtained by screening peptides recombinantly produced from the corresponding fragment of the nucleic acid encoding such peptides. In addition, fragments can be chemically synthesized using techniques known in the art such as conventional Merrifield solid phase f-Moc or t-Boc chemistry. For example, a SDF-1 protein of the present invention may be arbitrarily divided into fragments of desired length with no overlap of the fragments, or preferably divided into overlapping fragments of a desired length. The fragments can be produced recombinantly and tested to identify those peptidyl fragments which can function as agonists of native SDF-1 protein.

Variants of SDF-1 protein can also include recombinant forms of the SDF-1 proteins. Recombinant

polypeptides preferred by the present invention, in addition to a SDF-1 protein, are encoded by a nucleic acid that can have at least 85% sequence identity with the nucleic acid sequence of a gene encoding a mammalian SDF-1 protein.

SDF-1 protein variants can include agonistic forms of the protein that constitutively express the functional activities of a native SDF-1 protein. Other SDF-1 protein variants can include those that are resistant to proteolytic cleavage, as for example, due to mutations, which alter protease target sequences. Whether a change in the amino acid sequence of a peptide results in a variant having one or more functional activities of a native SDF-1 protein can be readily determined by testing the variant for a native SDF-1 protein functional activity.

Nucleic Acids

Another aspect of the present invention relates to nucleic acid molecules that encode an SDF-1 protein and non-native nucleic acids that encode an SDF-1 protein. Such nucleic acid molecules may be in the form of RNA or in the form of DNA (e.g., cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA). The DNA may be double-stranded or single-stranded, and if single-stranded may be the

coding (sense) strand or non-coding (anti-sense) strand. The coding sequence which encodes an SDF-1 protein may be identical to a nucleotide sequence shown GenBank Accession No. AF189724, GenBank Accession No. AF209976, GenBank Accession No. L120029, and GenBank Accession No. NM022177. It may also be a different coding sequence which, as a result of the redundancy or degeneracy of the genetic code, encodes the same polypeptide as such polynucleotides.

Other nucleic acid molecules that encode SDF-1 within the invention are variants of a native SDF-1 , such as those that encode fragments, analogs and derivatives of a native SDF-1 protein. Such variants may be, for example, a naturally occurring allelic variant of a native SDF-1 gene, a homolog of a native SDF-1 gene, or a non-naturally occurring variant of a native SDF-1 gene. These variants have a nucleotide sequence that differs from a native SDF-1 gene in one or more bases. For example, the nucleotide sequence of such variants can feature a deletion, addition, or substitution of one or more nucleotides of a native SDF-1 gene. Nucleic acid insertions are preferably of about 1 to 10 contiguous nucleotides, and deletions are preferably of about 1 to 10 contiguous nucleotides.

In other applications, variant SDF-1 proteins displaying substantial changes in structure can be generated by making nucleotide substitutions that cause less than conservative changes in the encoded polypeptide. Examples of such nucleotide substitutions are those that cause changes in (a) the structure of the polypeptide backbone; (b) the charge or hydrophobicity of the polypeptide; or (c) the bulk of an amino acid side chain. Nucleotide substitutions generally expected to produce the greatest changes in protein properties are those that cause non-conservative changes in codons. Examples of codon changes that are likely to cause major changes in protein structure are those that cause substitution of (a) a hydrophilic residue, e.g., serine or threonine, for (or by) a hydrophobic residue, e.g., leucine, isoleucine, phenylalanine, valine or alanine; (b) a cysteine or proline for (or by) any other residue; (c) a residue having an electropositive side chain, e.g., lysine, arginine, or histidine, for (or by) an electronegative residue, e.g., glutamine or aspartine; or (d) a residue having a bulky side chain, e.g., phenylalanine, for (or by) one not having a side chain, e.g., glycine.

Naturally occurring allelic variants of a native SDF-1 gene within the invention are nucleic acids isolated from mammalian tissue that have at least 75% sequence identity with a native SDF-1 gene, and encode polypeptides having structural similarity to a native SDF-1 protein. Homologs of a native SDF-1 gene within the invention are nucleic acids isolated from other species that have at least 75% sequence identity with the native gene, and encode polypeptides having structural similarity to a native SDF-1 protein. Public and/or proprietary nucleic acid databases can be searched to identify other nucleic acid molecules having a high percent (e.g., 70% or more) sequence identity to a native SDF-1 gene.

Non-naturally occurring SDF-1 gene variants are nucleic acids that do not occur in nature (e.g., are made by the hand of man), have at least 75% sequence identity with a native SDF-1 gene, and encode polypeptides having structural similarity to a native SDF-1 protein. Examples of non-naturally occurring SDF-1 gene variants are those that encode a fragment of a native SDF-1 protein, those that hybridize to a native SDF-1 gene or a complement of to a native SDF-1 gene under stringent conditions, those that share at

least 65% sequence identity with a native SDF-1 gene or a complement of a native SDF-1 gene, and those that encode a SDF-1 fusion protein.

Nucleic acids encoding fragments of a native SDF-1 protein within the invention are those that encode, amino acid residues of a native SDF-1 protein. Shorter oligonucleotides that encode or hybridize with nucleic acids that encode fragments of a native SDF-1 protein can be used as probes, primers, or antisense molecules. Longer polynucleotides that encode or hybridize with nucleic acids that encode fragments of a native SDF-1 protein can also be used in various aspects of the invention. Nucleic acids encoding fragments of a native SDF-1 can be made by enzymatic digestion (e.g., using a restriction enzyme) or chemical degradation of the full length native SDF-1 gene or variants thereof.

Nucleic acids that hybridize under stringent conditions to one of the foregoing nucleic acids can also be used in the invention. For example, such nucleic acids can be those that hybridize to one of the foregoing nucleic acids under low stringency conditions, moderate stringency conditions, or high stringency conditions are within the invention.

Nucleic acid molecules encoding a SDF-1 fusion protein may also be used in the invention. Such nucleic acids can be made by preparing a construct (e.g., an expression vector) that expresses a SDF-1 fusion protein when introduced into a suitable target cell. For example, such a construct can be made by ligating a first polynucleotide encoding a SDF-1 protein fused in frame with a second polynucleotide encoding another protein such that expression of the construct in a suitable expression system yields a fusion protein.

The oligonucleotides of the invention can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. Such oligonucleotides can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc. Oligonucleotides within the invention may additionally include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting target cell receptors in vivo), or agents facilitating transport across the cell membrane, hybridization-triggered cleavage. To this end, the oligonucleotides may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide,

hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, hybridization-triggered cleavage agent, etc.

SDF-1 Expression

In accordance with another aspect of present invention, the expression SDF-1 in the infarcted myocardium can be upregulated by transplanting biocompatible cells into the infarcted myocardial tissue. Transplantation of cells into the infarcted myocardium up-regulates the expression of SDF-1 protein in the infarcted myocardium. The up-regulation of SDF-1 protein in the infarcted myocardium was observed from about 1 hour after transplantation of cells into the myocardium to less than about 7 days after transplantation.

Examples of cell types that can be transplanted into the infarcted myocardium include cultured heart cells, skeletal myoblasts, fibroblasts, smooth muscle cells, and bone marrow derived cells. These cells are preferably harvested from the subject to be treated (i.e., autologous cells) and cultured prior to transplantation. Autologous cells are preferred in order to increase the biocompatibily of the cells upon transplantation and minimize the likelihood of rejection.

Preferred cells for transplantation into the infarcted myocardium are skeletal myoblasts. Myoblasts maintain the regenerative potential of skeletal muscle, during periods of stress, proliferate and differentiate into myotubes, eventually forming muscle fibers capable of contracting. Myoblasts implanted into myocardium undergo myotube formation, withdraw from cell cycle, and remain viable. Functional studies have shown an improvement in regional contractility and compliance after myoblast implantation into the myocardium.

Skeletal myoblasts can be readily harvested under the basal membrane of muscular fibers, cultured to scale up the cell line, and then transplanted into infarcted myocardium. For example, in a murine subject, skeletal myoblasts can be harvested from the hind limbs of the subject, cultured, and then transplanted into the infarcted myocardium of the subject.

The cultured cells can be transplanted in the infarcted myocardium by well-known cell transplant techniques. For example, a suspension of cultured cells can be injected using a tuberculin syringe into the infarcted myocardial tissue.

Alternatively, the expression of SDF-1 protein can be upregulated by introducing an agent into the target cells that increases expression of SDF-1 protein. The target cells can include cells within the infarcted myocardium or ex vivo cells, such as autologous skeletal myoblasts or fibroblasts, which have been harvested from the subject.

The agent can comprise natural or synthetic nucleic acids, according to present invention and described above, that are incorporated into recombinant nucleic acid constructs, typically DNA constructs, capable of introduction into and replication in the cell. Such a construct preferably includes a replication system and sequences that are capable of transcription and translation of a polypeptide-encoding sequence in a given target cell.

Other agents can also be introduced into the target cells to increase SDF-1 protein levels in the target tissue. For example, agents that increase the transcription of a gene encoding SDF-1 protein increase the translation of an mRNA encoding SDF-1 protein, and/or those that decrease the degradation of an mRNA encoding SDF-1 protein could be used to increase SDF-1 protein levels. Increasing the rate of transcription

from a gene within a cell can be accomplished by introducing an exogenous promoter upstream of the gene encoding SDF-1 protein. Enhancer elements which facilitate expression of a heterologous gene may also be employed.

A preferred method of introducing the agent into a target cell involves using gene therapy. Gene therapy refers to gene transfer to express a therapeutic product from a cell in vivo or in vitro. Gene therapy in accordance with the present invention can be used to express SDF-1 protein from a target cell in vivo or in vitro.

One method of gene therapy uses a vector including a nucleotide encoding an SDF-1 protein. A "vector" (sometimes referred to as gene delivery or gene transfer "vehicle") refers to a macromolecule or complex of molecules comprising a polynucleotide to be delivered to a target cell, either in vitro or in vivo. The polynucleotide to be delivered may comprise a coding sequence of interest in gene therapy. Vectors include, for example, viral vectors (such as adenoviruses (`Ad`), adeno-associated viruses (AAV), and retroviruses), liposomes and other lipid-containing complexes, and other macromolecular complexes capable

of mediating delivery of a polynucleotide to a target cell.

Vectors can also comprise other components or functionalities that further modulate gene delivery and/or gene expression, or that otherwise provide beneficial properties to the targeted cells. Such other components include, for example, components that influence binding or targeting to cells (including components that mediate cell-type or tissue-specific binding); components that influence uptake of the vector nucleic acid by the cell; components that influence localization of the polynucleotide within the cell after uptake (such as agents mediating nuclear localization); and components that influence expression of the polynucleotide. Such components also might include markers, such as detectable and/or selectable markers that can be used to detect or select for cells that have taken up and are expressing the nucleic acid delivered by the vector. Such components can be provided as a natural feature of the vector (such as the use of certain viral vectors which have components or functionalities mediating binding and uptake), or vectors can be modified to provide such functionalities.

Selectable markers can be positive, negative or bifunctional. Positive selectable markers allow selection for cells carrying the marker, whereas negative selectable markers allow cells carrying the marker to be selectively eliminated. A variety of such marker genes have been described, including bifunctional (i.e. positive/negative) markers (see, e.g., Lupton, S., WO 92/08796, published May 29, 1992; and Lupton, S., WO 94/28143, published Dec. 8, 1994). Such marker genes can provide an added measure of control that can be advantageous in gene therapy contexts. A large variety of such vectors are known in the art and are generally available.

Vectors for use in the present invention include viral vectors, lipid based vectors and other vectors that are capable of delivering a nucleotide according to the present invention to the target cells. The vector can be a targeted vector, especially a targeted vector that preferentially binds to cardiomyocytes. Preferred viral vectors for use in the invention are those that exhibit low toxicity to a target cell and induce production of therapeutically useful quantities of SDF-1 protein in a tissue-specific manner.

Presently preferred viral vectors are derived from adenovirus (Ad) or adeno-associated virus (AAV). Both human and non-human viral vectors can be used but preferably the recombinant viral vector is replication-defective in humans. Where the vector is an adenovirus, it preferably comprises a polynucleotide having a promoter operably linked to a gene encoding the SDF-1 protein and is replication-defective in humans.

Adenovirus vectors are preferred for use in the invention because they (1) are capable of highly efficient gene expression in target cells and (2) can accommodate a relatively large amount of heterologous (non-viral) DNA. A preferred form of recombinant adenovirus is a "gutless, "high-capacity", or "helper-dependent" adenovirus vector. Such a vector features, for example, (1) the deletion of all or most viral-coding sequences (those sequences encoding viral proteins), (2) the viral inverted terminal repeats (ITRs) which are sequences required for viral DNA replication, (3) up to 28-32 kb of "exogenous" or "heterologous" sequences (e.g., sequences encoding a SDF-1 protein), and (4) the viral DNA packaging sequence which is required for packaging of the viral

genomes into infectious capsids. For specifically myocardial cells, preferred variants of such recombinant adenoviral vectors contain tissue-specific (e.g., cardiomyoctye) enhancers and promoters operably linked to a SDF-1 gene.

AAV-based vectors are advantageous because they exhibit high transduction efficiency of target cells and can integrate into the target genome in a site-specific manner. Use of recombinant AAV vectors is discussed in detail in Tal, J., J. Biomed. Sci. 7:279-291, 2000 and Monahan and Samulski, Gene Therapy 7:24-30, 2000. A preferred AAV vector comprises a pair of AAV inverted terminal repeats which flank at least one cassette containing a tissue (e.g., myocardium)--or cell (e.g., cardiomyocyte)--specific promoter operably linked to a SDF-1 nucleic acid. The DNA sequence of the AAV vector, including the ITRs, the promoter and SDF-1 gene may be integrated into the target genome.

Other viral vectors that can be use in accordance with the present invention include herpes simplex virus (HSV)-based vectors. HSV vectors deleted of one or more immediate early genes (IE) are advantageous because they are generally non-cytotoxic, persist in a state

similar to latency in the target cell, and afford efficient target cell transduction. Recombinant HSV vectors can incorporate approximately 30 kb of heterologous nucleic acid. A preferred HSV vector is one that: (1) is engineered from HSV type I, (2) has its IE genes deleted, and (3) contains a tissue-specific (e.g., myocardium) promoter operably linked to a SDF-1 nucleic acid. HSV amplicon vectors may also be useful in various methods of the invention. Typically, HSV amplicon vectors are approximately 15 kb in length, and possess a viral origin of replication and packaging sequences.

Retroviruses such as C-type retroviruses and lentiviruses might also be used in the invention. For example, retroviral vectors may be based on murine leukemia virus (MLV). See, e.g., Hu and Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 and Fong et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:1-60, 2000. MLV-based vectors may contain up to 8 kb of heterologous (therapeutic) DNA in place of the viral genes. The heterologous DNA may include a tissue-specific promoter and an SDF-1 nucleic acid. In methods of delivery to an infarcted myocardium, it may also encode a ligand to a myocardial specific receptor.

Additional retroviral vectors that might be used are replication-defective lentivirus-based vectors, including human immunodeficiency (HIV)-based vectors. See, e.g., Vigna and Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000 and Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150-8157, 1998. Lentiviral vectors are advantageous in that they are capable of infecting both actively dividing and non-dividing cells. They are also highly efficient at transducing human epithelial cells.

Lentiviral vectors for use in the invention may be derived from human and non-human (including SIV) lentiviruses. Preferred lentiviral vectors include nucleic acid sequences required for vector propagation as well as a tissue-specific promoter (e.g., myocardium) operably linked to a SDF-1 gene. These former may include the viral LTRs, a primer binding site, a polypurine tract, att sites, and an encapsidation site.

A lentiviral vector may be packaged into any suitable lentiviral capsid. The substitution of one particle protein with another from a different virus is referred to as "pseudotyping". The vector capsid may contain viral envelope proteins from other viruses, including murine leukemia virus (MLV) or vesicular

stomatitis virus (VSV). The use of the VSV G-protein yields a high vector titer and results in greater stability of the vector virus particles.

Alphavirus-based vectors, such as those made from semliki forest virus (SFV) and sindbis virus (SIN), might also be used in the invention. Use of alphaviruses is described in Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 and Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000. Alphavirus vectors typically are constructed in a format known as a replicon. A replicon may contain (1) alphavirus genetic elements required for RNA replication, and (2) a heterologous nucleic acid such as one encoding a SDF-1 nucleic acid. Within an alphavirus replicon, the heterologous nucleic acid may be operably linked to a tissue-specific (e.g., myocardium) promoter or enhancer.

Recombinant, replication-defective alphavirus vectors are advantageous because they are capable of high-level heterologous (therapeutic) gene expression, and can infect a wide target cell range. Alphavirus replicons may be targeted to specific cell types (e.g., cardiomyocytes) by displaying on their virion surface a functional heterologous ligand or binding

domain that would allow selective binding to target cells expressing a cognate binding partner. Alphavirus replicons may establish latency, and therefore long-term heterologous nucleic acid expression in a target cell. The replicons may also exhibit transient heterologous nucleic acid expression in the target cell. A preferred alphavirus vector or replicon is non-cytopathic.

In many of the viral vectors compatible with methods of the invention, more than one promoter can be included in the vector to allow more than one heterologous gene to be expressed by the vector. Further, the vector can comprise a sequence which encodes a signal peptide or other moiety which facilitates the secretion of a SDF-1 gene product from the target cell.

To combine advantageous properties of two viral vector systems, hybrid viral vectors may be used to deliver a SDF-1 nucleic acid to a target tissue (e.g., myocardium). Standard techniques for the construction of hybrid vectors are well-known to those skilled in the art. Such techniques can be found, for example, in Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. or any

number of laboratory manuals that discuss recombinant DNA technology. Double-stranded AAV genomes in adenoviral capsids containing a combination of AAV and adenoviral ITRs may be used to transduce cells. In another variation, an AAV vector may be placed into a "gutless", "helper-dependent" or "high-capacity" adenoviral vector. Adenovirus/AAV hybrid vectors are discussed in Lieber et al., J. Virol. 73:9314-9324, 1999. Retrovirus/adenovirus hybrid vectors are discussed in Zheng et al., Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000. Retroviral genomes contained within an adenovirus may integrate within the target cell genome and effect stable SDF-1 gene expression.

Other nucleotide sequence elements which facilitate expression of the SDF-1 gene and cloning of the vector are further contemplated. For example, the presence of enhancers upstream of the promoter or terminators downstream of the coding region, for example, can facilitate expression.

In accordance with another aspect of the present invention, a tissue-specific promoter, such as tissue-specific transcriptional control sequences of left ventricular myosin light chain-2 (MLC_{2v}) or myosin heavy chain (MHC), can be fused to a SDF-1 gene. By fusing

such tissue specific promoter within the adenoviral construct, transgene expression is limited to ventricular cariomyocytes. The efficacy of gene expression and degree of specificity provided by tissue specific promoters can be determined, using the recombinant adenoviral system of the present invention. Cardiac-specific (i.e., myocardial tissue specific) expression is well known in the art. (J. Biol. Chem., 267:15875-15885, 1992). Other promoters, such as the troponin-C promoter, can also be used.

The use of tissue specific promoters directed to cardiomyocytes alone (i.e., without concomitant expression in endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts within the heart) when delivering the SDF-1 gene in vivo provides adequate expression of the SDF-1 protein for therapeutic treatment. Limiting expression to the cardiomyocytes also has advantages regarding the utility of gene transfer for the treatment of CHF. In addition, cardiomyocytes would likely provide the longest transgene expression since the cells do not undergo rapid turnover; expression would not therefore be decreased by cell division and death as would occur with endothelial cells. Endothelial-specific promoters are already available

for this purpose (Lee, et al., J. Biol. Chem., 265:10446-10450, 1990).

In addition to viral vector-based methods, non-viral methods may also be used to introduce a SDF-1 gene into a target cell. A review of non-viral methods of gene delivery is provided in Nishikawa and Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001. A preferred non-viral gene delivery method according to the invention employs plasmid DNA to introduce a SDF-1 nucleic acid into a cell. Plasmid-based gene delivery methods are generally known in the art.

Synthetic gene transfer molecules can be designed to form multimolecular aggregates with plasmid DNA (e.g., harboring a SDF-1 coding sequence operably linked to a myocardium-specific promoter). These aggregates can be designed to bind to a target cell (e.g., cardiomyocyte).

Cationic amphiphiles, including lipopolyamines and cationic lipids, may be used to provide receptor-independent SDF-1 nucleic acid transfer into target cells (e.g., cardiomyocytes). In addition, preformed cationic liposomes or cationic lipids may be mixed with plasmid DNA to generate cell-transfecting complexes. Methods involving cationic lipid formulations are

reviewed in Felgner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 772:126-139, 1995 and Lasic and Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996. For gene delivery, DNA may also be coupled to an amphipathic cationic peptide (Fominaya et al., J. Gene Med. 2:455-464, 2000).

Methods that involve both viral and non-viral based components may be used according to the invention. For example, an Epstein Barr virus (EBV)-based plasmid for therapeutic gene delivery is described in Cui et al., Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. Additionally, a method involving a DNA/ligand/polycationic adjunct coupled to an adenovirus is described in Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994.

Vectors that encode the expression of SDF-1 can be delivered to the target cell in the form of an injectable preparation containing pharmaceutically acceptable carrier, such as saline, as necessary. Other pharmaceutical carriers, formulations and dosages can also be used in accordance with the present invention.

Where the target cell comprises a cell of the infarcted myocardium, the vector can be delivered by direct intracoronary injection using a tuberculin

syringe under fluoroscopic guidance, at an amount sufficient for the SDF-1 protein to be expressed to a degree which allows for highly effective therapy. By injecting the vector directly into the infarcted myocardial tissue, it is possible to target the gene rather effectively, and to minimize loss of the recombinant vectors.

This type of injection enables local transfection of a desired number of cells, especially cardiomyocytes, in the affected myocardium, thereby maximizing therapeutic efficacy of gene transfer, and minimizing the possibility of an inflammatory response to viral proteins. A cardiomyocyte-specific promoter may be used, for example, to securely enable expression limited to the cardiomyocytes. Thus, delivery of the transgenes in this matter may result in targeted gene expression in, for example, the cells of the left ventricle. Other techniques well known in the art can also be used for transplanting the vector to the target cells of the infarcted myocardium.

Where the target cell is a cultured cell that is later transplanted into the infarcted myocardium, the vectors can be delivered by direct injection into the culture medium. A SDF-1 nucleic acid transfected into

cells may be operably linked to any suitable regulatory sequence, including a myocardium specific promoter and enhancer.

The transfected target cells can then be transplanted to the infarcted myocardium by well known transplantation techniques, such as by direct intracoronary injection using a tuberculin syringe. By first transfecting the target cells in vitro and then transplanting the transfected target cells to the infarcted myocardium, the possibility of inflammatory response in the infarcted myocardium is minimized compared to direct injection of the vector into the infarcted myocardium.

SDF-1 nucleic acids of the present invention may be expressed for any suitable length of time within the target cell, including transient expression and stable, long-term expression. In a preferred embodiment, the SDF-1 nucleic acid will be expressed in therapeutic amounts for a suitable and defined length of time.

A therapeutic amount is an amount, which is capable of producing a medically desirable result in a treated animal or human. As is well known in the medical arts, dosage for any one animal or human depends on many factors, including the subject's size,

body surface area, age, the particular composition to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Specific dosages of proteins, nucleic acids, or small molecules) can be determined readily determined by one skilled in the art using the experimental methods described below.

The SDF-1 expression may be transient as is the case when a cell that is not transfected with an SDF-1 protein encoding vector is transplanted into the infarcted myocardium. Alternatively, SDF-1 protein expression may be long-term, as is the case where the infarcted myocardium is transfected with an SDF-1 protein encoding vector or where a cell that is transfected with an SDF-1 protein encoding vector is transplanted to the infarcted myocardium.

Long term SDF-1 expression is advantageous because it allows the concentration of stem cells to be increased with a mobilizing agent, such as G-CSF or some other factor, at a time remote from the surgery or procedure that transplanted the cells. In the case where G-CSF is the mobilizing agent there is a significant increase in neutrophil count, which could cause negative effects in the peri-surgical period, but

not days or weeks later. Additionally, long term or chronic up-regulation SDF-1 protein expression would allow multiple attempts at stem cell mobilization. Further, chronic up-regulation in SDF-1 protein expression causes long term homing of stem cells into the infarcted myocardial tissue from the peripheral blood without the need of stem cell mobilization.

Stem cell mobilization

In accordance with another aspect of the present invention, the concentration of the stem cells in the peripheral blood of the subject can be increased by administering an agent to induce mobilization of stem cells to the peripheral blood of the subject. The stems cells can be mobilized to the peripheral blood of the subject to increase stem cell concentration in peripheral subject using a number of agents. For example, to increase the number of stem cells in the peripheral blood of a mammalian subject, an agent that causes a pluripotent stem cell to mobilize from the bone marrow can be administered to the subject. A number of such agents are known and include cytokines, such as granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin (IL)-7, IL-3, IL-12, stem cell

factor (SCF), and flt-3 ligand; chemokines such as IL-8, Mip-1α, and Groβ, and the chematherapeutic agents of cylcophosamide (Cy) and paclitaxel. These agents differ in their time frame to achieve stem cell mobilization, the type of stem cell mobilized, and efficiency.

The mobilizing agent can be administered by direct injection of the mobilizing agent into the subject. Preferably, the mobilizing agent is administered after SDF-1 expression is up-regulated in the infarcted myocardium. The mobilizing agent, however, can be administered before SDF- expression is up-regulated.

A preferred mobilizing agent is a colony stimulating factor, such as G-CSF. A typical dosage of G-CSF in a murine subject is about 125 µg/Kg per day for about 5 to about 10 days. The G-CSF agent is administered after the SDF-expression is up-regulated.

Alternatively, as is well known in the art, the concentration of stem cells in the peripheral blood can be increased by the injection of specialized stem cells into the peripheral blood (i.e., MAPC's).

VEGF

In accordance with another aspect of the present invention, the VEGF that is expressed in the infarcted myocardium is one of the family of vascular endothelial growth factors that induce the growth of new collateral blood vessels. VEGFs are specific angiogenic growth factors that have vaso-permeability activity and target endothelial cells almost exclusively.

The VEGF that is expressed in the infarcted myocardium can be an expression product of a VEGF gene. Preferred VEGFs that can be used in accordance with the present invention include VEGF-1 (also known as VEGF-A) and other structurally homologous VEGF's, such as VEGF-2 (VEGF-C), VEGF-3 (VEGF-B), VEGF-D, VEGF-E, and placental growth factor. Known isoforms of VEGF-1 include 121, 138, 162, 165, 182, 189, and 206 amino acids. These isoforms are identified, respectively, as VEGF-121, VEGF-165, VEGF-162, VEGF-182, VEGF-189, and VEGF-206. The mitogenic and heparin binding activity of these isoforms differ. A preferred isoform of VEGF-1 used in accordance with the present invention is VEGF-165. Other isoforms of VEGF-1 and other homologs of VEGF not listed can also be used in accordance with the present invention.

The VEGF of the present invention can have an amino acid sequence identical to one of the foregoing VEGFs. The VEGF of the present invention can also be a variant of one of the foregoing VEGFs, such as a fragment, analog and derivative of VEGF. Such variants include, e.g., a polypeptide encoded by a naturally occurring allelic variant of native VEGF gene (i.e., a naturally occurring nucleic acid that encodes a naturally occurring mammalian VEGF), a polypeptide encoded by an alternative splice form of a native VEGF gene, a polypeptide encoded by a homolog of a native VEGF gene, and a polypeptide encoded by a non-naturally occurring variant of a VEGF gene.

VEGF variants have a peptide sequence that differs from a native VEGF in one or more amino acids. The peptide sequence of such variants can feature a deletion, addition, or substitution of one or more amino acids of a native VEGF. Amino acid insertions are preferably of about 1 to 4 contiguous amino acids, and deletions are preferably of about 1 to 10 contiguous amino acids. Variant VEGF in accordance with the present invention substantially maintain a native VEGF functional activity. Preferred VEGF protein variants can be made by expressing nucleic acid

molecules within the invention that feature silent or conservative changes.

VEGF fragments corresponding to one or more particular motifs and/or domains or to arbitrary sizes, are within the scope of the present invention. Isolated peptidyl portions of VEGF can be obtained by screening peptides recombinantly produced from the corresponding fragment of the nucleic acid encoding such peptides. In addition, fragments can be chemically synthesized using techniques known in the art such as conventional Merrifield solid phase f-Moc or t-Boc chemistry.

Variants of VEGF can also include recombinant forms of the VEGF. Recombinant polypeptides preferred by the present invention, in addition to a VEGF protein, are encoded by a nucleic acid that has at least 85% sequence identity with the nucleic acid sequence of a gene encoding a mammalian VEGF.

VEGF variants can include agonistic forms of the protein that constitutively express the functional activities of a native VEGF. Other VEGF variants can include those that are resistant to proteolytic cleavage, as for example, due to mutations which alter protease target sequences. Whether a change in the

amino acid sequence of a peptide results in a variant having one or more functional activities of a VEGF can be readily determined by testing the variant for VEGF functional activity.

VEGF Nucleic Acids

Another aspect of the present invention relates to nucleic acid molecules that encode VEGF and non-native nucleic acids that encode a mammalian VEGF. Such nucleic acid molecules may be in the form of RNA or in the form of DNA (e.g., cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA). The DNA may be double-stranded or single-stranded, and if single-stranded may be the coding (sense) strand or non-coding (anti-sense) strand.

Other nucleic acid molecules within the invention are variants of a native VEGF gene, such as those that encode fragments, analogs and derivatives of a native VEGF. Such variants may be, e.g., a naturally occurring allelic variant of a VEGF gene, a homolog of a native VEGF gene, or a non-naturally occurring variant of a native VEGF gene. These variants have a nucleotide sequence that differs from a native VEGF gene in one or more bases. For example, the nucleotide sequence of such variants can feature a deletion,

addition, or substitution of one or more nucleotides of a native VEGF gene. Nucleic acid insertions are preferably of about 1 to 10 contiguous nucleotides, and deletions are preferably of about 1 to 30 contiguous nucleotides.

In other applications, variant VEGF displaying substantial changes in structure can be generated by making nucleotide substitutions that cause less than conservative changes in the encoded polypeptide. Examples of such nucleotide substitutions are those that cause changes in (a) the structure of the polypeptide backbone; (b) the charge or hydrophobicity of the polypeptide; or (c) the bulk of an amino acid side chain. Nucleotide substitutions generally expected to produce the greatest changes in protein properties are those that cause non-conservative changes in codons. Examples of codon changes that are likely to cause major changes in protein structure are those that cause substitution of (a) a hydrophilic residue, e.g., serine or threonine, for (or by) a hydrophobic residue, e.g., leucine, isoleucine, phenylalanine, valine or alanine; (b) a cysteine or proline for (or by) any other residue; (c) a residue having an electropositive side chain, e.g., lysine,

arginine, or histidine, for (or by) an electronegative residue, e.g., glutamine or aspartine; or (d) a residue having a bulky side chain, e.g., phenylalanine, for (or by) one not having a side chain, e.g., glycine.

Naturally occurring allelic variants of a VEGF gene within the invention are nucleic acids isolated from mammalian tissue that have at least 75% sequence identity with a native VEGF gene, and encode polypeptides having structural similarity to a native VEGF. Homologs of a native VEGF within the invention are nucleic acids isolated from other species that have at least 75% sequence identity with the native gene, and encode polypeptides having structural similarity to a native VEGF. Public and/or proprietary nucleic acid databases can be searched to identify other nucleic acid molecules having a high percent sequence identity to a native VEGF gene.

Non-naturally occurring VEGF variants are nucleic acids that do not occur in nature (e.g., are made by the hand of man), have at least 75% sequence identity with a native VEGF gene, and encode polypeptides having structural similarity to a native VEGF. Examples of non-naturally occurring VEGF gene variants are those that encode a fragment of a native VEGF, those that

hybridize to a native VEGF gene or a complement of to a native VEGF gene under stringent conditions, those that share at least 65% sequence identity with a native VEGF gene or a complement of a native VEGF gene, and those that encode a VEGF.

Nucleic acids encoding fragments of a VEGF within the invention are those that encode, amino acid residues of a native VEGF. Shorter oligonucleotides that encode or hybridize with nucleic acids that encode fragments of a native VEGF can be used as probes, primers, or antisense molecules. Longer polynucleotides that encode or hybridize with nucleic acids that encode fragments of a native VEGF can also be used in various aspects of the invention. Nucleic acids encoding fragments of a native VEGF can be made by enzymatic digestion (e.g., using a restriction enzyme) or chemical degradation of the full length native VEGF gene or variants thereof.

Nucleic acids that hybridize under stringent conditions to one of the foregoing nucleic acids can also be used in the invention. For example, such nucleic acids can be those that hybridize to one of the foregoing nucleic acids under low stringency

conditions, moderate stringency conditions, or high stringency conditions are within the invention.

Nucleic acid molecules encoding a VEGF fusion protein may also be used in the invention. Such nucleic acids can be made by preparing a construct (e.g., an expression vector) that expresses a VEGF fusion protein when introduced into a suitable target cell. For example, such a construct can be made by ligating a first polynucleotide encoding VEGF fused in frame with a second polynucleotide encoding another protein such that expression of the construct in a suitable expression system yields a fusion protein.

The oligonucleotides of the invention can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. Such oligonucleotides can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc. Oligonucleotides within the invention may additionally include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting cell receptors in vivo), or agents facilitating transport across the cell membrane. To this end, the oligonucleotides may be conjugated to another molecule,

e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, hybridization-triggered cleavage agent, etc.

VEGF Expression

In accordance with another aspect of present invention, the expression VEGF in the infarcted myocardium can be increased by introducing an agent into target cells that increases expression of VEGF.

The target cells can include cells within the infarcted myocardium or ex vivo cells, such as autologous skeletal myoblasts or fibroblasts, which are transplanted into the infarcted myocardial tissue following introduction of the agent. Where the target cells are cells that are transplanted into the infarcted myocardium, the target cell can be same cells as the cells used to promote up-regulation of SDF-1 protein or transfected with a SDF-1 protein encoding vector.

The agent can comprise natural or synthetic VEGF nucleic acids that are incorporated into recombinant nucleic acid constructs, typically DNA constructs, capable of introduction into and replication in the cell. Such a construct preferably includes a replication system and sequences that are capable of

transcription and translation of a polypeptide-encoding sequence in a given target cell.

Other agents can also be introduced the target cells to increase VEGF levels in a target tissue. For example, agents that increase the transcription of a gene encoding VEGF; increase the translation of an mRNA encoding VEGF, and/ or those that decrease the degradation of an mRNA encoding VEGF could be used to increase VEGF levels. Increasing the rate of transcription from a gene within a cell can be accomplished by introducing an exogenous promoter upstream of the gene encoding VEGF. Enhancer elements which facilitate expression of a heterologous gene may also be employed.

A preferred method of introducing the agent into a target cell involves using gene therapy. Gene therapy in accordance with the present invention can be used to express VEGF from a target cell in vivo or in vitro.

A preferred gene therapy method involves using a vector including a nucleotide encoding VEGF. Examples of vectors that can be used include, for example, viral vectors (such as adenoviruses (`Ad`), adeno-associated viruses (AAV); and retroviruses), liposomes and other lipid-containing complexes, and other macromolecular

complexes capable of mediating delivery of a polynucleotide to a target cell.

The vectors can also comprise other components or functionalities that further modulate gene delivery and/or gene expression, or that otherwise provide beneficial properties to the targeted cells. Such other components include, for example, components that influence binding or targeting to cells (including components that mediate cell-type or tissue-specific binding); components that influence uptake of the vector nucleic acid by the cell; components that influence localization of the polynucleotide within the cell after uptake (such as agents mediating nuclear localization); and components that influence expression of the polynucleotide. Such components also might include markers, such as detectable and/or selectable markers that can be used to detect or select for cells that have taken up and are expressing the nucleic acid delivered by the vector. Such components can be provided as a natural feature of the vector (such as the use of certain viral vectors which have components or functionalities mediating binding and uptake), or vectors can be modified to provide such functionalities.

Selectable markers can be positive, negative or bifunctional. Positive selectable markers allow selection for cells carrying the marker, whereas negative selectable markers allow cells carrying the marker to be selectively eliminated. A variety of such marker genes have been described, including bifunctional (i.e. positive/negative) markers Such marker genes can provide an added measure of control that can be advantageous in gene therapy contexts. A large variety of such vectors are known in the art and are generally available.

Vectors for use in expressing VEGF in the present invention include viral vectors, lipid based vectors and other vectors that are capable of delivering nucleotide according to the present invention to the target cells. The vector can be a targeted vector, especially a targeted vector that preferentially binds to ventricular myocytes. Preferred viral vectors for use in the invention are those that exhibit low toxicity to a target cell and induce production of therapeutically useful quantities of VEGF in a tissue-specific manner.

Presently preferred viral vectors are derived from adenovirus (Ad) or adeno-associated virus (AAV). Both

human and non-human viral vectors can be used but preferably the recombinant viral vector is replication-defective in humans. Where the vector is an adenovirus, it preferably comprises a polynucleotide having a promoter operably linked to a gene encoding an angiogenic protein or peptide, and is replication-defective in humans. Other vectors including viral and non-viral vectors well known in the art and described above can also be used.

In many of the viral vectors compatible with methods of the invention, more than one promoter can be included in the vector to allow more than one heterologous gene to be expressed by the vector. Further, the vector can comprise a sequence which encodes a signal peptide or other moiety which facilitates the secretion of a VEGF product from the target cell.

To combine advantageous properties of two viral vector systems, hybrid viral vectors may be used to deliver a VEGF nucleic acid to a target tissue (e.g., myocardium). Other nucleotide sequence elements which facilitate expression of the VEGF gene and cloning of the vector are further contemplated. For example, the presence of enhancers upstream of the promoter or

terminators downstream of the coding region, for example, can facilitate expression. In the vectors of the present invention, the presence of elements which enhance myocardium-specific expression of VEGF may be useful for gene therapy.

The present invention also contemplates the use of tissue-specific promoters for cell targeting. By fusing, for example, tissue-specific transcriptional control sequences of left ventricular myosin light chain-2 (MLC_{2v}) or myosin heavy chain (MHC) to a transgene, such as the VEGF-165 gene within the adenoviral construct, transgene expression is limited to ventricular cardiac myocytes.

By using the MLC_{2v} or MHC promoters and delivering the transgene in vivo, it is believed that the cardiomyocyte alone (that is without concomitant expression in endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts within the heart) will provide adequate expression of an angiogenic protein, such as VEGF-165 to promote angiogenesis. Limiting expression to cardiomyocytes also has advantages regarding the utility of gene transfer for treatment of congestive heart failure. By limiting expression to the heart, one avoids the potentially harmful effect of

angiogenesis in non-cardiac tissues. In addition, of the cells in the heart, the myocyte would likely provide the longest transgene expression since the cells do not undergo rapid turnover; expression would not therefore be decreased by cell division and death as would occur with endothelial cells. Endothelial-specific promoters are already available for this purpose.

By using drug-regulatable promoter systems (e.g., tetracycline), SDF-1 expression with or without stem cell mobilization can be started at times remote from surgical or percutaneous procedures necessary for implantation of engineered cells or genetic vectors. This would allow recovery of myocardial or non-myocardial tissues prior to increasing the number of circulating stem cells.

In addition to viral vector-based methods, non-viral methods may also be used to introduce a VEGF gene into a target cell. A preferred non-viral gene delivery method according to the invention employs plasmid DNA to introduce a VEGF nucleic acid into a cell. Plasmid-based gene delivery methods are generally known in the art.

Methods that involve both viral and non-viral based components may be used according to the invention. For example, an Epstein Barr virus (EBV)-based plasmid for therapeutic gene delivery is described in Cui et al., Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. Additionally, a method involving a DNA/ligand/polycationic adjunct coupled to an adenovirus is described in Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994.

The vectors that encode the expression of VEGF can be delivered to the target cell in the form of an injectable preparation containing pharmaceutically acceptable carrier such as saline, for example, as necessary. Other pharmaceutical carriers, formulations and dosages can also be used.

Where the target cell comprises a cell of the infarcted myocardium, the vector can be delivered by direct intracoronary (or graft vessel) injection using a tuberculin syringe under fluoroscopic guidance, at an amount sufficient for the VEGF to be expressed to a degree which allows for highly effective therapy. By injecting the vector directly into the infarcted myocardial tissue, it is possible to target the gene

rather effectively, and to minimize loss of the recombinant vectors.

This type of injection enables local transfection of a desired number of cells, especially cardiac myocytes, in the affected myocardium, thereby maximizing therapeutic efficacy of gene transfer, and minimizing the possibility of an inflammatory response to viral proteins. A ventricular cardiomyocyte-specific promoter may be used, for example, to securely enable expression limited to the cardiomyocytes. Thus, delivery of the transgenes in this matter may result in targeted gene expression in, for example, the cells of the left ventricle. Other techniques well known in the art can also be used for transplanting the vector to the target cells of the infarcted myocardium.

Where the target cell is a cultured cell that is later transplanted into the infarcted myocardium, the vectors can be delivered by direct injection into the culture medium. A VEGF nucleic acid transfected into cells may be operably linked to any suitable regulatory sequence, including a myocardium specific promoter and enhancer.

The transfected target cells can then be transplanted to the infarcted myocardium by well known transplantation techniques, such as by direct intracoronary injection using a tuberculin syringe. By first transfecting the target cells in vitro and than transplanting the transfected target cells to the infarcted myocardium, the possibility of inflammatory response in the infarcted myocardium is minimized compared to direct injection of the vector into the infarcted myocardium.

VEGF of the present invention may be expressed for any suitable length of time including transient expression and stable, long-term expression. In a preferred embodiment, the SDF-1 nucleic acid will be expressed in therapeutic amounts for a suitable and defined length of time.

Examples

The present invention is further illustrated by the following specific examples. The examples are provided for illustration and are not to be construed as limiting the scope or content of the invention in any way.

Effect of stem cell mobilization with G-CSF 8 weeks following MI

In order to ascertain whether stem cell mobilization by G-CSF leads to myocardial regeneration in rats with established ischemic cardiomyopathy, rats 8 weeks following MI were randomized to receive either recombinant human G-CSF (125 µg/kg/day for 5 days, via i.p. injection) or saline. Blood was obtained 5 days after initiating G-CSF therapy to verify bone marrow stimulation, revealing a tripling of the leukocyte count with G-CSF (37.3 + 5.3 cells/µl) compared with saline (11.8 + 4.0 cells/µl) therapy. 5-bromo- 2'-deoxyuridine, BrdU, was administered beginning on the final day after G-CSF administration for a total of 14 days in order to label any proliferating cells with in the myocardium 20.

Figs. 1(a and b) show, respectively, the number BrdU-positive cells within infarct zone (a) and the shortening fraction (b) 4 weeks following administration of saline or G-CSF (12 weeks following LAD ligation). Cell counts are cells per mm^2. Data represent mean ± s.d. n=6-8 per group.

The administration of G-CSF 2 months after LAD ligation did not lead to an increase in BrdU positive cell number within the infarct zone (Fig. 1a) or to meaningful myocardial regeneration as determined by the lack of angiogenesis or cardiac myosin positive cells within the infarct zone (data not shown). Twelve weeks following LAD ligation these animals demonstrated a significant cardiomyopathy with a shortening fraction in control animals of significant less than 10% (normal >60%). Consistent with lack of histological evidence of significant myocardial regeneration in response to G-CSF 8 weeks after LAD ligation, no meaningful recovery of systolic function was seen with G-CSF (Fig. 1b).

Effect of SKMB transplantation prior to stem cell mobilization on ischemic cardiomyopathy

In order to test the hypothesis that myocardium temporally remote from the time of myocardial infarction can be optimized for myocardial regeneration in response to stem cell mobilization, skeletal myoblast transplantation was performed 8 weeks following LAD ligation. Animals received 5 injections of 200,000 SKMB/injection within the infarct border zone. Because the initial hypothesis was that the transplanted SKMB would be used as a strategy for

expressing gene products responsible for stem cell homing, as a control, the SKMB were transfected with adenovirus encoding luciferase.

Figs. 2(a and b) show the effect of skeletal myoblast (SKMB) transplantation on BrdU+ cell counts within the infarct zone 4 weeks following cell transplantation (12 weeks following LAD ligation). Data represent mean ± s.d. n=6-8 per group.

The introduction of SKMB into the infarcted heart in the absence of G-CSF did not significantly increase the incorporation of BrdU positive cells into the infarct zone. However, the combination of SKMB transplantation and G-CSF did result in a significantly increased number of BrdU positive cells within the infarct zone 4 weeks later (Fig. 2a). In addition, compared to animals that received either G-CSF or SKMB transplantation alone, animals that received the combined therapy experienced a significant increase in shortening fraction (Fig. 2b) relative to saline controls.

In order to determine if the BrdU positive cells in the infarct zone originated in the bone marrow, or were endogenous cells from the myocardium that divided, 8 weeks following LAD ligation, BrdU was administered,

for 5 days, starting 6 days prior to transplantation of SKMB and initiation of G-CSF.

Fig. 3a shows that bone marrow (BM) stained for BrdU revealed almost 100% staining of BM cells cultured from multiple animals. Fig. 3b shows that no significant Brdu+ cells were seen in untreated myocardium after 5 days of BrdU administration. Data represent mean ± s.d. of positive cells quantified by two independent observers blinded to the identity of each animal. *n*=6-8 per group. Scale bar represents 25 μM. This led to labeling of cells in the bone marrow without any significant Brdu labeling of the myocardium (17.5 ± 2.9 positive cells/mm^2).

Fig. 3c shows the increased BrdU+ cells within the infarct zone assessed with the therapy in accordance with the present invention.

In these experiments, only those animals that received SKMB and G-CSF had a significant increase in the number of BrdU-positive cells within the infarct zone. These data are consistent with the concept that the BrdU-positive cells arose from the bone marrow and homed to the infarct zone following combined therapy. The data also support that SKMB transplantation

re-establishes the necessary signals for stem cell homing to the myocardium.

Signaling molecules responsible for stem cell homing to infarcted tissue

The observation that circulating cells will engraft into infarcted tissue 8 weeks after an MI with "stimulation" of the tissue by SKMB transplantation prompted the evaluation of potential mediators of stem cell homing. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) is known to mediate hematopoietic trafficking and stem cell homing in the bone marrow; therefore, its role as a potential signaling molecule for stem cell engraftment in MI and in response to SKMB transplantation was assessed.

Fig. 4 is a photograph showing RT-PCR revealing stromal derived factor-1 (SDF-1) expression as a function of time following myocardial infarction. SDF-1 expression is absent at baseline, increased at 1 and 24 hours following MI. SDF-1 expression returns to its absent state between 24 hours and 7 days following MI and remains absent 30 days following MI. SDF-1 expression recurs 72 hours following SKMB transplantation performed 30 days (30+) following MI.

Thus, by RT-PCR, SDF-1 expression was observed at 1 and 24 h, but not at 0, 7 or 30 days, after LAD

ligation. SDF-1 expression was induced by SKMB, and was observed 72 h after transplantation, but not in sham operated animals (data not shown). PCR for GAPDH in the same samples demonstrated that cDNA was intact in all samples (data not shown). The increase in SDF-1 expression in response to SKMB transplantation was confirmed by real-time PCR (data not shown). Real-time PCR revealed GAPDH levels were similar among groups.

To evaluate whether SDF-1 mediated engraftment of BrdU positive cells into the infarct zone, control cardiac fibroblasts or those stably transfected with an SDF-1 expression vector were transplanted into myocardium 4 weeks following LAD ligation. Ten days later, to allow for down-regulation of endogenous SDF-1 expression, G-CSF was administered for 5 days, as was BrdU for 5 days beginning on the final day of G-CSF administration.

Fig. 5(a and b) show the number of (a) BrdU+ cells and (b) CD117+ cells within the infarct zone 4 weeks following transplantation of cardiac fibroblasts stably transfected with or without SDF-1 expression vector with or without G-CSF administration for 5 days following cardiac fibroblast transplantation. Data represent mean ± s.d. of positive cells quantified by

two independent observers blinded to the identity of each animal. n=3-5 per group.

Fig. 5c is a photograph from a SDF-1/G-CSF treated animal stained CD117+. Scale bar represents 25 μM.

Consistent with SDF-1 being sufficient to induce stem cell homing to injured myocardium, in response to G-CSF, hearts transplanted with SDF-1-expressing cardiac fibroblasts revealed a greater than 3-fold increase in the number of BrdU-positive cells throughout the infarct zone. Animals that received control cardiac fibroblasts had a BrdU signal that was no different from control.

Identification of BrdU positive cells

We performed immunofluorescence in order to determine the identity of the BrdU cells within the infarct zone. Antibody staining for CD45 demonstrated that <5% of the BrdU-positive cells in response to cell transplantation and G-CSF administration are leukocytes, respectively. No cardiac myosin-BrdU positive cells were observed within the infarct zone of the animals treated with G-CSF without or with SKMB or cardiac fibroblast transplantation.

Effect of VEGF expressing SKMB and G-CSF on neovascularization and LV function late following MI

Despite an increased number of BrdU-positive cells in the animals that received combined SKMB transplantation and bone marrow stimulation with G-CSF, an increase in the vascular density or increase in the number of cardiac myocytes within the infarct zone was not observed. Therefore, we studied the added effect of VEGF over-expression on SKMB transplantation and G-CSF administration.

Figs. 6(a and b) show that the immunohistochemistry of the infarct zone revealed both BrdU + cells (open arrows) and cardiac myosin-expressing cells (closed arrows) 12 weeks following LAD ligation with cell transplantation of (a) SKMB or (b) VEGF-expressing SKMB followed by stem cell mobilization using G-CSF.

Fig. 6c shows improvement in LV function relative to no treatment control. Data represent mean ± s.d. n=6-8 per group. Scale bar represents 10 μM.

Transplantation of VEGF-165-expressing SKMB 8 weeks following MI resulted in an increased vascular density within the infarct zone compared to saline controls (44.1 ± 5.2 vs. 17.7 ± 2.8 vessels/mm^2; VEGF-165 vs. saline, respectively). Furthermore, the

combination VEGF-165 expression and stem cell mobilization with G-CSF led to repopulation of the infarct zone with cardiac myosin-expressing cells consistent with myocardial regeneration (Fig 6a). The addition of VEGF-165 expression to SKMB also significantly increased LV function as measured by shortening fraction (Fig. 6b). No significant difference was observed in shortening fraction between treatment strategies of transplantation of VEGF-165 expressing SKMB and SKMB transplantation combined with the administration of G-CSF (data not shown).

Methods

LAD Ligation

All animal protocols were approved by the Animal Research Committee, and all animals were housed in the AAALAC animal facility of the Cleveland Clinic Foundation. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital, 50 mg/kg, intubated, and ventilated with room air at 80 breaths per minute using a pressure cycled rodent ventilator (Kent Scientific Corp, RSP1002). Anterior wall MI was induced in 150-175g male Lewis rats by ligation of the left anterior descending (LAD) artery with the aid of a surgical microscope (Leica M500){}.

2D-Echocardiography

2D-echocardiography was performed 5-7 days and 8 weeks following LAD ligation and 4 weeks following SKMB transplantation using a 15-MHz linear array transducer interfaced with a Sequoia C256 (Acuson). Rats were lightly sedated with ketamine (50mg/kg) for each echocardiogram. For quantification of LV dimensions and wall thickness, we digitally recorded 2D clips and m-mode images in a short axis view from the mid-LV just below the papillary muscles allowing for consistent measurements from the same anatomical location in different rats. Measurements were made by two independent blinded observers offline using ProSolve. Each measurement in each animal is made 6 times, from 3 randomly chosen m-mode clips out of 5 recorded by an observer blinded to treatment arm. As a measure of LV function, the shortening fraction was calculated from M-Mode recordings. Shortening fraction (%) = (LVEDD-LVESD)/LVEDD*100, where LVEDD - left ventricular end diastolic dimension and LVESD - left ventricular end systolic dimension. Dimensions were measured between the anterior wall and posterior wall from the short axis view just below the level of the papillary

muscle. In addition, anterior wall thickness was measured at end-diastole.

Cell Preparation and Delivery

Skeletal myoblasts were harvested from the hind limbs of several Lewis rats (Harlan Labs), plated in 175ml culture flask (Falcon), and grown in DMEM including 10% fetal bovine serum, 300mg/l ECGS, and the antibiotics penicillin, streptomycin, and ofloxacin. Cells underwent passaging once 75% confluence was achieved to avoid differentiation. On the day prior to cell transplantation, purified myoblasts were transfected with 108 pfu/ml of replicative deficient adenovirus expressing VEGF-165 or luciferase (control) under control of a CMV promoter. On the day of transplantation, myoblasts were harvested with trypsin, washed extensively in PBS to remove any free viral particles and reconstituted immediately prior to transplantation. Animals were then anesthetized, ventilated and subjected to a lateral thoracotomy for direct visualization of the infarct zone. Approximately 1 x 10(6) cells were injected per animal in 5 locations.

Cardiac fibroblasts were harvested from several adult rat hearts and plated in a similar fashion

to SKMB. SDF-1 from the total RNA retrieved from hearts 24 h after myocardial infarction was cloned into the expression vector PCDNA3.1 (Forward-(NOT-1)-AATAAGAAATGCGGCCGCATGGACGCCAAGGTCGTCGC TGTGCTGGCC; Reverse-(Xba-1)-TCTAGACTTGTTTAAGGCTTTGTCCAGGTACTCTTGGA. Cardiac fibroblasts stably transfected with SDF-1 PCDNA3.1 expression vector were selected with neomycin.

Stem Cell Mobilization

Recombinant human G-CSF (125 ug/kg) was administered via intraperitoneal (i.p.) injection for 5 days beginning on the day of skeletal myoblast transplantation. Complete blood count and differential data (Bayer, ADVIA) were obtained on day 0, 5, 14, and 21 post transplantation. In order to measure the cumulative extent of cell proliferation, 50 mg/kg of BrdU was injected i.p. for 14 days beginning on day 5 to allow for BrdU labeling of any proliferating stem cells induced by G-CSF.

Histologic Analysis

Rats were euthanized, their hearts harvested for analysis 4 weeks following cell transplantation following perfusion fixation with HistoChoice (Amresco Inc., Solon, OH), and sectioned into 3 equal division

perpendicular to the LV long-axis. The mid-ventricular and apical segments were paraffin-embedded and several sections 6 um thick were utilized for immunohistochemistry. Monoclonal antibodies to cardiac myosin (Chemicon), CD45 (Chemicon), Factor VIII (Chemicon), CD117 (Santa Cruz Biotehnology) and BrdU (Vector labs) were utilized. Secondary antibodies either FITC- or biotin-labeled were used. For quantification, five sections within the infarct zone were analyzed for positive cells and vascular density. We were unable to perform CD117 and BrdU double labeling because the HCl treatment in our protocol for BrdU antigen presentation resulted in the expression of a nuclear epitope that three different CD117 antibodies recognized.

PCR Analysis

RT-PCR analysis was performed on total RNA isolated from rat hearts as a function of time after LAD ligation and after SKMB transplantation. Total RNA was extracted from tissue by the guanidine isothiocyanate-cesium chloride method. Primers specific for rat SDF-1 (Forward: TTGCCAGCACAAAGACACTCC; Reverse: CTCCAAAGCAAACCGAA TACAG, expected product 243 base pairs, 40 cycles) were utilized and GAPDH

(Forward: CCCCTGGCCAAGGTCATCCA; Reverse: CGGAAGGCCATGCCAGTGAG, expected product 238 base pairs, 20 cycles). Real time PCR (Perkin-Elmer, ABI Prism 7700) was then used to confirm the increase in expression within infarcted and transplanted hearts using SYBR-green incorporation into the PCR product SDF-1 (Forward: ATGCCCCTGCCGATTCTTTG Reverse: TGTTGTTGCTTTTCAGCCTTGC, expected product 116 base pairs) and GAPDH as above.

Adenoviral Construct

The adenoviral construct encoding VEGF-165 was generous gift from Gen Vec, Inc (Gaithersburg, MD). Briefly, 293 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC CRL. 1573) and were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% calf serum. The E1-,E3-adenovirus vector AdVEGF-165 was generated by linearizing the shuttle vector plasmid at a unique restriction site adjacent to the left end inverted terminal repeat (ITR) and cotransfected into 293 cells with ClaI digested H5d1324 DNA. After two sequential plaque purifications vector stocks were propagated on 293 cells and purified through three sequential bandings on cesium chloride gradients. The purified virus was dialyzed against a

buffer containing 10 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl2 and 3% sucrose and stored at -80 0C until use. The transgene expression is under the control of the cytomegalovirus immediate early promoter.

Statistical Analysis

Data are presented as mean ± SEM. Comparisons between groups were made by Student *t*-test.

Having described the invention, I claim the following:

1. A method of treating infarcted myocardial tissue, the infarcted tissue including a first concentration of SDF-1 protein, peripheral blood of the infarcted tissue including a first concentration of stem cells, said method comprising the steps of:

increasing the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue from the first concentration to a second concentration; and

increasing the concentration of stem cells in the peripheral blood of the infarcted tissue from the first concentration to a second concentration, said concentration of stem cells in the peripheral blood being increased while the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue is increased.

2. The method of claim 1 wherein the step of increasing the number of stem cells comprises administering an agent that causes the stem cells to mobilize from bone marrow to the peripheral blood.

3. The method of claim 2 wherein the agent that causes the stem cells to mobilize from the bone marrow to the peripheral blood is selected from the group consisting of cytokines, chemokines, and the chematherapeutic agents.

4. The method of claim 3 wherein the agent comprises G-CSF.

5. The method of claim 1 wherein the step of increasing the number of stem cells comprises injecting stem cells into the peripheral blood.

6. The method of claim 1 wherein the step of increasing the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue comprises introducing an expression vector into the infarcted tissue, said expression vector including a nucleic acid encoding for SDF-1 protein.

7. The method of claim 6 wherein the vector includes a tissue specific promoter directed to myocardial tissue.

8. The method of claim 7 wherein the vector includes a tissue specific promoter directed to cardiomyocytes.

9. The method of claim 1 wherein the step of increasing the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue comprises introducing cells that have been cultured ex vivo into the infarcted tissue.

10. The method of claim 9 wherein said cells comprise autologous cells that have been harvested from the subject to be treated prior to culturing.

11. The method of claim 10 wherein said cells introduced into said infarcted tissue are transfected with an expression vector prior to being introduced into said infarcted tissue, said expression vector including a nucleic acid encoding for SDF-1 protein.

12. The method of claim 10 wherein said infarcted tissue includes a first concentration of VEGF and further comprising the step of increasing the concentration of VEGF in the infarcted tissue from said first concentration to a second concentration while the

concentration of SDF-1 in the infarcted tissue is increased.

13. The method of claim 12 wherein the step of increasing the concentration VEGF in the infarcted tissue comprises introducing an agent into cells of the infarcted tissue.

14. The method of claim 12 wherein the step of increasing the concentration of VEGF in the infarcted tissue comprises introducing an expression vector into the infarcted tissue, said expression vector including a nucleic acid encoding for VEGF.

15. The method of claim 14 wherein the vector includes a tissue specific promoter directed to myocardial tissue.

16. The method of claim 15 wherein the vector includes a tissue specific promoter directed to cardiomyocytes.

17. The method of claim 12 wherein the step of increasing the concentration of VEGF in the infarcted tissue comprises introducing cells into the infarcted tissue, said cells being transfected with an expression vector prior to being introduced into said infarcted tissue, said expression vector including a nucleic acid encoding for VEGF.

18. The method of claim 17 wherein said cells transfected with an expression vector encoding for VEGF are the same cells introduced into the infarcted tissue to increase the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue.

19. A method of treating a infarcted myocardial tissue, said infarcted tissue including at a time remote from myocardial infarction a first concentration of SDF-1 protein and a first concentration of VEGF, said method comprising the steps of:

increasing the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue from the first concentration to a second concentration substantially greater than said first concentration;

increasing the concentration of VEGF in the infarcted tissue from the first concentration to a second concentration substantially greater than the first concentration;

administering an agent that mobilizes stem cells from bone marrow to the peripheral blood of the infarcted tissue, said stem cells being mobilized from the bone marrow to the peripheral blood while the concentrations of SDF-1 and VEGF in the infarcted tissue are increased.

20. The method of claim 19 wherein the step of increasing the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue comprises introducing cells into the infracted tissue that have been cultured ex vivo.

21. The method of claim 20 wherein said cells introduced into said infarcted tissue are transfected with an expression vector prior to being introduced into said infarcted tissue, said expression vector including a nucleic acid encoding for SDF-1 protein.

22. The method of claim 20 wherein the step of increasing the concentration of VEGF in the infarcted tissue comprises introducing cells into the infarcted tissue, said cells being transfected with an expression vector prior to being introduced into said infarcted tissue, said expression vector including a nucleic acid encoding for VEGF.

23. The method of claim 22 wherein said cells transfected with an expression vector encoding for VEGF are the same cells introduced into the infarcted tissue to increase the concentration of SDF-1 in the infarcted tissue.

Fig. 1a

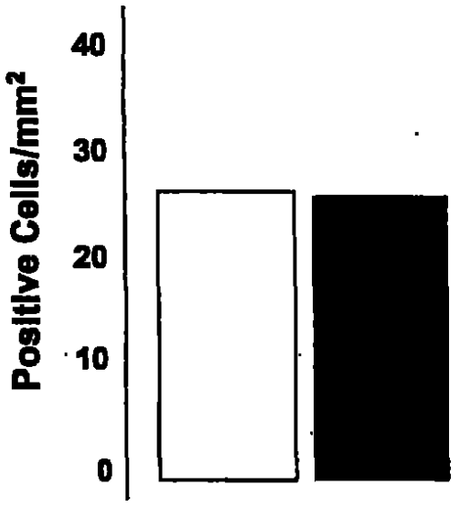

Positive Cells/mm²
40
30
20
10
0

Fig. 1b

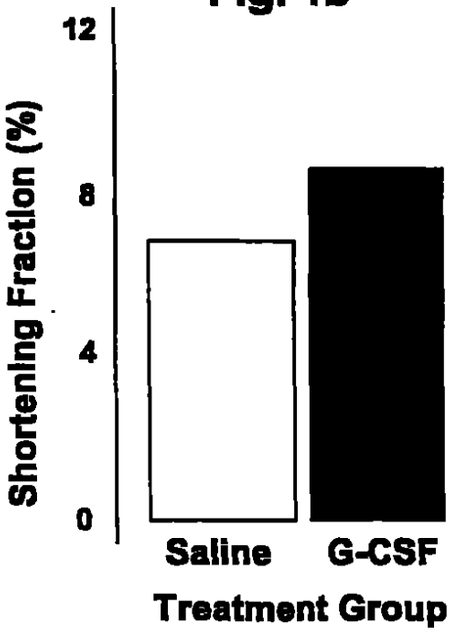

Shortening Fraction (%)
12
8
4
0
Saline
G-CSF
Treatment Group

Fig. 2a

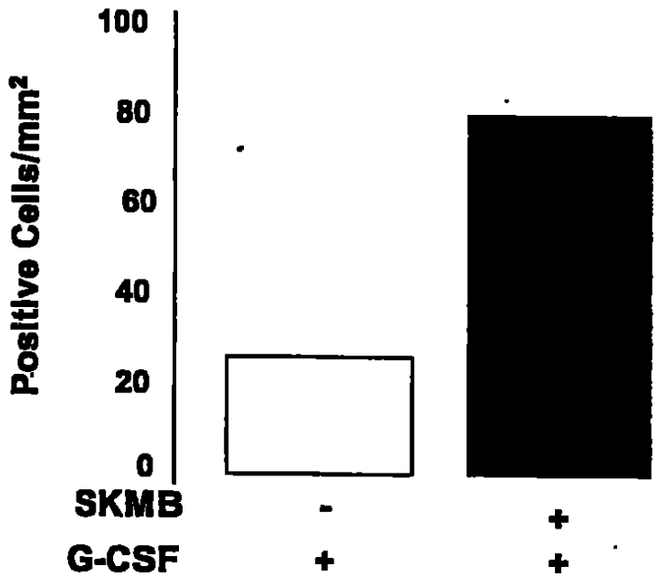

Positive Cells/mm²
100
80
60
40
20
0
SKMB
G-CSF
-
+
+
+

Fig. 2b

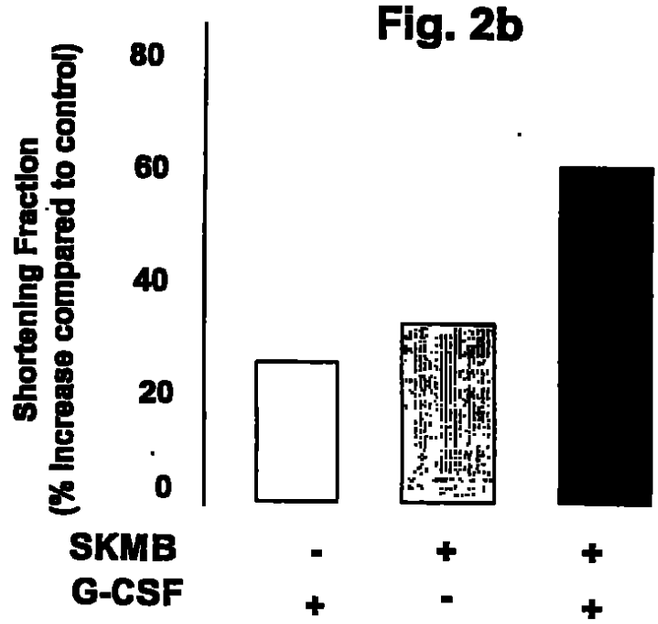

Shortening Fraction
(% Increase compared to control)
80
60
40
20
0
SKMB
G-CSF
-
+
+
+
-
+

Fig.3a



Fig.3b

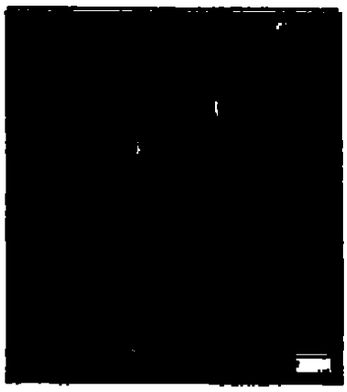


Fig. 3c

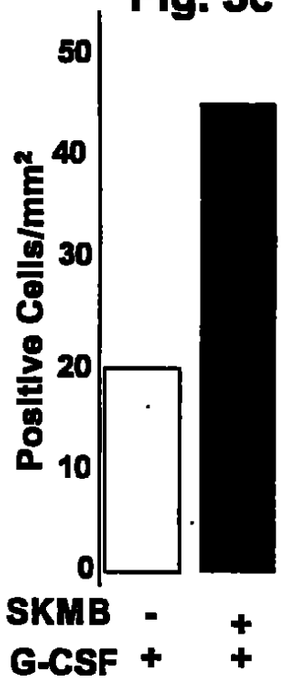


Fig. 4

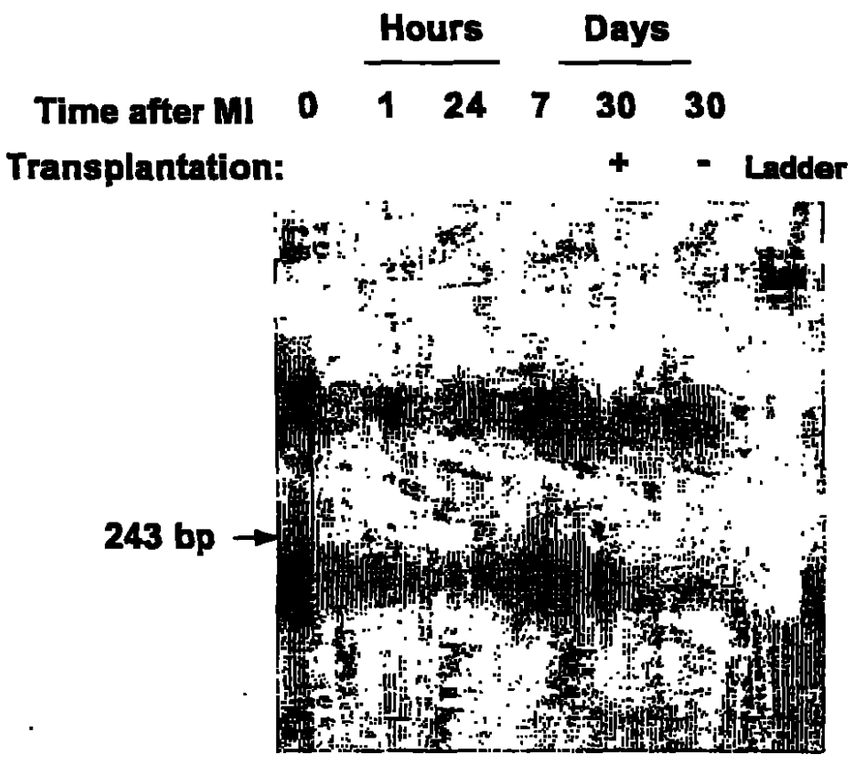

Hours
Days
Time after MI 0 1 24 7 30 30
Transplantation: + - Ladder
243 bp

Fig. 5a

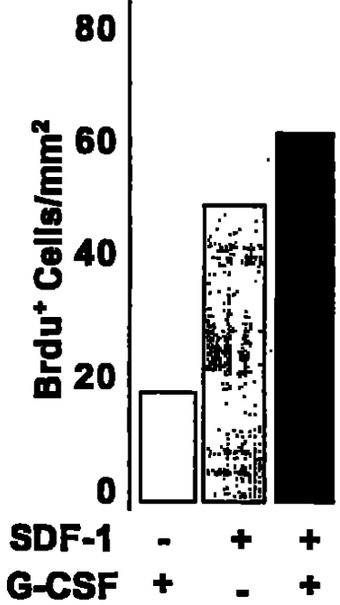


Fig. 5b

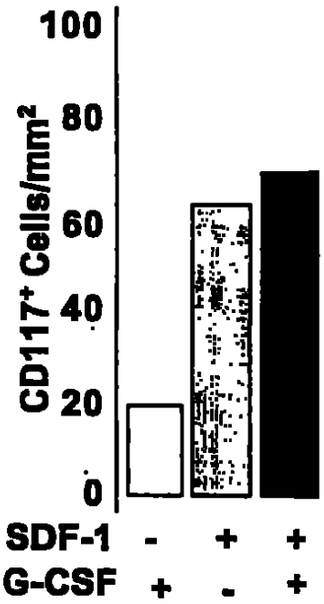


Fig. 5c



Fig. 6a

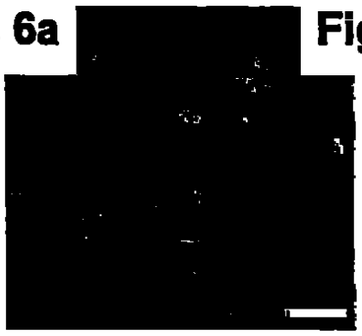


Fig. 6b

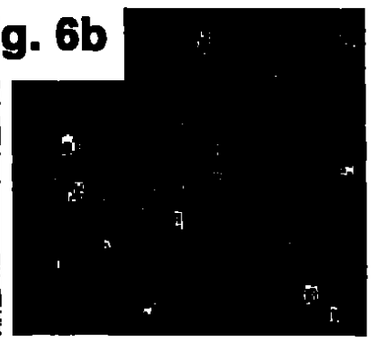
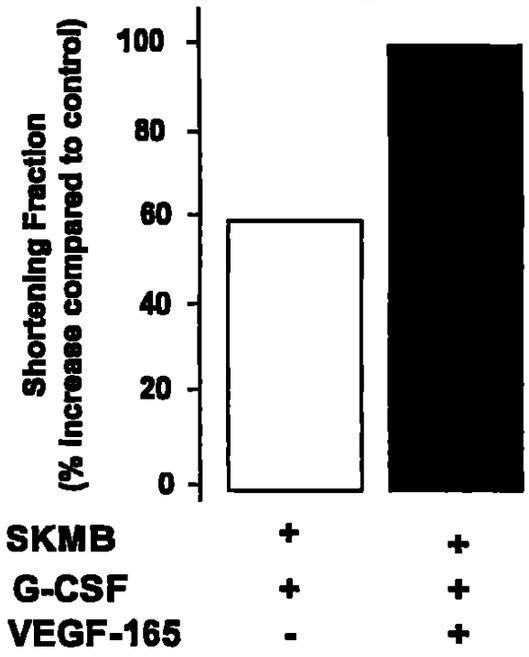


Fig. 6c



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/26013

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
APS, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS
Search terms: SDF-1, stem cell, homing, myocardial, cardiomyopathy, infarcted, vector, mobilization

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/26013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 31/70, 48/00, 45/00; A01N 63/00; C12N 15/63, 5/00, 5/08
US CL : 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/45775 A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER) 16 September 1999 (16.09.1999), see the entire document, particularly pages 4-12 and page 15, lines 1-10.	1-23
X	US 2002/0061587 A1 (ANVERSA) 23 May 2002 (23.05.2002), see the entire document, particularly pages 4 and 10-13.	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 November 2003 (04.11.2003)	12 DEC 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Qunig Nguyen, Ph.D. Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Oficina Internacional

WIPO - OMPI

PCT

(43) Fecha de Publicación Internacional: 4 de marzo de 2004 (4-03-04)

(10) Publicación Internacional Número: WO 2004/017978 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: A61K 31/70, 48/00, 45/00, A01N 63/00, C12N 15/63, 5/00, 5/08

(21) Solicitud Internacional Número: PCT/US2003/26013

(22) Fecha de Presentación Internacional: 21 de agosto de 2003 (21/08/2003)

(25) Idioma de Presentación: inglés

(26) Idioma de Publicación: inglés

(30) Datos de la Prioridad:

60/405.274 22 de agosto de 2002 (22-08-2002) US

10/426.712 30 de abril de 2003 (30-04-2003) US

(71) Solicitante THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION [Estados Unidos/Estados Unidos]; 9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44195 (Estados Unidos).

(72) Inventores: PENN, Marc S.; 26091 Shaker Boulevard, Shaker Heights, Ohio 44122 (Estados Unidos). ASKARI, Arman T., 2421 Traymore Road, University Heights, Ohio 44118 (Estados

Unidos). KIEDROWSKI, Matthew, 5924 N. Mayflower Drive, Lorain, Ohio 44053 (Estados Unidos).

(74) Agente: WESORICK, Richard S., Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino LLP, Oficina 1111, 526 Superior Avenue, Cleveland, Ohio 44114 (Estados Unidos).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

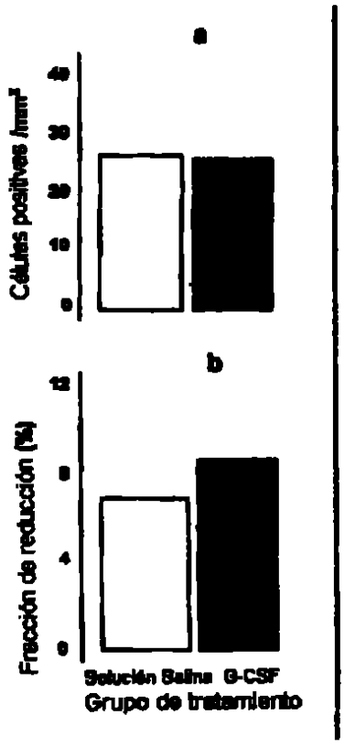
(84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente de Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado: con informe de búsqueda internacional

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, recurra a las "Notas de Guía acerca de Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada emisión regular del Boletín del PCT.

(54) Título: FACTOR DERIVADO DE LA CÉLULA ESTROMAL QUE MEDIA LA ALBERGA LA CÉLULA MADRE Y LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS EN LA CARDIOMIOPATÍA ISQUÉMICA

(57) Resumen: Método para tratar tejidos de miocardio infartado que incluye, la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado. Se incrementa la concentración de las células madre en la sangre periférica del tejido infartado. El número de células madre en la sangre periférica es incrementada mientras que la concentración de SDF-1 en el tejido infartado es incrementada.



Factor derivado de la célula estromal que media la alberga la célula madre y la regeneración de tejidos en la cardiomiopatía isquémica

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con un método para la regeneración de tejidos en cardiomiopatía isquémica y particularmente se relaciona con un método para tratar cardiomiopatía isquémica en un tiempo remoto (es decir, semanas)desde el infarto de miocardio.

Antecedente de la Invención

El infarto agudo de miocardio (IM) continúa siendo la causa principal de morbosidad y mortalidad en la sociedad occidental. A pesar de que hay avances terapéuticos que apuntan predominantemente a restaurar la perfusión en la arteria relacionada con el infarto, se ha encontrado un "estancamiento". Topol, E.J. Lancet 357, 190-1914 (2001). Una gran cantidad de pacientes que han sufrido de infarto agudo de miocardio (IM) en última instancia padece insuficiencias coronarias congestivas (ICC) en gran parte como resultado de la reconstrucción del

ventrículo izquierdo (VI), un proceso que incluye debilitamiento de miocardio, dilatación, función disminuida, llevando en última instancia a la muerte. Robbins, M.A. & O´ Connell, J.B., pp. 3-13 (Lippincott- Raven, Philadelphia, 1998). Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J. & Braunwald, E. Am. J. Physiol 260, H1406-H1414 (1991). Pfeffer, M.A. & Braunwald, E. Circulation 81, 1161-1172 (1990).

Un método para tratar este proceso seguido de infarto de miocardio incluye celuloterapia. Penn, M.S. et al. Prog. Cardiovasc. Dis. 45, 21-32 (2002). El transplante ha sido enfocado utilizando una variedad de tipos de células incluyendo células diferenciadas, como mioblastos óseos, miocitos cardíacos, células de músculo liso, y fibroblastos, o células derivadas de la médula ósea. Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H. & Field, L.J. J. Clin. Invest 92, 1548-1554 (1993). Taylor, D.A. et al. Nat Med. 4, 929-933 (1998). Jain, M. et al. Circulation 103, 1920-1927 (2001). Li. R.K. et al. Ann. Torca. Surg. 62, 654-660 (1996). Etzion, S. et al. J. Mol. Cell Cardiol. 33, 1321-1330 (2001). Li. R.K., Jia, Z.Q., Weisel, R.D., Merante, F& Mickle, D.A. J. Mol. Cell Cardiol. 31, 513-522 (1999). Yoo, K.J. et al. Yonsei Med. J. 43, 296-303 (2002). Sakai, T. et al. Ann. Torca. Surg. 68, 2074-2080 (1999). Sakai, T. et al. J. Torca.

Cardiovasc. Surg. 118, 715-724 (1999). Orlic, D. et al. Nature 410, 701-724 (2001). Tomita, S. et al. J. Torca. Cardiovasc. Surg. 123, 1132-1140 (2002).

En la literatura se sugiere que la movilización de la célula madre al corazón y que la diferenciación en miocitos cardíacos es un proceso que se produce naturalmente. Jackson, K.A. et al. J. Clin, Invest 107, 1395-1402 (2001). Quaini, F. Et al. N. Engl. J. Med. 346-5-15 (2002). Este proceso sucede en un promedio incapaz de dar como resultado una recuperación importante de la función del ventrículo izquierdo continuando con infarto de miocardio. Recientemente, estudios han demostrado la posibilidad de regenerar el miocardio dañado, ya sea a través de inyección directa de células madres en el torrente sanguíneo, o mediante movilización química de las células madre de la médula ósea antes del infarto de miocardio. Estos estudios han demostrado la capacidad de las células madre para albergarse en la zona del infarto en el período peri-infarto, así como también se ha demostrado la habilidad de dichas células para luego diferenciarse en los miocitos cardíacos. Kocher, A.A. et al. Nat. Med. 7, 430-436 (2001). Orlic. D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 98, 10344-10349 (2001). Peled, A. et al. Blood 95, 3289-3296 (2000). Yong, K. et al. Br. J. Haematol. 107, 441-449

(1999). Hasta la fecha, todos los estudios se han enfocado en la habilidad de las células madre para regenerar miocardio en 48 horas luego del infarto de miocardio.

Resumen de la Invención

Un aspecto de la presente invención se relaciona con un método para tratar tejido infartado. El tejido infartado incluye una primera concentración de proteína SDF-1. La sangre periférica de tejido infartado incluye una primera concentración de células madre. En el método, la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado puede ser incrementada desde la primera concentración hacia una segunda concentración. La concentración de las células madre en la sangre periférica puede ser aumentada mientras que la concentración de SDF-1 en el tejido infartado es disminuida.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el número de células madre puede aumentar ya sea administrando un agente que hace que las células madre se movilicen desde la médula ósea hacia la sangre periférica o inyectando células madre en la sangre periférica. En una incorporación preferida de la presente invención, el agente que hace que las células madre se

movilicen desde la médula ósea hacia la sangre periférica puede ser seleccionado del grupo formado por citocinas, quimosinas, y agentes quimioterapéuticos. En una incorporación más preferida de la presente invención, el agente comprende factor de estimulación de colonia de granulocitos (G-CSF).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado puede ser incrementada introduciendo un vector de expresión en el tejido infartado. El vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica la proteína SDF-1. Opcionalmente, el vector de expresión puede incluir un promotor específico de tejido dirigido al tejido de miocardio y, preferentemente, a cardiomiocitos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado puede ser incrementada introduciendo células en el tejido infartado que han sido cultivadas ex vivo. Las células que han sido cultivadas ex vivo pueden comprender células derivadas de sí mismas que pueden ser obtenidas del paciente a ser tratado.

En otro aspecto de la presente invención, las células que son introducidas en el tejido infartado pueden ser transfectadas con un vector de expresión antes de ser introducidas en el tejido infartado. El vector de expresión puede incluir un ácido nucleico que codifica la proteína SDF-1.

En otro aspecto de la presente invención, el tejido infartado tiene una primera concentración del FCEV. La concentración del FCEV en el tejido infartado puede ser incrementada desde una primera concentración hacia una segunda concentración. La concentración del FCEV en el tejido infartado puede ser incrementada mientras que la concentración de SDF-1 en el tejido infartado es disminuida.

En otro aspecto, la concentración del FCEV en el tejido infartado es aumentada introduciendo en el tejido infartado un vector de expresión, que codifica FCEV. Opcionalmente, el vector de expresión puede incluir un promotor específico de tejido dirigido al tejido de miocardio, y preferentemente, cardiomiocitos.

En otro aspecto, la concentración del FCEV en el tejido infartado puede ser incrementada introduciendo en el tejido

infartado células que son transfectadas con un vector de expresión. El vector de expresión puede incluir un ácido nucleico que codifica FCEV. Las células transfectadas con un vector de expresión incluyendo un ácido nucleico que codifica FCEV pueden ser las mismas células introducidas en el tejido infartado para incrementar la concentración de SDF-1 en el tejido infartado.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para tratar tejido de miocardio infartado en un tiempo remoto del infarto de miocardio. El tejido infartado puede incluir una primera concentración de proteína SDF-1 en una primera concentración del FCEV. En el método, la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado puede ser incrementada desde la primera concentración hacia una segunda concentración sustancialmente mayor que la primera concentración. La concentración del FCEV en el tejido infartado puede ser incrementada desde la primera concentración hacia una segunda concentración sustancialmente mayor que la primera concentración. Un agente puede ser administrado el cual moviliza las células madre desde la médula ósea hasta la sangre periférica del tejido infartado. Las células madre pueden ser movilizadas desde la médula ósea hacia la sangre periférica mientras que las

concentraciones de SDF-1 y FCEV en el tejido infartado pueden ser incrementadas.

En otro aspecto, la concentración de proteína SDF-1 en el tejido infartado puede ser incrementada introduciendo en el tejido infartado células que han sido cultivadas ex vivo. Las células introducidas en el tejido infartado pueden ser transfectadas con un vector de expresión antes de ser introducidas en el tejido infartado. El vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica la proteína SDF-1.

En otro aspecto, la concentración del FCEV en el tejido infartado puede ser incrementada introduciendo células en el tejido infartado. Las células pueden ser transfectadas con un vector de expresión antes de ser introducidas en el tejido infartado. El vector de expresión puede incluir un ácido nucleico que codifica FCEV. Las células transfectadas con un vector de expresión que codifica FCEV pueden ser las mismas células introducidas en el tejido infartado para aumentar la concentración de SDF-1 en el tejido infartado.

Breve descripción de las figuras

Otras características de la presente invención serán obvias para aquellos expertos en la materia a la cual se refiere dicha invención leyendo la siguiente descripción de la invención con referencia a las figuras que acompañan:

Las Figuras 1 (a y b) son gráficos que muestran, respectivamente, el número de células positivas-BrdU en la zona infartada (a) y reducción de fracción (b) 4 semanas después de administración de solución salina o G-CSF (12 semanas después de ligadura LAD).

Las Figuras 2 (a y b) son gráficos que muestran el efecto de transplante de mioblasto óseo (SKMB) en conteo celular + BrdU en la zona infartada 4 semanas después del transplante celular (12 semanas después de ligadura LAD).

Las Figuras 3 (a y b) son fotografías que muestran (a) médula ósea de color BrdU y (b) miocardio no tratado luego de 5 días de administración de BrdU.

La Figura 3c es un gráfico que muestra las células BrdU+ aumentadas en la zona infartada evaluada con la terapia de acuerdo con la presente invención.

La Figura 4 es una fotografía que muestra RT-PCR revelando la expresión del factor-1 derivado estromal (SDF-1) como una función de tiempo seguido por infarto de miocardio.

Las Figuras 5 (a y b) son gráficos que muestran el número de células (a) BrdU+ y (b) células CD117+ en la zona infartada 4 semanas seguido por el transplante de fibroblastos cardíacos establemente transfectadas con o sin el vector de expresión SDF-1 con o sin la administración de G-CSF durante 5 días siguiendo con transplante de fibroblasto cardíaco.

La Figura 5c es una fotografía desde SDF-1/ G-CSF tratada con CD117+ animal.

Las Figuras 6 (a y b) son fotografías que muestran la inmunohistoquímica e la zona infartada revelando tanto las células BrdU+ como las células que expresan miosina cardiaca 12 semanas siguiendo con ligadura LAD con el transplante celular de (a) SKMB o (b) SKMB que expresa EGF seguido por movilización de célula madre utilizando G-CSF.

La Figura 6c es un gráfico que muestra mejoras en la función del ventrículo izquierdo con relación a la celuloterapia sin sobre expresión del FCEV.

Descripción de las incorporaciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos médicos utilizados en la presente tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente cualquier experto en la materia a la cual la presente invención pertenece. Las definiciones comúnmente entendidas de los términos de biología molecular pueden ser encontrados, por ejemplo, en Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th Edition, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.

Se describen en la presente métodos que incluyen técnicas de biología molecular convencionales. Dichas técnicas son generalmente conocidas en la materia y se describen en detalle en los tratados de metodología, como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al.,

428

Greene Publishing and Wiley- Interscience, New York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Se discuten métodos para síntesis química de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Beaucage and Carruthers, Tetra. Letts. 22:1859-1862, 1981, y Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103-3185, 1981. Se pueden realizar síntesis químicas de ácidos nucleicos, por ejemplo, en sintetizadores de oligonucleótidos automatizados comerciales. Se describen métodos inmunológicos (por ejemplo, preparación de anticuerpos específicos de antígeno, inmunoprecipitación e inmunotransferencia), por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, ed. Coligan et al., John Wiley & Sons, New York, 1991; and Methods of Immunological Análisis, ed. Masseyeff et al., Jon Wiley & Sons, New York, 1992. Métodos convencionales de transferencia de genes y terapia de genes pueden ser adaptados para el uso en la presente invención. Véase por ejemplo, Gene Therapy: Principles and Applications, ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), ed. P.D. Robbins, Humana Press, 1997; y Retro-cvectors for Human Gene Therapy, ed. C.P. Hodgson, Springer Verlag, 1996.

La presente invención se relaciona con un método de regeneración de miocardio en regiones isquémicas del corazón (o

músculo óseo en el caso de tejido vascular periférico). El método de la presente invención puede ser utilizado para tratar cardiomiopatía isquémica en un tiempo remoto (es decir, semanas) desde el infarto de miocardio.

El método incluye movilizar y dirigir migración de células madre pluripotentes hacia el miocardio infartado en un mamífero. El paciente puede ser cualquier mamífero, como por ejemplo, seres humanos, ratas, ratones, gatos, perros, cabra, ovejas, caballos, monos, simios, conejos, ganado, etc. El mamífero puede encontrarse en cualquier estado de desarrollo, incluyendo adultos, jóvenes o recién nacidos. También se pueden incluir aquellos mamíferos que se encuentran en estado fetal de desarrollo.

El miocardio infartado puede incluir el tejido de miocardio infartado, el tejido de miocardio en la periferia del tejido de miocardio infartado, y tejido de miocardio infartado y el tejido de miocardio en la periferia del tejido de miocardio infartado.

En un tiempo remoto desde el infarto de miocardio, un primer número de células madre pluripotentes fluyen en el miocardio infartado. Este primer número de célula madre puede ser

incrementado de manera tal que un mayor número de células madre fluye en el miocardio infartado. Incrementando el número de células madre que fluyen en el miocardio infartado, el tejido de miocardio infartado puede ser regenerado porque habrá un mayor número de células madre pluripotentes en el miocardio afectado que puede diferenciarse en células, que pueden poblar (es decir, injertar) y restaurar parcial o totalmente la función normal del miocardio infartado.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el método incluye el paso de inducir células madre pluripotentes para albergar el miocardio infartado para regenerar dicho miocardio infartado. Las células madre pluripotentes descriptas en la invención son cualquier célula que puede ser inducida para diferenciarse de otro tipo de célula. Otro ejemplo incluye células madre hematopoiéticas que pueden ser diferenciadas de las células cardiomiocitos.

Las células madre pluripotentes pueden ser albergadas en el miocardio infartado incrementando la concentración de la proteína en el miocardio infartado desde una primera concentración hacia una segunda concentración. La primera concentración de proteína SDF-1 puede ser la concentración de proteína SDF-1 comúnmente

246
431

encontrada en un miocardio infartado en un tiempo remoto (es decir, semanas) desde el infarto de miocardio. La segunda concentración de proteína SDF-1 puede ser sustancialmente mayor que la primera concentración de proteína SDF-1. La concentración de proteína SDF-1 puede ser incrementada en el miocardio infartado mediante la regulación de la expresión de la proteína SDF-1 en el miocardio infartado en un tiempo remoto desde el infarto de miocardio.

El método de la presente invención además incluye el paso de incrementar la concentración (es decir, número) de células madre en la sangre periférica desde una primera concentración hacia una segunda concentración sustancialmente mayor que la primera concentración. La primera concentración de las células madre puede ser la concentración de las células madre comúnmente encontradas en la sangre periférica en un tiempo remoto desde el infarto de miocardio. La concentración de las células madre en la sangre periférica en puede ser incrementada mientras que la concentración de la proteína SDF-1 en el miocardio infartado disminuye. La concentración de las células madre en la sangre periférica puede ser incrementada, ya sea, antes o después de que la expresión de proteína SDF-1 es regulada en el miocardio infartado.

La proteína SDF-1 expresada por el miocardio infartado induce a las células madre en la sangre periférica hacia el miocardio infartado. Las células madre inducidas hacia el miocardio infartado facilitan la regeneración del tejido infartado y proporcionan un aumento importante en la función del ventrículo izquierdo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el método puede también incluir el paso de aumentar la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV)en el miocardio infartado de la sangre periférica desde una primera concentración hacia una segunda concentración sustancialmente mayor que la primera concentración. La primera concentración del FCEV en el miocardio infartado es la concentración de las células madre comúnmente encontradas en el miocardio infartado en un tiempo remoto desde el infarto de miocardio. La concentración del FCEV puede ser incrementada en el miocardio infartado mediante regulación de la expresión de la proteína del FCEV en el miocardio infartado desde la suma del FCEV comúnmente expresado en el miocardio infartado en un tiempo remoto desde el infarto de miocardio.

La concentración de FCEV en el miocardio infartado puede incrementarse mientras que se incremente tanto la concentración de la proteína SDF-1 en el miocardio infartado como la concentración de células madre en la sangre periférica. El aumento de la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular en el miocardio infartado en combinación con el aumento en la concentración de la proteína SDF-1 en el miocardio infartado y el aumento en la concentración de células madre en la sangre periférica eleva la densidad vascular dentro del miocardio infartado en comparación con los controles de solución salina. Mas aún, esta combinación condujo a la repoblación del miocardio infartado con células que expresan la miosina cardiaca así como también a un incremento en la función ventricular izquierda cuando se la medía mediante una fracción de reducción.

Proteína SDF-1

De acuerdo con uno de los aspectos de la presente invención, la proteína SDF-1 (o polipéptido SDF-1) que se expresa en el miocardio infartado, puede ser producto de la expresión de un gen SDF-1. Se conoce la secuencia de aminoácido de un número o de diferentes proteínas SDF-1 de mamífero, incluyendo las ratas, los humanos, el ratón, y el gato. La proteína SDF-1 puede tener una

secuencia de aminoácido idéntica a la de las proteínas SDF-1 de los mamíferos nativos anteriores.

La proteína SDF-1 de la presente invención puede también ser una variante de proteína SDF-1 de mamífero, así como un fragmento, análogo y derivado de la proteína SDF-1 de mamífero. Tales variantes incluyen, por ejemplo, un polipéptido codificado por una variante alélica que se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo (es decir, un ácido nucleico que se produce naturalmente que codifica una proteína SDF-1 de mamífero que se produce naturalmente), por un polipéptido codificado por una forma de unión alternativa de un gen SDF-1 nativo, un polipéptido codificado por un homólogo de un gen SDF-1 nativo y un polipéptido codificado por una variante que no se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo.

Las variantes de la proteína SDF-1 tienen una secuencia de péptidos que difiere de la proteína SDF-1 nativa en uno o más aminoácidos. La secuencia de péptidos de tal variante puede figurar una supresión, adición o sustitución de uno o más aminoácidos de una proteína SDF-1. Las inserciones de aminoácidos son preferentemente de alrededor de 1 a 4 aminoácidos contiguos, y las supresiones son preferiblemente de alrededor de 1 a 10

aminoácidos contiguos. La variante de las proteínas SDF-1 mantiene substancialmente una actividad funcional en la proteína SDF-1 nativa. Las variantes preferidas de la proteína SDF-1 pueden generarse mediante la expresión de las moléculas de ácido nucleico dentro de la invención que muestra cambios silenciosos o conservadores.

Los fragmentos de proteína SDF-1 que corresponden a uno o más temas y/o dominios particulares o a tamaños arbitrarios, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Las porciones de peptídicas aisladas de las proteínas SDF-1 pueden ser obtenidas mediante la revisión de los péptidos producidos por recombinación del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifique tales péptidos. Más aún, los fragmentos pueden ser sintetizados químicamente mediante la utilización de técnicas conocidas en la materia tales como la convencional fase f-Moc o t-Boc sólida Merrifield. Por ejemplo, una proteína SDF-1 de la presente invención puede ser arbitrariamente dividida en fragmentos de la longitud deseada sin ninguna coincidencia en los fragmentos, o dividida preferiblemente en fragmentos que coincidan y de una longitud deseada. Los fragmentos pueden ser producidos por recombinación y testeados para identificar a

aquellos fragmentos de péptidos que pueden funcionar como agonistas de la proteína SDF-1 nativa.

Las variantes de la proteína SDF-1 pueden también incluir fórmulas recombinantes de las proteínas SDF-1. Los polipéptidos recombinantes preferidos por la presente invención, en adición a la proteína SDF-1, son codificados por un ácido nucleico que puede tener al menos una identidad de secuencia del 85% con la secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica la proteína SDF-1 de un mamífero.

Las variantes de la proteína SDF-1 pueden incluir fórmulas agonísticas de una proteína que expresa constitutivamente las actividades funcionales de una proteína SDF-1 nativa. Otras variantes de la proteína SDF-1 pueden incluir aquellas que son resistentes a la división proteolítica, como por ejemplo, como consecuencia de las mutaciones, que alteran las secuencias diana de proteasa. Pronto se determinará si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido resulta en una variante con una o más actividades funcionales de una proteína SDF-1 nativa, mediante la evaluación de la variante por una actividad funcional en una proteína SDF-1 nativa.

Ácidos nucleicos

Otro aspecto de la presente invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifica una proteína SDF-1 y ácidos nucleicos no nativos que codifican una proteína SDF-1. Tales moléculas de ácido nucleico pueden presentarse tanto como ARN o ADN (por ejemplo, cADN, ADN genómico, y ADN sintético). El ADN puede ser de cadena doble o de cadena simple, y si es de cadena simple puede estar en la cadena de codificación (sentido) o en la cadena de no-codificación (antisentido). La secuencia de codificación que codifica una proteína SDF-1 puede ser idéntica a la secuencia de nucleótido exhibida en GenBank Accession Number AF189724, GenBank Accession Number AF209976, GenBank Accession Number L120029, GenBank Accession Number NM022177. También puede ser una secuencia de codificación diferente que, como consecuencia de la redundancia o la degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido como tales polinucleótidos.

Otras moléculas de ácido nucleico que codifican SDF-1 dentro de la invención son variantes de una SDF-1 nativa, como aquellas que codifican fragmentos, análogos y derivados de una proteína SDF-1 nativa. Tales variantes pueden ser, por ejemplo, una

variante alélica que se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo, un homólogo de un gen SDF-1 nativo o una variante que no se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo. Estas variantes poseen una secuencia de nucleótido que difiere de un gen SDF-1 en una o más bases. Por ejemplo, la secuencia de nucleótido de tales variantes puede figurar una supresión, una adición o una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen SDF-1 nativo. Las inserciones de ácido nucleico son preferiblemente de entre 1 a 10 nucleótidos contiguos, y las supresiones son preferiblemente de entre 1 a 10 nucleótido contiguos.

En otras aplicaciones, las proteínas SDF-1 de la variante que manifiestan cambios sustanciales en su estructura pueden generarse mediante sustituciones de nucleótidos que provocan nada menos que cambios conservadores en el polipéptido codificado. Ejemplos de tales sustituciones de nucleótidos pueden ser aquellos que provocan cambios en (a) la estructura de la columna vertebral del polipéptido; (b) el cambio o la hidrofobicidad del polipéptido; o (c) la mayor parte de la cadena secundaria del aminoácido. Las sustituciones de nucleótidos que generalmente se prevé que produzca los cambios más significativos en las propiedades proteínicas son aquellas que producen cambios no conservadores en los codones. Aquellos ejemplos en los que los

cambios de codones probablemente provoquen la sustitución de (a) un residuo hidrofílico, como la serina o la treonina, por (o mediante) un residuo hidrofóbico, como la leucina, la isoleucina, la fenilalanina, valina o alanina; (b) cisteína o prolina para (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo con una cadena secundaria electropositiva, como la lisina, la arginina o la histidina, para (o por) un residuo electronegativo, como la glutamina o la aspartina; o (d) un residuo con una cadena secundaria, como la fenilalanina, para (o por) uno que no posea una cadena secundaria, como la glicina.

Las variantes alélicas que se producen naturalmente de un gen SDF-1 nativo dentro de la invención son ácidos nucleicos aislados del tejido del mamífero con al menos una identidad de secuencia del 75 % con un gen SDF-1 nativo, y codifican polipéptidos que tienen una similitud estructural en relación con la proteína SDF-1 nativa. Los homólogos a un gen SDF-1 nativo dentro de la invención son ácidos nucleicos aislados de otras especies que tienen una identidad de secuencia de al menos un 75 % con un gen nativo, y codifican polipéptidos que tienen una similitud estructural en relación con la proteína SDF-1 nativa. Se pueden buscar las bases de datos públicas o registradas de ácidos nucleicos a fin de identificar otras moléculas de ácidos

nucleicos con un elevado porcentaje (del 70 % o más) de identidad de secuencia para un gen SDF-1 nativo.

Las variantes del gen SDF-1 que no se producen naturalmente son ácidos nucleicos que no se producen naturalmente (son producidos por la mano del hombre), tienen al menos una identidad de secuencia del 75 % con un gen SDF-1 nativo, y codifican polipéptidos que tienen una similitud estructural en relación con la proteína SDF-1 nativa. Podemos mencionar como ejemplos de variantes de genes SDF-1 que no se producen naturalmente, a aquellos que codifican un fragmento de la proteína SDF-1 nativa, aquellos que hibridizan a un gen SDF-1 nativo o a un complemento a un gen SDF-1 nativo bajo condiciones rigurosas, aquellos que comparten al menos un 65% de la identidad de secuencia con un gen SDF-1 nativo o un complemento de un gen SDF-1 nativo, y aquellos que codifican una proteína de fusión SDF-1.

Los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un proteína SDF-1 nativa incluidos en esta invención son aquellos que codifican los residuos de ácido nucleico de una proteína SDF-1 nativa. Los oligonucleótidos más cortos que codifican o hibridizan con ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una proteína SDF-1 nativa pueden ser utilizados como sondas,

cebadores o moléculas antisentido. Los oligonucleótidos más largos que codifican o hibridizan con los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una proteína SDF-1 nativa pueden además ser utilizados en diferentes aspectos de la presente invención. Los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una SDF-1 nativa pueden ser utilizados por la digestión enzimática (como la utilización de una enzima de restricción) o por la degradación química del gen SDF-1 nativo de extensión completa de las variantes del mismo.

Los ácidos nucleicos que hibridizan en condiciones rigurosas a uno de los ácidos nucleicos precedentes pueden ser también utilizados en la presente invención. Por ejemplo, incluimos en la presente invención, a aquellos ácidos nucleicos que hibridizan a uno de los ácidos nucleicos precedentes en condiciones de baja rigurosidad, condiciones de rigurosidad moderada, o condiciones de alta rigurosidad.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican a una proteína de fusión SDF-1 pueden también ser utilizadas en la presente invención. Estos ácidos nucleicos pueden ser utilizados para preparar un constructo (como un vector de expresión) que expresa una proteína de fusión SDF-1 cuando es introducida en una célula

diana apropiada. Por ejemplo, tal constructo puede generarse mediante la ligadura de un primer polinucleótido que codifique una proteína SDF-1 fusionada con un segundo polinucleótido que codifique otra proteína, de manera tal que la expresión del constructo en un sistema de expresión apropiado, produzca una proteína de fusión.

Los oligonucleótidos de la presente invención ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena simple o de cadena doble. Tales oligonucleótidos pueden ser modificados en porción de base, porción de azúcar, o columna principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridización, etcétera. Los oligonucleótidos incluidos en la presente invención pueden además incluir otro grupo añadido tales como los péptidos (por ejemplo, para receptores de células diana in vivo), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular, y la división provocada por la hibridización. A tal fin, los oligonucleótidos pueden ser conjugados a otras moléculas, como un péptido, un agente de unión recíproca provocado por la hibridización, un agente de transporte, y un agente de división provocado producido por la hibridización, etc.

Expresión de SDF-1

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la expresión de SDF-1 en el miocardio infartado puede ser sobreregulada mediante el transplante de células biocompatibles sobre el tejido del miocardio infartado. El transplante de células al miocardio infartado sobreregula la expresión de la proteína SDF-1 al miocardio infartado. Se observó una sobreregulación de la proteína SDF-1 en el miocardio infartado después de alrededor de una hora de haberse realizado el transplante de células al miocardio a menos de siete días transcurridos al transplante.

Ejemplos de este tipo de células que se pueden transplantar en un miocardio infartado incluyen células coronarias cultivadas, mioblastos óseos, fibroblastos, células de músculo liso, y células derivadas de médula ósea. Estas células se extraen preferentemente del sujeto que será tratado (células derivadas de sí mismas) y se cultivan con anterioridad al transplante. Se prefiere a las células derivadas de sí mismas a fin de aumentar la biocompatibilidad de las células para el transplante y minimizar la posibilidad de rechazo.

Las células preferidas para un transplante dentro del miocardio infartado son los mioblastos óseos. Los mioblastos mantienen el potencial regenerativo del músculo óseo durante períodos de estrés, se prolifera y diferencia en miotubos, formando finalmente fibras musculares capaces de contraerse. Los mioblastos implantados en el miocardio sufren una formación miotubular, se retira del ciclo celular y permanece viable. Algunos estudios funcionales han demostrado un mejoramiento en la contractilidad regional y resistencia con posterioridad al transplante en el miocardio.

Los mioblastos óseos pueden ser extraídos con rapidez por debajo de la membrana basal de las fibras musculares, luego cultivados hasta ampliar la cadena celular, y finalmente transplantados en el miocardio infartado. Por ejemplo, en un murino, los mioblastos óseos pueden ser extraídos de los miembros traseros del sujeto, luego cultivados y luego transplantados dentro del miocardio infartado del sujeto.

Las células cultivadas pueden ser transplantadas en el miocardio infartado llevando a cabo las técnicas conocidas de transplantes. Por ejemplo, se puede inyectar una suspensión de

266
245
945

células cultivadas utilizando una jeringa de tuberculina sobre el tejido de miocardio infartado.

Alternativamente, la expresión de la proteína SDF-1 puede ser sobreregulada mediante la introducción de un agente en las células diana que eleva la expresión de la proteína SDF-1. Las células diana pueden incluir células que se encuentren dentro del miocardio infartado o células ex vivo, tales como mioblastos óseos derivados de si mismo o fibroblastos, que han sido extraídos del sujeto.

De acuerdo con la presente invención, y como ya se ha detallado anteriormente, el agente puede abarcar ácidos nucleicos naturales o sintéticos, que son incorporados a los constructos del ácido nucleico recombinante, normalmente constructos de ADN, capaces de introducirse y replicarse dentro de la célula. Un constructo semejante incluye preferentemente un sistema de replicación y secuencias capaces de hacer la transcripción y traducción de una secuencia que codifica un polipéptido en una determinada célula diana.

También pueden introducirse otros agentes a las células diana para elevar los niveles de proteína SDF-1 en el tejido

diana. Por ejemplo, los agentes que elevan la transcripción de un gen codificando la proteína SDF-1 elevan la traducción de un mARN codificando la proteína SDF-1, y/o aquellos que disminuyen la degradación de un mARN codificando la proteína SDF-1 podrían utilizarse para elevar los niveles de proteína SDF-1. Elevar el grado de transcripción desde un gen dentro de una célula, es posible si se introduce un promotor exógeno en dirección del gen que codifica la proteína SDF-1. También se pueden utilizar elementos que facilitan la expresión de un gen heterólogo.

Un método preferido para introducir el agente dentro de la célula diana involucra una terapia de genes. La terapia de genes se refiere a una transferencia de genes para expresar un producto terapéutico a partir de una célula in vivo o in vitro. La terapia de genes, de acuerdo con la presente invención, puede utilizarse para expresar la proteína SDF-1 a partir de una célula diana in vivo o in vitro.

Un método de terapia de genes utiliza un vector que incluye un nucleótido que codifica una proteína SDF-1. Un "vector" (al que nos referimos como distribución de genes o "vehículo" de transferencia de genes) se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que contienen un polinucleótido que será enviado a

447

una célula diana, ya sea in vivo o in vitro. El polinucleótido que será enviado puede contener una secuencia de codificación de interés para la terapia de genes. Los vectores incluyen, por ejemplo, vectores virales (tales como los adenovirus ("Ad"), virus asociados con los adenovirus (AAV) y retrovirus), liposomas, y otros complejos que contienen lípidos, y otros complejos macromoleculares capaces de mediar la distribución de un polinucleótido a una célula diana.

Los vectores también pueden contener otros componentes o funcionalidades que modulan más aún la distribución del gen y/o expresión del gen, o que en caso contrario suministran propiedades beneficiosas a las células diana. Tales otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión u objetivo de las células (incluyendo componentes que interfieren en la unión de tipo celular o de tejido específico); componentes que influyen en la respuesta del ácido nucleico vector a través de la célula; componentes que influyen en la localización de un polinucleótido dentro de la célula con posterioridad a la respuesta (tales como agentes que interfieren en la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión de los polinucleótidos. Tales componentes también podrían incluir indicadores, tales como marcadores detectables o

selectivos que pueden utilizarse para detectar o seleccionar células que han tomadas y se encuentran expresando el ácido nucleico entregado por el vector. Estos componentes pueden ser provistos como una característica natural del vector (así como el uso de ciertos vectores virales que tienen componentes o funcionalidades de mediación respecto de la unión y la emisión de una respuesta), o los vectores pueden ser modificados a fin de suministrar tales funcionalidades.

Los marcadores de selección pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores seleccionables positivos permiten la selección de células llevando el marcador, mientras que los marcadores seleccionables negativos permiten que las células lleven el marcador para ser selectivamente eliminado. Se ha descrito una variedad de los genes marcadores, incluyendo los marcadores (positivos - negativos) bifuncionales (ver Lupton, S., WO 92/08796, publicado el 29 de Mayo de 1992; y Lupton, S., WO 94/28143, publicado el 8 de diciembre de 1994). Estos genes marcadores pueden suministrar una medida adicional de control que puede resultar beneficiosa en el contexto de la terapia de genes. Se conoce una gran variedad de estos vectores y generalmente son viables.

Los vectores que se utilizan en la presente invención incluyen vectores virales, vectores basados en lípidos, y otros vectores capaces de distribuir un nucleótido de acuerdo con la presente invención, a las células diana. El vector puede ser un vector diana, en especial un vector diana que preferentemente se una a los cardiomiocitos. Los vectores virales preferidos para su uso en la presente invención, son aquellos que exhiben un bajo grado de toxicidad a una célula diana e induce a la producción de cualidades terapéuticas útiles de la proteína SDF-1 de una forma de tejido específico.

Actualmente los vectores virales que se prefieren del adenovirus (Ad) o virus asociado a adenovirus (AAV). Ambos vectores virales humanos o no humanos pueden utilizarse pero preferentemente el vector viral recombinante no tiene replicación en humanos. Donde el vector es un adenovirus, preferentemente comprende un polinucleótido que lleva un promotor factiblemente unido a un gen que codifica la proteína SDF-1 y no tiene replicación en humanos.

Para el uso en la presente invención se prefiere los vectores del adenovirus ya que ellos (1) son capaces de una expresión altamente eficiente de genes en células diana y (2)

pueden acomodar una cantidad relativamente grande de ADN heterólogo (no viral). Una forma de adenovirus recombinante que se prefiere es un vector de adenovirus "cobarde", "de alta capacidad", o "dependiente de ayuda". Tales características del vector, por ejemplo, (1) la supresión de todas las secuencias de codificación viral, o de la mayoría de ellas (aquellas secuencias que codifican las proteínas virales), (2) la terminal viral invertida repite (ITRs) que son secuencias que se requieren para la replicación de ADN viral, (3) hasta 28-32 kb de secuencias exógenas o heterólogas (como secuencias que codifican una proteína SDF-1), y (4) la secuencia de empaquetamiento de ADN viral que se requiere para empaquetar los genomas virales dentro de cápsidas infectadas. Para las células de miocardio específicamente, las variantes que se privilegian de tales vectores de adenovirus recombinante contienen intensificadores específicos de tejidos (como el cardiomiocito) y promotores operablemente unidos a un gen SDF-1.

Los vectores basados en AAV son beneficiosos, ya que exhiben una elevada eficiencia respecto de la transducción de células diana y pueden integrarse al genoma diana de una forma específica. La utilización de los vectores AAV está discutida en detalle en Tal, J., J. Biomed. Sci. 7: 279-291, 2000 y Monahan

and Samulski, Gene Teraphy 7:24-30, 2000. Un vector AAV preferiblemente comprende un par de repeticiones de terminales AAV invertidas que flanquean al menos un casete que contiene un tejido (por ejemplo, el miocardio)- o célula (por ejemplo, cardiomiocitos) - promotor específico operablemente unido a un ácido nucleico SDF-1. La secuencia de ADN de un vector AAV, incluyendo el ITRs, el promotor y el gen SDF-1 pueden ser integrados al genoma diana.

Otros vectores virales que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención incluyen vectores (HSV) basados en virus de herpes simple. Los vectores HSV eliminados de uno o más genes tempranos inmediatos(IE) son beneficiosos ya que generalmente no son citotóxicos, persisten en un estado similar a la latencia en las células diana, y soportan una transducción eficiente de células diana. Los vectores recombinantes HSV pueden incorporar aproximadamente 30 kb de ácido nucleico heterólogo. El vector HSV que se prefiere es uno que: (1) es construido a partir del HSV de tipo I, (2) tiene sus genes IE borrados, y (3) contiene un promotor de tejido específico (como el miocardio) operablemente unido al ácido nucleico SDF-1. Los vectores amplicon HSV también pueden ser útiles en varios métodos de la invención. Comúnmente, los vectores amplicon HSV tienen

aproximadamente 15 kb de longitud, y poseen un origen viral de secuencias de replicación y empaquetamiento.

Los retrovirus tales como los de tipo C y los lentivirus también podrían ser utilizados en la presente invención. Por ejemplo, los vectores de retrovirus pueden estar basados en virus de leucemia en murinos (MLV). Ver ejemplos en Hu and Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 y Fong et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier syst. 17:1-60, 2000. Los vectores basados en MLV pueden contener hasta 8 kb de ADN heterólogo (terapéutico) en lugar de los genes virales. El ADN heterólogo puede incluir un promotor de tejido específico y un ácido nucleico SDF-1. En los métodos de transporte a un miocardio infartado, este también puede codificar un ligando a un receptor específico de miocardio.

Los vectores de retrovirus adicionales que podrían ser utilizados son vectores basados en lentivirus y sin replicación, incluyendo vectores basados en la inmunodeficiencia humana (HIV). Ver, por ejemplo, Vigna and Naldini, J. Gene Med. 5: 308-316, 2000 y Miyoshi et al., J. Virol. 72: 8150-8157, 1998. Los vectores de lentivirus son beneficiosos en el sentido que son capaces de infectar tanto a células de división activa como a

células sin división. También son altamente eficientes en traducir células epiteliales humanas.

Los vectores de lentivirus que se utilizan en la presente invención pueden derivar de lentivirus humanos o no humanos (incluyendo SIV). Los vectores de lentivirus que se prefieren incluyen secuencias de ácido nucleico requeridos para la propagación vectorial así como también un promotor de tejido específico (por ejemplo, miocardio) operablemente unido a un gen SDF-1. Los que se han mencionado pueden incluir LTRs virales, un sitio de ligadura de cebador, un tracto polipurina, sitios att y un sitio de encapsulamiento.

Un vector de lentivirus puede ser empaquetado adentro de una cápsida de lentivirus adecuada. La sustitución de una proteína de partícula con otra de un virus diferente se denomina "pseudotipeo". La cápsida vectoral puede contener proteínas de envolturas virales de otros virus, incluyendo virus de leucemia en murinos (MLV) o virus de estomatitis vesicular (VSV). El uso de la proteína VSV G da lugar a un título vector alto y da como resultado una mayor estabilidad de las partículas virales del vector:

Los vectores basados en alfavirus, tales como aquellos generados de los virus semliki forest (SFV) y los virus sindbis (SIN), también pueden ser utilizados en la presente invención. La utilización de los alfavirus está descripta en Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 y Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000. Los vectores de alfavirus normalmente están construidos en un formato que se conoce con el nombre de replicon. Un replicon puede contener (1) elementos genéticos de alfavirus requeridos para la replicación del ARN, y (2) un ácido nucleico heterólogo que codifique un ácido nucleico SDF-1. Dentro de un replicon alfavirus, el ácido nucleico heterólogo puede estar operablemente unido a un promotor de tejido específico (como el miocardio) o un intensificador.

Los vectores recombinantes de alfavirus defectuosos en la replicación son beneficiosos ya que son capaces de un alto nivel de expresión genética heteróloga (terapéutica), y puede infectar a un amplio espectro de células diana. Los replicons alfavirus pueden tener como objetivo tipos específicos de células (por ejemplo, cardiomiocitos) mediante el despliegue de un ligando heterólogo funcional o un dominio de ligadura sobre su superficie de virión que permitiría una ligadura selectiva a las células diana que expresan un par de unión cognado. Los replicons de

alfavirus pueden establecer latencia, y por ende expresión de ácido nucleico heterólogo de largo plazo. Los replicons pueden también exhibir expresión de ácido nucleico heterólogo en la célula diana. Un vector de alfavirus o replicon que se prefiere es el no-citofático.

En muchos de los vectores virales compatibles con los métodos de la presente invención, se puede incluir más de un promotor en el vector para permitir que más de un gen heterólogo sea expresado por el vector. Más aún, el vector puede comprender una secuencia que codifique un péptido de señal u otra porción que facilite la secreción de un producto del gen SDF-1 a partir de la célula diana.

Para combinar las propiedades beneficiosas de dos sistemas de vectores virales, pueden utilizarse los vectores virales híbridos para transportar un ácido nucleico SDF-1 a los tejidos diana (por ejemplo, miocardio). Las técnicas habituales para la construcción de vectores híbridos son conocidas para aquellos expertos en la materia. Estas técnicas pueden hallarse, por ejemplo, en Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold spring Harbor, N.Y. o en cualquier número de manual de laboratorio que analice la tecnología de ADN recombinante.

Para transducir células, se pueden utilizar genomas AAV de doble cadena en las cápsidas adenovirales que contienen una combinación de AAV y ITRs adenoviral. En otra variación, un vector AAV puede ser ubicado en un vector "cobarde", "dependiente de ayuda" o vector adenoviral de "alta capacidad". Los vectores híbridos de adenovirus AAV están analizados en Lieber et al., J. Virol. 73:9314-9324, 1999. Los vectores híbridos de adenovirus/ retrovirus están analizados en Zheng et al., Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000. Los genomas retrovirales contenidos en un adenovirus se pueden integrar dentro del genoma de la célula diana y provocar una expresión estable del gen SDF-1.

También se contemplan otros elementos de la secuencia de nucleótidos que facilitan la expresión del gen SDF-1 y la clonación del vector. Por ejemplo, la presencia intensificadores en dirección al promotor o terminadores en dirección descendiente hacia de la región de codificación, por ejemplo, pueden permitir la expresión.

De acuerdo con otro de los aspectos de la presente invención, un promotor de tejido específico, las secuencias de control de transcripción de tejido específico de la cadena-2 (MLC_{2v}) liviana de la miosina ventricular izquierda o l cadena

(MHC) pesada de miosina, puede fusionarse a un gen SDF-1. Por medio de la fusión, estos promotores de tejido específico que se encuentran dentro del constructo adenoviral, la expresión transgénica se limita a los cardiomiocitos ventriculares. Se puede determinar la eficacia de la expresión de los genes y el grado de especificidad provisto por los promotores de tejido específico, mediante la utilización del sistema adenoviral recombinante de la presente invención. La expresión específica cardiaca (es decir, específico de tejido de miocardio) es bien conocida en la materia (J. Biol. Chem., 267: 15875-15885, 1992). También pueden utilizarse otros promotores, tales como el promotor troponina- C.

La utilización de promotores de tejido específico dirigidos únicamente a los cardiomiocitos (es decir, sin la expresión concomitante en las células endoteliales, las células de músculos lisos, y los fibroblastos del corazón) al momento de transportar el gen SDF-1 in vivo suministran una expresión adecuada de la proteína SDF-1 para el tratamiento terapéutico. Limitar la expresión de los cardiomiocitos también resulta beneficioso en cuanto a la utilidad de la transferencia de genes para el tratamiento de CHF. Más aún, los cardiomiocitos posiblemente suministren la expresión transgénica más grande ya que las

células no sufren un rápido movimiento; la expresión entonces no disminuiría a partir de la división celular y la muerte como ocurriría con las células endoteliales.

Los promotores específicos endoteliales ya se encuentran disponibles para tal fin (Lee, et al., J. Biol. Chem., 265: 10446-10450, 1990).

En adición a los métodos basados en el vector viral, también pueden utilizarse los métodos no virales para introducir un gen SDF-1 adentro de una célula diana. En Nishikawa and Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001, se brinda una revisión respecto de los métodos no virales de transmisión de genes. El método no viral de transmisión de genes que se prefiere de acuerdo con la presente invención utiliza un ADN plásmido para introducir un ácido nucleico SDF-1 dentro de la célula. Los métodos de transmisión de genes basados en plásmidos son bien conocidos en la materia.

Se pueden designar moléculas de transferencia de genes sintéticos para formar agregados multimoleculares con ADN plásmido (es decir, obteniendo una secuencia de codificación SDF-1 operablemente unida al promotor específico de miocardio).

Estos agregados pueden ser designados para unirse a la célula diana (es decir, cardiomiocitos).

Pueden utilizarse anfifilos catiónicos, incluyendo lipopoliaminas y lípidos catiónicos, para suministrar una transferencia de ácido nucleico SDF-1 independiente del receptor a las células diana (a saber, cardiomiocitos). Más aún, los liposomas catiónicos preformados o lípidos catiónicos pueden ser mezclados con los ADN plásmidos para generar complejos para transfección celular. Los métodos que involucran formulaciones de lípidos catiónicos se encuentran en Felgner et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 772:126-139, 1995 y Lasic and Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996. Para la transmisión de genes, el ADN también puede asociarse a un péptido catiónico (Fominaya et al, J. Gene Med. 2:455-464, 2000).

De acuerdo con la presente invención, también pueden utilizarse los métodos que involucran tanto componentes virales como no virales. Por ejemplo, un plásmido basado en el virus Epstein Barr (EBH) para la transmisión terapéutica del gen está analizado en Cui et al, Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. más aún, en Curiel, D. T., Nat. Inmun. 13: 141-164, 1994, se describe un

método que involucra un adjunto policatiónico/ ligando/ ADN unido a un adenovirus.

Los vectores que codifican la expresión de SDF-1 pueden ser transmitidos a la célula diana mediante una preparación inyectable que contiene un portador farmacéuticamente aceptable, como solución salina, si es necesario. De acuerdo con la presente invención, también pueden utilizarse otros portadores farmacéuticamente aceptables, formulaciones y dosis.

El vector puede ser transmitido al lugar en que la célula diana contiene una célula del miocardio infartado mediante una inyección intra coronaria directa utilizando una jeringa tuberculina con guía fluoroscópica, en cantidad suficiente para que la proteína SDF-1 se exprese a un grado que permita una terapia altamente efectiva. Al inyectar el vector directamente en el tejido del miocardio infartado, es posible tener como objetivo el gen con bastante efectividad y minimizar la pérdida de los vectores recombinantes.

Este tipo de inyección permite la transfección local de una cantidad deseada de células, especialmente los cardiomiocitos, en el miocardio afectado, maximizado así la efectividad terapéutica

de la transferencia de genes y minimizando la posibilidad de una respuesta inflamatoria a las proteínas virales. Se puede utilizar un promotor específico de cardiomiocito, por ejemplo, para permitir con seguridad una expresión limitada a los cardiomiocitos. Así, la transmisión de los transgenes en este caso puede resultar en una expresión de genes objetivo, por ejemplo, las células del ventrículo izquierdo. También pueden utilizarse otras técnicas conocidas la materia para transplantar el vector a las células diana del miocardio infartado.

Los vectores pueden ser transmitidos por inyección directa al medio de cultivo en donde la célula diana es una célula de cultivo que luego es transplantada al miocardio infartado. Un ácido nucleico SDF-1 transfectado en las células puede estar operablemente unido a cualquier secuencia regulatoria adecuada, incluyendo un promotor específico de miocardio y un intensificador.

Las células diana transfectadas luego pueden ser transplantadas al miocardio infartado como bien se conoce en las técnicas de transplante, tales como la inyección intra coronaria directa utilizando una jeringa tuberculina. Si en primera instancia se transfecta las células diana in vitro y luego se le

transplanta las células diana transfectadas al miocardio infartado, la posibilidad de una respuesta inflamatoria en el miocardio infartado se encuentra minimizada en comparación de la inyección directa del vector en el miocardio infartado.

Los ácidos nucleicos SDF-1 presentes en la invención pueden ser expresados durante cualquier duración de tiempo apropiado dentro de la célula diana, incluyendo la expresión pasajera y la expresión estable a largo plazo. En una incorporación preferida, el ácido nucleico SDF-1 será expresado en cantidades terapéuticas durante una duración definida y adecuada de tiempo.

Una cantidad terapéutica es una cantidad capaz de producir un resultado clínicamente deseable en un animal o humano tratado. Como bien se conoce en el campo de la medicina, la dosis para cualquier animal o humano dependerá de muchos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, la composición particular que será administrada, el sexo, horarios y vías de dosificación, salud general, y otras drogas que estén siendo administradas en ese momento. Las dosis específicas de proteínas, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas pueden ser rápidamente determinadas por un experto en la materia

mediante la utilización de los métodos experimentales que a continuación se detallan.

La expresión de SDFD-1 puede ser pasajera cuando por ejemplo una célula que no es transfectada con una proteína SDF-1 que codifique el vector, es transplantada al miocardio infartado. Alternativamente, la expresión de la proteína SDF-1 puede ser a largo plazo, como sucede cuando el miocardio infartado es transfectado con un vector codificador de la proteína SDF-1 o cuando se transplanta una célula transfectada con un vector codificador de la proteína SDF-1 en el miocardio infartado.

La expresión de SDF-1 a largo plazo es beneficiosa ya que permite que la concentración de células madre aumente con un agente movilizador, como lo es G-CSF o cualquier otro factor, en un tiempo lejano a partir de la cirugía o un procedimiento que transplante las células. Cuando G-CSF es el agente movilizador hay un aumento significativo en el conteo neutrófilo, que podría provocar efectos negativos en el período peri- quirúrgico, pero no en los días o semanas posteriores. Más aún, la expresión de la proteína SDF-1 de sobreregulación crónica o a largo plazo en la expresión de la proteína SDF-1 podría dar lugar a múltiples intentos respecto de la movilización de las células madre.

Además, la sobreregulación crónica en la expresión de la proteína SDF-1 provoca la guía de las células madre a largo plazo en el tejido del miocardio infartado de la sangre periférica sin la necesidad de movilización por parte de las células madre.

La movilización de las células madre

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la concentración de células madre en la sangre periférica del sujeto puede aumentar si se le administra un agente inductor de la movilización de las células madre hacia la sangre periférica del sujeto. Las células madre pueden ser movilizadas hacia la sangre periférica del sujeto a fin de elevar la concentración de células madre en el sujeto periférico mediante la utilización de un número de agentes. Por ejemplo, para elevar el número de células madre de la sangre periférica de un mamífero, se le puede administrar un agente que induce a que las células madre se movilicen desde la médula ósea. Se conoce un gran número de esos agentes e incluyen citocinas, tales como el factor de estimulación de colonia de granulocito (G-CSF), el factor de estimulación de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interleucina (IL)-7, IL-3, IL-12, factor de células madre(SCF), y ligando flt-3; quimosinas como la IL-8, Mip-1α, y Groβ, y los

agentes quimioterapéuticos de ciclofosamida (Cy) y paclitaxel. Estos agentes difieren en cuanto a su marco de tiempo para lograr la movilización de las células madre, el tipo de células madre movilizadas y la eficacia.

El agente movilizador puede ser administrado al sujeto por inyección directa del agente movilizador. Es preferible que el agente movilizador sea administrado luego de la sobreregulación de la expresión SDF-1 en el miocardio infartado. El agente movilizador, sin embargo, puede ser administrado antes de que la expresión SDF-1 sea sobreregulada.

Un agente movilizador que se prefiere es un factor de estimulación de colonias, como el G-CSF. Una dosis normal de G-CSF en un sujeto murino es de alrededor de 125 µg/ kg por día durante un tiempo de entre 5 a 10 días. El agente G-CSF se administra luego de que se sobreregule la expresión SDF.

Alternativamente, como se conoce en la materia, la concentración de células madre en la sangre periférica puede aumentar a partir de la inyección de células madre especializadas en la sangre periférica (a saber, MAPC's).

FCEV

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el FCEV expresado en el miocardio infartado es de la familia de los factores de crecimiento endotelial vascular que inducen al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos colaterales. Los FCEVs son factores de crecimiento angiogénicos específicos con una actividad de vaso-permeabilidad y células endoteliales diana casi exclusivas.

El FCEV expresado en el miocardio infartado puede ser una expresión producida por un gen FCEV. Los FCEVs preferidos que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención incluyen FCEV-1 (también conocido como FCEV-A) y otros FCEV´1, tales como FCEV-2 (FCEV-C), FCEV-3 (FCEV-B), FCEV-D, FCEV-E, y factores de crecimiento placental estructuralmente homólogos. Las isoformas conocidas de FCEV-1 incluyen 121, 138, 162, 165, 182, 189, y 206 aminoácidos. Estas isoformas están identificados, respectivamente, como FCEV-121, FCEV-165, FCEV-162, FCEV-182, FCEV-189 y FCEV-206. La actividad mitogénica y de unión de heparina de estas isoformas difiere. Una isoforma de FCEV-1 que se prefiere en su utilización para la presente invención es el FCEV-165. También se pueden utilizar de acuerdo con la presente

invención, otras isoformas de FCEV-1 y otros homólogos de FCEV que no se mencionan.

El FCEV de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la del FCEVs anterior. El FCEV de la presente invención también puede ser una variante de uno de los FCEVs anteriores, como un fragmento, análogo y derivado de FCEV. Tales variantes incluyen, por ejemplo, un polipéptido codificado por una variante alélica se produce naturalmente del gen FCEV nativo (a saber, un ácido nucleico que se produce naturalmente que codifica un FCEV de mamífero que se produce naturalmente), un polipéptido codificado por una unión alternativa por el homólogo de un gen FCEV nativo, y un polipéptido codificado por una variante que no se produce naturalmente del gen FCEV.

Las variantes de FCEV tienen una secuencia de péptidos que difiere del FCEV nativo en uno o más aminoácidos. La secuencia de péptidos de tales variantes puede figurar una supresión, adición o sustitución de uno o más aminoácidos de un FCEV nativo. Es preferible que las inserciones de aminoácidos sean de aproximadamente 1 a 4 aminoácidos contiguos, y las supresiones de entre 1 a 10 aminoácidos contiguos. El FCEV de la variante, de acuerdo con la presente invención, mantiene sustancialmente una

468 285 468

actividad funcional de FCEV nativo. Es preferible que las variantes de la proteína FCEV puedan ser realizadas mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico dentro de la invención que figuren cambios silenciosos o conservadores.

Los fragmentos de FCEV correspondientes a uno o más motivos particulares y/o dominios o a tamaños arbitrarios, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Al examinar los péptidos producidos por recombinación se pueden obtener porciones aisladas de peptidilo de FCEV del fragmento del ácido nucleico que codifique tales péptidos. Más aún, los fragmentos pueden ser químicamente sintetizados mediante la utilización de técnicas conocidas en la materia, como por ejemplo la base sólida f-Moc Merifield o la química t-Boc.

Las variantes de FCEV también incluyen formas recombinantes de FCEV. Los polipéptidos recombinantes que se prefieren en la presente invención, además de la proteína FCEV, son codificados por un ácido nucleico que tiene al menos una identidad de secuencia del 85% con una secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica un FCEV de un mamífero.

Entre las variantes de FCEV se pueden incluir formas agonísticas de la proteína que constitutivamente expresa las actividades funcionales del FCEV nativo. Otras variantes de FCEV son resistentes al desdoblamiento proteolítico, como por ejemplo, como consecuencia de las mutaciones que alteran las secuencias diana proteasa. Si se examina la variante para la actividad funcional FCEV, se podrá determinar si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido puede resultar en una variante de una o más actividades funcionales de un FCEV.

Ácidos Nucleicos FCEV

Otro aspecto de la presente invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican ácidos nucleicos FCEV y no nativos que codifican un FCEV de mamífero. Estas moléculas de ácido nucleico pueden presentarse como ARN o ADN (por ejemplo, cADN, ADN genómico, y ADN sintético). El ADN puede ser de cadena doble o simple, y si es de cadena simple puede ser la cadena de codificación (sentido) o de no codificación (antisentido).

Otras moléculas de ácido nucleico incluidas en la presente invención son variantes de un gen FCEV nativo, como aquellos que codifican fragmentos, análogos y derivados de un FCEV nativo.

Estas variantes pueden ser, por ejemplo, una variante alélica que se produce naturalmente de un gen FCEV, un homólogo de un gen FCEV, o una variante que no se produce naturalmente de un gen FCEV nativo. Estas variantes cuentan con una secuencia de nucleótido que difiere del gen FCEV nativo en una o más bases. Por ejemplo, la secuencia de nucleótido de tal variante puede figurar una supresión, una adición o una sustitución de uno o más nucleótidos del gen nativo FCEV. Es preferible que las inserciones de ácido nucleico sean de entre 1 a 10 nucleótidos, y las supresiones sean de entre 1 a 30 nucleótidos contiguos.

En otras aplicaciones, los cambios sustanciales manifestados por el FCEV de la variante respecto de su estructura, pueden ser generados si se llevan a cabo sustituciones de nucleótidos que provoquen nada menos que cambios conservadores en el polipéptido codificado. Ejemplo de tales sustituciones de nucleótidos son aquellas que producen cambios en (a) la estructura de la médula ósea péptica; (b) la carga de hidrofobicidad del polipéptido; o (c) la mayor parte de una cadena secundaria de aminoácidos. Las sustituciones de nucleótidos que generalmente se espera que produzcan los cambios más importantes en las propiedades proteínicas son aquellos que inducen cambios no conservadores en codones. Son ejemplos de cambios de codones que posiblemente

produzcan cambios mayores en la estructura proteínica aquellos que provocan la sustitución de (a) un residuo hidrofílico, por ejemplo, la serina o la treonina, para (o por) un residuo hidrofóbico, como la leucina, la isoleucina, la fenilalanina, valina o alanina; (b) una cisteína o prolina para (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo con cadena secundaria electropositiva, como la lisina, arginina, o histidina, para (o por) un residuo electronegativo, como la glutamina o el aspartamo; o (d)un residuo con cadena secundaria, como la fenilalanina, para (o por) uno que no tenga cadena secundaria, como la glicina.

Las variantes alélicas que se producen naturalmente del gen FCEV comprendidas en esta invención son ácidos nucleicos aislados del tejido de un mamífero, con al menos una secuencia de identidad del 75% con un gen FCEV nativo, y codifican polipéptidos que tienen una estructura similar al FCEV nativo. Los homólogos de un FCEV nativo que están comprendidos en la presente invención son ácidos nucleicos aislados de otras especies que tienen por lo menos una secuencia de identidad del 75% con un gen nativo, y codifica los polipéptidos con una estructura similar al FCEV nativo. Se pueden buscar las bases de datos de los ácidos nucleicos, ya sean públicas o registradas, a

fin de identificar otras moléculas de ácido nucleico con un elevado porcentaje de identidad de secuencia para un gen FCEV nativo.

Las variantes FCEV que no se producen naturalmente son ácidos nucleicos que no se producen naturalmente (por ejemplo, están producidos por la mano del hombre), y tienen una secuencia de identidad de al menos un 75% con un gen FCEV nativo, y codifican polipéptidos con una estructura similar al FCEV nativo. Como ejemplos de variantes de genes FCEV no naturales se puede mencionar a aquellas que codifican un fragmento de un FCEV nativo, aquellas que hibridizan a un gen FCEV nativo o a un complemento de un gen FCEV nativo en condiciones de rigurosidad, aquellas que comparten un 65% de la secuencia de identidad con un gen FCEV nativo, y aquellas que codifican un FCEV.

Los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de FCEV contenidos en la presente invención son aquellos que codifican residuos de aminoácidos de un FCEV nativo. Los oligonucleótidos más cortos que codifican o hibridizan con ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un FCEV nativo pueden ser utilizados como moléculas antisentido, cebadores o sondas. Los polinucleótidos más grandes que codifican o hibridizan con ácidos

nucleicos que codifican fragmentos de un FCEV nativo también pueden ser utilizados en varios aspectos de la presente invención. Los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un FCEV nativo pueden producirse a partir de la digestión enzimática (por ejemplo, utilizando una enzima de restricción) o de la degradación química de la extensión máxima del gen FCEV nativo o de las variantes del mismo.

En la presente invención también pueden utilizarse los ácidos nucleicos que hibridizan en condiciones rigurosas los ácidos nucleicos mencionados. Por ejemplo, pueden estar comprendidos en la presente invención, los ácidos nucleicos que hibridicen a uno de los ácidos nucleicos mencionados en condiciones de mínima rigurosidad, condiciones de rigurosidad moderada, o condiciones de una rigurosidad elevada.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión FCEV también pueden ser utilizadas en esta invención. Estos ácidos nucleicos pueden obtenerse si se prepara un constructo (por ejemplo, un vector de expresión) que exprese una proteína de fusión FCEV cuando sea introducida en la célula diana adecuada. Por ejemplo, el constructo puede obtenerse al ligar un primer polinucleótido que codifique un FCEV fusionado con un

secundo polinucleótido que codifique otra proteína, de manera que la expresión del constructo en un sistema de expresión adecuado produce una proteína de fusión.

Los oligonucleótidos comprendidos en la invención pueden ser mezclas quiméricas de ADN o ARN o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena simple o de cadena doble. Estos oligonucleótidos pueden ser modificados en la porción de la base, porción de azúcar o columna principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridización, etcétera. Los oligonucleótidos comprendidos en esta invención pueden además incluir otro grupo adicional, como los péptidos (por ejemplo, para tener como objetivo receptores celulares in vivo), o agentes que faciliten el transporte a lo largo de la membrana celular. A tal fin, los oligonucleótidos pueden conjugarse a otras moléculas, por ejemplo, un péptido, un agente de unión recíproca desencadenado por la hibridización, agentes de transporte, agentes de descomposición desencadenados por la hibridización.

Expresión FCEV

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la expresión FCEV en el miocardio infartado puede aumentar si se le introduce un agente a las células diana que aumente la expresión de FCEV.

Las células diana pueden incluir células que estén dentro del miocardio infartado o células ex vivo, tales como mioblastos o fibroblastos, que son transplantados en los tejidos del miocardio infartado con la posterior introducción del agente. Cuando las células diana son células que son transplantadas dentro del miocardio infartado, la célula diana puede ser la misma célula que las células utilizadas para promover la sobreregulación de la proteína SDF-1 o transfectada con una proteína SDF-1 que codifique el vector.

El agente puede comprender ácidos nucleicos FCEV naturales o sintéticos que son incorporados a los constructos del ácido nucleico recombinante, normalmente constructos de ADN, capaces de introducirse y replicarse en la célula. Es preferible que este constructo incluya un sistema de replicación y secuencias capaces de producir transcripción y traducción de una secuencia de codificación de polipéptidos en una determinada célula diana.

También se pueden introducir otros agentes a las células diana a fin de elevar los niveles de FCEV en el tejido diana. Por ejemplo, los agentes que aumentan la transcripción de un gen que codifica FCEV; elevan la traducción de un mARN que codifica un FCEV, y/o aquellos que aumentan el grado de degradación de un mARN que codifica FCEV podrían ser utilizados para elevar los niveles de FCEV. A fin de elevar el grado de transcripción de un gen dentro de una célula debe introducirse un promotor exógeno en dirección a un gen que codifica FCEV. También pueden aplicarse los elementos intensificadores que facilitan la expresión de un gen heterólogo.

Un método preferido para introducir al agente dentro de la célula diana involucra la utilización de terapia de genes. La terapia de genes, de acuerdo con la presente invención, puede ser utilizada para expresar FCEV a partir de una célula diana in vivo o in vitro.

Un método preferido de terapia de genes involucra la utilización de un vector que incluye un nucleótido que codifica FCEV. Podemos incluir algunos ejemplos de vectores que pueden utilizarse, como por ejemplo, vectores virales (como adenovirus (Ad), virus asociados con virus adenovirus (AAV), y retrovirus),

liposomas, y otros complejos que contienen lípidos, y otros complejos macromoleculares capaces de mediar la transmisión de un polinucleótido a una célula diana.

Los vectores también pueden abarcar otros componentes o funcionalidades que modulan aún más la transmisión de genes y/o la expresión de genes, o que en caso contrario suministran propiedades beneficiosas para las células objetivo. Esos otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influencian la unión o el objetivo de las células (incluyendo componentes que median la unión de tipo celular o específicamente tisular); componentes que influyen en la toma del ácido nucleico del vector a través de la célula; componentes que influyen en la localización de los polinucleótidos dentro de la célula luego de la toma (tales como agentes que median la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión de los polinucleótidos. Estos componentes también pueden incluir marcadores, tales como marcadores de detección o selección que pueden ser utilizados para detectar o seleccionar células que han que han sido utilizadas y están expresando el ácido nucleico transmitido por el vector. Estos componentes pueden ser provistos como una característica natural del vector (como el uso de ciertos vectores virales que poseen componentes de

funcionalidades que median la unión y utilizadas), o los vectores pueden ser modificados para suministrar tales funcionalidades.

Los marcadores de selección pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores de selección positivos permiten la selección a células que portan el marcador, mientras que los marcadores de selección negativos permiten que las células porten el marcador para que éste sea selectivamente eliminado. Se ha descrito una variedad de estos genes marcadores, incluyendo los marcadores (a saber positivos/ negativos) bifuncionales, los cuales pueden suministrar una dosis adicional de control que puede resultar beneficioso en los contextos de terapia de genes. Se conoce una gran variedad de estos vectores y en general están disponibles.

De acuerdo con la presente invención, los vectores que se utilizan en la expresión de FCEV de la presente invención incluyen vectores virales, vectores basados en lípidos y otros vectores capaces de enviar nucleótido a las células diana. El vector puede ser un vector objetivo, en especial un vector objetivo que preferentemente se une a los miocitos ventriculares. Los vectores virales que se utilizan en esta invención son aquellos que manifiestan una baja toxicidad a la célula diana e

inducen la producción de cantidades útiles de FCEV en, términos terapéuticos, de una forma específicamente tisular.

Los vectores que aquí se prefieren derivan del adenovirus (Ad) o virus asociado a adenovirus (AAD). Tanto los vectores virales humanos como los no humanos pueden ser utilizados pero es preferible que el vector viral recombinante sea con replicación defectuosa en humanos. Cuando el vector es adenovirus, comprende preferiblemente un polinucleótido con un promotor operablemente unido a un gen que codifica una proteína angiogénica o péptido, y es de replicación defectuosa en humanos. También pueden utilizarse otros vectores que incluyen vectores virales o no virales conocidos en la materia y descriptos anteriormente.

En muchos de los vectores virales compatibles con los métodos de la invención, se puede incluir más de un promotor en el vector para permitir que el vector exprese más de un gen heterólogo. Más aún, el vector puede comprender una secuencia que codifique un péptido de señal u otra porción que facilite la secreción de un producto FCEV de la célula diana.

Para combinar las propiedades beneficiosas de dos sistemas de vectores virales, se pueden utilizar vectores virales híbridos

para enviar un ácido nucleico FCEV al tejido diana (por ejemplo, miocardio). También se contemplan otros elementos de la secuencia de nucleótidos que permiten la expresión del gen FCEV y la clonación del vector. Por ejemplo, la presencia de intensificadores en dirección al promotor o de terminadores de dirección descendiente a la región de codificación puede permitir la expresión. En los vectores de la presente invención, la presencia de elementos que intensifican la expresión de FCEV específica de miocardio también puede resultar útil para la terapia de genes.

En la presente invención también se contempla la utilización de promotores específicos de los tejidos para la célula objetivo. Mediante la fusión, por ejemplo, las secuencias de control de transcripción específicas de los tejidos de la cadena-2 (MLC2v) liviana de miosina de ventrículo izquierdo o cadena pesada de miosina (MHC) a un transgen, como el gen FCEV-165 dentro del constructo viral, se limita la expresión del transgen a los miocitos cardíacos ventriculares.

Se cree que mediante la utilización de los promotores MLC2v y MHC y la transmisión del transgen in vivo, el cardiomiocito solo (que carece de expresión concomitante en células

epiteliales, células de músculos lisos, y fibroblastos en el corazón) suministrará una expresión adecuada de una proteína angiogénica, como la FCEV-165 para promover la angiogenesis. La limitación de la expresión a los cardiomiocitos también puede traer ventajas concernientes a la utilidad de la transferencia del gen para el tratamiento de alteraciones coronarias congestivas. Si se le limita la expresión al corazón, se evitan efectos potencialmente perjudiciales de angiogénesis en tejidos no cardíacos. Más aún, de las células del corazón, el miocito posiblemente suministre la expresión transgénica más extensa ya que las células no pueden sobrellevar un rápido movimiento; la expresión entonces no disminuiría como consecuencia de la división celular y la muerte como sí podría ocurrir con las células endoteliales. Los promotores específicos endoteliales están disponibles para este objetivo.

Mediante la utilización de sistemas de promotor regulable por drogas (por ejemplo la tetraciclina), puede iniciarse la expresión de SDF-1 con o sin la movilización de la célula madre en tiempo remoto de los procedimientos precutáneos o quirúrgicos necesarios para la implantación de células diseñadas o vectores genéticos. Ello podría permitir la recuperación de los tejidos de

miocardio o no miocardiales antes de producirse un aumento en la cantidad de células madre que circulan.

Además de los métodos basados en vectores virales, también pueden utilizarse los métodos no virales para introducir un gen FCEV en una célula diana. De acuerdo con la presente invención, un método de transmisión de genes no virales utiliza ADN plásmido para introducir un ácido nucleico FCEV en la célula. Los métodos de transmisión de genes basados en el plásmido, son generalmente conocidos en la materia.

De acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar tanto componentes virales como no virales. Por ejemplo, el plásmido basado en el virus Epstein Barr (EBV) para la transmisión terapéutica de genes se encuentra descripta en Cui et al., Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. Además, en Curiel, D. T., Nat. Inmun. 13: 141-164, 1994 se describe un método que involucra un adjunto policatiónico/ ligando/ ADN unido a un adenovirus.

Los vectores que codifican la expresión de FCEV pueden ser enviados a la célula diana en forma de preparación inyectable que contenga un portador farmacéuticamente aceptable como solución salina, por ejemplo, como sea necesario. También se pueden

utilizar otros portadores farmacéuticamente aceptables, formulaciones y dosis.

En el lugar en el cual la célula diana contenga una célula del miocardio infartado, el vector puede ser enviado a través de una inyección intra coronaria directa mediante la utilización de una jeringa tuberculina con guía fluoroscópica, en cantidades suficientes como para que FCEV se exprese a un grado que permita la realización de una terapia altamente efectiva. Al inyectar el vector directamente dentro del tejido de miocardio infartado, es posible que se ataque el gen con bastante efectividad, y se minimicen las pérdidas de los vectores recombinantes.

Este tipo de inyección permite la transfección local de una cantidad deseada de células, en especial miocitos cardíacos, en el miocardio afectado, maximizando de esta manera la eficacia terapéutica de la transferencia de genes, y minimizando la posibilidad de obtener una respuesta inflamatoria a las proteínas virales. Se puede utilizar un promotor específico del cardiomiocito ventricular, por ejemplo, para facilitar una expresión segura limitada a los cardiomiocitos. Así, la transmisión de los transgenes en este caso puede resultar en una expresión de gen objetivo en, por ejemplo, las células del

ventrículo izquierdo. También se pueden utilizar otras técnicas conocidas en la materia para el transplante del vector en las células diana del miocardio infartado.

Los vectores pueden ser enviados a través de una inyección directa al medio de cultivo, donde la célula diana es una célula de cultivo que luego será transplantada en el miocardio infartado. Un ácido nucleico FCEV transfectado en las células puede estar unido operablemente a cualquier secuencia regulatoria apropiada, incluyendo un promotor específico de miocardio y un intensificador.

Las células diana transfectadas pueden entonces ser transplantadas al miocardio infartado mediante la utilización de las técnicas conocidas de transplante, tales como la inyección intra coronaria directa mediante una jeringa tuberculina. Si en primer lugar se transfectan las células diana al miocardio infartado, se minimiza la posibilidad de una respuesta inflamatoria en el miocardio infartado si se lo compara con la inyección directa del vector en el miocardio infartado.

El FCEV de la presente invención puede ser expresado a través de cualquier medida de tiempo apropiada, incluyendo la

expresión pasajera y expresión estable a largo plazo. En una incorporación preferida, el ácido nucleico SDF-1 será expresado en cantidades terapéuticas por una porción apropiada y definida de tiempo.

Ejemplos

La presente invención se encuentra aún más ilustrada a través de los siguientes ejemplos específicos. Los ejemplos son suministrados a modo de ilustración y bajo ningún concepto deben interpretarse a fin de limitar el alcance o el contenido de la invención

Efecto de la movilización de células madre con G-CSF con 8 semanas después de IM

A fin de afirmar si la movilización de la célula madre promovida por G-CSF conduce a una regeneración de miocardio en ratas con una cardiomiopatía isquémica establecida, las ratas 8 semanas después del IM eran aleatorias para recibir ya sea G-CSF recombinante humano (125 µg/kg/ por día durante 5 días, vía inyección i.p), como solución salina. La sangre extraída 5 días

después de haberse iniciado la terapia G-CSF a fin de verificar la estimulación medular, reveló una triplicación en el conteo de leucocitos con G-CSF (37,3 + 5,3 células/µl) comparado con la terapia de solución salina (11,8 + 4,0 células µl). Al comienzo del último día se comenzó a dosificar 5-bromo- 2´- deoxiuridina, BrdU, luego de haberle administrado G-CSF por un total de 14 días a fin de rotular cualquier célula proliferativa con un miocardio 20.

Las Figuras 1 (a y b) muestran, respectivamente, la cantidad de células BrdU- positivas dentro de la zona infartada (a) y la fracción de reducción (b) a los cuatro día de dosificación de salina o G-CSF (12 semanas posteriores a la ligadura LAD). Los conteos celulares son células por mm2. Los datos representan los promedios ± s.d. *n*=6-8 de cada grupo.

La administración de G-CSF 2 meses después de la ligadura LAD no produjo un incremento en la cantidad de células positivas BrdU dentro de la zona infartada (ilustración 1a) ni condujo a una regeneración de miocardio significativa determinada por la falta de angiogenesis o células positivas de la miosina cardiaca dentro de la zona infartada (los datos mostrados). Doce semanas

después de la litigación LAD estos animales demostraron una cardiomiopatía significativa con una fracción de reducción en animales de control de menos del 10% (normal >60%). Como consecuencia de la falta de pruebas histológicas respecto de una significativa regeneración de miocardio en respuesta al G-CSF 8 semanas después de la ligadura LAD, no se halló ningún tipo de recuperación significativa con G-CSF (figura. 1b) respecto de la función sistólica.

Efecto del transplante de SKMB previo a la movilización de la célula madre en cardiomiopatías isquémicas.

A fin de comprobar la hipótesis de que el miocardio temporalmente lejos del momento del infarto de miocardio puede ser optimizado para la regeneración de miocardio en respuesta a la movilización de las células madre, se llevó a cabo el transplante de mioblastos óseos 8 semanas después de la litigación LAD. Los animales recibieron 5 inyecciones de 200.000 SKMB por inyección en la zona fronteriza del infarto. Ya que la hipótesis inicial fue que el SKMB transplantado sería utilizado como una estrategia para la expresión de productos genéticos responsables de albergar a la célula madre, como control, el SKMB fue transfectado con el adenovirus que codifica la luciferasa.

Las Figuras 2 (a y b) muestran el efecto de los mioblastos óseos (SKMB) sobre los conteos celulares BrdU+ en la zona infartada 4 semanas luego del transplante celular (12 semanas después de la ligadura LAD). Los datos representan un promedio ± s.d. *n*=6-8 por grupo.

La introducción del SKMB en del corazón infartado en ausencia del G-CSF no incrementó significativamente la incorporación de células BrdU positivas en la zona infartada. Sin embargo, la combinación del transplante de SKMB y G-CSF no produjo un incremento significativo respecto de la cantidad de células BrdU positivas en la zona infartada 4 semanas más tarde (ilustración 2b). Más aún, comparado con otros animales que han recibido ya sea un transplante de G-CSF o de SKMB solamente, los animales que recibieron la terapia combinada experimentaron un aumento significativo en la fracción de reducción (ilustración 2b) relativa a los controles de solución salina.

A fin de determinar si las células BrdU positivas de la zona del infarto se originaron en la médula, o si eran células endógenas del miocardio que se dividieron, 8 semanas después de

la ligadura LAD, se administró BrdU durante 5 días, comenzando 6 días antes del transplante de SKMB y al inicio del G-CSF.

La figura 3a muestra que la médula (MO) manchada por BrdU reveló casi el 100% de la mancha de las células BM cultivadas de múltiples animales. La ilustración 3b muestra que no se observó ninguna célula BrdU significativa en un miocardio sin tratar luego de 5 días de dosificación de BrdU. Los datos representan un promedio ± s.d. de células positivas cuantificadas por dos observadores independientes que no podían ver la identidad de cada animal. N=6-8 por grupo. La barra en escala representa 25 μM. Ello hizo que se rotularan las células en la médula sin una rotulación de BrdU significativa del miocardio (17,5 ± 2,9 células positivas /mm2).

La figura 3c muestra el incremento de células BrdU dentro de la zona del infarto evaluado con la terapia de acuerdo con la presente invención.

En estos experimentos, solo aquellos animales que han recibido SKMB y G-CSF poseen un aumento significativo respecto de la cantidad de células BrdU positivas en la zona del infarto. Estos datos concuerdan con el concepto de que las células BrdU

positivas surgieron de la médula ósea y se guiaron a la zona del infarto después de la terapia combinada. Los datos también sostienen que los transplantes de SKMB reestablecen las señales necesarias para la guía de las células madre en el miocardio.

Moléculas de señalización responsables de la guía de las células madre en el tejido infartado

La observación realizada respecto de que las células en circulación se injertarán en el tejido infartado 8 semanas posteriores al IM con estimulación del tejido mediante el transplante de SKMB urgió la necesidad de evaluar a los potenciales mediadores de la guía de las células madre. El factor -1 estromal de derivación celular (SDF-1) media el tráfico hematopoiético y la guía de las células madre en la médula ósea; por ello, se evaluó su rol como una potencial molécula de señalización para el injerto de las células madre en IM y en respuesta al transplante de SKMB.

La figura 4 es una fotografía que muestra la expresión del SDF-1 revelado por RT - PCR como una función de tiempo posterior al infarto de miocardio. La expresión SDF-1 está ausente en la línea de base, aumentó a la hora y a las 24 horas posteriores al

IM. La expresión de SDF-1 vuelve a su estado ausente entre 24 horas y 7 días posteriores al IM y permanece ausente 30 días después del IM. La expresión SDF-1 vuelve a aparecer 72 horas después del transplante de SKMB realizado 30 días después (30+) del IM.

De esta forma, por la acción de RT-PCR, la expresión de SDF-1 fue observada a la hora y a las 24 horas, pero no a 0,7 o 30 días, luego de la ligadura de LAD. La expresión de SDF-1 fue inducida por SKMB, y se la observó 72 horas después de realizado el transplante, pero no en animales operados sustitutos (los datos no se han revelado). PCR para GAPDH en las mismas muestras revelaron que el ADNc permanecía intacto en todas las muestras (los datos no se han revelado). Se ha confirmado a través del PCR en tiempo real, un aumento en la expresión de SDF-1 como consecuencia del transplante de SKMB (los datos no se han revelado). El PCR en tiempo real reveló que los niveles de GAPDH eran similares entre los grupos.

Para evaluar si SDF-1 medió el injerto de la células BrdU positivas en la zona del infarto, los fibroblastos cardiacos de control o aquellos transfectados establemente con un vector de expresión SDF-1, se transplantaron vectores de expresión SDF-1 en

el miocardio 4 semanas después de la ligadura de LAD. Diez días más tarde, para permitir la regulación en dirección descendiente de la expresión SDF-1 endovenosa, se administró G-CSF durante 5 días, así como también BrdU durante 5 días a partir del último día de dosificación de G-CSF.

Las figuras 5 (a y b) muestran el número de células (a) BrdU+ y de (b) células CD117+ en la zona del infarto después de transcurridas 4 semanas del transplante de fibroblastos cardíacos establemente transfectados con o sin el vector de expresión SDF-1 con o sin la administración de G-CSF durante los 5 días posteriores al transplante de fibroblastos cardíacos. Los datos representan un promedio de células ± s.d cuantificadas por dos observadores independientes sin poder ver la identidad de cada animal. N=3-5 por grupo.

La figura 5c es una fotografía de CD117+ animal SDF-1/G-CSF La barra en escala representa 25 μM.

A causa de que SDF-1 ha sido suficiente para inducir la guía de las células madre al miocardio lastimado, en respuesta a G-CSF, los transplantes de corazón con fibroblastos cardíacos de expresión SDF-1 han revelado que se ha más que triplicado el

aumento en la cantidad de células BrdU positivas en toda la zona del infarto. Los animales que recibieron fibroblastos cardíacos de control tuvieron una señal BrdU que no ha diferido del control.

Identificación de células BrdU positivas

Hemos producido inmunofluorescencia a fin de determinar la identidad de las células BrdU en la zona del infarto. La decoloración de los anticuerpos para CD45 ha demostrado que más del 5% de las células BrdU positivas en respuesta al transplante celular y a la dosificación de G-CSF son leucocitos, respectivamente. No se observó ninguna célula positiva BrdU de miosina cardiaca dentro de la zona del infarto en animales tratados con G-CSF sin o con SKMB o transplante de fibroblasto cardíaco.

Efecto de la expresión de SKMB y G-CSF sobre la neovascularización y la función LV posterior a IM

A pesar del aumento en la cantidad de células BrdU positivas en los animales que recibieron el transplante de SKMB combinado y la estimulación medular con G-CSF, no se observó ningún aumento

en la densidad vascular ni en la cantidad de miocitos en la zona del infarto. Así, hemos estudiado el efecto adicional de la sobreexpresión de FCEV sobre el transplante de SKMB y la dosificación de G-CSF.

Las figuras 6 (a y b) muestran que la inmunohistoquímica de la zona del infarto reveló tanto células BrdU+ (flechas abiertas) como células de expresión de miosina cardiaca (flechas cerradas) 12 semanas posteriores a la ligadura LAD con transplante celular de (a) SKMB o (b) SKMB de expresión FCEV seguida de movilización celular utilizando G-CSF.

La figura 6c muestra un mejoramiento en la función LV relativa al control del tratamiento. Los datos representan una proporción ± s.d. n=6-8 por grupo. La barra en escala representa 10 μM.

El transplante de SKMB de expresión FCEV-165, 8 semanas después del IM, dio como resultado una densidad vascular incrementada en la zona del infarto en comparación con los controles de solución salina (44,1 ± 5,2 vs 17,7 ± 2,8 vasos sanguíneos/ mm^2; FCEV-165 vs solución salina respectivamente). Además, la combinación de expresión FCEV-165 y movilización de

célula madre con G-CSF condujo a una repoblación de la zona del infarto con células de expresión de miosina cardiaca con regeneración de miocardio (Figura 6a). La adición de la expresión FCEV-165 a SKMB también incrementó significativamente la función LV según fue medido por la fracción de reducción (Figura 6b). No se ha observado una diferencia importante en fracción de reducción entre las estrategias de tratamiento de transplante de SKMB que expresa FCEV-165 y transplante de SKMB combinado con la administración de G-CSF (datos no mostrados).

Métodos

Ligadura LAD

Todos los protocolos de animales fueron mejorados por Animal Research Committee, y todos los animales fueron alojados en las instalaciones de AAALAC de Cleveland Clinic Foundation. A los animales se los anestesió con pentobarbital de sodio, 50 mg/kg, se los intubó, y se los dejó ventilados a temperatura ambiente a 80 respiraciones por minuto utilizando un ventilador para roedores (Kent Scientific Corp. RSP1002). Se indujo la anterior pared de IM en ratas Lewis de 150-175 g mediante ligadura de la

arteria descendiente inferior izquierda (LAD) con la ayuda de un microscopia quirúrgico. (Leica M5000).

Ecocardiografía 2D

Se realizó una Ecocardiografía 2D 5-7 días y 8 semanas después de la ligadura LAD y 4 semanas después del transplante SKMB utilizando un transductor de selección lineal 15-MHz relacionado con Sequoia C256 (Acuson). Se sedó suavemente a las ratas con quetamina (50 mg/kg) para cada ecocardiograma. Para la cuantificación de las dimensiones LV y el grosor de la pared, grabamos digitalmente fragmentos 2D e imágenes en modo-m en una vista del eje breve desde mid-LV justo debajo de los músculos papilares permitiendo medidas coherentes desde la misma ubicación anatómica en diferentes ratas. Las medidas se obtuvieron mediante dos observadores independientes fuera de línea utilizando ProSolve. Cada medida en cada animal es realizada 6 veces, de 3 elegidos al azar fragmentos de 5 grabados por un observador para tratar el brazo. Como medida de la función LV, la fracción de reducción fue calculada desde grabaciones en Modo-m. La fracción de reducción (%)= (LVEDD-VCESD)/ LVEDD*100, donde LVEDD-dimensión diastólica de extremo ventricular izquierdo y LEVSD-dimensión diastólica de extremo ventricular izquierdo. Las

dimensiones fueron medidas entre la pared anterior y posterior desde la vista del eje corto debajo del nivel del músculo papilar. Además, el grosor de la pared anterior fue medido en el extremo- diástole.

Preparación y distribución celular

Los mioblastos óseos fueron obtenidos de los miembros traseros de varias ratas Lewis (Harlan Labs), se pusieron en placas de frasco de cultivo de 175 ml (Falcon), y se las hizo crecer en DMEM incluyendo 10% de suero bovino fetal, 300 mg/1 ECGS, y antibióticos de penicilina, estreptomicina, y ofloxacin. Para evitar la diferenciación se logró que las células pasen una vez 75% de confluencia. En el día anterior al transplante celular, los mioblastos purificados se transfectaron con 108 pfu/ml de adenovirus de replicación defectuosa expresando FCEU-165 o luciferaza (control) bajo el control de un promotor CMV. En el día del transplante, se obtuvieron los mioblastos con tripsina, se lavaron extensivamente en PBS para extraer cualquier partícula viral libre y se reconstruyeron inmediatamente antes del transplante. Se anestesió a los animales, se los ventiló, y se les practicó una toracotomía lateral para dirigir

visualización de la zona infartada. Aproximadamente 1 x 10(6) células fueron inyectadas por animal en 5 ubicaciones.

Los fibroblastos cardiacos fueron obtenidos de corazones de varias ratas adultas y se las ubicó de manera similar para SKMB. SDF-1 del ARN total recuperado de corazones 24 horas después del infarto de miocardio fue clonado en el vector de expresión PCDNA3.1 (Hacia delante- (NOT-1)-AATAAGAAATGCGGCCGCATGGACGCCAAGGTCGTGCTGTGCTGGCC; Reverso-(Xba-1)-TCTAGACTTGTTTAAGGCTTTGTCCAGGTACTCTTGGA. Los fibroblastos cardíacos transfectados establemente con SDF-1 vector de expresión PCDNA3.1 fueron seleccionados con neomicina.

Movilización de célula madre

G-CSF (125 ug/kg) humana recombinante se administró vía inyección intraperitoneal (i.p) durante 5 días comenzando en el día del transplante de mioblasto óseo. Conteo sanguíneo completo y datos diferenciales (Bayer, ADVIA) se obtuvieron en el día 0, 5, 14, y 21 después del transplante. Para medir la extensión acumulativa de la proliferación celular, se inyectó vía i.p 50 mg/kg de BrdU durante 14 días comenzando en el día 5 para

499

permitir que BrdU rotule cualquier célula madre proliferante inducida por G-CSF.

Análisis histológico

Se les practicó eutanasia a las ratas, los corazones fueron obtenidos para análisis 4 semanas después del transplante celular seguido de fijación de perfusión con HistoChoice (Amresco Inc., Solon, OH), y se seleccionaron en tres divisiones iguales perpendiculares al eje largo LV. Los segmentos apicales y mid-ventriculares se insertaron en parafina y se utilizaron varias secciones de 6um de espesor para la inmunohistoquímica. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales para miosina cardiaca (Chemicon), CD45 (Chemicon), Factor VIII (Chemicon), CD117(Santa Cruz Biotechnology) y BrdU (Vector Labs). Se utilizaron anticuerpos secundarios, ya sea rotulados FITC o biotina. Para la cuantificación; se analizaron cinco secciones en la zona infartada para células positivas y densidad vascular. No pudimos realizar rotulación CD117 y BrdU doble porque el tratamiento HCI en nuestro protocolo para la presentación de antigen BrdU dio como resultado la expresión de un epitope nuclear que reconocieron tres anticuerpos CD117 diferentes.

Análisis PCR

Se realizó el análisis RT- PCR en un ARN total separado de los corazones de las ratas como una función de tiempo luego de la ligadura LAD y luego del transplante SKMB. El ARN total fue extraído del tejido mediante el método de cloruro de guanidina isotiocianato- cesio. Los cebadores específicos para la SDF-1 de la rata (hacia adelantes: TTGCCAGCACAAAGACACTCC; Reverso: CTCCAAAGCAAACCGAA TACAG, pares de base 243 del producto esperado, 40 ciclos) se utilizaron y GAPDH (hacia delante: CCCCTGGCCAAGGTCATCCA; Reverso: CGGAAGGCCATGCCAGTGAG, pares de base 238 del producto esperado, 20 ciclos). PCR en tiempo real (Perkin- Elmer, ABI Prism 7700) se utilizó luego para confirmar el aumento en la expresión en los corazones infartados y transplantados utilizando incorporación de SYBR verde en SDF-1 de producto PCR (Hacia delante: ATGCCCCTGCCGATTCTTTG, Reverso: TGTTGTTGCTTTTCAGCCTTGC, pares de base 116 del producto esperado) y GAPDH como se indicara anteriormente.

Constructo de adenovirus

El constructo de adenovirus que codifica FCEV-165 fue un obsequio generoso de Gen Vec, Inc (Gaithersburg, MD). Brevemente,

las células 293 fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC CRL. 1573) y se mantuvieron en medio de Eagle (DMEM) modificado de Dulbecco con suplemento de 10% de suero de ternero. El vector de adenovirus E1, E3 AdFCEV fue generado mediante alineación del plásmido del vector de transporte en un sitio de restricción adyacente la invertida terminal de repetición (ITR)de extremo izquierdo y se contransfectó en 293 células con ADN H5d1324 digerido CLAI. Luego de dos purificaciones de placas secuenciales los bloques vectores se propagaron en 293 células y se purificaron a través de tres grupos de gradientes de cloruro de cesio. El virus purificado fue dializado contra un amortiguador que contienen 10 mM de Tris, pH 7,8, 150 mM de NaCl, 10 mM de MgC12 y 3% de sacarosa y se almacenó en -80 °C hasta su uso. La expresión transgénica está bajo control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como un media ± SEM. Student t- test realizó comparaciones entre los grupos

REIVINDICACIONES

1. El uso de un agente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tejido de miocardio infartado,

el tejido de miocardio infartado que incluye una primera concentración de proteína SDF-1,

el medicamento que es adecuado para incrementar la concentración de proteína SDF-1 en el tejido de miocardio infartado desde la primera concentración hacia la segunda concentración.

2. El medicamento de la reivindicación 1 que comprende mioblastos óseos de mamíferos modificados para expresar la proteína SDF-1 de mamíferos.

3. El medicamento de la reivindicación 2, el mioblasto óseo que es genéticamente modificado con un vector de expresión, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica la proteína SDF-1 de mamíferos.

4. El medicamento de la reivindicación 3, el vector de expresión que comprende un vector viral derivado de al menos un adenovirus,

virus asociado con adenovirus, virus de herpes simple, o retrovirus.

5. El medicamento de la reivindicación 2, los mioblastos óseos que son cultivados ex vivo.

6. El medicamento de la reivindicación 5, los mioblastos óseos que son introducidos en el tejido de miocardio infartado mediante inyección de una suspensión de mioblasto óseo en la periferia del tejido de miocardio infartado o cerca de la misma.

7. El medicamento de la reivindicación 1, el tejido de miocardio infartado y la sangre periférica del tejido de miocardio infartado que incluye una primera concentración de células madre y el medicamento que es adecuado para aumentar la concentración de las células madre en la sangre periférica del tejido infartado desde una primera concentración hacia una segunda concentración.

8. El medicamento de la reivindicación 1, que es adecuado para aumentar la concentración de las células madre en la sangre periférica simultáneamente con el incremento de la concentración de SDF-1 en el tejido de miocardio infartado.

RESUMEN

Método para tratar tejidos de miocardio infartado que incluye, la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado. Se incrementa la concentración de las células madre en la sangre periférica del tejido infartado. El número de células madre en la sangre periférica es incrementada mientras que la concentración de SDF-1 en el tejido infartado es incrementada.

Fig. 1a

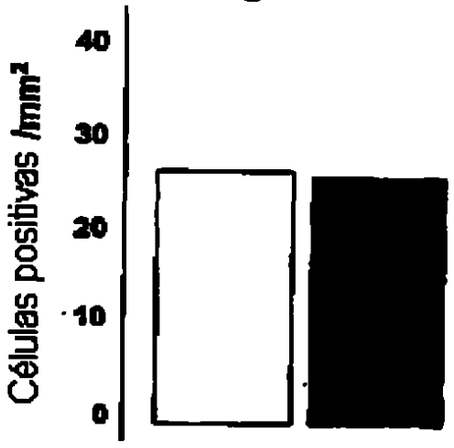

Células positivas /mm²
40
30
20
10
0

Fig. 1b

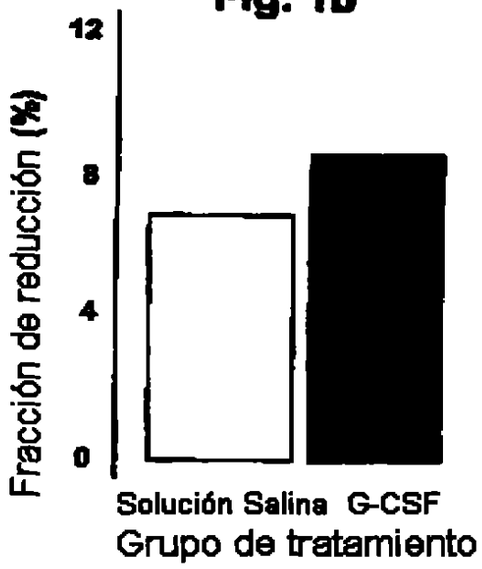

Fracción de reducción (%)
12
8
4
0
Solución Salina
G-CSF
Grupo de tratamiento

Fig. 2a

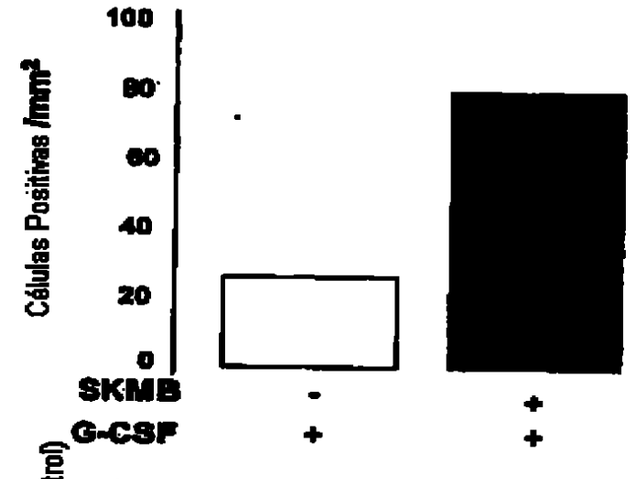

Células Positivas /mm²
100
80
60
40
20
0
SKMB
G-CSF
-
+
+
+

Fig. 2b

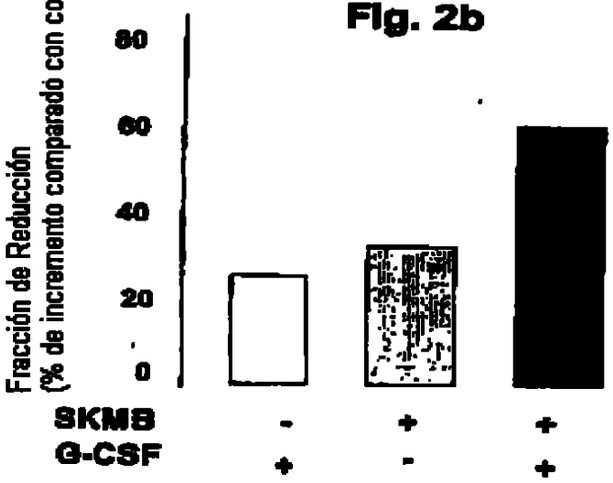

Fracción de Reducción
(% de incremento comparado con control)
80
60
40
20
0
SKMB
G-CSF
-
+
+
+
-
+

Fig.3a



Fig.3b



Fig. 3c

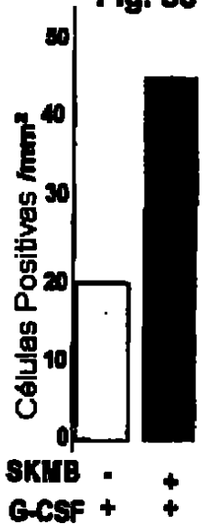


Fig. 4

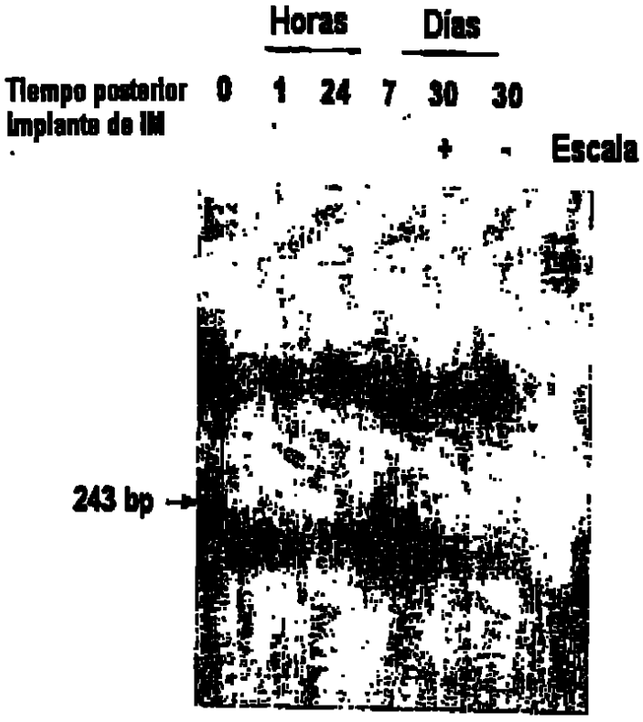

Horas
Días
Tiempo posterior Implante de IM
0
1
24
7
30
30
+
-
Escala
243 bp

Fig. 5a

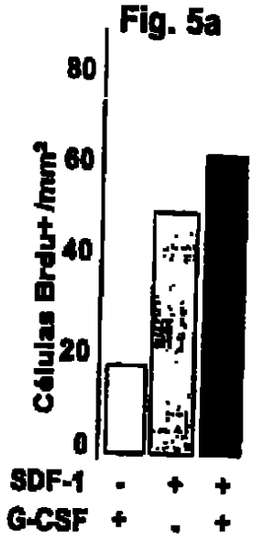


Fig. 5b

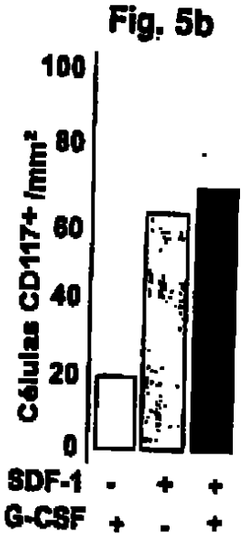


Fig. 5c



Fig. 6a



Fig. 6b

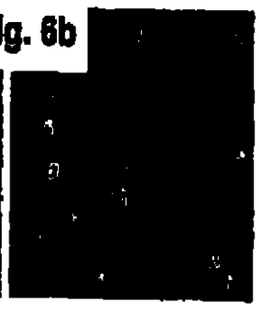
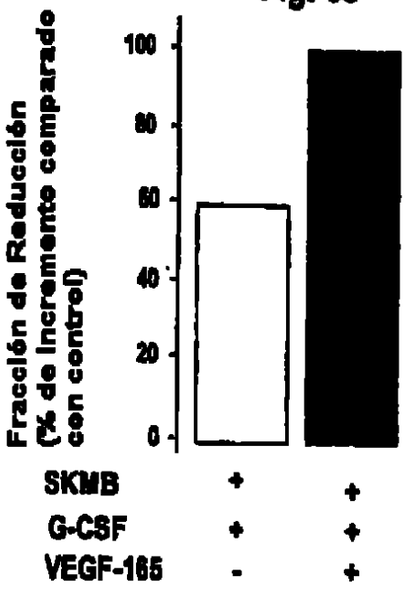


Fig. 6c



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N° PCT/US03/26013

Continuación de B. CAMPOS DE BÚSQUEDA Punto 3:

APS, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Términos buscados: SDF-1, célula madre, alojamiento, miocardio, cardiomiopatía, infartado, vector, movilización

327

512

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/US03/26013

A. Clasificación de la Materia:

IPC(7) A61K 31/70, 48/00, 45/00; A01N 63/00; C12N 15/63, 5/00, 5/08

CLASE INTERNACIONAL: 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o con la clasificación nacional e IPC.

B. Campos de Búsqueda:

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación)

Estados Unidos: 514/44; 424/93.2, 93.21, 93.7, 85.1; 435/320.1, 455, 325, 372

Documentación buscada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos están incluidos en los campos de búsqueda:

--

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda usados):

--

C. Documentos Considerados Relevantes

Categoría*	Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
X	WO 99/45775 A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER) 16 de septiembre de 1999 (16-09-1999), véase el documento completo, particularmente las páginas 4-12 y la página 15, líneas 1-10	1-23
X	US 2002/0061587 A1 (ANVERSA) 23 de mayo de 2002 (23-05-2002), véase el documento completo, particularmente las páginas 4 y 10-13	1-23

[] Se mencionan otros documentos en la continuación del Casillero C.

[] Véase el anexo de familia de patentes

* Categorías especiales de documentos citados:

"A": documento que define el estado general del arte que no se considera de particular relevancia

"E": documento anterior pero publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a ella.

"L": documento que puede arrojar dudas sobre la reivindicación de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita o por otra razón especial (especificada).

"O": documento que refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otro medio.

"P": documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T": documento posterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o a la fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para comprender un principio o teoría que sustenta la invención.

"X": documento de particular relevancia: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implica un paso inventivo cuando el documento se toma solo.

"Y": documento de particular relevancia: la invención reivindicada no puede considerarse que implica un paso inventivo cuando el documento se combina con otro u otros documentos, siendo dicha combinación obvia para un experto en el arte.

"&": documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la finalización efectiva de la búsqueda internacional: 4 de noviembre de 2003 (11-04-2003)

330

515

Fecha de envío del informe de búsqueda internacional: 12 de diciembre de 2003

Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/US:

Casillero de PCT, Atención: ISA/US. Comisario de Patentes, Casilla de Correo 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Fax N° (703)305-3230

Funcionario autorizado: Quang Nguyen, Doctor en Filosofía

Teléfono N° (703) 308-1235

Formulario PCT/ISA/210 (página dos) (julio de 1998)