



TM TAMAYO & ASOCIADOS
INTERNATIONAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Trademark
Patent
Health Permit
Software
Commercial Name
Design

Marcas
Patentes
Registros Sanitarios
Soporte Lógico
Nombres Comerciales
Diseños

05-15803

③ Parte

Señor

JEFE DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05015803 00000004

Folios: 231

Fecha (Año): 2005-04-12 16:39:06

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 444 MEMORIA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF: EXPEDIENTE : 05-15803

**PATENTE PCT : "FACTOR DERIVADO DE LA CELULA
ESTROMAL QUE MEDIA LA ALBERGA LA CELULA MADRE Y
LA REGENERACION DE TEJIDOS EN LA CARDIOMIOPATIA
ISQUEMICA"**

ACTUACION : RESPUESTA EXAMEN DE FORMA

Estimados señores:

CARLOS ORLANDO MAYA RODRÍGUEZ, mayor de edad, vecino de esta ciudad, identificado con la Cédula de Ciudadanía No.17.117.818 expedida en Bogotá, Abogado titulado en ejercicio y portador de la Tarjeta Profesional No. 17.402 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando en calidad de apoderado de la sociedad **THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION**, según Poder debidamente conferido y legalizado, adjunto a las presentes diligencias administrativas, encontrándome dentro del término legal comparezco para responder el oficio de Requerimiento No. 12592 del Examen de Forma, emanado de esa Oficina, y con fundamento en el Artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51

Carrera 13 A No. 28-38 Mz 2 Bufette 245 Parque Central Bavaria

Tel. (57 1) 341 9841 - FAX (57 1) 336 8592 - Cel. (315) 317 1181

E-mails: tncarlos@etb.net.co , trademarks1@hotmail.com

Bogotá D.C., COLOMBIA, S.A.

bis del Reglamento y Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio y la Decisión 486 de 2.000 de C.A.N, en los siguientes términos.

1.- Para dar cumplimiento a los requerimientos de su despacho anexamos:

1.1 Anexamos copia autentica del Poder debidamente legalizado hasta por Apostilla, que le otorga la sociedad CLEVELAND CLINIC FOUNDATION al doctor DANIEL GOYTIA, con el lleno de los requisitos exigidos por los Artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil, junto con su traducción.

1.2- Anexamos copia autentica legalizada hasta por Apostilla, del Poder de sustitución del doctor Daniel Goytia en representación de la sociedad CLEVELAND CLINIC FOUNDATION, al suscrito.

1.3- Anexamos copia autentica legalizada hasta por Apostilla, del documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante CLEVELAND CLINIC FOUNDATION, junto con su traducción.

2.- Anexamos copia del documento de CESION debidamente legalizado por apostilla, de acuerdo al Art. 26-K de la Decisión 486/2000 junto con su traducción.

- 3.- El lugar de constitución de la sociedad solicitante es el Estado de Columbus, Ohio, U.S.A., tal como aparece en el Acta Constitutiva de la sociedad CLEVELAND CLINIC FOUNDATION de acuerdo al Art. 27-C de la Decisión 486/2000, la cual anexamos con el presente documento.
- 4.- No se anexó la traducción de los anexos del reporte del examen preliminar Internacional de acuerdo con el Ar. 36.2.b del tratado PCT, ya que por error se solicitó Capítulo II siendo realmente el CAPITULO I.
- 5.- Se anexa la traducción de la solicitud internacional tal como fue presentada de acuerdo con el Numeral 5.2.5, capítulo quinto del título décimo de la Circular Unica de la SIC. Adicionalmente se presenta copia completa de la Solicitud Internacional.
- 6.- El nuevo título que identificará la patente solicitada será:
"MEDICAMENTO PARA TRATAR TEJIDO DE MIOCARDIO INFARTADO QUE COMPRENDE MIOBLASTOS OSEOS DE MAMIFEROS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA EXPRESAR LA PROTEINA SDF-1 DE MAMIFERO".
Lo anterior de acuerdo con la Regla 4.- PCT, Art 26-27 D-486, Circular Unica 5.2.9.

De acuerdo con lo anterior solicito dar por subsanado dicho requerimiento y de igual forma, se me reconozca Personería para este caso específico y ordenar lo pertinente con el fin de que el expediente en mención siga su curso normal.

NOTIFICACIONES

Mi poderdante y yo recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi Oficina de Abogado ubicada en la Carrera 13A No. 28- 38 Bufete 245 MZ.2 Parque Central Bavaria de la ciudad de Bogotá D.C.

Del señor Jefe,



CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

No.17.117.818 expedida en Bogotá,

T.P No. 17.402 del C.S.J.

State of Florida



Department of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by Felicia Artiles

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

Certified

5. at Tallahassee, Florida

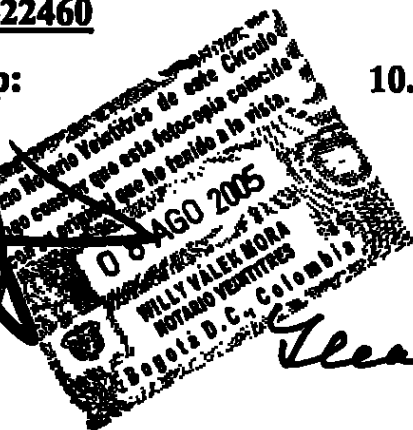
6. the Fourth day of April, A.D., 2005

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2005-22460

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Felicia E. Hood

Secretary of State

DSDE 99 (3/03)

The original document has a reflective line mark in paper. Hold at an angle to view when checking.

USA - LIT/04 02A
GALIZACION
418131775



11:18:03

USA - LIT/04 02A
418033457



11:18:02

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 2827

DANIEL GOYTIA - PATENTS & TRADEMARKS**Power of Attorney****Poder**

The undersigned (1)

El abajo firmante (1)

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION**THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION**

Residing at (2)

Domiciliado en (2)

9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44195, USA

9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44195, USA

hereby grants to DANIEL GOYTIA

por el presente otorga a DANIEL GOYTIA

residing in Buenos Aires, Argentina

domiciliado en Buenos Aires, Argentina

full and ample power of attorney to represent him (it) and to apply to the proper national authorities, either administrative or judiciary for

poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean éstas administrativas y/o judiciales, la obtención de

Patents, Trademarks, Models, Designs and their Renewals

Patentes, Marcas, Modelos, Diseños y sus renovaciones

and to carry out all the necessary steps to protect our rights, which effect they are empowered to take all necessary steps before the said national authorities, either administrative and/or judicial, for the aforementioned purposes, including to file petitions, arguments oppositions, protests, appeals and claims, to waive, settle and compromise; to accept assignments and transfers; to apply for certified copy; to receive documents and other valuable things; to prove workings; to collect monies; to sign public and private instruments and deeds; to either waive or not at their discretion the right of resorting to court proceedings; to do all and whatever shall be necessary before any national judicial and/or administrative authorities to protect the constituent's interests, either as plaintiff or defendant, with power to substitute this instrument and to revoke such substitution. It being understood that the above powers enumerated in this mandate are merely exemplifying and not limitative of other powers and therefore the attorneys-in-fact are authorized to exercise without any restriction whatsoever, all the rights granted by Law or emerging from it or which, may be a consequence of the objects of this mandate and whether this be under legislation at present in force or legislation which may be promulgated in the future.

y realizar todos los tramites conducentes para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales, todos los tramites necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones, protestas, apelaciones y demandas; desistir, arreglar y transigir; aceptar cesiones y transferencias, solicitar testimonios, recibir documentos y otros valores; justificar explotaciones, cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y escrituras publicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emanen y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue.

Dated (3)

Day 14th Of March

20 05

(3) Fechado el
de

de 20

(4) *David E. Rowan*
David E. Rowan, Secretary and General Counsel

(1) Applicant's name - (2) Applicant's address - (3) Date - (4) Applicant's Signature

This document is effective as of February 15, 2005



Felicia Artilles
Felicia Artilles
Commission #DD258763
Expires: Nov. 07, 2007
Banded Type
Atlantic Bonding Co., Inc.

Alejandro M. Liporace
ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3897
ESCRIBANO PUBLICO

CERTIFICADO NOTARIAL (CORPORACIÓN)

Hoy de de 20
compareció a quien conozco, quien luego de
prestar juramento debidamente, declaró y dijo que él es
de

la compañía nombrada en el documento
que antecede, una corporación organizada conforme a las leyes
del Estado de

domiciliada en la ciudad de
Estado de

Legalmente constituida para un período de duración que aún no
ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha
compañía para conferir este poder y que personalmente ha
firmado y estampado el sello de la compañía al pie de dicho poder
en nombre y representación de la compañía mencionada.

El suscrito Notario ha visto los estatutos de incorporación
firmados en

Estado de

Con fecha y certifica que de conformidad con la
legislación de dicho Estado la anterior declaración jurada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son
ciertos o verdaderos de lo cual da fe como asimismo de que el
compareciente firmó este instrumento en su presencia.

KENNETH A. KRIZNER
Notary Public - State of Ohio
My Commission expires 9/30/08

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 14th day of MARCH 2005
personally came **DAVID W. FOWAN**
known to me, who being by me duly sworn did depose and say
that he is the **SECRETARY GENERAL COUNCIL**
of **THE CLEVELAND CLINIC**

FOUNDATION the Company herein named, a Corporation
organized under the laws of the State of **OHIO**
domiciled in the City of **CLEVELAND**
State of **OHIO**

and legally constituted for a period of tenure not yet expired,
furthermore that the deponent is authorized by said Company to
confer this Power of Attorney, and that he personally has signed
and affixed the seal of the Corporation a the foot of such power
of attorney in the name and on behalf of the Corporation
mentioned.

The undersigned Notary Public has seen the Articles of
Incorporation of said Corporation executed in **OHIO**
State of **OHIO**

on (date) **MARCH 14, 2005**
And hereby certifies that under the laws of **OHIO** the
foregoing acknowledgement is a sufficient proof of the facts
therein contained are true, which he attests as also that the
apparer signed this instrument in his presence.

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUAL)

PLANKENHORN
A los días del mes de
20 compareció
personalmente ante mí, Notario Público en y por el condado antes
citado,

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) descrita(s) y firmante(s) del documento que precede,
declarando ante mí que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

SILVIA P. P.
Notary Public (Notario Público)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this day of
20 personally appeared before me, a Notary Public, in and
for the above mentioned county

to me known, and known to me to be the person(s) described
herein, who executed the foregoing document, and duly
acknowledged to me that he(they) executed the same for the uses
and purposes therein expressed.

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUAL)

CHICHIN
A los días del mes de
20 compareció
personalmente ante mí, Notario Público en y por el condado antes
citado,

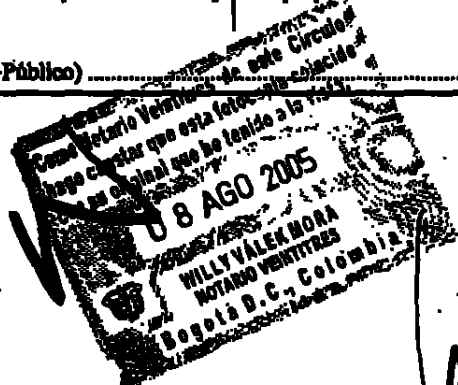
a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) descrita(s) y firmante(s) del documento que precede,
declarando ante mí que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

Notary Public (Notario Público)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this day of
20 personally appeared before me, a Notary Public, in and
for the above mentioned county

to me known, and known to me to be the person(s) described
herein, who executed the foregoing document, and duly
acknowledged to me that he(they) executed the same for the uses
and purposes therein expressed.



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

525 B
525
1

TRADUCCIÓN.-----

[Página 1].-----

ESTADO DE FLORIDA.-----

DEPARTAMENTO DE ESTADO.-----

APOSTILLA.-----

(Convención de La Haya del 05 de octubre de 1961).-----

1. País: Estados Unidos de América.-----

Este documento público-----

2. ha sido firmado por FELICIA ARTILES-----

3. actuando en carácter de Notaria Pública de Florida-----

4. lleva el sello/timbre de Notario Público, Estado de Florida-----

HA SIDO CERTIFICADO-----

5. en Tallahassee, Florida-----

6. el cuatro de abril de 2005-----

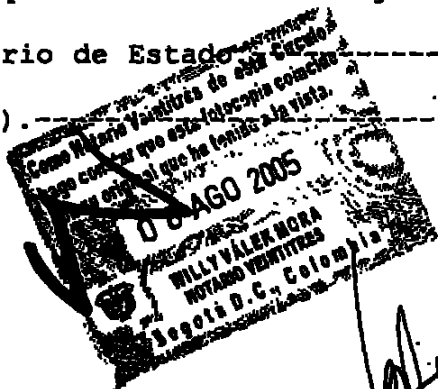
7. por el Secretario de Estado, Estado de Florida-----

8. con el No. 2005-22460-----

9. Sello/Timbre: [Aparece un sello impreso que reza:] Gran Sello del Estado de Florida. En Dios confiamos.-----

10. Firma: [Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Secretario de Estado-----

DSDE 99 (3/03).-----



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

[En el margen superior se lee lo siguiente:] Cualquier copia de este documento en blanco y negro no es oficial.-----

[En el margen inferior aparece lo siguiente:] El documento original tiene una marca de línea que se refleja en el papel. Sostener en ángulo para observarlo cuando sea verificado.----

[En el margen izquierdo aparece lo siguiente:] En caso de ser fotocopiado o alterado químicamente, aparecerá la palabra "NULO".-----

[En el margen derecho aparece lo siguiente:] "Estado de Florida" aparece en letras pequeñas a lo largo de la cara de este documento de 8 1/2 X 11".-----

[Página 2].-----

[Aparece un PODER redactado en dos idiomas: inglés y español]. DANIEL GOYTIA - MARCAS Y PATENTES.-----
PODER.-----

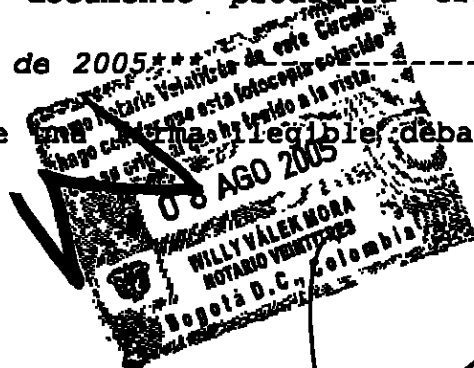
[Al pie del documento se lee:] Fecha: 14 de marzo de 2005.---

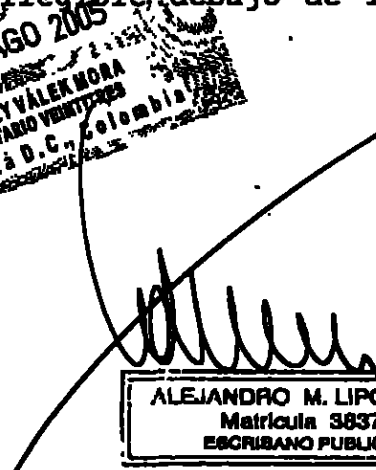
[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] David Rowan, Secretario y Asesor General.-----

(1) Nombre del solicitante; (2) Domicilio del solicitante;
(3) Fecha; (4) Firma del solicitante.-----

Este documento produce efectos a partir del 15 de febrero de 2005-----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se observa un




ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

sello que reza:] NOTARIO PÚBLICO - ESTADO DE FLORIDA. FELICIA ARTILES, Matrícula N° DD258763. Vencimiento: 07 de noviembre de 2007. Asegurada por: Altantic Bonding Co., Inc.-----

[Página 3].-----

[Aparece una Certificación Notarial redactada en dos idiomas: inglés y español].-----

CERTIFICACIÓN NOTARIAL.-----

[Debajo del texto de la certificación se lee:] Notario Público: [Aparece luego una firma ilegible].-----

[A la izquierda se observa un sello que reza:] KERRIE A. KRIZNER, Notaria Pública, Estado de Ohio. Mi mandato concluye el: 20-09-08. [Y luego un sello en relieve que dice: SELLO NOTARIAL, ESTADO DE OHIO.-----

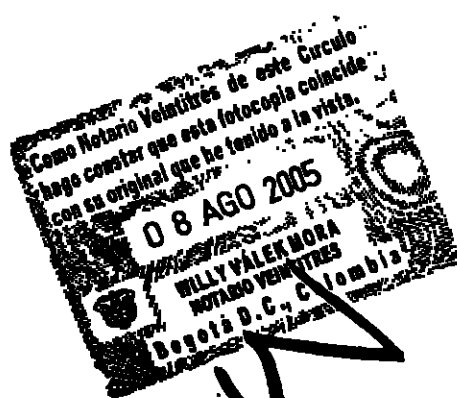
Es traducción fiel al idioma español de la parte pertinente del documento original redactado en idioma inglés y otro, que he tenido a la vista y al cual me remito en la Ciudad de Buenos Aires, a los once días del mes de abril del año dos mil cinco.-----



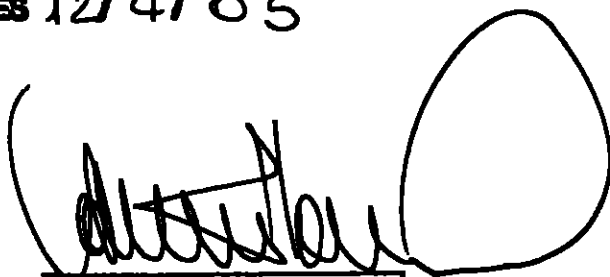
Silvia P. Plankenhorn

SILVIA P. PLANKENHORN
TRADUCTORA PUBLICA
INGLES
MAT. 1 - 1 F. 442 - CAP. FED.
INSUR. C. P.O.B.A. N° 4554

ALEJANDRO M.
Matrícula
ESCRIBANO PL



CERTIFICO EN SELLO DE ACTUA-
CION NOTARIAL N° 700369 64 68
BUENOS AIRES 12/4/05


ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO



CERTIFICACION DE REPRODUCCIONES
LEY 404



T 003696468

Buenos Aires, 12 de Abril de 2005.-

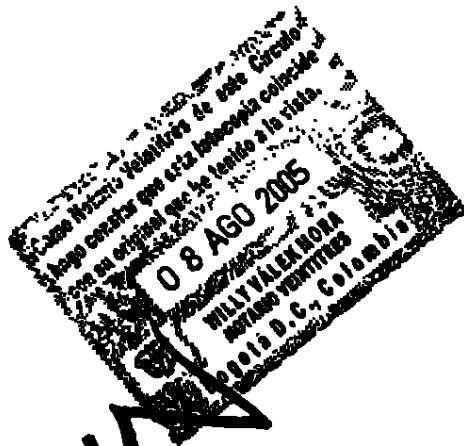
En mi carácter de Escribano Titular del Registro 1331 de Capital Federal.-

CERTIFICO que la reproducción anexa, extendida en Seis.-

foja/s, que sello y firmo, es COPIA FIEL de su original, que tengo a la vista, doy fe.

El Autorizante deja constancia que el documento original cuyas fotocopias se certifican se encuentra redactado en idioma extranjero con su correspondiente traducción al español y consiste en un PODER.-

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO



LIPORACE
3837
BUCO

52812
529



L 006457149

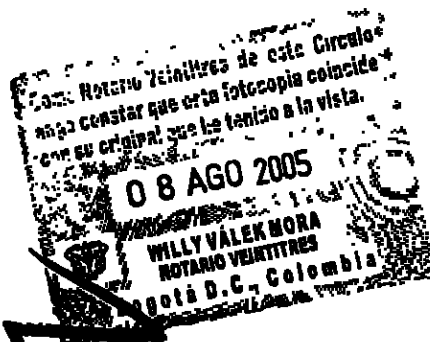
EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano **ALEJANDRO MARIA LIPORACE**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **050418131775/A**. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, **Lunes 18 de Abril de 2005**



ESC. LILIANA MABEL SEREBRISKY
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA



APOSTILLE

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00036077

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por LILIANA MABEL SEREBRISKY

Quien actúa en calidad de CONSEJERA

3. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS

AIRES

En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 18/04/2005

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 050418033457

9. Sello / Timbre



10. Firma

EDC. LUIS FEDERICO BERUTI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



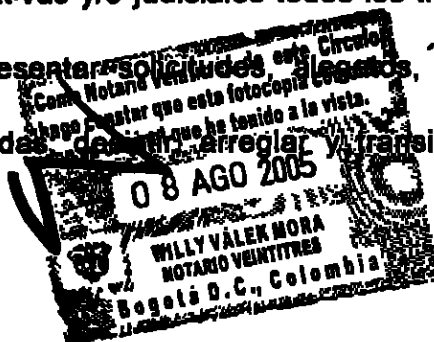
ACTUACION NOTARIAL
LEY 404



N 004708009

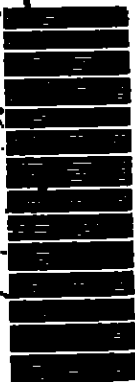
FOLIO 406.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO DOSCIENTOS

CINCO.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a trece de abril de dos mil cinco, ante mi, Escribano Autorizante, **COMPARECE** el Doctor **Daniel GOYTIA**, argentino, mayor de edad, casado, Libreta de Enrolamiento número 4.526.965, domiciliado en Avenida Leandro N. Alem 449, 3º piso, de esta Ciudad.- El compareciente es persona hábil y de mi conocimiento, doy fe, así como que **DICE**: I.- Que por escritura de fecha 12 de abril de 2005 pasada ante mi, al folio 396 del Protocolo de este mismo Registro, al que me remito, doy fe, se protocolizó un Poder otorgado por **THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION**, con domicilio en 9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44195, USA, a su favor.- II.- Que viene por la presente a **SUSTENTUIR** el citado mandato, reservándose para si las facultades, a favor de **"CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS"** y/o Carlos Orlando Maya Rodriguez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Graciela Florez y/o Clara Cortes Charry y/o Mayerling Rocio Castelblanco S., con domicilio en Carrera 13A N° 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Central Bavaria, Bogotá, COLOMBIA, para actuar en dicho país con las siguientes facultades: "... poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean estas administrativas y/o judiciales, la obtención de **"PATENTES, MARCAS, MODELOS, DISEÑOS Y SUS RENOVACIONES"** y realizar todos los trámites conducentes para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales todos los trámites necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones, protestas, apelaciones y demandas de nulidad, interponer recursos de amparo y transigir; aceptar cesiones y



CECBA - LEY 404 - CECBA

050418033456



11:18:02

\$20.00

19/04/2005

CECBA - LEY 404 - CECBA

LEGALIZACION

050418131774



11:18:03

\$20.00

19/04/2005



N 004708009

transferencias; solicitar testimonios; recibir documentos y otros valores; justificar explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y escrituras públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue. Este documento producirá efectos a partir del 15 de febrero de 2005...".- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandato relacionado.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, a aptó y firmó, por ante mi, doy fe.- "SIGUE UNA FIRMA".- Esta mi sello.- Ante mi: ALEJANDRO M. LIPORACE.- CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mi, al folio 406 del Protocolo del Registro 1331, a mi cargo. PARA LOS APODERADOS expido esta PRIMERA COPIA en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 004708009 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

COI
ESC
de la
BUEN



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO



LEGALIZACION
LEY 404



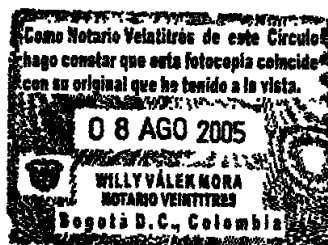
L 006457150

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 050418131774/A. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Lunes 18 de Abril de 2005

ESC. LILIANA MABEL SERENITSKY
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA





APOSTILLE

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00036062

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por LILIANA MABEL SEREBRISKY3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOSAIRES5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 18/04/20057. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 050418033456

9. Sello / Timbre



10. Firma

EGG. LUIS FEDERICO BERUTI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



State of Florida



Department of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **United States of America**

This public document

2. has been signed by Felicia Artiles

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

Certified

5. at Tallahassee, Florida

6. the Seventh day of June, A.D., 2005

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2005-39228

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



DSDE 99 (3/03)



Secretary of State

The original document has a reflective line mark in paper. Hold at an angle to view when checking.

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

535 18 535

1291 2340

Page 27 Line 53
Number 95560

ARTICLES OF INCORPORATION

THE Cleveland
Glenn
Foundation COMPANY.

Filed in the office of the Secretary of State,
Columbus, Ohio, on the 10 day
Feb A. D. 1921
and recorded in Volume 258 page 720

the Records of Incorporations.

STATE OF FLORIDA, COUNTY OF MIAMI-DADE
I, the undersigned FELICIA ARTILES
duly commissioned and qualified, do hereby certify that the
foregoing is a true and faithful copy of the original this day
exhibited to me, the same having been carefully examined by
me and compared with the said original and found to agree
therewith word for word and figure for figure.

IN-WITNESS WHEREOF I have hereunto set my hand and seal
[Signature] 6/5/05
NOTARY PUBLIC SIGNATURE AND SEAL DATE

Felicia Artiles
Commission #DD258763
Expires: Nov. 07, 2007
Bonded Thru
Atlantic Bonding Co., Inc.

Como Notario Voluntario (E) de este Circulo
Hago constar que esta fotocopia coincide
con el original que he tenido a la vista.
21 JUL 2005
NOTARIO PUBLICO
COLUMBUS, O.H.

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

A291 234 95560

ARTICLES OF INCORPORATION

536 536

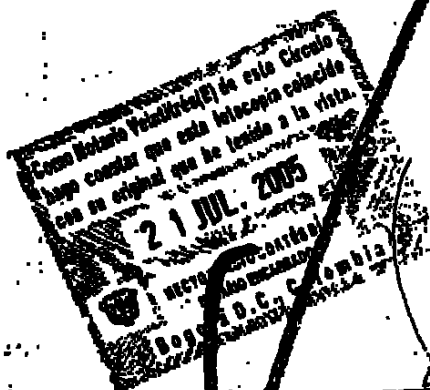
THREE ARTICLES OF INCORPORATION OF THE CLEVELAND CLINIC

desiring to form a corporation not for profit under the general corporation laws of said State, do hereby certify:

FIRST: The name of said corporation shall be THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION;

SECOND: Said corporation and its principal office shall be located at Cleveland, Cuyahoga County, Ohio, and its principal business shall be:

THIRD: The purpose for which said corporation is formed is to own and operate hospitals for sick and disabled persons, to maintain, construct, improve, and equip hospitals, clinics, dispensaries, laboratories, buildings and equipment for medical and hygienic care and treatment of sick and disabled persons, in making scientific diagnoses and clinical studies in, carrying on scientific research in, and conducting public lectures on, the sciences and subjects of medicine, surgery, hygiene, anatomy and kindred sciences and subjects, accepting, receiving and acquiring funds, stocks, securities and property by donations, bequests, devises or otherwise, conveying, holding, investing reinvesting, conveying, exchanging, selling, transferring, leasing, mortgaging, pledging and disposing of, any and all funds, stocks, securities and property so received or acquired, and not receiving compensation for services, care, or attention rendered, and for the purpose of maintaining said hospitals not for profit, and the doing of all acts, exercising all powers and assuming all obligations necessary or incident thereto.



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

20
337

IN WITNESS WHEREOF, we have hereunto set our hands, this
day of February, 1981.

John Phillips
Admiral D. D. D.

THE STATE OF OHIO, COUNTY OF CUYAHOGA, ss.

Personally appeared before me the undersigned, a Notary Public
in and for said county, this 5th day of February, A. D. 1981,
above named Frank C. Bonta, George H. Biele, John Phillips,
Admiral D. D. D., who each severally
and jointly acknowledged to me that they executed the foregoing
instrument and the contents thereof.

Witness my hand and official seal on the day and year
aforesaid.

Lita T. Robinson
Notary Public.

09560

THE STATE OF OHIO, COUNTY OF CUYAHOGA, ss.

I, Edward B. Hasebrodt, Clerk of the Court of Common Pleas for this
county, do hereby certify that the foregoing instrument was
properly acknowledged and qualified, and authorized as such to be
recorded, and further that I am well acquainted with the handwriting and believe
the signature to said acknowledgment is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and official seal
at the Court at Cleveland, Ohio, this 5th day of February, 1981.

Edward B. Hasebrodt
Clerk

Como Notario Público de este Estado
de Ohio certifico que esta fotocopia coincide
con el original que he tenido a la vista.
21 JUL. 2005
RECTORIA NOTARIAL
NOTARIO PUBLICO
Eduardo B. Hasebrodt

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

ALL ARTICLES OF INCORPORATION FILED MUST BE ACCOMPANIED BY FOLLOWING DESIGNATION OF AGENT.

APPROVED
FOR FILING

Original Appointment of Agent

(Section 8623-129, G. C. O.)

1291 2344

95560

JUL 27 1951

KNOW ALL MEN BY THESE PRESENTS, That CLARENCE M. TAYLOR

of 2020 East 93rd Street in Cleveland

Cuyahoga County, Ohio, a natural person and resident

of said county, being the county in which the principal office of The Cleveland

Clinic Foundation (a corporation not for profit) is located, is hereby appointed as the person on

whom process, tax notices and demands against said The Cleveland Clinic Foundation may be served.

The Cleveland Clinic Foundation

By John J. Tracy
Secretary

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Cleveland, Ohio

July 26 1951

The Cleveland Clinic Foundation

2020 East 93rd Street
Cleveland, Ohio

Gentlemen: I hereby accept the appointment as the representative of your company upon whom process, tax notices, or demands may be served.

Clarence M. Taylor
(Agent)

State of Ohio

County of Cuyahoga ss:

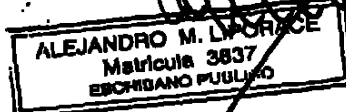
Personally appeared before me, the undersigned, a Notary Public in and for said County, this 26th day of July, 1951, the above named CLARENCE M. TAYLOR, who acknowledged the signing of the foregoing to be his free act and deed for the use and purposes therein mentioned.

WITNESS my hand and official seal on the day and year last aforesaid.

W. B. Connelley
Notary Public in and for

Cuyahoga County, Ohio

W. B. CONNELLEY
My commission expires Aug 18 1952



53824
39

1291 2345

THE STATE OF OHIO, COUNTY OF _____, SS.

Personally appeared before me, the undersigned, a Notary Public in and for said county, this _____ day of _____ A.D. the above named _____

who each severally acknowledged the signing of the foregoing articles of incorporation to be his free act and deed, for the uses and purposes therein mentioned.

Witness my hand and official seal on the day and year last aforesaid.

Notary Public.

(SEAL)

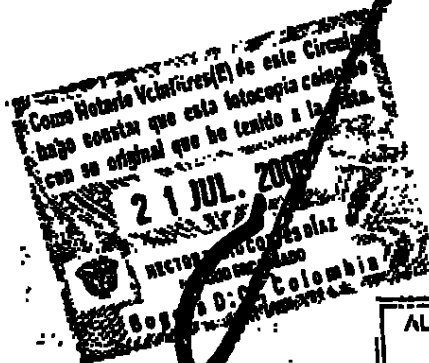
THE STATE OF OHIO, COUNTY OF _____, SS.

I, _____, Clerk of the Court of Common Pleas, within and for the county aforesaid, do hereby certify that

whose name is subscribed to the foregoing acknowledgment as a Notary Public was at the date thereof a Notary Public in and for said county, duly commissioned and qualified, and authorized as such to take said acknowledgment; and further, that I am well acquainted with his handwriting, and believe that the signature to said acknowledgment is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said Court, at _____ this _____ day of _____ A.D.

(SEAL)



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

STATE OF OHIO

546-123
540

Filed:
Feb. 10th, 1921
Corp. No. 95560

THESE ARTICLES OF INCORPORATION OF THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

WITNESSETH, That we, the undersigned, all of whom are citizens of the State of Ohio, desiring to form a corporation, not for profit, under the general corporation laws of said State, do hereby certify:

FIRST, The name of said corporation shall be The Cleveland Clinic Foundation

SECOND, Said corporation is to be located at Cleveland, Cuyahoga County, Ohio, and its principal business there transacted.

THIRD, Subject-matter of the corporation. The purpose for which said corporation is formed is to own and conduct hospitals for sick and disabled persons; and in connection therewith, owning, maintaining, developing and conducting institutions, dispensaries, laboratories, buildings and equipment for medical, surgical and hygienic care and treatment of sick and disabled persons, engaging in making scientific diagnoses and clinical studies, in carrying on scientific research in, and conducting public lectures on, the sciences and subjects of medicine, surgery, hygiene, anatomy and kindred sciences and subjects, accepting, receiving and acquiring funds, stock, securities and property by donations, bequests, devises or otherwise, and using, holding investing, reinvesting, conveying, exchanging, selling, transferring, leasing, mortgaging, pledging and disposing of, any and all funds, stocks, securities and property so received, charging and receiving compensation for services, care, treatment and accommodations for the purpose of maintaining said hospitals not for profit and the doing of all acts, exercising all powers and assuming all obligations necessary or incident thereto.

IN WITNESS WHEREOF, We have hereunto set our hands, this 5th day of Feb. A. D. 1921

Frank E. Bunts
George W. Crile
William E. Lower
John Phillips
Edward C. Daoust

The State of Ohio, County of Cuyahoga ss:
Personally appeared before me, the undersigned, a Notary Public in and for said county, this 5th day of February, A. D. 1921, the above named Frank E. Bunts, George W. Crile, William E. Lower, John Phillips,

and Edward C. Daoust, who each severally acknowledged the signing of the foregoing articles of incorporation to be his free act and deed, for the uses, and purposes therein mentioned. Witness my hand, and official seal on this day and year aforesaid.



Litta F. Perkins Notary Public

The State of Ohio, County of Cuyahoga ss:
I, Edward E. Harcourt, Clerk of the Court of Common Pleas, within and for the county aforesaid, do hereby certify that Litta F. Perkins whose name is subscribed to the foregoing acknowledgement as a Notary Public was at the date thereof a Notary Public, in and for said county, duly commissioned and qualified, and authorized, as such to take said acknowledgment, and further, that I am well acquainted with his handwriting and believe that the signature to said acknowledgment is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand, and affixed the seal of said Court, at



Cleveland, Ohio, this 5th day of Feb. A. D. 1921

United States of America
STATE OF OHIO
Office of the Secretary of State

Edward E. Harcourt, Clerk.
By, P. M. Gibbons - Deputy Clerk.

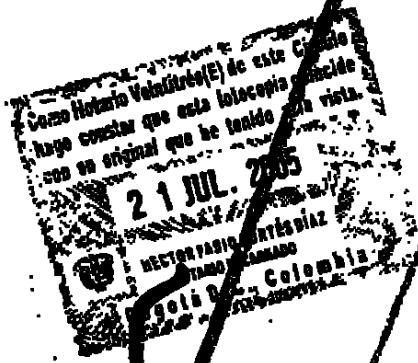
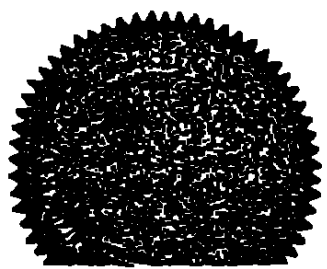
I, WARREN C. Smith, Secretary of State of the State of Ohio, do hereby certify that the foregoing is an exemplified copy carefully compared by me with the original record now in my official custody as Secretary of State, and found to be true and correct, of the Articles of Incorporation of

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

Filed in this office on the 10th day of Feb. A. D. 1921, and recorded in Volume 256, Page 20, of the Records of Incorporations.

Witness my hand and official seal at Columbus, Ohio, this 10th day of February, A. D. 1921.

Warren C. Smith

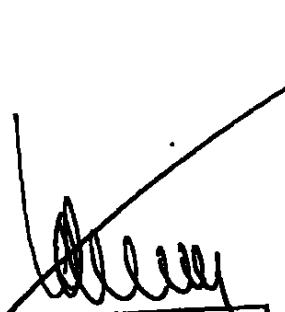


ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

TYPED VERSION OF
CCF ARTICLES OF INCORPORATION

(For legibility reasons)

Have not been amended since original filing of February 10, 1921


ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO


Como Notario Velatirica(E) de este Circulo
hago constar que esta fotocopia colada
con su original que he tenido a la vista.
21 JUL. 2005
OFICINA NOTARIAL
BOGOTA D.C. Colombia

STATE OF OHIO

Filed
February 10, 1921
Corp. No. 95560

THESE ARTICLES OF INCORPORATION OF
THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

WITNESSETH, That we, the undersigned, all of whom are citizens of the State of Ohio, desiring to form a corporation, not for profit, under the general corporation laws of said State, do hereby certify:

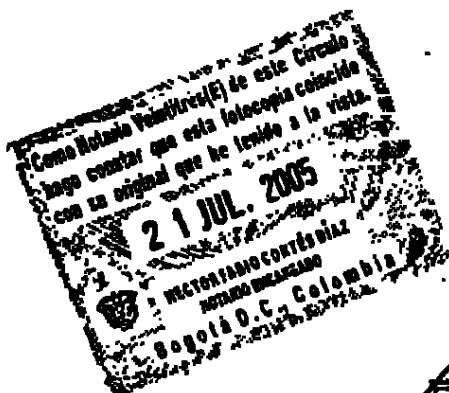
FIRST: The name of said corporation shall be THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION.

SECOND: Said corporation is to be located at CLEVELAND in CUYAHOGA COUNTY, Ohio, and its principal business there transacted.

THIRD: The purpose for which said corporation is formed is to own and conduct hospitals for sick and disabled persons; and in connection therewith, owning, maintaining, developing and conducting institutions, dispensaries, laboratories, buildings and equipment for medical, surgical and hygienic care and treatment of sick and disabled persons, engaging in making scientific diagnoses and clinical studies, in carrying on scientific research in, and conducting public lectures on, the sciences and subjects of medicine, surgery, hygiene, anatomy and kindred sciences and subjects, accepting, receiving and acquiring funds, stock, securities and property by donations, bequests, devises or otherwise, and using, holding, investing, reinvesting, conveying, exchanging, selling, transferring, leasing, mortgaging, pledging and disposing of, any and all funds, stock, securities and property so received, charging and receiving compensation for services, care, treatment and accommodations for the purpose of maintaining said hospitals not-for-profit and the doing of all acts, exercising all powers and assuming all obligations necessary or incident thereto.

IN WITNESS WHEREOF, we have hereunto set our hands, this 5th day of February A.D. 1921.

Frank E. Motts
George W. Crile
William E. Lower
John Phillips
Edward C. Daoust



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3937
ESCRIBANO PÚBLICO

TRADUCCIÓN PÚBLICA.

[Página 1].

ESTADO DE FLORIDA.

DEPARTAMENTO DE ESTADO.

APOSTILLA.

(Convención de La Haya del 05 de octubre de 1961).

1. País: Estados Unidos de América.

Este documento público

2. ha sido firmado por FELICIA ARTILES

3. actuando en carácter de Notaria Pública de Florida

4. lleva el sello/timbre de Notaria Pública, Estado de Florida

ha sido CERTIFICADO

5. en Tallahassee, Florida

6. el siete de junio de 2005

7. por el Secretario de Estado, Estado de Florida

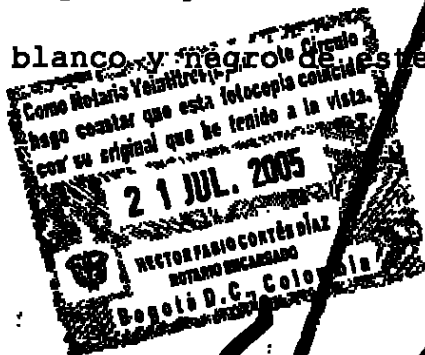
8. con el No. 2005-39228

9. Sello/Timbre: [Aparece un sello impreso que reza:] Gran Sello del Estado de Florida. En Dios confiamos.

10. Firma: [Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Secretario de Estado.

DSDE 99 (3/03).

[En el margen superior se lee lo siguiente:] Cualquier copia en blanco y negro de este documento no es oficial.



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

84427
544

[En el margen inferior aparece lo siguiente:] El documento original tiene una marca de línea que se refleja en el papel. Sostener en ángulo para observarla cuando sea verificado.-----

[En el margen izquierdo aparece lo siguiente:] En caso de ser fotocopiado o alterado químicamente, aparecerá la palabra "NULO".-----

[En el margen derecho aparece lo siguiente:] "Estado de Florida" aparece en letras pequeñas a lo largo de la cara de este documento de 8 1/2 X 11".-----

[Página 1 - reverso].-----

[En el margen inferior izquierdo se lee el siguiente número:] 0023299.-----

[Página 2].-----

[Esta página consiste en la copia de un documento cuyo contenido resulta parcialmente legible].-----

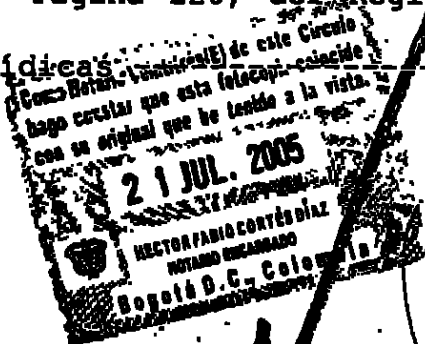
A291 - 2340.-----

Página 27 - Línea 53 - Número 95560.-----

ACTA CONSTITUTIVA.-----

De la sociedad: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION-----

Presentada en la oficina de la Secretaria de Estado, Columbus, Ohio, el 10 de febrero de 1921, se inscribió en el Tomo 258, Página 220, del Registro de Inscripciones de Personas Jurídicas.-----



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

28
545

[Aparece debajo un texto que resulta ilegible].-----

[A la derecha se observa un sello que dice:]-----

ESTADO DE FLORIDA, CONDADO DE MIAMI-DADE.-----

Yo, la abajo subscripta FELICIA ARTILES, debidamente matriculada y habilitada, por la presente certifico que el documento precedente es copia fiel y exacta del documento original que en el día de la fecha se exhibió ante mí; he examinado y comparado cuidadosamente dicha copia con su original para concluir que ambos documentos coinciden en cada una de sus palabras y en cada uno de sus números.-----

EN FE DE LO CUAL, suscribo la presente con mi firma y sello.-----

Notaria Pública - Firma y sello. [Aparece una firma ilegible].-----

Fecha: 07-06-05.-----

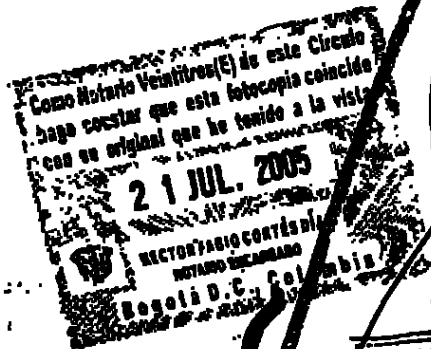
[Se observa debajo un sello que reza:] NOTARIA PÚBLICA, ESTADO DE FLORIDA. FELICIA ARTILES - Matrícula N° DD258763, con vencimiento el 07 de noviembre de 2007. Asegurada por Altantic Bonding Co., Inc.-----

[Página 3].-----

[Esta página consiste en la copia de un documento cuyo contenido resulta parcialmente legible]-----

A291 - 2341 - 95560.-----

ACTA CONSTITUTIVA.-----



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

546 29
546

ACTA CONSTITUTIVA DE THE CLEVELAND CLINIC [lo que sigue resulta ilegible].-----

[El párrafo siguiente resulta ilegible].-----

PRIMERO: El nombre de la sociedad será THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION.-----

SEGUNDO: Dicha sociedad y sus oficinas principales tendrán su domicilio en Cleveland, Condado de Cuyahoga, Ohio [el resto resultad ilegible].-----

TERCERO: El objeto por el cual se constituye la sociedad es [lo que sigue resulta sólo parcialmente legible, lo cual priva de cohesión al texto en su conjunto e imposibilita realizar una traducción adecuada].-----

[Página 4].-----

[Esta página consiste en la copia de un documento cuyo contenido resulta parcialmente legible].-----

A291 - 2342 - 95560.-----

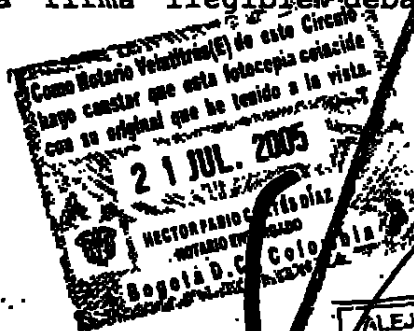
EN PRUEBA DE CONFORMIDAD, firmamos la presente, a los 5 días del mes de febrero de 1921.-----

[Lo que sigue resulta ilegible].-----

ESTADO DE OHIO, CONDADO DE [lo que sigue resulta ilegible].

A los 5 días de febrero de 192, ante mí, Notario Público en y para dicho condado, comparecieron personalmente [lo que sigue resulta ilegible].-----

[Aparece una firma ilegible, debajo de la cual se lee:]



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

237 30
547

Notario Público.-----

ESTADO DE OHIO, CONDADO DE CUYAHOGA. A SABER:-----

[El texto que sigue resulta sólo parcialmente legible, lo cual priva de cohesión al texto en su conjunto e imposibilita realizar una traducción adecuada].-----

[Página 5].-----

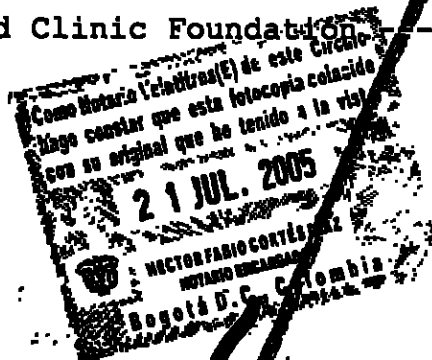
Todas las Actas Constitutivas Presentadas deben estar acompañadas por la siguiente designación de representante.-----

APROBADA PARA SU PRESENTACIÓN.-----

DESIGNACIÓN DE REPRESENTANTE ORIGINAL (Sección 8623-129, G.C.O.) [A la derecha aparece un texto que resulta ilegible].-----

A291 - 2344 - 95560.-----

POR LA PRESENTE SE COMUNICA A QUIEN CORRESPONDA QUE (nombre del representante) Clarence M. Taylor de (calle o avenida) 2020 East 93rd Street, en (ciudad o pueblo) Cleveland, Condado de Cuyahoga, Ohio, persona física residente en dicho condado, que es el condado en el cual tiene sus oficinas principales (nombre de la sociedad) The Cleveland Clinic Foundation (persona jurídica sin fines de lucro), queda designada como la persona facultada para recibir las notificaciones oficiales relacionadas con procesos, impuestos y demandas contra (nombre de la sociedad) The Cleveland Clinic Foundation.-----



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3887
ESCRIBANO PÚBLICO

548
548

(Nombre de la Sociedad) The Cleveland Clinic Foundation.---

A través de [aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Secretario.-----

Cleveland, Ohio, 26 de julio de 1951.-----

(Nombre de la Sociedad) The Cleveland Clinic Foundation.---

2020 East 93rd Street, Cleveland, Ohio.-----

A quien corresponda: En este acto acepto la designación como representante de su empresa, a quien se dirigirán todas las notificaciones oficiales relacionadas con procesos, impuestos y demandas.-----

(Representante) [Aparece una firma ilegible].-----

Estado de Ohio, Condado de Cuyahoga. A saber:-----

A los 26 días de julio de 1951, ante mí, Notario Público en y para dicho Condado, compareció personalmente el arriba nombrado Clarence M. Taylor, quien reconoció haber firmado el documento precedente en un acto libre y voluntario para los usos y fines allí establecidos.-----

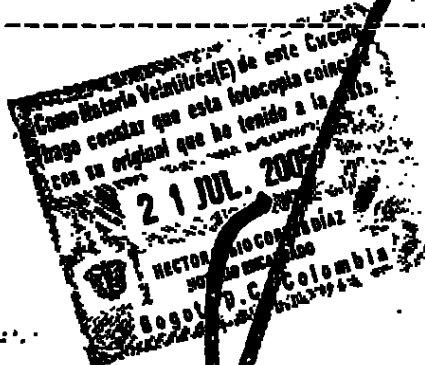
EN FE DE LO CUAL, suscribo la presente con mi firma y sello oficial, en la fecha arriba indicada.-----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:]

Notario Público en y para el Condado de Cuyahoga, Ohio.----

[Se observa debajo un sello cuyo contenido resulta ilegible].-----

[Página 6].-----



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

A291 - 2345.-----

ESTADO DE OHIO, CONDADO DE [en blanco]. A saber:-----

A los [en blanco] días del mes de [en blanco] de [en blanco], ante mí, Notario Público abajo subscripto en y para dicho condado, compareció personalmente el(os) arriba nombrado(s) [en blanco], quien(es) reconoció(eron) haber firmado el Acta Constitutiva precedente en un acto y libre y voluntario, para los usos y fines allí establecidos.-----

En fe de lo cual, suscribo la presente con mi firma y sello oficial, en la fecha arriba indicada.-----

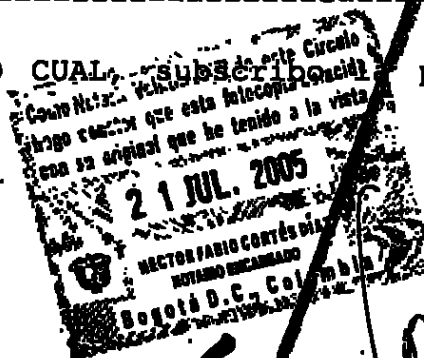
Notario Público [en blanco].-----

(SELLO) [En blanco].-----

ESTADO DE OHIO, CONDADO DE [en blanco]. A saber:-----

Yo, [en blanco], Secretario del Tribunal de Primera Instancia, en y para dicho condado, por la presente certifico que [en blanco], cuyo nombre subscribe la certificación precedente en su carácter de Notario Público era, en esa fecha, Notario Público en y para dicho condado, debidamente matriculado y habilitado, y autorizado como tal para realizar certificaciones; asimismo, certifico que conozco la caligrafía de dicho Notario Público que creo que la firma que acompaña tal certificación es su firma auténtica.-----

EN FE DE LO CUAL, suscribo la presente con mi firma y



[Handwritten signature]
ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

acompañó el sello oficial de dicho tribunal, en [en
blanco], a los [en blanco] días del mes de [en blanco] del
año [en blanco].-----

SECRETARIO - [En blanco].-----

(SELLO) - [En blanco].-----

[Página 7].-----

ESTADO DE OHIO.-----

Presentado: 10 de febrero de 1921.-----

Persona Jurídica N° 95560.-----

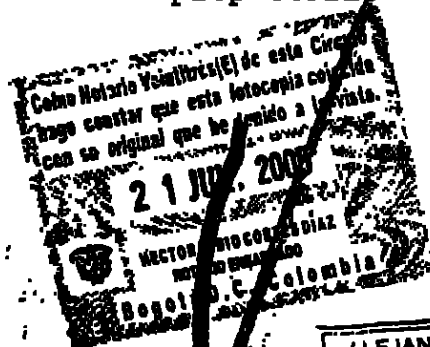
ACTA CONSTITUTIVA DE THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION.-----

CONÓZCASE QUE, quienes abajo subscribimos, todos ciudadanos
del Estado de Ohio, con la intención de constituir una
sociedad, persona jurídica sin fines de lucro, en
conformidad con la ley general de personas jurídicas de
dicho Estado, declaramos:-----

PRIMERO: El nombre de la entidad será The Cleveland Clinic
Foundation.-----

SEGUNDO: La sociedad se encuentra ubicada en Cleveland, en
el Condado de Cuyahoga, Ohio, donde se desarrollan sus
actividades principales.-----

TERCERO: El objeto para el cual se constituye dicha
sociedad es ser titular de y administrar hospitales para
personas enfermas y minusválidas; en relación a lo
anterior, ser propietario de equipamiento médico,



ALEJANDRO M. KIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

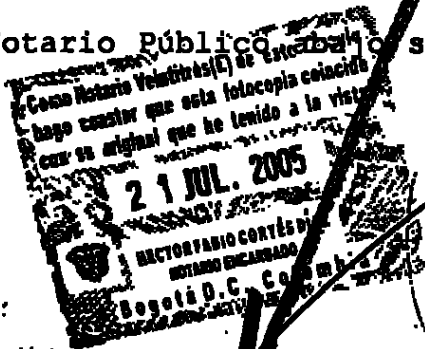
quirúrgico y para el tratamiento y el cuidado de la higiene de personas enfermas o minusválidas, participar en la elaboración de diagnósticos científicos y estudios médicos, llevar a cabo investigaciones científicas, conferencias públicas relacionadas con las siguientes ciencias y materias: medicina, cirugía, higiene, anatomía, y ciencias de la familia; aceptar, recibir y adquirir fondos, acciones, valores y otros bienes a través de donaciones, legados, y de otras formas; utilizar, invertir, reinvertir, traspasar, intercambiar, vender, transferir, locar, hipotecar, embargar, y disponer de todos y cualquiera de los fondos, acciones, valores y bienes recibidos; cobrar y recibir contraprestación por servicios prestados, cuidado, tratamiento y alojamiento, con la finalidad de mantener dichos hospitales, sin fines de lucro,; y realizar todos los actos, ejercer todas las facultades y asumir todas las obligaciones necesarias o inherentes a la actividad.-----

EN PRUEBA DE CONFORMIDAD, firmamos el presente, a los 5 días del mes de febrero del 1921.-----

Frank E. Bunts; George W. Crile; William E. Dwyer; John Phillips; Edward C. Daoust.-----

Estado de Ohio, Condado de Cuyahoga. A saber:-----

A los 05 días del mes de febrero de 1921, ante mí, [en blanco], Notario Público, [en blanco] o subscripto, en y para dicho



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

condado, comparecieron personalmente los arriba nombrados Frank E. Bunts, George W. Crile, William E. Lower, John Phillips y Edward C. Daoust, quienes por separado reconocieron que han firmado el acta constitutiva precedente en un acto libre y voluntario, para los usos y fines allí establecidos.-----

En fe de lo cual suscribo la presente con mi firma y sello oficial, en la fecha antes mencionada.-----

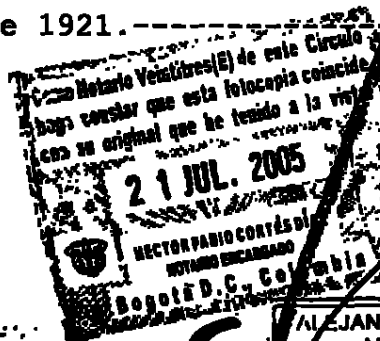
Litta F. Perkins, Notaria Pública.-----

(Sello) [En blanco].-----

Estado de Ohio, Condado de Cuyahoga. A saber:-----

Yo, Edmund B. Haserodt, Secretario del Tribunal de Primera Instancia, en y para el condado antes mencionado, por la presente certifico que Litta B. Perkins, cuyo nombre suscribe la certificación precedente en su carácter de Notaria Pública, era, en esa fecha, Notaria Pública en y para dicho condado, debidamente matriculada y habilitada, y autorizada como tal para realizar certificaciones; asimismo, certifico que conozco la caligrafía de dicha Notaria Pública, y que creo que la firma que aparece en la certificación es auténtica.-----

EN FE DE LO CUAL, firmo la presente y estampo el sello de dicho Tribunal, en Cleveland, Ohio, a los 9 días del mes de febrero de 1921.-----



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

(Sello) [En blanco].-----

Edmund B. Haserodt, Secretario. Por P. M. Gibbons -
Secretario Suplente.-----

Estados Unidos de América. Estado de Ohio, Oficina de la
Secretaria de Estado. A saber:-----

Yo, Harvey C. Smith, Secretario de Estado, del Estado de
Ohio, por la presente certifico que la copia que antecede
es una copia, cuidadosamente compara por mí con el registro
original ahora bajo mi custodia oficial como Secretario de
Estado, y que declaro es copia fiel y exacta del Acta
Constitutiva de THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION, presentada
en esta oficina el 10 de febrero de 1921, e inscrita en el
Tomo 256, Página 220, del Registro de Personas Jurídicas.-
En fe de lo cual, suscribo el presente con mi firma y
sello oficial, en Columbus, Ohio, a los 10 días del mes de
febrero de 1921.-----

[Aparece una firma ilegible]. [A la izquierda se observa
una estampilla cuyo contenido resulta ilegible].-----

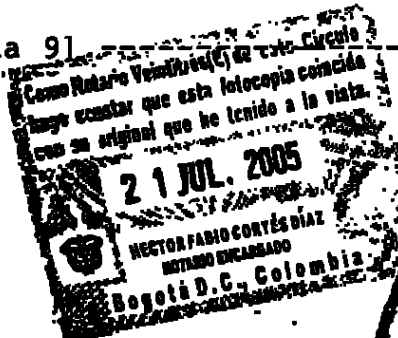
[Página 8].-----

VERSIÓN MECANOGRAFIADA DEL ACTA CONSTITUTIVA DE CCF.-----

(A los fines de su legibilidad).-----

Sin modificaciones desde la presentación original del 10 de
febrero de 1921.-----

[Página 9].-----



LEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

ESTADO DE OHIO.-----

Presentada:-----

10 de febrero de 1921.-----

Persona Jurídica N° 95560.-----

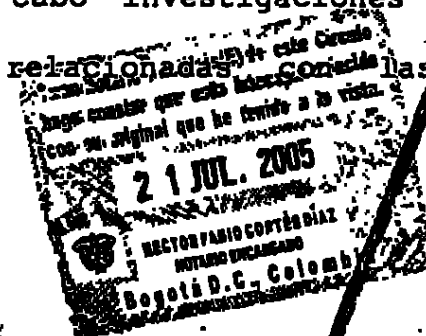
ACTA CONSTITUTIVA DE THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION.-----

CONÓZCASE QUE, quienes abajo subscribimos, todos ciudadanos del Estado de Ohio, con la intención de constituir una sociedad, persona jurídica sin fines de lucro, en conformidad con la ley general de personas jurídicas de dicho Estado, declaramos:-----

PRIMERO: El nombre de la entidad será **THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION.**-----

SEGUNDO: La sociedad se encuentra ubicada en **Cleveland**, en el **Condado de Cuyahoga**, Ohio, donde se desarrollan sus actividades principales.-----

TERCERO: El objeto para el cual se constituye dicha sociedad es ser titular de y administrar hospitales para personas enfermas y minusválidas; en relación a lo anterior, ser propietario de equipamiento médico, quirúrgico y para el tratamiento y el cuidado de la higiene de personas enfermas o minusválidas, participar en la elaboración de diagnósticos científicos y estudios médicos, llevar a cabo investigaciones científicas conferencias públicas relacionadas con las siguientes ciencias y



[Handwritten signature of Alejandro M. Liporace]

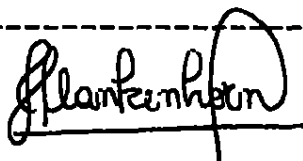
ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

materias: medicina, cirugía, higiene, anatomía, y ciencias de la familia; aceptar, recibir y adquirir fondos, acciones, valores y otros bienes a través de donaciones, legados, y de otras formas; utilizar, invertir, reinvertir, traspasar, intercambiar, vender, transferir, locar, hipotecar, embargar, y disponer de todos y cualquiera de los fondos, acciones, valores y bienes recibidos; cobrar y recibir contraprestación por servicios prestados, cuidado, tratamiento y alojamiento, con la finalidad de mantener dichos hospitales, sin fines de lucro,; y realizar todos los actos, ejercer todas las facultades y asumir todas las obligaciones necesarias o inherentes a la actividad.-----

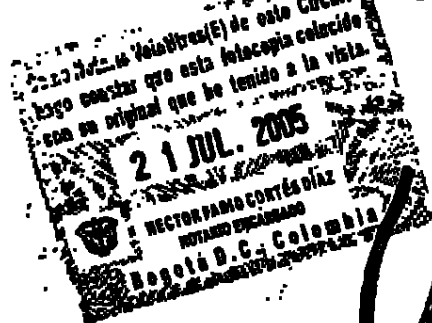
EN PRUEBA DE CONFORMIDAD, firmamos la presente, a los 5 días del mes de febrero del 1921.-----

Frank E. Bunts; George W. Crile; William E. Lower; John Phillips; Edward C. Daoust.-----

Es traducción fiel al idioma español del documento original redactado en idioma inglés, que he tenido a la vista y al cual me remito en la Ciudad de Buenos Aires, a los veintinueve días del mes de junio del año dos mil cinco.---



SILVIA P. PLANKENHORN
TRADUCTORA PUBLICA
INGLES
MAT. T. XII - F 488 - UOAR. FED.
INSCRIP. Q.T.P.C.B. N° 4884

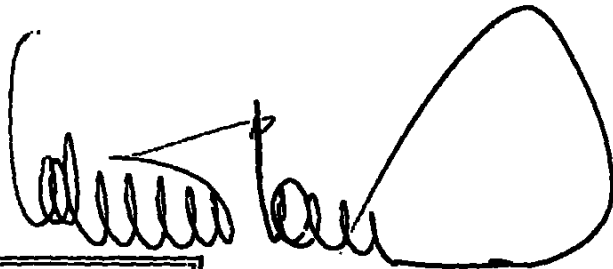


ALEJANDRO
MORA
ESCRIBE

ENHORN
PUBLICA

C.A.P. FED.
Nº 4864

CERTIFICO EN SELLO DE ACTUA-
CION NOTARIAL Nº T003987437
BUENOS AIRES 4 17 105



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

Como Secretario Vicesecretario(E) de este Circulo
Dejo constar que esta fotocopia coincide
con el original que he tenido a la vista.
21 JUL. 2005
ALEJANDRO MORA
BOGOTA D.C. Colombia



CERTIFICACION DE REPRODUCCIONES
LEY 404



556 37

T 003987437

Buenos Aires, 4 de Julio de 2005.-

En mi carácter de Escribano Titular del Registro 1331 de Capital Federal.-

CERTIFICO que la reproducción anexa, extendida en Veintidos.-

foja/s, que sello y firmo, es COPIA FIEL de su original, que tengo a la vista, doy fe.

El Autorizante deja constancia que el documento original cuyas fotocopias se certifican se encuentra redactado en idioma extranjero con su correspondiente traducción al español y consiste en un ACTA CONSTITUTIVA de THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION.-

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

Como Notario Verificador(E) de este Circulo
depo constar que esta fotocopia coincide
con un original que he tenido a la vista.
21 JUL. 2005
HECTOR PABLO CORTESOLAZ
NOTARIO ENCARGADO
Bogotá D.C., Colombia

JO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by Felicia Artiles

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

Certified

5. at Tallahassee, Florida

6. the Fourth day of April, A.D., 2005

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2005-22462

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Glenda E. Hood

Secretary of State

DSDE 99 (3/03)

The original document has a reflective line mark in paper. Hold at an angle to view when checking.

558
41188
558

A 1289729



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME;

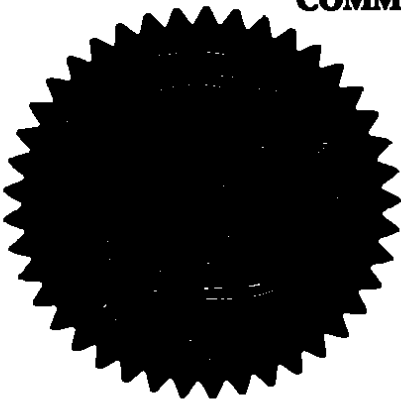
UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

March 08, 2005

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
APRIL 30, 2003.**

**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



M. K. Hawkins

M. K. HAWKINS

Certifying Officer

Felicia Artiles



**Felicia Artiles
Commission #DD258763
Expires: Nov. 07, 2007
Banded Thru
Altmatic Bonding Co., Inc.**

FORM PTO-1595
(Rev. 6-03)

OMB No. 0851-0011 (exp. 4/94)
Tab settings 900 t

05-08-2003



102442957

3ET

U.S. Department of Commerce
Patent and Trademark Office
OUR FILE CCF-6288NP

tt

To the Honorable Commissioner of

attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):
Marc S. Peret; Armen T. Askari; and
Matthew Kladrowski

4-30-03

Additional name(s) of conveying party(ies) attached ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

- ☒ Assignment ☐ Merger
☐ Security Agreement ☐ Change of Name
☐ Other _____

Execution Date: April 29, 2003

2. Name and address of receiving party(ies)

Name: The Cleveland Clinic Foundation

Internal Address: _____

Street Address: 9500 Euclid Avenue

City: Cleveland State: OH Zip: 44195

Additional name(s) and address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

RECEIVED
U.S. PATENT & TRADEMARK OFFICE
04/30/03

4. Application number(s) or patent number(s):

10426712

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is April 29, 2003

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom
correspondence concerning document
should be mailed:

Name: Richard S. Wesorick

Internal Address: Taroli, Sundheim, Covell,

& Tummino L.L.P.

Street Address: 528 Superior Avenue, Suite 1111

City: Cleveland State: Ohio Zip: 44114-1400

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41).....\$40.00

- ☒ Enclosed is a check for the amount indicated above.
☐ Authorized to be charged to deposit account.

8. Deposit Account No.

20-0090 (charge for insufficient fees only)

(Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)

DO NOT USE SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document

Richard S. Wesorick
Name of Person Signing
Reg. No. 40,871

Signature

Date

4/30/03

Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 3

05/02/2003 EFILED 00000036 10426712

03 FC:0021

40.00 OP

Mail Documents to be recorded with required cover sheet information to:
Commissioner of Patents & Trademarks, Box Assignments
Washington D.C. 20231

PATENT
REEL: 014032 FRAME: 0476

548
560

ASSIGNMENT

WHEREAS, we, Marc S. Penn, Arman T. Askari, and Matthew Kledrowski, 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 Kledrowski 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, 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
My commission has no expiration date.
Exhibit 10.1.1.1.1.1.1


Notary Public
REEL: 014032 FRAME: 0476

581
561

Signed at
County of Cuyahoga
This 29th

and State of Ohio
day of April, 2003

Arman T. Askari
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.

Theodore C. Theofrastous
Notary Public

Signed at
County of Cuyahoga
This 29th

and State of Ohio
day of April, 2003

Matthew Kledrowski
Matthew Kledrowski

STATE OF Ohio
COUNTY OF Cuyahoga

On this 29th day of April, 2003
Personally appeared before me Matthew Kledrowski 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.

Theodore C. Theofrastous
Notary Public

563
562

TRADUCCIÓN PÚBLICA -----
ESTADO DE FLORIDA -----
DEPARTAMENTO DE ESTADO -----
APOSTILLA -----
[Aparece una frase en otro idioma] -----
1. País: Estados Unidos de Norteamérica -----
Este documento público -----
2. ha sido firmado por Felicia Artiles -----
3. actuando en carácter de Escribana Pública de Florida -----
4. lleva el sello/timbre del Escribano Público, Estado de
Florida -----
CERTIFICADO -----
5. en Tallahassee, Florida -----
6. el cuatro de abril de 2005 -----
7. por el Secretario de Estado, Estado de Florida -----
8. No. 2005-22462 -----
9. Sello/Timbre: Gran Sello del Estado de Florida, Confiamos en
Dios -----
10. Firma: [Aparece una firma ilegible debajo de la cual se
lee:] Secretario de Estado. -----
[En el margen superior aparece lo siguiente:] Una copia de este
documento en blanco y negro no es oficial. -----
[En el margen inferior aparece lo siguiente:] El
documento original tiene una marca de línea que se
refleja en el papel. Sostener de un ángulo para
observarlo cuando sea verificado. -----

584
47
93

[En el margen izquierdo aparece lo siguiente:] En caso de ser
fotocopiado o alterado químicamente, aparecerá la palabra
"NULO". -----

[En el margen derecho aparece lo siguiente:] "Estado de
Florida" aparece en letras pequeñas a lo largo de la cara 8 1/2
X 11" de este documento. -----

ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA -----

A QUIEN CORRESPONDA: -----

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de
Norteamérica -----

08 de marzo de 2005 -----

Por medio del presente se certifica que adjunto se encuentra
una copia fiel de los registros de esta oficina de un documento
registrado el 30 de abril de 2003. -----

Por autorización del Comisario de Patentes y Marcas -----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] M. K.
HAWKINS, Funcionario de Certificaciones. -----

[A la izquierda de lo antedicho aparece una oblea que reza:]
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de
Norteamérica. Departamento de Comercio. -----

[Debajo de lo antedicho aparece una firma ilegible
junto a un sello que reza:] ESCRIBANO PÚBLICO, ESTADO
DE FLORIDA. Felicia Artiles. Matrícula #DD258763.

585
48
564

Vence: 07 de noviembre de 2007. Obligado a través de
Atlantic Bonding Co., Inc. -----

Formulario "PTO" (Oficina de Patentes y Marcas)-1595 (Rev. 6-
93) -----

No. OMB 0651-0011, (vence 4/94) -----

[Aparece un código de barras con los siguientes datos:] 05-08-
2003, 102442957 -----

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA

Oficina de Patentes y Marcas -----

Nuestro caso CCF-6288NP -----

Tabulaciones -----

Al Honorable Comisario de [la frase aparece interrumpida por el
código de barras antes mencionado] documentos originales
adjuntos o la copia de los mismos. -----

1. Nombre de la(s) parte(s) transmisora(s) de derechos: -----

Marc S. Penn; Arman T. Askari; y Matthew Kiedrowski -----

30-4-03 -----

¿Se adjunta(n) otro(s) nombre(s) de la(s) parte(s)
transmisora(s)? ☐ Sí; ☒ No. -----

2. Nombre y domicilio de la(s) parte(s) receptora(s) de
derechos: -----

Nombre: **The Cleveland Clinic Foundation.** -----

Domicilio Interno: [en blanco] -----

Domicilio: 9500 Euclid Avenue. Ciudad: Cleveland; Estado: OH;
Código Postal: 44195. -----

¿Se adjunta(n) otro(s) nombre(s) y domicilio(s)? ☐ Sí; ☒ No.

3. Tipo de transferencia: -----

☒ Cesión. -----

☐ Fusión. -----

☐ Contrato de garantía real. -----

☐ Cambio de nombre. -----

☐ Otro: [en blanco]. -----

Fecha de formalización: 29 de abril de 2003. -----

4. Números de solicitudes o números de patentes: 10426712 -----

Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la
fecha de formalización de la solicitud es: 29 de abril de 2003.

A. Solicitud(es) de Patente No(s). [en blanco]-----

B. Patente(s) No(s). [en blanco]-----

¿Se adjuntan números adicionales? ☐ Sí; ☒ No. -----

5. Nombre y domicilio de la parte a quien debería remitirse la
correspondencia referente al documento: -----

Nombre: Richard S. Wesorick -----

Domicilio Interno: Tarolli, Sundheim, Covell & Tummino L.L.P. -

Domicilio: 526 Superior Avenue, Suite 1111; Ciudad: Cleveland;

Estado: Ohio; Código Postal: 44114-1400. -----

585
566

6. Número total de solicitudes y patentes involucradas: 1. ----

7. Arancel total (37 "CFR" 3.41): \$ 40,00. ----

[X] Adjunto se encuentra un cheque por la suma que se indica
más arriba. ----

[] Autorizado a debitarlo de la cuenta de depósito. ----

8. Número de Cuenta de Depósito: 20-0090 (solamente cobrar
aranceles insuficientes) ----

*(Adjuntar una copia en duplicado de esta página si se paga por
medio de cuenta de depósito)* ----

NO USAR ESTE ESPACIO ----

9. Declaración y firma. ----

*A mi leal saber y entender, la información precedente es
auténtica y correcta y cualquier copia adjunta es una copia
fiel del documento original.* ----

Nombre de la persona firmante: Richard S. Wesorick - Matrícula
No. 40.871 ----

Firma: [aparece una firma ilegible] ----

Fecha: 30 de abril de 2003. ----

Número total de páginas incluyendo la carátula, anexos y
documentos: 3. ----

Enviar documentos a ser registrados con la información
requerida en la carátula a: Comisario de Patentes y Marcas,
Casillero de Cesiones, Washington D.C. 20231 ----

[Aparece un timbrado] -----

PATENTE. ROLLO: 014032. CASILLERO: 0475. -----

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 sobre "FACTOR F-1 DERIVADO DE CÉLULA ESTROMAL QUE INTERVIENE EN LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE Y REGENERACIÓN DEL TEJIDO EN CARDIOMIOPATÍA ISQUÉMICA"

(referida en general como No. de Proyecto CCF 02-333);-----

POR CUANTO, The Cleveland Clinic Foundation (en adelante "CCF"), una organización libre de impuestos, debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Ohio, con domicilio legal en Cleveland, Condado de Cuyahoga, Estado de Ohio, desea adquirir la totalidad de los derechos personales y reales en y sobre dichas mejoras y todas las patentes de las mismas que se obtengan en los Estados Unidos de Norteamérica y países extranjeros; -----

POR TODO ELLO, CONSTE POR EL PRESENTE QUE, en virtud de la invención de CCF y Discovery Policy tal como se indicó en el "Yellow Book" de CCF a partir de esta fecha y en virtud de una contraprestación susceptible de apreciación pecuniaria pagada a nosotros, de la cual se acusa recibo por la presente, nosotros, los mencionados Marc S. Penn, Arman T. Askari y Matthew

Kiedrowski por la presente cedemos, vendemos y transferimos a favor de la mencionada CCF, sus sucesores a título universal y particular, la totalidad de los derechos personales y reales en y sobre dichas mejoras y cualquier y todas las invenciones pertenecientes a las mismas, la solicitud para obtener una patente estadounidense fue firmada por nosotros respectivamente el 29 de abril de 2003, 29 de abril de 2003 y 29 de abril de 2003, todas las patentes por las mismas en los Estados Unidos de Norteamérica y de otros lugares, y el derecho de solicitar patentes por las mismas en todos los países extranjeros y de reivindicar para dichas solicitudes las prioridades de las solicitudes de los Estados Unidos de Norteamérica. Asimismo por la presente solicitamos al Comisario de Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica y a cualquier funcionario de cualquier país extranjero cuyo deber sea el de emitir patentes, que emita dichas patentes a favor de CCF, sus sucesores a título universal y particular; además, acordamos firmar otras solicitudes y demás documentos y realizar todos los actos que CCF, sus sucesores a título universal y particular pudieran considerar necesarios a fin de asegurar, proteger y preservar en forma completa sus derechos sobre dichas mejoras y para obtener patentes por las mismas en los Estados Unidos de Norteamérica y todos los países extranjeros, sin contraprestación adicional pero con gastos a cargo de CCF, sus sucesores a título universal o particular. -----

Firmado en el Condado de Cuyahoga y Estado de Ohio el 29 de
abril de 2003. -----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] **Marc S.
Penn.** -----

ESTADO DE Ohio, CONDADO DE Cuyahoga, a saber: -----

A los 29 días de abril de 2003 compareció personalmente ante mí
Marc S. Penn, a quien conozco como la persona mencionada y
quien firmó el documento precedente, y quien reconoció ante mí
que lo firmó para los usos y fines expresados en el mismo. ----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Escribano
Público. -----

[Aparece un sello que reza:] THEODORE C. THEOFRASTOUS, Abogado.
Escribano Público, Estado de Ohio. Mi mandato no tiene fecha de
vencimiento [el resto del sello es ilegible]. -----

PATENTE. CASILLERO: 014032. ROLLO: 0476. -----

Firmado en el Condado de Cuyahoga y Estado de Ohio el 29 de
abril de 2003. -----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] **Arman T.
Askari.** -----

ESTADO DE Ohio, CONDADO DE Cuyahoga, a saber: -----

A los 29 días de abril de 2003 compareció personalmente ante mí
Arman T. Askari, a quien conozco como la persona mencionada y
quien firmó el documento precedente, y quien reconoció ante mí
que lo firmó para los usos y fines expresados en el mismo. ----

.. - 571
STP

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Escribano Público. -----

[Aparece un sello que reza:] THEODORE C. THEOFRASTOUS, Abogado. Escribano Público, Estado de Ohio. Mi mandato no tiene fecha de vencimiento. Artículo 147.03 O.R.C. -----

Firmado en el Condado de Cuyahoga y Estado de Ohio el 29 de abril de 2003. -----

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] **Matthew Kiedrowski** -----

ESTADO DE Ohio, CONDADO DE Cuyahoga, a saber: -----

A los 29 días de abril de 2003 compareció personalmente ante mí Matthew Kiedrowski, a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó el documento precedente, y quien reconoció ante mí que lo firmó para los usos y fines expresados en el mismo. -

[Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Escribano Público. -----

[A la izquierda de lo antedicho aparece un sello ilegible] -----

REGISTRADO: 30/04/2003. -----

PATENTE. ROLLO: 014032. CASILLERO: 0477. -----

Certifico por la presente que lo que antecede es traducción fiel y completa al español del documento original redactado en idioma inglés que tuve ante mí y al cual me remito. En la ciudad de Buenos Aires, a los 27 días del mes de mayo de 2005.-

Valeria Fiori Ubarde

VALERIA FIORI UBARTE
TRADUCTORA PUBLICA - INGLES
Mat. To. XII Fo. 233 Cap. Fed.
Esc. C.T.P.C.B.A. Pro. 4416

572
58
571

**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 morbilidad 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 trasplante 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 madre 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 periodo 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.

578
575

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.

526
576

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 trasplante de mioblasto óseo (SKMB) en conteo celular + BrdU en la zona infartada 4 semanas después del trasplante 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 trasplante 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 trasplante 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 cardíaca 12 semanas siguiendo con ligadura LAD con el trasplante 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., 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 Analysis, ed. Masseyeff et al., John 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

583
66
582

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 descritas 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 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 cardíaca 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

589
72
588

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.

583
72
592

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

~~584~~
593

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 sobrerregulada mediante el transplante de células biocompatibles sobre el tejido del miocardio infartado. El transplante de células al miocardio infartado sobrerregula la expresión de la proteína SDF-1 al miocardio infartado. Se observó una sobrerregulación 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 trasplante 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 trasplantes. Por ejemplo, se puede inyectar una suspensión de células cultivadas utilizando una jeringa de tuberculina sobre el tejido de miocardio infartado.

Alternativamente, la expresión de la proteína SDF-1 puede ser sobrerregulada 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 mRNA codificando la proteína SDF-1, y/o aquellos que disminuyen la degradación de un mRNA 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 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

- - - 309
598

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

800
8/3
599

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 une 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

~~684~~
680

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 Therapy 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

.. 86603
602

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.

604
87
63

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 vectorial 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 descrita 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 contruidos 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

697
605

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.

70807
606

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 1 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 cardíaca (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 anfífilos 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 (EBV) 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 trasplante, 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.

9642
611

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 sobrerregulación 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 sobrerregulación 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-1 α , y Gro β , 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 sobrerregulación 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 sobrerregulada.

9/8
8/15
614

Un agente movilizador que se préfiere 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's, tales como FCEV-2 (FCEV-C), FCEV-3 (FCEV-B), FCEV-D, FCEV-E, y factores de crecimiento

placentar 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

~~820~~
616

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 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

~~829~~
618

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

~~828~~
619

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.

C 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.

C 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 segundo 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

622/106
623

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 sobrerregulación 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 mRNA que codifica un FCEV, y/o aquellos que aumentan el grado de degradación de un mRNA 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 influyen 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 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 miocárdiales 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 descrita en Cui et al., Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. Además, en Curiel, D. T., Nat. Immun. 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 trasplante, 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 días 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 cardíaca 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 trasplante celular (12 semanas después de la ligadura LAD). Los datos representan un promedio $\pm$ s.d. $n=6-8$ por grupo.

La introducción del SKMB en el 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 trasplante 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 trasplante 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 trasplante 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 $\pm$ 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 μ M. Ello hizo que se rotularan las células en la médula sin una rotulación de BrdU significativa del miocardio ($17,5 \pm 2,9$ 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 trasplantes de SKMB reestablecen las señales necesarias para la guía de las células madre en el miocardio.

687
636

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 trasplante 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 trasplante 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 trasplante 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 trasplante, 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 trasplante 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 cardíacos 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 trasplante 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 trasplante de

fibroblastos cardíacos. Los datos representan un promedio de células $\pm$ 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 μ M.

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 trasplantes 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 trasplante celular y a la dosificación de G-CSF son leucocitos, respectivamente. No se observó ninguna célula positiva BrdU de miosina cardíaca dentro de la zona del infarto en animales tratados con G-CSF sin o con SKMB o trasplante 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 trasplante 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 trasplante 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 cardíaca (flechas cerradas) 12 semanas posteriores a la ligadura LAD con trasplante 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 $\pm$ s.d. n=6-8 por grupo. La barra en escala representa 10 μ M.

El trasplante 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 $(44,1 \pm 5,2$ vs $17,7 \pm 2,8$ 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 cardíaca 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 microscopio 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 trasplante 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 (%) = $(LVEDD - VCESD) / LVEDD \times 100$, 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/l 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 trasplante 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 trasplante, se obtuvieron los mioblastos con tripsina, se lavaron extensivamente en PBS para extraer cualquier partícula viral libre y se reconstruyeron inmediatamente antes del trasplante. Se anestesió a los animales, se los ventiló, y se les practicó una toracotomía lateral para dirigir visualización de la zona infartada. Aproximadamente 1×10^6 células fueron inyectadas por animal en 5 ubicaciones.

Los fibroblastos cardíacos fueron obtenidos de corazones de varias ratas adultas y se las ubicó de manera similar para SKMB. SDF-1 del ARN total recuperado de

643 127
643

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)-TCTAGACTTGTTTAAGGCTTTGTCCAGGTACTCTTGA. Los fibroblastos cardiacos 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 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.

645 120
644

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 HCl 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: ATGCCCTGCCGATTCTTTG, Reverso: TGTGTTGCTTTTCAGCCTTGC, pares de base 116 del producto esperado) y GAPDH como se indicara anteriormente.

Construido 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 contranfectó 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 MgCl₂ 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 $\pm$ SEM. Student t-test realizó comparaciones entre los grupos

648 131
647

REIVINDICACIONES

1. Un método de tratar el tejido de miocardio infartado, el tejido de miocardio infartado incluye una primera concentración de proteína SDF-1, la sangre periférica del tejido infartado incluye una primera concentración de células madre, el método comprende los pasos de:

aumentar la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado desde la primera concentración hacia una segunda concentración; y

aumentar la concentración de las células madre en la sangre periférica del tejido infartado desde la primera concentración hacia una segunda concentración, dicha concentración de las células madre en la sangre periférica aumenta mientras la concentración de SDF-1 en el tejido infartado aumenta.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de aumentar el número de células madre comprende administrar un agente que produce que las células madre se movilicen desde la médula ósea hacia la sangre periférica.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el agente que produce que las células madre se movilicen desde la médula ósea hacia la sangre periférica se selecciona del grupo

649 132
648

formado por citocinas, quimocinas, y los agentes quimioterapéuticos.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el agente comprende G-CSF.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de aumentar el número de las células madre comprende inyectar células madre en la sangre periférica.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de aumentar la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido de miocardio infartado comprende introducir un vector de expresión en el tejido infartado, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica la proteína SDF-1.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el vector incluye un promotor específico del tejido dirigido al tejido de miocardio.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el vector incluye un promotor específico del tejido dirigido a cardiomiocitos.

650 133
649

9. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de aumentar la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado comprende introducir células que se han cultivado ex vivo en el tejido infartado.

10. El método de la reivindicación 9, en donde las células comprenden células autólogas que se han cosechado del sujeto al que se debe tratar con anterioridad al cultivo.

11. El método de la reivindicación 10, en donde las células introducidas en el tejido infartado se transfectan con un vector de expresión antes de introducir las en el tejido infartado, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica la proteína SDF-1.

12. El método de la reivindicación 10, en donde el tejido infartado incluye una primera concentración de VEGF y además comprende el paso de aumentar la concentración de VEGF en el tejido infartado desde la primera concentración hacia una segunda concentración mientras la concentración de SDF-1 en el tejido infartado aumenta.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el paso de aumentar la concentración de VEGF en el tejido infartado

comprende introducir un agente en células del tejido infartado.

14. El método de la reivindicación 12, en donde el paso de aumentar la concentración de VEGF en el tejido infartado comprende introducir un vector de expresión en el tejido infartado, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica VEGF.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el vector incluye un promotor específico del tejido dirigido al tejido de miocardio.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el vector incluye un promotor específico del tejido dirigido a los cardiomiocitos.

17. El método de la reivindicación 12, en donde el paso de aumentar la concentración de VEGF en el tejido de miocardio comprende introducir células en el tejido infartado, las células se transfectan con un vector de expresión antes de introducirlas en el tejido infartado, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica VEGF.

18. El método de la reivindicación 17, en donde las células transfectadas con un vector de expresión que codifica VEGF son las mismas células introducidas en el tejido infartado para aumentar la concentración de SDF-1 en el tejido infartado.

19. Un método de tratar un tejido de miocardio infartado, el tejido de miocardio infartado incluye en un tiempo remoto desde el infarto de miocardio una primera concentración de proteína SDF-1 y una primera concentración de VEGF, el método comprende los pasos de:

aumentar la concentración de la proteína SDF-1 en el tejido infartado desde la primera concentración hacia una segunda concentración sustancialmente mayor que la primera concentración;

aumentar la concentración de VEGF en el tejido infartado desde la primera concentración hacia una segunda concentración sustancialmente mayor que la primera concentración;

administrar un agente que moviliza células madre desde la médula ósea a la sangre periférica del tejido infartado, las células madre son movilizadas desde la médula ósea a la sangre periférica mientras las concentraciones de SDF-1 y VEGF en el tejido infartado aumentan.

20. El método de la reivindicación 19, en donde el paso de aumentar la concentración de proteína SDF-1 en el tejido

infartado comprende introducir células en el tejido infartado que se han cultivado ex vivo.

21. El método de la reivindicación 20, en donde las células introducidas en el tejido infartado se transfectan 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.

22. El método de la reivindicación 20, en donde el paso de aumentar la concentración de VEGF en el tejido infartado comprende introducir células en el tejido infartado, las células se transfectan con un vector de expresión antes de ser introducidas en el tejido infartado, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que codifica VEGF.

23. El método de la reivindicación 22, en donde las células transfectadas con un vector de expresión que codifica VEGF son las mismas células introducidas en el tejido infartado para aumentar la concentración de SDF-1 en el tejido 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.

1/6

Fig. 1a

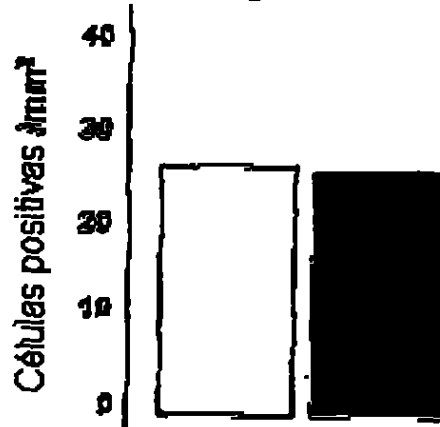
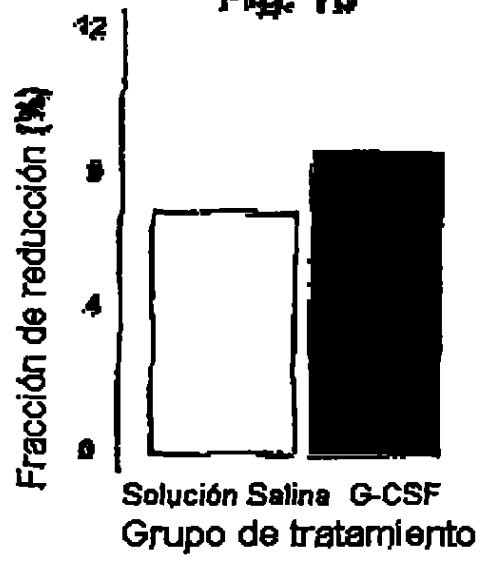


Fig. 1b



2/6

Fig. 2a

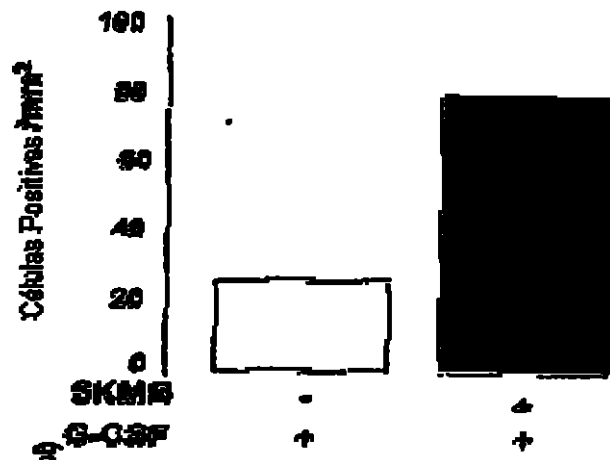
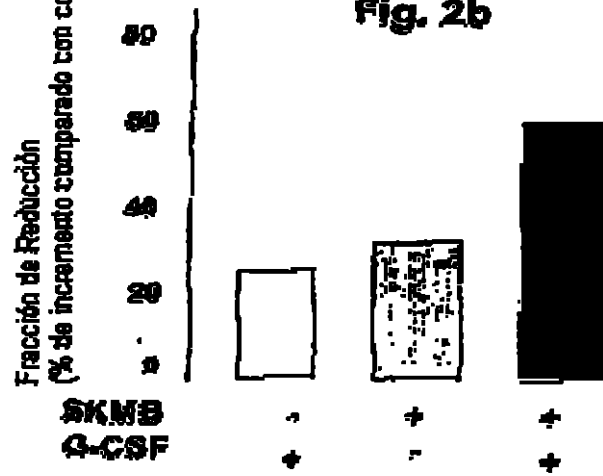


Fig. 2b



3/6

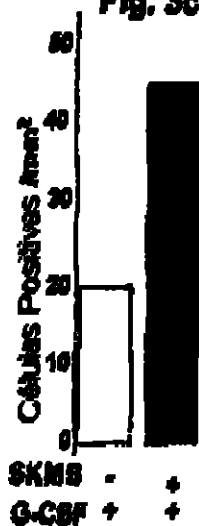
Fig. 3a



Fig. 3b



Fig. 3c

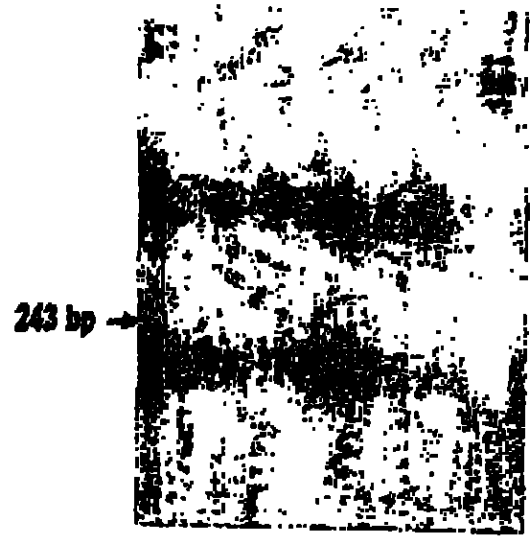


65X 658 141

4/8

Fig. 4

	<u>Horas</u>			<u>Días</u>		
Tiempo posterior implante de IM	0	1	24	7	30	30
					+	- Escala



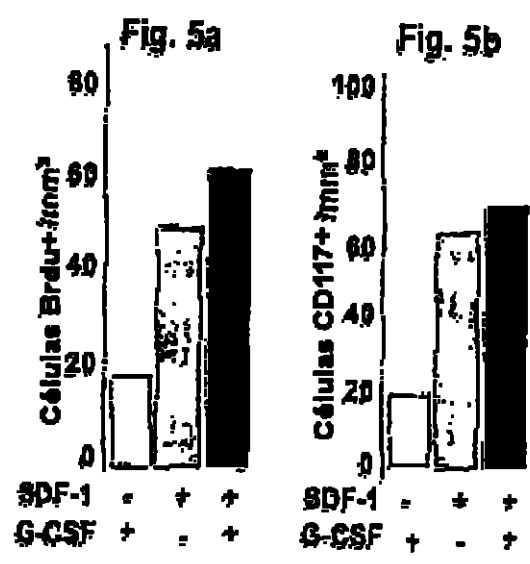


Fig. 5c



6/6

Fig. 6a



Fig. 6b

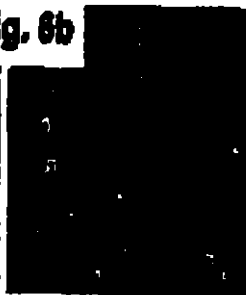
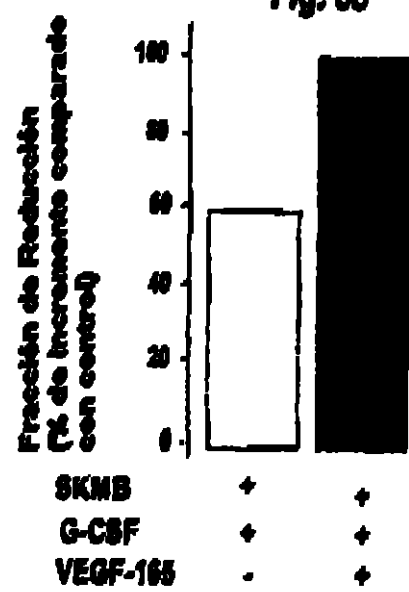


Fig. 6c



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

Field of the Invention

5 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.

10 **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
15 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

662 145
667

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,
5 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. &
10 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
15 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.
20 *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. &

662

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.*

5 *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).

10 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

15 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

20 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,

684 187
663

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
5 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
10 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
15 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
20 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
5 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 chemotherapeutic agents. In a more preferred aspect of the present invention, the agent comprises granulocyte
10 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
15 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
20 present invention, the concentration of SDF-1 protein in the infarcted tissue can be increased by introducing cells into the infarcted tissue that have been cultured ex vivo. The cells that have been cultured ex vivo can

66849
665

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 infarcted 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

667,50
666

-7-

into the infarcted 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

5 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

10 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

15 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

20 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

668 1st
667

-8-

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
5 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
10 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
15 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
20 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

669 152
668

-9-

following description of the invention with reference to the accompanying drawings in which:

5 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).

10 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).

15 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.

20 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

670⁵³
669

SDF-1 expression vector with or without G-CSF administration for 5 days following cardiac fibroblast transplantation.

5 Fig. 5c is a photograph from a SDF-1/G-CSF treated animal stained CD117+.

10 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.

15 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
20 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.

671 154
670

-11-

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:

672/55
671

-12-

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,
5 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
10 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
15 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
20 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

6735
672

-13-

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

674 137
673

-14-

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.

15 The method of the present invention further includes a step of increasing the concentration (i.e., number) of stem cells in the peripheral blood from a first concentration to a second concentration substantially greater than the first concentration.

20 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

674 675 158

-15-

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 stem 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

677 100
676

-17-

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.

5 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
10 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
15 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
20 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

678 679 162

-19-

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

5 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

10 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

15 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

20 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

680 463
679

-20-

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.

10 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
15 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
20 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.

681-104
680

-21-

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.

682/65
681

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

CBV 160
683

-23-

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.

5 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.

10 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

15 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

20 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.

683 167
684

-24-

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 biocompatibility 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.

686 120
687

-27-

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
5 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
10 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"
15 (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
20 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

688 689

-29-

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.

689 / 680 .

-30-

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

692
691

-32-

genomes into infectious capsids. For specifically myocardial cells, preferred variants of such recombinant adenoviral vectors contain tissue-specific (e.g., cardiomyocyte) enhancers and promoters operably
5 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
10 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.,
15 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.

20 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

692

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.

10 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.,
15 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
20 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

685
694

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
5 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
10 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
15 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
20 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

686
695

-36-

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

687/85
696

-37-

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
5 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
10 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
15 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.

20 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 cardiomyocytes. 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

699
698

-39-

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
5 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
10 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
15 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-
20 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

5 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

10 (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.

15 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

20 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

20/201

-41-

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 manner 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

701 70

-42-

cells may be operably linked to any suitable regulatory sequence, including a myocardium specific promoter and enhancer.

The transfected target cells can then be
5 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
10 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
15 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.

20 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,

262 708

-43-

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
5 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
10 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
15 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
20 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

x2 204

-44-

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
5 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
10 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
15 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
20 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

704 785

-45-

factor (SCF), and flt-3 ligand; chemokines such as IL-8, Mip-1 α , and Gro β , and the chemotherapeutic agents of cyclophosphamide (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 μ g/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.

706787

-47-

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
5 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
10 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
15 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,
20 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

207 190
788

-48-

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

703 789

-49-

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.

5 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
10 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.

15 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
20 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,

710
209

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.

10 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
15 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
20 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.

5 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
10 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
15 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
20 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
5 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
10 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
15 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
20 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

-53-

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
5 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
10 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
15 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
20 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

5 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.

10 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
15 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.

20 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

25 716

-56-

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

5 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

10 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

15 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

20 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

200
7/27/18

-58-

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.

10 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
15 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
20 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,

10 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

221 722

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 manner 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.

22 7/23

-63-

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.

723 724

-64-

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 within the myocardium.

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 mm². Data represent mean $\pm$ s.d. n=6-8 per group.

724 725

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).

15 **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.

5 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 $\pm$ s.d. n=6-8 per group.

10 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
15 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
20 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,

226 727

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 $\pm$ 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 μ M. 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

227 728

re-establishes the necessary signals for stem cell homing to the myocardium.

Signaling molecules responsible for stem cell homing to infarcted tissue

5 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
10 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.

15 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
20 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
25 at 1 and 24 h, but not at 0, 7 or 30 days, after LAD

728 2/6
7/29

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 $\pm$ s.d. of positive cells quantified by

229 780

-70-

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 μ M.

5 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
10 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
15 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
20 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 $\pm$ s.d. $n=6-8$ per group. Scale bar represents 10 μ M.

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

231
7/2

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){}.

242
732
7332D-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 (%) = $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$, 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

233
284 213

muscle. In addition, anterior wall thickness was measured at end-diastole.

Cell Preparation and Delivery

Skeletal myoblasts were harvested from the hind
5 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
10 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
15 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
20 direct visualization of the infarct zone.
Approximately 1×10^6 cells were injected per animal
in 5 locations.

Cardiac fibroblasts were harvested from several
adult rat hearts and plated in a similar fashion

734/285 214

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)-AATAAGAAATGCGGCCGCATGGACGCCAAGGTCGTGCGC

5 TGTGCTGGCC;

Reverse-(Xba-1)-TCTAGACTTGTTTAAGGCTTTGTCCAGGTACTCTTGGA.

Cardiac fibroblasts stably transfected with SDF-1 pCDNA3.1 expression vector were selected with neomycin.

Stem Cell Mobilization

10 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,

15 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.

20 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

235/28

-76-

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 Biotechnology) 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

2/6
737

(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

5 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.

10 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

15 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)

20 and cotransfected into 293 cells with ClaI digested

H5dl324 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

27
32 738

buffer containing 10 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 3% sucrose and stored at -80 °C until use. The transgene expression is under the control of the cytomegalovirus immediate early promoter.

5 Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Comparisons between groups were made by Student t-test.

238 213
789

-79-

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.

239 241
240

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 chemotherapeutic 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.

240 320
741

-81-

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

221
741
742

-82-

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 infarcted 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.

224
7/5

-85-

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.

265
266

Fig. 1a

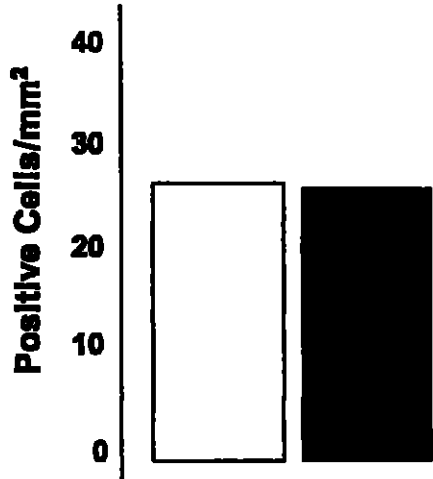
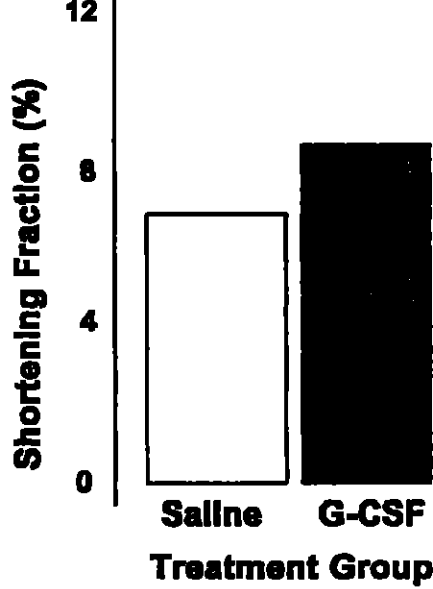


Fig. 1b



74/626
2/27

2/6

Fig. 2a

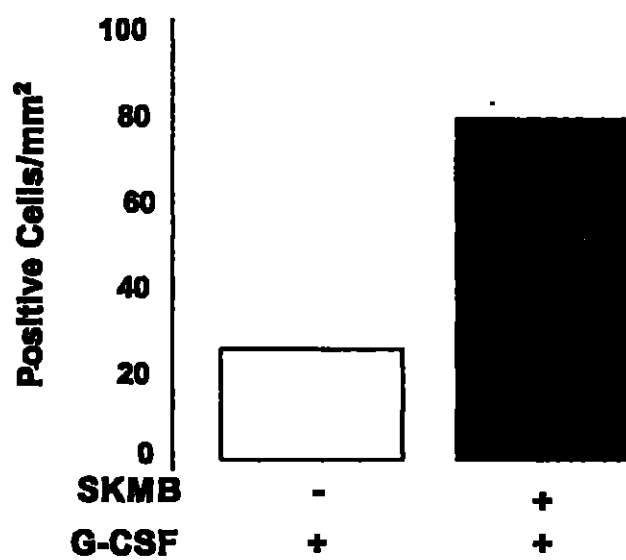
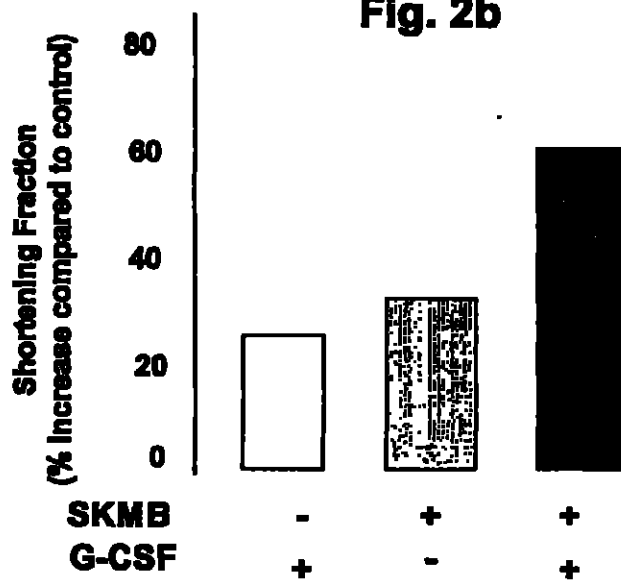


Fig. 2b



224
248
247

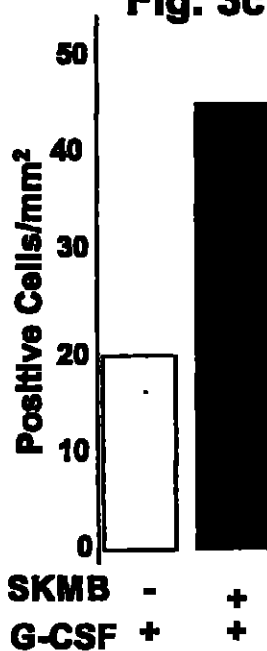
Fig.3a



Fig.3b

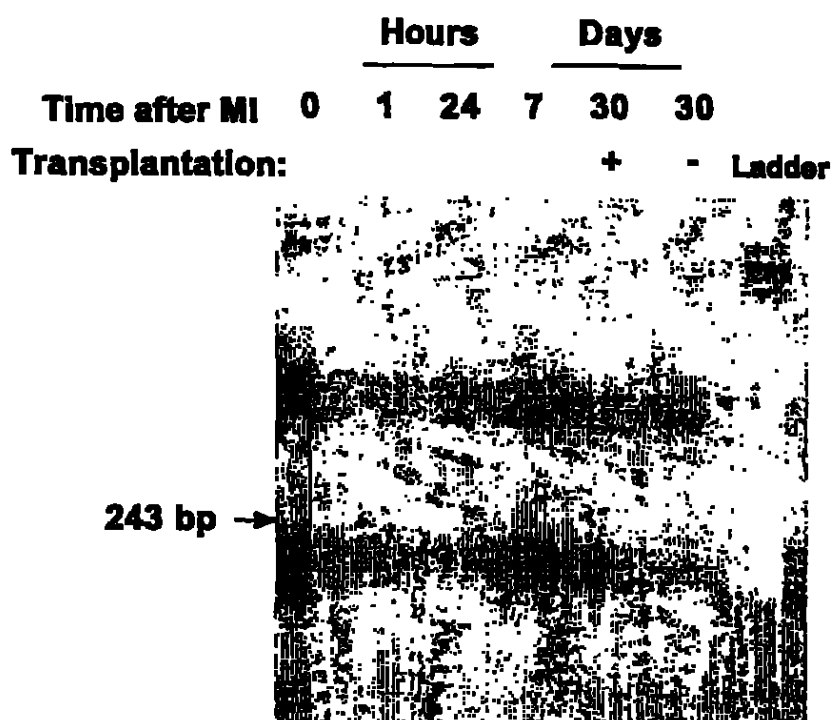


Fig. 3c



228
249
250

Fig. 4



250
279
749

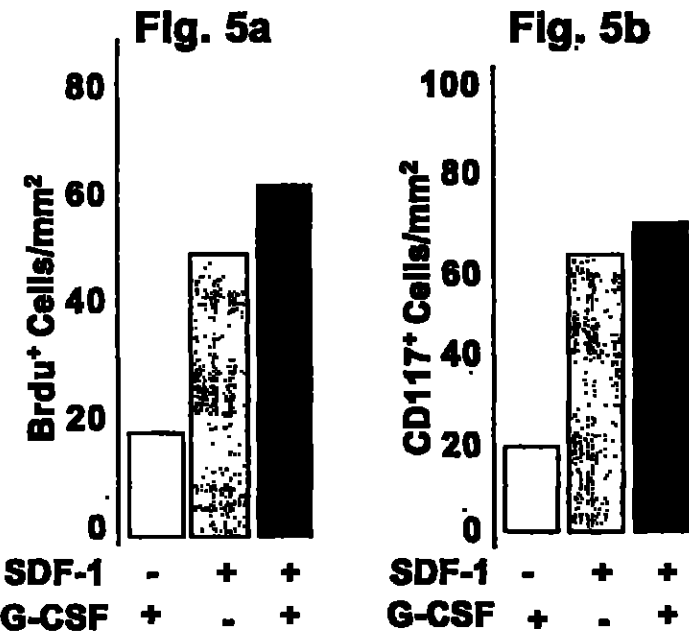
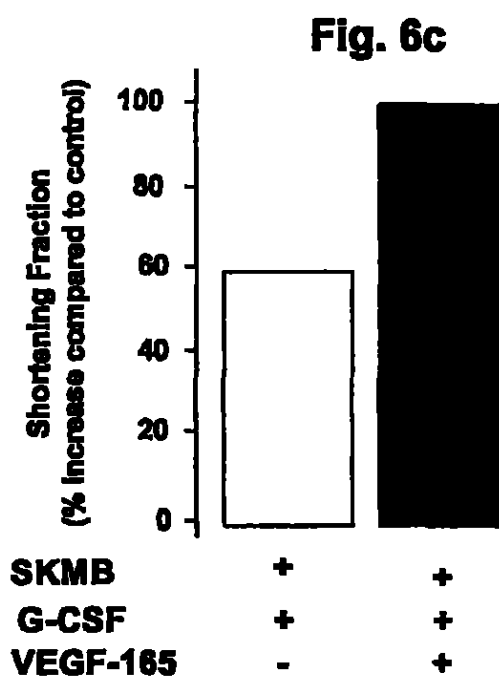
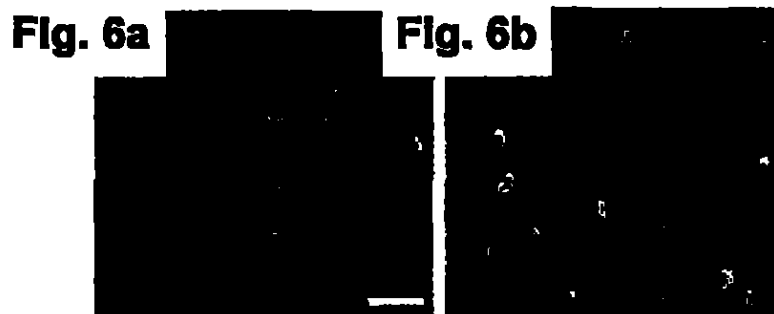


Fig. 5c



25 7/21 430



231
57/2

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

1 : : 140-140-1

252

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 753

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
MAYA RODRIGUEZ CARLOS ORLANDO
Apoderado(a) y/o Representante de
THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION

REFERENCIA	Radicación No.	05 15803
	Solicitud internacional	PCT/US2003/026013
	Fecha inicio fase nacional	22/03/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	1059
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

28 ABR 2006

ALIX CARMENZA CESPEDÉS DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10