

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
 Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
Bernardo NADAL GINARD	01/25/2008
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	CORETHERAPIX, SLU
Street Address:	PLAZA DE LA ENCINA NO. 10-11
Internal Address:	Nucleo 1, Planta 3A, Edificio La Encina Tres Cantos
City:	Madrid
State/Country:	SPAIN
Postal Code:	E-28760
PROPERTY NUMBERS Total: 1	
Property Type	Number
Application Number:	13873812
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	2015870715
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>	
Phone:	(201) 487-5800
Email:	info@kjiplaw.com
Correspondent Name:	Klauber & Jackson LLC
Address Line 1:	25 East Spring Valley Avenue
Address Line 2:	Suite 160
Address Line 4:	Maywood, NEW JERSEY 07607
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	3275-1-001PCT/US/CON3
NAME OF SUBMITTER:	DAVID A. JACKSON
Signature:	/David A. Jackson/
Date:	08/10/2013

CH \$40.00 13873812

Total Attachments: 102

source=3275 - Assignment#page1.tif
source=3275 - Assignment#page2.tif
source=3275 - Assignment#page3.tif
source=3275 - Assignment#page4.tif
source=3275 - Assignment#page5.tif
source=3275 - Assignment#page6.tif
source=3275 - Assignment#page7.tif
source=3275 - Assignment#page8.tif
source=3275 - Assignment#page9.tif
source=3275 - Assignment#page10.tif
source=3275 - Assignment#page11.tif
source=3275 - Assignment#page12.tif
source=3275 - Assignment#page13.tif
source=3275 - Assignment#page14.tif
source=3275 - Assignment#page15.tif
source=3275 - Assignment#page16.tif
source=3275 - Assignment#page17.tif
source=3275 - Assignment#page18.tif
source=3275 - Assignment#page19.tif
source=3275 - Assignment#page20.tif
source=3275 - Assignment#page21.tif
source=3275 - Assignment#page22.tif
source=3275 - Assignment#page23.tif
source=3275 - Assignment#page24.tif
source=3275 - Assignment#page25.tif
source=3275 - Assignment#page26.tif
source=3275 - Assignment#page27.tif
source=3275 - Assignment#page28.tif
source=3275 - Assignment#page29.tif
source=3275 - Assignment#page30.tif
source=3275 - Assignment#page31.tif
source=3275 - Assignment#page32.tif
source=3275 - Assignment#page33.tif
source=3275 - Assignment#page34.tif
source=3275 - Assignment#page35.tif
source=3275 - Assignment#page36.tif
source=3275 - Assignment#page37.tif
source=3275 - Assignment#page38.tif
source=3275 - Assignment#page39.tif
source=3275 - Assignment#page40.tif
source=3275 - Assignment#page41.tif
source=3275 - Assignment#page42.tif
source=3275 - Assignment#page43.tif
source=3275 - Assignment#page44.tif
source=3275 - Assignment#page45.tif
source=3275 - Assignment#page46.tif
source=3275 - Assignment#page47.tif
source=3275 - Assignment#page48.tif
source=3275 - Assignment#page49.tif
source=3275 - Assignment#page50.tif
source=3275 - Assignment#page51.tif
source=3275 - Assignment#page52.tif
source=3275 - Assignment#page53.tif
source=3275 - Assignment#page54.tif

source=3275 - Assignment#page55.tif
source=3275 - Assignment#page56.tif
source=3275 - Assignment#page57.tif
source=3275 - Assignment#page58.tif
source=3275 - Assignment#page59.tif
source=3275 - Assignment#page60.tif
source=3275 - Assignment#page61.tif
source=3275 - Assignment#page62.tif
source=3275 - Assignment#page63.tif
source=3275 - Assignment#page64.tif
source=3275 - Assignment#page65.tif
source=3275 - Assignment#page66.tif
source=3275 - Assignment#page67.tif
source=3275 - Assignment#page68.tif
source=3275 - Assignment#page69.tif
source=3275 - Assignment#page70.tif
source=3275 - Assignment#page71.tif
source=3275 - Assignment#page72.tif
source=3275 - Assignment#page73.tif
source=3275 - Assignment#page74.tif
source=3275 - Assignment#page75.tif
source=3275 - Assignment#page76.tif
source=3275 - Assignment#page77.tif
source=3275 - Assignment#page78.tif
source=3275 - Assignment#page79.tif
source=3275 - Assignment#page80.tif
source=3275 - Assignment#page81.tif
source=3275 - Assignment#page82.tif
source=3275 - Assignment#page83.tif
source=3275 - Assignment#page84.tif
source=3275 - Assignment#page85.tif
source=3275 - Assignment#page86.tif
source=3275 - Assignment#page87.tif
source=3275 - Assignment#page88.tif
source=3275 - Assignment#page89.tif
source=3275 - Assignment#page90.tif
source=3275 - Assignment#page91.tif
source=3275 - Assignment#page92.tif
source=3275 - Assignment#page93.tif
source=3275 - Assignment#page94.tif
source=3275 - Assignment#page95.tif
source=3275 - Assignment#page96.tif
source=3275 - Assignment#page97.tif
source=3275 - Assignment#page98.tif
source=3275 - Assignment#page99.tif
source=3275 - Assignment#page100.tif
source=3275 - Assignment#page101.tif
source=3275 - Assignment#page102.tif

12/2007 State stamp

PAPER EXCLUSIVELY FOR NOTARIAL
DOCUMENTS

800606607

€0.15 stamp

[Round rubber stamp of the Notary's office of
Martin M^o Recarte Casanova, Madrid]

[Stamp:
Martin M^o Recarte Casanova
NOTARY
P^o Gral Martínez Campos 41, 2^o
Telephone: 91 308 28 15
28010 MADRID]

DEED OF NOTARIZATION AND RECORDING IN A PUBLIC DOCUMENT
OF THE PRIVATE AGREEMENT BETWEEN GENETRIX, S.L., MR.
BERNARDO NADAL GINARD AND CORETHERAPIX, S.L.U.

NUMBER FOUR HUNDRED AND EIGHTY-NINE.

IN MADRID, on the twenty-fifth day of February of the year two thousand
and eight.

Before me, MARTIN MARIA RECARTE CASANOVA, notary of this
City and its Notaries' Association,

APPEAR:

Of the one part.- MS. CRISTINA GARMENDIA MENDIZÁBAL, of
age, married, resident for the purposes hereof at [REDACTED]
[REDACTED] Tres Cantos (Madrid), with National Identification
Document/Taxpayer Identification Number: [REDACTED]

And of the other part.- MR. BERNARDO NADAL GINARD, of age, a
Spanish national, married, with domicile at 334 Hammond Street, Chestnut Hill,
MA 02467,

[Paraph]

USA, with National Identification Document/Taxpayer Identification Number:
41.334.816-K.

ACTING.-

The first person, for and on behalf of:

1.-) For and on behalf of GENETRIX, S.L. Such company, with
Employer Identification Number B-82826546, has its registered office in Tres
Cantos (Madrid), at [REDACTED]

It was formed for an indefinite term in a deed executed before the Madrid
Notary, Mr. Jaime Recarte Casanova on 13 November 2000 under number 2,710
of his protocol and is registered at the Mercantile Registry of this province in
volume 15,909, book, 0, sheet 140, section 8, page M268899.

SHE IS AUTHORISED TO EXECUTE THIS DEED by virtue of her
position as MANAGING DIRECTOR of the aforementioned Company, a
position which is duly registered at the Madrid Mercantile Registry, as the
appearing party evidences to me, and by virtue of which all of the powers of the
Board of Directors have been delegated to her, except for those which are not
delegable according to the Law or the Company Bylaws.

The appearing party declares that her position and the powers with which
she acts remain valid, and I, the Notary, consider her, on the grounds of her
aforementioned position, to have sufficient legal capacity to execute this deed.

12/2007
State stamp

PAPER EXCLUSIVELY FOR NOTARIAL
DOCUMENTS

800606608

€0.15 stamp

[Round rubber stamp of the Notary's office of
Martín M^o Recarte Casanova, Madrid]

2.) For and on behalf of CORETHERAPIX, S.L. Such company, with Employer Identification Number B-64282650, has its registered office in Tres Cantos (Madrid), Plaza de la Encina, number 10-11 (Edif. La Encina, Núcleo 1), Planta 3ª, 28760.

It was formed for an indefinite term in a deed executed before the Madrid Notary Mr. Jaime Recarte Casanova on 5 July 2006, under number 2,493 of his protocol and is registered at the Barcelona Mercantile Registry, in volume 38942, sheet 203, page B-339284.

SHE IS AUTHORIZED TO EXECUTE THIS DEED by virtue of her position as natural person representative of the Sole Director, Genetrix, S.L., they having been appointed to such respective positions, which are duly registered at the Barcelona Mercantile Registry, as the appearing party evidences to me, in the aforementioned deed of formation.

I, the Notary, consider the appearing party, on the grounds of her aforementioned position, to have sufficient legal capacity to execute this deed.

[Paraph]

The appearing party declares that the position and powers by virtue of which she acts are valid.

The latter, acting in his own name and right, shall be referred to hereinafter as the "Researcher".

Similarly, GENETRIX, the Researcher, and CORETHERAPIX, may hereinafter be jointly referred to as the "Parties". And GENETRIX and the Researcher may be referred to hereinafter as the "Partners".

In my opinion, THE APPEARING PARTIES HAVE, acting as stated above, sufficient legal capacity to perform this act and, for such purpose,

WITNESSETH:

I. Whereas CORETHERAPIX is a limited liability company which is engaged in the development and marketing of (i) cellular therapies for myocardial regeneration, and (ii) locally administered pharmacologic therapies for tissue regeneration or preservation; it has a share capital of [REDACTED], divided into [REDACTED] company shares.

II. Whereas the Researcher is the legitimate holder of extensive knowledge and experimental data which are relevant for the treatment of

12/2007 *State stamp*

€0.15 stamp

*[Round rubber stamp of the Notary's office of
Martín M^a Recarte Casanova, Madrid]*

myocardial diseases and for the development of as yet unpatented therapies. It is reasonably foreseeable that the suitable development of such knowledge may lead to an invention or inventions which are suitable for commercial or industrial exploitation and either patentable or susceptible to other forms of intellectual property (the "Invention").

III. Whereas GENETRIX is currently the sole shareholder of CORETHERAPIX. GENETRIX forms part of a business group the purpose of which is the promotion of business projects based on the exploitation of medical and biotechnological research.

IV. Whereas it is in the interests of the Partners to cooperate in the performance of the necessary research that will give rise to the Invention, in order to subsequently proceed to exploit it commercially (the "Project"). In this connection, the Project consists of an initial research phase that will lead to the birth of the invention (the "Research"), and a second phase, consisting of the industrial exploitation and marketing of such Invention.

[Paraph]

on all of the copies hereof that may be issued.

Such document is issued on seventeen sheets of ordinary paper, typed on one side only, together with the schedule thereto, which is issued on 19 sheets printed on one side only and signed at the end thereof by the appearing parties.

TWO.- The appearing parties, acting as stated above, ratify each and every one of the clauses that appear in the document which is notarized and placed on public record by means of this deed.

THREE.- GENETRIX, S.L. shall assume the costs of preparing and registering this Agreement as well as the costs incurred in the preparation and execution of the purchase option over the company shares of CORETHERAPIX, S.L. by the Researcher.

FOUR.- The appearing parties, acting as stated above, accept this deed in all of its parts.

EXECUTION AND AUTHORIZATION

I have made and stated the statutory reservations and caveats, particularly those established in the tax laws, and have advised them of the obligation of to pay the fees corresponding to this deed within thirty working days.

I, the Notary, as data controller with respect to the computerized file containing my protocol and notarial documentation and the administration and organisation file of the Notary's office, guarantee full compliance with the

12/2007

State stamp

€0.15 stamp

*[Round rubber stamp of the Notary's office of
Martín M^a Recarte Casanova, Madrid]*

Personal Data Protection regulations and thus, pursuant to Organic Law 15/99, the appearing parties are informed of the inclusion of their data into the aforementioned computerised files that exist at the Notary's office for which I am responsible, and of the fact that such data may be ceded to such public authorities as may be entitled thereto in accordance with a legally binding rule.

The Notary guarantees the rights of access, rectification, cancellation and objection, which are exercisable by the interested party affected, except for those which must legally be made available to Public Authorities, Judges and Courts, or those which are indispensable for the work of the Notary.

Having chosen to read all of the above for themselves, the appearing parties consider it to reflect their intentions and sign it with me, the Notary.

I, the Notary, DO HEREBY BEAR WITNESS, that I have identified the appearing parties by supplementary means of the identity documents submitted by them and described above, that their consent has been freely given,

[Paraph]

that this deed is executed in accordance with the law and the duly informed will of the intervening and executing parties, as well as to all other matters consigned in this public instrument, which is issued on five sheets of stamped State paper, exclusively for notarial documents, numbered with the number of this page and those preceding it in consecutive order. THERE FOLLOW THE SIGNATURES OF THE APPEARING PARTIES.- SIGNED: MARTIN MARIA RECARTE CASANOVA.- PARAPHEDED AND SEALED.

Attached documentation follows.-

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin Maria Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606612
-----------------------------	---	-----------

PRIVATE CONTRACTUAL DOCUMENT BETWEEN

GENETRIX, S.L.,

Mr BERNARDO NADAL GINARD

and

CORETHERAPIX, S.L.

Madrid, 25 January 2008

PRIVATE CONTRACTUAL DOCUMENT BETWEEN GENETRIX, S.L., Mr BERNARDO
NADAL GINARD, and CORETHERAPIX, S.L.U.

THE PARTIES

Party of the first part, Ms Cristina Garmendia Mendizábal, of legal age, with business address for the purposes hereof in Tres Cantos (Madrid), [REDACTED] Madrid, holder of National Identity Document (DNI)/Taxpayer's Identity Number (NIF) [REDACTED] who acts herein for and on behalf, in her capacity as Managing Director, of GENETRIX, S.L., a company with registered address in Tres Cantos (Madrid), [REDACTED] with Corporate Tax Code B-82826546. GENETRIX, S.L., shall hereinafter be referred to as "GENETRIX".

Party of the second part, Mr Bernardo Nadal Ginard, of legal age, a Spanish national, married, with business address at 334 Hammond Street, Chestnut Hill, MA 02467, USA, holder of National Identity Document (DNI)/Taxpayer's Identity Number (NIF) 41334816-K, who acts herein in his own name and right. Mr Nadal shall hereinafter be referred to as the "Investigator".

Party of the third part, Ms Cristina Garmendia Mendizábal, of legal age, with business address for the purposes hereof in Tres Cantos (Madrid), calle Marconi, nº 1, Parque Tecnológico de Madrid, holder of National Identity Document (DNI)/Taxpayer's Identity Number (NIF) 15,957,763-H, who acts herein for and on behalf of the legal representative of the Sole Director of CORETHERAPIX, S.L.U., GENETRIX, S.L.. CORETHERAPIX, S.L.U., hereinafter referred to as "CORETHERAPIX".

GENETRIX, the Investigator and CORETHERAPIX may hereinafter be jointly referred to as the "Parties", and GENETRIX and the Investigator may hereinafter be jointly referred to as the "Shareholders".

WHEREAS

- I. CORETHERAPIX is a limited liability company specialised in the development and commercialisation of (i) cell therapies for myocardial regeneration, and (ii) local vascular application pharmacological therapies for tissue regeneration or preservation. The company has a share capital of [REDACTED], divided into [REDACTED] shares.
- II. The Investigator is the legitimate owner of extensive know-how and experimental data which is of relevance to the treatment of myocardium-related diseases and to the development of therapies not as yet patented. There are reasonable prospects that adequate development of this know-how may lead to one or more inventions suitable for commercial or industrial exploitation, whether they qualify for patenting or other forms of industrial property (the "Invention").

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin Maria Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606613
-------------------------	---	-----------

- III. GENETRIX is currently CORETHERAPIX's sole shareholder. GENETRIX forms part of a corporate group that sponsors business projects relating to the exploitation of medical and biotechnological investigations.
- IV. The Shareholders are interested in collaborating in the investigations necessary to achieve the Invention in order to commercially exploit it at a later stage (the "Project"). Thus, the Project has a first investigative phase leading to the achievement of the Invention (the "Investigation"), and a second phase in which the Invention is industrially or commercially exploited.
- V. The Investigator is interested in taking part in the Project by assigning to CORETHERAPIX the know-how and experimental data to which he holds title (the "Initial Information") and by undertaking the scientific management of the development of the said know-how until the Invention is achieved (the "Scientific Management"). GENETRIX, for its part, is interested in taking part in the Project by assuming the obligation to procure the necessary Initial Funding, providing business and administrative management support to CORETHERAPIX, and also through the previously effected transfer to CORETHERAPIX of a cardiovascular medicine project originally conducted by [REDACTED]
- VI. The Shareholders wish this joint collaboration to be carried out at CORETHERAPIX and to be formalised in this agreement (the "Agreement"). Specifically, it is the will of both Shareholders that the patents and any other industrial property assets generated during the course and as a result of the Project, be owned by CORETHERAPIX. The Shareholders also represent that CORETHERAPIX shall be the vehicle through which GENETRIX shall conduct any projects in connection with cardiovascular therapies.
- VII. The Shareholders have adopted a number of resolutions or principles for the management and governance of CORETHERAPIX, as well as a purchase option which grants the Investigator the right to acquire a given number of CORETHERAPIX shares.

Now therefore, the Parties

AGREE

ONE. PURPOSE OF THE AGREEMENT.

The purpose of this Agreement is to govern the following aspects:

1. The obligations undertaken by each of the Shareholders as their contribution to the Project, the aim of which is the achievement of the Invention, which shall be

owned by CORETHERAPIX, and its subsequent commercial and industrial exploitation.

2. The Investigator's assignment to CORETHERAPIX of all his property rights in the Initial Information, which shall be used in the Investigation leading to the Invention and in the completion of the Project.
3. A Shareholders' agreement on certain aspects of the governance of CORETHERAPIX, including a purchase option in favour of the Investigator over a given number of shares in the company.

TWO. INITIAL INFORMATION.

1. Pursuant to this Agreement, the Investigator undertakes (i) to provide to CORETHERAPIX, free of charge, any physical medium, and specifically the necessary media and reports containing the Initial Information, and (ii) to facilitate the drafting of the patent applications produced on the basis of the aforementioned information in order to enable their filing with the patent office chosen by GENETRIX, within two (2) months of the date of signature of this Agreement.
2. For the purposes hereof, Initial Information shall mean information on the following subjects, in the status of development specified below:
 - a. Information relating to the therapeutic effect of HGF and IGF-1 growth factors on the activation of the endogenous population of CMC during the post-acute period of myocardial infarction in swine.
 - b. Information relating to the therapeutic effect of the application of a selected population of heterologous cardiac stem cells for the activation of the endogenous population of CMC during the post-acute period of myocardial infarction in swine.
 - c. The information referred to in points 1.a. and 1.b. shall be provided on a computer-readable medium in a format agreed with the Industrial Property Department to facilitate the drafting of the necessary patent applications.
3. The Investigator assigns to CORETHERAPIX the ownership of the Initial Information, without prejudice to CORETHERAPIX's obligation to acknowledge the Investigator as its author and creator.
4. The Investigator represents that the know-how and the data included in the Initial Information has not been previously provided by the Investigator to any other persons or entities. The Investigator also represents that he is not aware that the provision of the Initial Information to CORETHERAPIX constitutes a breach of third party rights or of any

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin María Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606614
-----------------------------	---	-----------

obligations of the Investigator arising from his relationship with other research centres.

5. The Investigator undertakes not to provide the Initial Information to any third parties and not to divulge it by any medium, oral or written, without prior written consent from CORETHERAPIX.

THREE. OBJECT OF THE INVESTIGATION.

The Investigation that is the object of this Agreement comprises the following activities:

1. Assessment of the therapeutic effects of cytokine formulations on myocardial regeneration.
2. Additionally, assessment of the therapeutic effectiveness of the local administration of stem cells on myocardial regeneration.

FOUR. OBLIGATIONS OF GENETRIX IN THE INVESTIGATION

1. GENETRIX undertakes to guarantee the provision of up to [REDACTED] for the execution of the Project defined in Annex 1, which sets out the time schedule for its completion, its milestones and financial needs (the "Initial Funding"). Notwithstanding the foregoing, the Parties represent that, prior to the signature of this Agreement, GENETRIX advanced the provision of [REDACTED] to account of the Initial Funding, in the form of: one first convertible loan of [REDACTED] issued on 1 April 2007 and maturing on 31 March 2008, and one second convertible loan of [REDACTED] issued on 1 December 2007 and maturing on 30 November 2008.
2. The Initial Funding shall be provided within six (6) months of filing the patent applications described in Clause 2.
3. For the purposes hereof, the Initial Funding may originate from subsidies or free third party contributions managed directly by GENETRIX, or else from convertible or non-convertible loans granted by GENETRIX S.L. [REDACTED]
4. GENETRIX undertakes to identify, apply for and manage, free of charge, the portion of the Initial Funding that does not originate in its own funds.
5. GENETRIX shall provide administrative, business and legal support services to CORETHERAPIX under similar terms as it provides them to other

companies in the corporate group. The specific services GENETRIX undertakes to provide are the following:

- a. services necessary to favour the award of subsidies by the central government, the autonomous regional governments, the European Union or private entities promoting the development of invention, in order to fulfil the undertaking to provide the Initial Funding. GENETRIX shall provide these services free of charge.
 - b. services necessary to favour the award of subsidies by the central government, the autonomous regional governments, the European Union or private entities promoting the development of invention, in order to continue funding CORETHERAPIX's operations after the Initial Funding has been provided in full. GENETRIX shall provide these services for valuable consideration, applying the established fees for such services.
 - c. industrial property advice services as necessary to draft and pursue the patent application(s) aimed at obtaining industrial property protection for the Invention. GENETRIX shall provide these services for valuable consideration to be paid by CORETHERAPIX, with the established fees for such services being applied.
 - d. general services (procurement, accountancy, human resources, legal, tax payment, etc.) as necessary for the start-up and development of CORETHERAPIX until such time as it is in a position to generate these services. GENETRIX shall provide these services for valuable consideration to be paid by CORETHERAPIX, with the established fees for such services being applied.
6. [REDACTED]

FIVE. OBLIGATIONS AND RESPONSIBILITIES OF THE INVESTIGATOR IN THE INVESTIGATION.

- 1 The Investigator shall perform the role of Scientific Manager at CORETHERAPIX, ensuring that the company pursues the investigation objectives set out in Clause Three. Specifically, the Investigator's activities as Scientific Manager shall be the following:
 - i. Take part in CORETHERAPIX's Management Committee, along with the representatives of GENETRIX.

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin María Recarte Casanova, Madrid. Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606615
-----------------------------	---	-----------

- ii. Chair CORETHERAPIX's Consultative Scientific Committee and, jointly with GENETRIX's Chief Executive Officer, select the members of this Committee.
- iii. Be responsible for CORETHERAPIX's short-, medium- and long-term scientific strategy and objectives, so that the company may build and protect its own niche in the field of regenerative medicine, specifically in the field of cardiovascular medicine. The foregoing shall be subject to the budgets and protocols approved by the Shareholders.
- iv. Be responsible for the Scientific Management of the company's projects.
- v. Develop and supervise the protocols necessary to complete the pre-clinical phase of the projects, irrespective of whether the work is performed by CORETHERAPIX investigators at company premises or at collaborating entities.
- vi. Take part in and be responsible for the interpretation of the experimental results and their organisation for the delivery of presentations to collaborating entities, potential financial partners, regulatory agencies, R&D grant applications, etc.
- vii. Develop alternative and/or supplementary strategies for the development and improvement of the myocardial regeneration methods currently available.
- viii. Explore and develop the scientific basis and methods of application for the extension of myocardial regeneration methods and procedures to other solid tissues.
- ix. Take part in and provide the scientific know-how for the protection of CORETHERAPIX's industrial and intellectual property, whether by patent application, registration, etc. For these purposes, the Investigator will collaborate with technical and legal personnel in order to suitably draft and register the patent or any other forms of industrial or intellectual property that may be generated. Notwithstanding the foregoing, the contents of this paragraph are independent of the terms set forth in Clause Two hereof, concerning the Initial Information.
- x. Take part in the formulation of CORETHERAPIX's R&D budgets, issued by the Management Committee.
- xi. Determine what scientific personnel, laboratory space and equipment are needed to achieve CORETHERAPIX's scientific objectives, so that these needs may be approved by the Management Committee. Evaluate and select the scientific personnel CORETHERAPIX considers recruiting.

- xii. Evaluate potential scientific collaborators for CORETHERAPIX and take part in the negotiations for the relevant contracts, prior to submitting them to the Management Committee.
- 2 The Investigator shall perform this role autonomously and under his own responsibility, alternating periods of physical presence at the company or its premises with off-site work. For the avoidance of doubt, the Parties represent that the Investigator's role as Scientific Manager, as described in this Agreement, shall not be performed under a relationship of employment with CORETHERAPIX. Both Parties reserve the right to modify this relationship according to the interests of CORETHERAPIX and by mutual agreement between the Parties.
 - 3 The Investigator shall draw up periodical scientific reports outlining the investigations carried out and laying down guidelines for the investigations to be carried out in the future. These reports shall be periodically submitted to CORETHERAPIX's Management Committee and shall remain the property of CORETHERAPIX. For such purpose, the Investigator hereby assigns to CORETHERAPIX all his rights in the results of his investigations in the fields of activity listed in Clause Three that are generated as a result of the performance of this Agreement.
 - 4 The Investigator shall collaborate as necessary in the performance of all the tasks relating to the drafting and filing of the patent applications for the Invention, and to the adequate pursuit of these applications, including formulating observations, challenging oppositions and any other tasks necessary to ensure the award of the patent in all the territories where CORETHERAPIX decides to apply for protection of the Invention and of subsequent inventions resulting from the work carried out by CORETHERAPIX, its personnel or its collaborators, subject to the relevant collaboration agreements.

SIX. INITIAL FUNDING OF THE ACTIVITIES INCLUDED IN THIS AGREEMENT.

1. Annexe 1 includes the budget and the time schedule of the planned investigation activities to which the Initial Funding will be applied. Any modifications thereto shall require the consent of both Shareholders.
2. GENETRIX undertakes the obligation to procure, free of charge, the Initial Funding necessary for the Investigation, up to [REDACTED], without prejudice to the terms provided in Clause Four(1).
3. The funds procured by GENETRIX shall be provided on the basis of fulfilment of the milestones and scientific investigation results detailed in Annex 1.

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin Maria Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606616
-----------------------------	---	-----------

4. The Investigator shall receive from CORETHERAPIX a variable monthly remuneration of [REDACTED] per day of work in the Scientific Management of CORETHERAPIX. This remuneration, which is subject to an annual maximum of [REDACTED], is conditional upon the Investigator continuing to perform the role of Scientific Manager of CORETHERAPIX, and it may only be modified by mutual agreement between the Parties. At the date of signature hereof, a total of [REDACTED] have been paid in respect of expenses incurred up to and including November 2007, which the Investigator has already accepted and received. This remuneration excludes the unremunerated drafting and preparation of the Initial Information as described in Clause Two.
5. The Investigator shall receive compensation from CORETHERAPIX for the travel and subsistence expenses incurred in travelling from his residence in [REDACTED] to the place where his activity as Scientific Manager is to be performed, whenever such travel is necessary. This compensation is subject to submission of the relevant expense statement and proof of payment to the Management Committee.
6. The Investigator shall be entitled to compensation by CORETHERAPIX for any travel expenses incurred in the fulfilment of his obligation to collaborate in the preparation and pursuance of patent applications, as set forth in Clause Two, subject to submission of the relevant expense statement and proof of payment to the Management Committee.
7. The Shareholders shall not be entitled to compensation or remuneration by CORETHERAPIX for their services or any activities carried out as part of the performance of this Agreement, or for any expenses incurred which are not expressly acknowledged and provided for herein. Accordingly, and for these purposes, CORETHERAPIX's Management Committee shall not pay any Shareholder any compensation or remuneration which is not envisaged or is in excess of the amount specified in this Agreement. For the avoidance of doubt, the Parties represent that any services provided by the Shareholders consisting in the provision and assignment of the Initial Information, the procurement of subsidies or the raising of funds for the Initial Funding, shall not be remunerated.

SEVEN. SUPERVISION AND MONITORING OF FULFILMENT OF THE SHAREHOLDERS' OBLIGATIONS.

1. CORETHERAPIX's Management Committee shall be the body responsible for constantly monitoring the fulfilment of the Shareholder's obligations. For such purpose, it shall supervise the activities of each Shareholder to ensure that they are in keeping with the programme and time schedule set out in Annex 1.

The Management Committee shall be made up of Mr Eduardo González Martínez, Mr Bernardo Nadal Ginard, and Ms Cristina Garmendia Mendizábal.

The meetings of the Management Committee shall be held on a monthly basis, unless for any reason they need to be held at shorter intervals.

The Management Committee's decisions shall be taken by a simple majority, except where the matters specified in this Agreement are concerned, namely the matters set out in Clause Ten(3).

2. CORETHERAPIX's Management Committee shall notify the Shareholders of any deviations in the time schedule or the milestones established for the investigation activities, of any shortcomings by a Shareholder in the fulfilment of its(his) obligations, and, generally, of any relevant new developments that may affect or be of relevance to the Investigation or to the achievement of the Invention.
3. Should it become necessary to modify the budget or the time schedule included in Annex 1, CORETHERAPIX's Management Committee shall refer the matter to the Shareholders. Any proposed modification may only be implemented once it has been approved by both Shareholders.
4. Any amounts to be paid to the Shareholders for services or items envisaged in this Agreement, among other compensations or remunerations, shall require express authorisation from CORETHERAPIX's Management Committee, provided that they correspond to items included in the budget or agreed by the Parties.

EIGHT. INDUSTRIAL PROPERTY OF THE INVENTION.

1. The rights in the Invention, whether or not they qualify for industrial or intellectual property protection, shall be owned exclusively by CORETHERAPIX, and no additional agreement or contract shall be necessary in order for this ownership to be recognised.
2. The authors shall be mentioned in the patent application as inventors.
3. CORETHERAPIX shall cover any costs deriving from the protection of the Invention, specifically those in connection with the patentability assessment, the application, the obtention and maintenance of the property rights and any other expenses deriving from the application for the protection of the rights referred to in this Agreement.
4. CORETHERAPIX shall be exclusively responsible for deciding the territories where protection of the Invention is to be sought.
5. The terms of this Agreement shall also apply to dependent patents developed in the field of the Investigation.

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martín María Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606617
-----------------------------	---	-----------

6. The Investigator shall hold CORETHERAPIX free and harmless of any third party claims involving the breach of prior industrial or intellectual property rights in relation to the registration, offer, manufacture, distribution or commercialisation of the Invention or the Initial Information.
7. GENETRIX and CORETHERAPIX shall refrain from participating in any third party claim against the Investigator involving the breach of prior industrial or intellectual property rights in relation to the registration, offer, manufacture, distribution or commercialisation of the Invention or the Initial Information. However, GENETRIX and CORETHERAPIX may participate in actions to defend themselves against any claims filed directly against either GENETRIX or CORETHERAPIX.
8. In order to publish in any format or disseminate in any way the scope or the partial or final results of the Project, whether or not they qualify for patenting, the Investigator shall request prior written authorisation from CORETHERAPIX's Management Committee.
9. CORETHERAPIX shall reply to the request mentioned in the preceding paragraph within thirty (30) days, after which time, if no positive reply has been received, the Investigator's request for authorisation shall be understood to have been refused.
10. The Investigator and GENETRIX undertake to inform CORETHERAPIX of any infringement of intellectual or industrial property rights under this Agreement of which they may become aware, and they shall be obliged to collaborate in any aspects in which their participation is required for the defence of the rights in the Invention.

NINE. SHARE PURCHASE OPTION CONTRACT.

1. GENETRIX grants the Investigator an option to purchase (the "Option") [REDACTED] shares into which CORETHERAPIX's share capital is divided. This Option shall extend to any shares or securities which may be issued in replacement of [REDACTED] shares into which CORETHERAPIX's share capital is divided as a result of a corporate transaction of any kind.
2. The price at which the Investigator may purchase the individual shares included in the Option shall be [REDACTED] (the "Option Price").
3. The term to exercise the Option shall be one (1) month from the date on which GENETRIX notifies the Shareholders that the Initial Funding has been provided in full. Once this term has elapsed, the right to exercise the Option shall automatically be forfeited without the need for any prior notice.

The Parties agree that the Management Committee shall have a duty to notify the full provision of the Initial Funding upon its occurrence.

4. The Option shall be exercised as follows:

- a. The Investigator shall give notice to GENETRIX and CORETHERAPIX of his decision to exercise the option and to acquire ownership of the shares it includes at the applicable Option Price (the "Notice"). The Option must necessarily be exercised over the totality of the shares it includes. Thus, partial exercise is not admissible.
- b. The Notice shall set forth the notary in Madrid province that has been designated by the Investigator and the date of signing of the deed of sale, which shall in no event take place earlier than ten (10) calendar days following receipt of the Notice by GENETRIX. The Notice shall also set forth the total Option Price to be paid by the Investigator, calculated in accordance with the aforementioned rules of calculation.
- c. GENETRIX shall be obliged to appear before the notary and execute a deed of sale, which shall be notified to CORETHERAPIX so that it may duly record the change in ownership of the shares in the company's Register of Shareholders.
- d. If GENETRIX fails to appear before the notary on the date arranged, the Investigator shall, before the Madrid notary, declare the Option exercised, depositing the total Option Price with the notary where it shall be at GENETRIX's disposal. Upon signature of this statement before the notary, with the deposit of the total Option Price, ownership of the shares included in the Option shall be transferred to the Investigator.
- e. The notary costs incurred in the exercise of the Option, specifically the execution of the deed of sale and the recording of the change in ownership of the shares, shall be for the account of CORETHERAPIX.

TEN

CORPORATE GOVERNANCE OF CORETHERAPIX.

1. The position of sole administrator of CORETHERAPIX shall be held by GENETRIX, and in representation thereof by Ms Cristina Garmendia, until the Option is exercised, upon which time the company's corporate governance shall be regulated in accordance with the rules established for such purpose or, failing this, the rules laid down in this Agreement for the period prior to the exercise of the Option shall continue to apply.

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin María Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606618
-----------------------------	---	-----------

2. Mr Bernardo Nadal Ginard shall hold, from the signature hereof until the



3. Without prejudice to the terms of the preceding paragraph, the following decisions in connection with the management of CORETHERAPIX shall require the agreement of GENETRIX S.L. and Mr Bernardo Nadal Ginard in a meeting of the Management Committee, which shall be established upon signature of this Agreement:
- i. Definition of the activity and investigation lines to be followed under the terms of this Agreement.
 - ii. Approval of the budgets.
 - iii. Modifications to the business plan set out in Annex 1.
 - iv. Appointment of the personnel and senior management of CORETHERAPIX and conferment of powers thereto.
 - v. Valuation of the company.
 - vi. Any negotiations aimed at achieving an agreement between new shareholders and, generally, an agreement of any nature having the purpose of enabling the entry of investors or shareholders into the share capital of CORETHERAPIX. Nonetheless, the Investigator shall be obliged to collaborate in good faith with GENETRIX in the negotiation of shareholders' agreements and to sign any agreements entered into with parties becoming shareholders of or investors in CORETHERAPIX.
 - vii. Decisions in connection with licences for the acquisition or sale of technology.
 - viii. Approval of the company budgets and decisions concerning budget deviations affecting more than twenty per cent (20%) of the annual budget.
 - ix. Those decisions which the Investigator and GENETRIX agree should be subject to this sub-clause.
4. The Shareholders hereby enter into a specific non-competition pact, by virtue of which GENETRIX undertakes, in so far as it is within its control, not to promote

within its corporate group any investigations that are in competition with those described in Clause Three. Likewise, the Investigator undertakes not to engage in any collaboration with third party public or private entities, specifically advice, consultancy or advertising activities, which may generate for such

entities rights of any nature in the data, information or industrial property included in Clause Three, or provide consultancy services that may lead to competition between CORETHERAPIX and the entity concerned. In the event of a conflict of interest, GENETRIX shall refrain from taking part in any decisions that may lead to competition between its subsidiaries and CORETHERAPIX.

ELEVEN. TERMINATION OF THE AGREEMENT

1. This Agreement may be terminated by any of the Parties, provided that the grounds for termination do not stem from non-performance or any other action of the Party seeking termination. For these purposes, the following shall be deemed specific grounds for termination of this Agreement:
 - a. Non-performance of this Agreement by the other party, provided that the non-performing party has not remedied the non-compliance within thirty (30) days of being required to do so.
 - b. The existence of evidence or objective indications that the Investigation will not lead to a result that is patentable or susceptible of industrial exploitation. Non-patentability of the Investigation shall be determined in accordance with the opinion of an independent European patent agent with proven experience in the field, linked to an agency that has not had any previous relationship with the Parties hereto. Non-susceptibility of industrial exploitation shall be determined by an investigator with no connection to any of the Parties who has participated in the commercialisation of therapies and/or devices for the treatment of cardiovascular diseases. These experts shall be selected by mutual agreement between the Parties.
 - c. The existence of a decision issued by a court of law or arbitration at the instigation of a third party claiming ownership, acquisition or priority rights of any kind in the Initial Information or in the industrial property generated during the course of the Investigation, irrespective of whether CORETHERAPIX has obtained a patent.
 - d. The existence of an impasse in the management of CORETHERAPIX. For these purposes, an impasse shall be deemed to exist where both of the following circumstances apply:
 - i. A term of one (1) month has elapsed since one of the Shareholders requested the other in writing to adopt a given decision without an agreement having been reached, or since one of the Shareholders requested the other in writing to adopt a given decision in the General Meeting.

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin María Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606619
-----------------------------	---	-----------

- ii. Once the aforementioned term of one (1) month has concluded, a further fifteen (15) days have elapsed without one Shareholder having notified the other in
 - iii. writing of the existence of an impasse making express reference to this Clause.
- 2. Should this Agreement be terminated on any of the grounds set out above after the Investigator has acquired a shareholding in CORETHERAPIX by exercising his option rights, the following rules shall apply:
 - a. If the termination of the Agreement is based on non-performance on the part of a Shareholder, the other Shareholder shall be entitled to purchase the non-performing Shareholder's shareholding for a third of its real value, calculated in accordance with the terms of paragraph 2(b)(i).
 - b. If the termination of the Agreement were validly decided by one of the Shareholders without any non-performance on the part of the other Shareholder, the following steps shall be followed:
 - i. The Shareholders shall jointly determine which is the value of CORETHERAPIX and, consequently, the value of each share. If no agreement is reached within fifteen (15) days, a valuer shall be appointed by lot among the auditing companies KPMG, PriceWaterhouse and Deloitte (the "Valuer"). The draw shall be held before a notary of Madrid at the instigation of either of the Shareholders, which shall be required to give certified notification to the other Shareholder. However, if at the time of the draw, one of the auditing companies holds or has held the position of auditor at CORETHERAPIX and GENETRIX during the five (5) preceding years, such auditing company shall be excluded from the draw. The Valuer shall have one (1) month to present a report to the Shareholders, the cost of which shall be borne by CORETHERAPIX.
 - ii. Once the valuation has been received, the Shareholder that did not seek termination shall decide within fifteen (15) days whether it shall purchase the shareholding of the other Shareholder. If it fails to take any decision within this period of time, the Shareholder that sought termination shall be obliged to purchase the shareholding of the other Shareholder. In all the cases

described in this sub-section, the shares shall be sold at the value established by the Valuer.

3. With regard to the provisions set forth in this Clause for the case of an impasse in the company, specifically the adoption of decisions that prevent the progress and continuity of the performance of this Agreement, if the Investigator has not yet acquired ownership of the shares to which he is entitled by virtue of this

Agreement, the terms of sections 1 and 2 of this Clause Eleven shall apply.

4.

TWELVE. APPLICABLE LAW AND JURISDICTION.

1. This Agreement shall be governed in accordance with Spanish Law.
2. The Parties agree to submit any matter or conflict that may arise in connection with the applicability, performance or interpretation of this Agreement to the courts and tribunals of the city of Madrid.

THIRTEEN. MISCELLANEOUS.

1. Notices

Any notices the Parties are required to give to one another under this Agreement shall be sent by letter, fax or any other medium, including electronic, that produces evidence of receipt. Notices shall be delivered to the following addresses:

GENETRIX

Att. Ms Cristina Garmendia Mendizabal

Tres Cantos (Madrid), [REDACTED]

Spain

Mr Bernardo Nadal Ginard

334 Hammond Street, Chestnut Hill, MA 02467,

USA

CORETHERAPIX

Att. Ms Cristina Garmendia Mendizabal

Tres Cantos (Madrid), [REDACTED]

Spain

2. Confidentiality.

This Agreement and all its contents are confidential. Any announcement or communication relating thereto shall require the consent of the Shareholders. Neither Shareholder may disclose any information on the Agreement without the express consent of the other Shareholder, except where so ordered by a court of law or an administrative authority in the exercise of their jurisdiction.

3. Expenses

[State seal] 12/2007	Paper exclusively for notary documents [Stamp: Notary's Office of Martin Maria Recarte Casanova, Madrid, Nihil Prius Fide] [State duty stamp: EUR 0.15]	800606620
-----------------------------	---	-----------

Each Party shall bear the costs, expenses, taxes, levies and duties of whatsoever nature it incurs in respect of any advice services in areas including but not limited to legal, tax and labour, which may be obtained for the purposes of the performance of this Agreement. GENETRIX shall bear the costs of preparation

and registration of this Agreement and the costs incurred in the preparation and exercise of the Investigator's option to purchase CORETHERAPIX shares.

4. Revocation of prior agreements.

This Agreement renders ineffective all and any agreements previously existing between the Shareholders or the Parties, such that, as from the date hereof, the relationship between them shall be governed solely by the terms set forth in this Agreement.

By virtue of all the above, the Parties sign this document in three counterparts, printed only on one side, in the place and on the date first above written.

For GENETRIX

[Illegible signature]
[Redacted signature]

Signed:

Ms Cristina Garmendia Mendizábal

For Mr Bernardo Nadal Ginard

[Illegible signature]

Signed:

Mr Bernardo Nadal Ginard

For CORETHERAPIX, S.L.U.

[Illegible signature]
[Redacted signature]

Signed:

Ms Cristina Garmendia Mendizábal

800606621

ANNEX 1

[Notary's revision mark, repeated on all facing pages]

**Research Project on Myocardial Regeneration by
Allogeneic Transplant of Adult Cardiac Cells and
Growth Factors**

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto: "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

CONTENTS

1	INTRODUCTION	3
2	METHODOLOGY AND WORKPLAN	4
2.1	Description of animal model	4
2.2	Establishing protocols for experiments with animals	5
PT 1	Setting up the protocol to detect activation of endogenous CSCs	5
PT 2	Protocol for determining the extent of infarction by magnetic resonance	5
2.3	Development of CSM cell lines for heterologous transplant	8
PT 3	Isolating, cultivating and assessing pig cardiac stem cell lines	8
PT 4	Isolating, cultivating and evaluating human cardiac stem cells	9
PT 5	Analysis of secretome of human CSCs	9
PT 6	Assessment and selection of clones of human CSCs	9
PT 7	Testing the tumorigenesis of the CSCs	10
PT 8	Analysis of the immunosuppression of hCSCs	11
2.4	Developing a regenerative therapy by means of cytokines	11
PT 9	Clinical formulation for local administration of cytokines in the myocardium	11
PT 10	Establishing a system of fast assessment of cytokines	12
PT 11	Safety of means of activating system of administering cytokines	12
2.5	Experimental assessment of the therapeutic effect of the CSCs	12
PT 12	Concept test of the therapeutic effect of pig CSCs and optimisation of their administration	13
PT 13	Study of the relation dosage effect of the administration of porcine CSCs	13
PT 14	Demonstration of the therapeutic effect of human CSCs in pigs	13
2.6	Experimental assessment of the therapeutic effect of the cytokines	14
PT 15	Study of dosage-effect relation in the administration of encapsulated cytokines	14
PT 16	Study of combined therapy	14
2.7	Budgets and timescales	15
2.7.1.	Estimated timescales	15
2.7.2.	Estimated budget for Coretherapix Project	15
3.	PARTICIPATING RESEARCHERS	18
3.1.1.	[REDACTED]	18
3.1.2.	[REDACTED]	18
3.1.3.	[REDACTED]	18
4.	REFERENCES	19

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTÍN MARÍA RECARTÉ
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE" ("NOTHING SURPASSES
LOYALTY"), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

800606622

1. INTRODUCTION

This document describes the project described in the contract between Bernardo Nadal Ginard and Genetrix S.L.

The aim of the project is to compile sufficient experimental scientific data to patent the concept of regenerative therapy proposed by Coretherapix and draw up a regulatory dossier that describes the viability of said therapy in sufficient detail to enable it to be presented to the Spanish Agency for Drugs and Healthcare Products (AEMPS). Said dossier must facilitate negotiations on the stipulations for embarking on the clinical phase thereby reducing the cost and length of the process.

The therapies under development include the heterologous transplant of cardiac stem cells (CSCs) and the use of cytokines to stimulate myocardial regeneration.

The project comprises two therapeutic avenues (CSCs and cytokines), developing a vehicle for administering them and setting in train the technical protocols required to begin experimentation on animals. These tasks will be undertaken in close cooperation with contracted research centres under the direction of Bernardo Nadal Ginard. The fourteen work programmes comprising the project and the partners working on each of them are as follows:

Establishing protocols for experiments with animals

PT 1. Establishing a protocol to detect activation of endogenous CSCs.

- [REDACTED]

PT 2. Establishing a protocol to determine the extent of heart damage using magnetic resonance.

- [REDACTED]

Developing CSC cell lines for heterologous transplants

PT 3. Isolation and cultivation of porcine CSCs.

- [REDACTED]

PT 4. Isolation and cultivation of human CSCs.

- [REDACTED]

PT 5. Analysing the protein secretions of human CSCs.

- [REDACTED]

PT 6. Assessment and selection of human CSC clones

- [REDACTED]

PT 7. Tumorigenesis testing of human CSCs.

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTI:
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHI
PRIUS FIDEM" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY) of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

▪ [REDACTED]

PT 8. Activation testing of the immune system

▪ [REDACTED]

Developing a regenerative therapy using cytokines

PT 9. Clinical formula for administering cytokines in the myocardium.

▪ [REDACTED]

PT 10. Establishing a rapid system for assessing cytokines.

▪ [REDACTED]

PT 11. Assessing the reliability of the activating mechanism of micro particles.

▪ [REDACTED]

PT 12. Testing the therapeutic effectiveness of porcine CSCs and optimising their administration.

▪ [REDACTED]

▪ [REDACTED]

PT 13. Studying the dosage-effect relation of administering porcine CSCs.

▪ [REDACTED]

▪ [REDACTED]

PT 14. Demonstrating the therapeutic effect of human CSCs on pigs.

▪ [REDACTED]

▪ [REDACTED]

Experimental assessment of the therapeutic effect of cytokines

PT 15. Study of the dosage-effect relation in administering encapsulated growth factors.

▪ [REDACTED]

▪ [REDACTED]

PT 16. Study of the therapeutic effect of a combined (CSC and cytokines) therapy.

▪ [REDACTED]

▪ [REDACTED]

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]

12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARÍA RECARTI-
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

The duration of the work is calculated at 12 months as from the experiments already undertaken in September 2007. The [REDACTED] will outsource the experiments on animals to the [REDACTED] and other external contractors.

All copyrights emanating from this project will be owned by Coretherapix S.L. The [REDACTED] will obtain the right to a free license to use the copyright inherent in the project exclusively for purposes of research.

2. METHODOLOGY AND WORK PLAN

Below are described the 16 tasks to be undertaken in the course of the project together with a description of the animal model. Section 3 of the document contains a timetable that indicates the relation between these tasks.

2.1 Description of the animal model

Pigs were selected as the experimental animal on account of their cardiovascular anatomical and physiological similarity with humans. Given this similarity with humans, pigs have been used extensively by various groups to understand the pathophysiology of atherothrombosis, acute and chronic ischemia, assessing new anticoagulants and antiarrhythmics and for validating new imaging technologies. In addition, the team has ample experience working with this model and the preliminary results of the model of myocardial infarction. Various characteristics of pigs make them the ideal model for this study. In the first place, distribution of the coronary arteries is similar to that of humans. Secondly, they have a relatively scant network of collateral blood vessels and a low ability to recruit new collateral vessels in the course of an acute ischemic episode as occurs with healthy humans not subject to cardiovascular disease (this is not the case with dogs, which would be the alternative experimental model). It is important to point out that while in the case of human patients with severe cardiovascular disease we do see an extensive collateral circulatory network, this is in a relatively small proportion (less than 30%), meaning that the model provides in most cases a reasonably good approximation.

The size of a pig also allows us to gauge the effectiveness of the protocols on a heart that is similar to the human heart using the same surgical techniques and protocols. It enables us to determine qualitatively and quantitatively the destiny of transplanted cells, by their direct contribution to the regeneration of the myocardium (which we cannot expect to see using heterologous cells), by an increase in the survival rate of damaged cells, and/or by stimulation of the endogenous cells by virtue of the production of anti-apoptotic and growth factors. As stated earlier, this kind of information is not as yet available despite the number of clinical experiments undertaken or in progress. Without this kind of information, which we hope to obtain from this project, it is very difficult to interpret the results of clinical experiments and, more to the point, it is

800606623

impossible to propose rational improvements to existing protocols as we lack various key parameters that cannot be obtained in humans.

Our model will test the efficacy of three different regenerative modalities (cellular transplant, factor administration and combined therapy) to improve the anatomy and physiology of infarcted myocardium and avoid or reverse cardiac remodelling. In addition, before commencing application in humans, we will establish the ideal timing of surgery and the dosage pattern needed to obtain the desired results.

Though indicated in occlusion-reperfusion coronary studies, porcine models have a bad reputation due to their high mortality rate. However, our model based on a closed thorax has shown considerable consistency in terms of both pathological evidence of transmural necrosis and a low mortality (between 15% and 20%). The rate of total success of the complete model, including RMC assessment, is of the order of 90%, excluding the rate of mortality. In 3%-5% of cases it is not possible to see the infarct by RMC or the infarct is too small to produce hemodynamic changes. We suspect that this is due to situations in which incomplete occlusions occurred. Also, in another 3%-5% of cases, animals showed myocardial necrosis next to the right coronary artery, presumably due to thrombosis induced by catheterisation.

Porcine model of acute myocardial infarction: Before inducing the myocardial infarction the animals will be treated for three days with 81mg of aspirin, 71mg of Plavix and Labetalol. The combination of oral antiplatelet therapy and beta blockers is maintained throughout the week following the operation. This treatment helps to keep the coronary artery in which the infarct occurs open. The animals are sedated (100mg intramuscular telazol) before commencing any intervention (experimental infarction, intracoronary injection or image studies). Once sedated the animals are tubed and a general anaesthetic is performed using isoflurane (2%-5% in O₂) as required. Mechanical ventilation will be used when necessary.

The methodology for intervention using a coronary balloon has been described by us and other groups (Badimon L., 1987; Lee, H.W., 1998). Once the animal is fully anaesthetised and stable, access is obtained to the left femoral artery by incision, placing a 6.5-8 F introducer and administering 70 units per kilogram of intravenous heparin. A 6.5-8 F catheter guide AR-1 or AR-2 is then introduced via the ostium of the left coronary artery, injecting angiographic contrast. The median or proximate coronary of the anterior descending artery depending on the anatomy is then selected for the purpose of producing an infarct in a substantial portion of the left anterosseptal segment or the antero-apex of the free ventricle wall. Once the location has been selected, 2mg/kg of lidocain is injected intravenously, the balloon is inflated and kept inflated for 90 minutes. The balloon used is 2.5 to 3.0 mm in diameter and 15 mm long. The catheter is 143 cm long. Another angiogram is then taken to ascertain the location of the balloon. After 90 minutes' occlusion, the catheters are removed and a further angiogram is taken. At this point the incision in the femoral is repaired. To prevent and treat cardiac arrhythmias, cardiac resuscitation techniques are employed including administration of pharmaceuticals and transthoracic electric shocks.

2.2 Establishing protocols for experiments with animals

PT 1 Setting up the protocol to detect activation of endogenous CSCs.

Participants and main roles

- ~~Participant~~ Detailed pathological anatomy

- **General pathological anatomy**

Resources

- 1 medical student, 1 technician. Specific training for medical student. Modernisation of equipment. Fungibles and antibodies
- Within budget.

Continuous marking with BrdU -

In order to identify and quantify all myocardial cells born subsequent to administration of each treatment, a subcutaneous osmotic pump (1-Flow Easypump/3, Braun) will be implanted in each animal prior to the commencement of treatment. These pumps have a 60-ml capacity that can be refilled easily. They will be filled with a 0.5M BrdU solution to obtain uniform marking in the first three weeks following the operation. Using this system we have regularly marked animals for as long as nine weeks without adverse effects. We consider that this protocol may be extended for 16 weeks without modifications.

Collecting, fixing and processing samples of pathological anatomy -

Following the last RMC the animals are euthanised. After applying a general anaesthetic, the animals are given heparine, the thoracic aorta is exposed by laparotomy and a catheter is placed in the ascending aorta. 1 litre of cleansing fluid (0.1 M PBS containing papaverine at pH 7.4) is fed in through the catheter. Next, fixing is achieved by means of pressure applied using a litre of 4% paraformaldehyde at 4% in 0.1 molar PBS, pH 7.4. All perfusions are undertaken at 100mm Hg. Once the heart is rigid, the major blood vessels are extracted and the whole is submerged in fixer. After 24 hours in fixer, the organ and attachments are stored for several days in 0.1 M PBS before continuing.

Dissection and histological preparation -

The heart is cleaned of blood and the aorta and pulmonary artery are cut at 2 cm from their roots. The heart is cleaned of epicardial fat and external macroscopic signs of infarction are examined. The dimensions of the infarction are taken and the heart is weighed. At this point two photographs are taken, one from the front and the other from the back of the heart. Beginning at the apex and continuing to the atrioventricular ring (mitral), six 8 mm parallel incisions of an equal width of 8mm are made separating it from the auricle. Each of the six cuts is subdivided into segments corresponding to the right ventricle, septum, and left ventricle. The left ventricle is set aside for histological processing. The cuts of the left ventricle are subdivided into the lateral and lower front segments. The weight of each section of the left ventricle and the macroscopic size of the infarction are noted.

Measuring the size of the infarct -

Five sections, from the base to the apex of the left ventricle are examined by means of an ordinary microscope. The sections containing the complete thickness of the left ventricle wall and the septum are dyed with alpha sarcomeric actin for the myocytes, lectine for the endothelial cells, alpha-lisa actin for the smooth muscle cells and vimentin for the fibre blasts.

The wall is split lengthwise in 60 consecutive fields (30 from the endo and 30 from the epimyocardium), which are then examined by confocal microscope to calculate the relative area occupied by myocytes, endothelial cells, smooth muscle, coronary and capillary arterioles. These areas are equivalent to the volumes occupied by each structure. The surface area of the capillary and arterioles will then be examined, along with the lengths and structural properties associated with oxygenation. The samples for each cell type must be adjusted according to Poisson statistics in such a way that the sampling error is less than 10%. The relative volume of each cellular type multiplied by the total volume gives as the result the aggregate volume of each cardiac cell type. The volumetric sizes of the myocytes will give us one of the key measurements in determining the size of the infarction.

Following MI there are two processes whose properties change over time. Initially, there is a reduction of the necrotic infarcted area with formation of a scar. Then, in second place, we observe the reactive hypertrophy of the myocytes in the overloaded healthy part of the ventricle, which enlarges the amount of surviving myocardium. These phenomena are difficult to separate and measure independently, which complicates any assessment of the size of the infarction at various points in time following the occlusion of the coronary artery and its reperfusion. The number of myocytes dwindles even further as a result as a result of the death of cells dispersed by the ventricle. Thus, the total number of dead cardiac myocytes left in the myocardium and the aggregate volume of ventricular myocytes give us a better idea of the size of the infarction and regeneration. The lost fraction of myocytes will provide a quantitative measurement of the true impact of the ischemia and the degree of reperfusion over the infarction wound.

Immunohistochemistry - ~~300606624~~

800606624

A series of dyes will be used to identify specific components within the infarcted area and its surroundings by means of confocal microscopy. The dyes and their purpose are described below.

- a. BrdU + cKit: generation of new cardiac stem cells.
- b. BrdU + alpha sarcomeric actina: generation of new cardiomyocytes.
- c. BrdU + WF: Generation of new vascular tissue.
- d. GFP: location of the injected stem cells (where there is a need to be more specific, this can be achieved by using an anti-GFP antibody).
- e. Collagen: Assessment of the scar.

The percentage of cells marked with BrdU and GFP in the myocardium can be determined by averaging the amounts in three sections within the area of interest.

PT 2 Protocol for determining the extent of the infarction by magnetic resonance.

Participants and main roles

RMC is an extremely precise, non-invasive, technique for obtaining a complete assessment, structure and perfusion of the heart. For this reason each animal acts as its own controller. The endpoints (final decision points of an essay) will include not only global measures and regional measures by segments as described. The animals will be sacrificed after the final examination and the heart will be submitted to a histopathological study. Histopathological and immunohistochemical tests will be undertaken, as will an examination of the ultrastructure, using confocal microscopy on the infarcted areas, the area around the infarct and the areas not affected. A comparison will be run on these measurements and those resulting from MR, thus permitting calibration of the MR parameters. The non-invasive nature of the process will allow us to obtain consecutive data in such a way that each animal will serve as its own control with respect to the results of the treatment, thus reducing the

number of animals required. The size of the samples used in previous studies (Meyer BJ, 1994; Spangrude GJ, 2003; Collins K, 2002) using similar models was ten. In order to ensure the validity of the information we will use 15 animals per group.

Below we give details on the RMC protocol and the measures that in due course would be of great use for animal tests and which at the time of writing this Annex are subject to availability in León.

Assessment of the myocardial infarction and of the heart function by means of magnetic resonance.

As described above the animal is sedated and anaesthetised (Propofol 3mg/kg/hr) and taken to the image room. A ventilator compatible with the resonance is employed during transport and throughout the diagnostic process. The study is conducted with the animal in supine position with electrophysiological 'gating'. The animal is submitted to a 60-minute examination to find and quantify the infarcted area. Once the study is completed the animal is returned to the stables after an hour in observation. The image is obtained at a magnetic resonance of 3T using a 'phased array' coil of four elements.

Assessment of the volume of the mass of the left ventricle. The volume and functionality of the left ventricle are significant prognostic factors in patients suffering coronary disease. Magnetic resonance is the preferred method for obtaining a non-invasive assessment of ventricular volumes and mass (Chimenti C, 2003; Nadal-Ginard B, 2003). The preferred method of acquisition is 'TrueFISP' as it permits shorter acquisition times, easier reproduction and improved contrasting, in addition to the availability of reference values (Obata H, 2003). Contiguous short-axis sections are obtained from the base to the apex of the left ventricle with retrospective gating of the electrocardiogram (Figure 1). The parameters of the image will be: TR = 32 msec., TE = 1.6 msec. 63°-90°, cut width of 8 mm without spacing, FOV=360x270mm = 256x125 (spatial resolution on a plane of 2.2 x 1.4 mm), 10-15 segments, 20 cardiac phases, and a bandwidth of 930Hz/px.

The images are transferred to the system workstation where the telesystolic and telediastolic outlines corresponding to the endocardium and epicardium of the left ventricle will be copied semi-automatically by means of manual adjustments to each section of the short axis (Figure 1). The sum of the areas of endocardial outlines of each section multiplied by the thickness of the section will be used to estimate telesystolic and telediastolic volumes (Scholzen T, 2000). Geometric approximation will not be used in order to include anatomic abnormalities. The same method will be employed to calculate the volume of the myocardium of the left ventricle between the endocardial and epicardial outlines. Papillary muscles will be included in the ventricular volume (Dutta A., 1997; Blasco M.A., 2002). This volume is then multiplied by the specific density of the myocardium (1.05g/cm³) to obtain the mass of the left ventricle (Dutta A., 1997). The ease of reproduction of this technique facilitates assessment of changes in the course of the ischemic illness and its response to different treatments (Dutta A. 1997; Beausejour CM, 2003).

Global function of the left ventricle. Using the aforesaid calculations it is possible to quantify the ejection fraction, the ejection volume and the ventricle discharge (multiplying the ejection volume by the cardiac frequency) which, in the absence of valve regurgitations correlates well with haemodynamic measurements. The reproducibility of these parameters is excellent, far superior to other methods (Kamihata H, 2001; Kamihata H, 2002). For example, whereas detection of a change of 3% in the ejection fraction (with a degree of confidence of 90%) requires 87 patients in the case of echocardiography, using CMR only 11 are needed.

Figure 1: Telediastolic and telesistolic contours drawn by hand in two short axes

Figure 2: Different images of a patient with large aneurism in the left ventricle resulting from a myocardial infarct: A, four cameras; B, two cameras; C, three cameras

Assessment of the regional function of the left ventricle. An assessment of the abnormalities in the wall can be estimated either qualitatively or quantitatively. MR is easy to reproduce and has proved itself superior to echocardiography both in repose and under pharmacological stress, probably due to the greater quality of the image (Boyum A. 1968). To assess the function of the heart wall the short-axis images are contrasted with those of the three large axes (two, three and four cameras) that are also obtained using TrueFISP. The left ventricle is divided into 17 segments in accordance with the standard classification (Pfein S. 2001) (Figure 3). The qualitative analysis will be undertaken by means of the use of the classification of habitual regional function and a general index can be computed on the basis of the average for all segments. Absolute quantification of regional thickening can be obtained with the help of purpose-built software (e.g. Argus). Calculation is made of the telesystolic thickness (en mm.), the thickening (en mm) and the percentage of thickening (Eur. Heart1, 1998) (Figure 4).

Figure 3: Classification of myocardial segments according to the AHA.

Figure 4: Drawing of the myocardium and segmentation of a short axis of a pig with acute myocardial infarction. Telediastolic contours (left) and telesistolic contours (right) and report showing the distribution of regional thickening.

2.3 Development of CSM cell lines for heterologous transplant

PT 3 Isolating, cultivating and assessing pig cardiac stem cell lines

Participants and main roles:

- [REDACTED] Isolation and cell culture.

Resources

- [REDACTED] 1 medical student, fungibles, means of cultivation.

800606625

In order to carry out the concept test and preliminary assessment of the dosage-effect relation (PT10 and PT11), we will use pig cells provided by Bernardo Nadal Ginard. These CSCs have been extracted from the auricular and ventricular cavities of normal healthy pigs by means of either explants or catheter biopsies. Four of the six samples were taken by means of an endomyocardial biopsy by catheter with a Bipal biptome (Cordis). The c-kit cells are separated using magnetic microspheres and the autoMACS (Miltenyi Biotec) device. Cell purity is determined by FACS. To test by FACS the cells are dyed with FITC ExtrAvidin FITC (Sigma). The c-kit cell culture is obtained by plating $1-2 \times 10^4$ cells per ml for 5-7 days in F12K medium containing 10% FBS, 5% HS. By this procedure it is possible to obtain a large number of cells (up to 1×10^6) within 7-10 days from starting the culture. The progeny of a single cell has resulted in a cell line of continuous passages over the last two and a half years. The line has a duplication time of approximately 24 hours, presents a normal karyotype and normal characteristics of a stem cell.

Two marking techniques are required to monitor the destiny of transplanted cells. One to track them with MR and another for histological identification and enable identification of progeny is applicable. For MR identification it is necessary to mix a contrast agent with the cell cultures to confirm the distribution of the cells in the myocardium after the transplant. To this end the cells are cultivated from 4 to 8 hours in a suspension of iron-oxide particles (10ml/L) at 37° C in 5% of CO₂ and washed with PBS prior to injection.

[PRINTED STATE STAMP]

{Document protocol number}
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTÍN MARÍA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDELI" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

It is also necessary to use a genetic marker to distinguish transplanted cells from their progeny and from those resulting from activation of endogenous cells. At present transplanted cells carry two markers. The cells derive from a boar pig and are always transplanted in sows to ensure that the Y chromosome functions as a marker; also the culture is transfected with lentiviruses that express the EGFP protein in such a way that a master culture having 99% positive GFP is always available.

The work undertaken by ~~XXXXXXXXXX~~ on the Concept Test for establishing a cell bank for the cells detailed above and the corresponding marking protocol is detailed in the document, "*Preclinical test for using cardiac stem cells in an infarcted pig model*" (18.05.2007).

Isolating, cultivating and evaluating the human cardiac stem cells.

Participants and main roles:

- [REDACTED] Cell isolation and cultivation

Resources

- [REDACTED]: Medical student, fungibles, means of cell cultivation.

Isolating, cultivating and marking cardiac stem cells of porcine origin – Fundación Inbiomed

In the same way as the porcine cell line has been set up we propose to create a series of human cell lines to determine inter-clone variability and select the most effective cells for future preclinical and clinical trials. Isolating, expanding, characterising and marking these cells will be undertaken at [REDACTED] under the supervision of Bernardo Gimard, Scientific Director of Coretherapix.

PT 5 Analysis of the secretome of human CSCs

Participants and main roles:

- [REDACTED] Preliminary secretome by RT-PCR and GeneChip
- Contracted supplier: Proteomic study

Resources

- [REDACTED] 1 medical student, fungibles, means of cultivation.

In order to develop optimal regeneration protocols by means of the activation and multiplication of intrinsic myocardium stem cells it is essential to know which factors these cells respond to and which are responsible for their overlife, growth and differentiation. In addition, most stem cells, whether of adults or embryos, including hCSCs, show short-term autocrine and paracrine systems (in the niche) to regulate their biology. These same molecules frequently exercise activities over neighbouring cells. It is therefore important to identify the auto- and paracrine mechanisms of CSCs. It is foreseeable that these mechanisms change according to the degree of differentiation of the cells.

Preparation and selection of CSC populations in specific stages of differentiation [REDACTED]

[REDACTED] One of the hCSC clones that has maintained a stable differentiation cariotype and patron over the last 12 months will be transfected with different constructions that allow us to identify and select a specific state or determination corresponding to a specific type of cell. These constructions present a uniform anatomy. Each of them may reproduce themselves like a lentivirus and carry a gene that makes them resistant to antibiotics, with the result that such cells can be selected while under cultivation, the promotor of the specific gene of the cell type to be selected which directs the expression of fluorescent protein (generally eGFP), which thus allows the interesting cells to be selected, i.e., "cell sorting".

The constructions to be used lead the gene developers to select the following cell populations: primitive CSCs, known as "stemness genes", i.e., that have not yet induced the cardiac phenotype; cells that express specific transcription factors for one or another of the following three cell types (myocytes, smooth muscle, endothelium) but remain undifferentiated; and cells that have already commenced differentiation.

Analysis of the "receptoma" of the CSCs and their progeny: The battery of membrane receptors expressed by these different cell types ("secretome") will be determined by "gene array" analysis using conventional techniques. This analysis will be outsourced to an external genomic unit. The results obtained from the "arrays" will be confirmed by PCR. The expression at the protein level of the molecules of greatest interest will be confirmed by means of cito immunofluorescence and western blot microscopy. This analysis will produce the condition of "receptoma" and their evolution in the course of their differentiation and specification in different cell types, which in turn will provide information on the molecular mechanisms responsible for this specification process.

Analysis of the secretome of the CSCs and their progeny: the battery of proteins secreted by the CSCs (secretoma) contains growth factors, hormones, cytokines, chemokines, metalloproteins and proteins from the extracellular matrix that determine their biology and that of the neighbouring cells. Their identification is required to discover which molecules affect the biology of the myocardium and are therefore candidates for use as therapeutic agents.

Characterisation of the secretome of CSCs will use the same cellular populations described for the "receptoma". At the initial stage, all genes expressed by the CSCs corresponding to the secreted molecules will be identified. This analysis will be undertaken by means of "gene arrays" in an external genomic unit.

800606626

In a second phase, each of the cell populations that is of interest will be cultivated in a protein-less medium. The proteins secreted in this medium will be characterised using standard proteomic techniques: 2D gel electrophoresis, spectrometry of masses, etc. This analysis will be carried out in an external proteomic unit.

This work will also allow us to determine the inclusion of new cytokines to test in PT13 and PT14.

PT 6 Assessment and selection of clones of human CSCs

Participants and principle roles:

- ~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~ cell production
- External contractor: experiments with immunodeficient rats

Resources

- ~~XXXXXXXXXXXX~~ medical student, fungibles, means of cultivation.
- External contractor: access to immunodeficient animals and experts in experimental modelling.

To prepare a regulatory dossier it is a good idea to anticipate the Agency's need to study the behaviour of the same human cells to be tested in clinical conditions in order to show that their performance is predictable.

In an initial phase, we will evaluate the performance of four cellular lines provided by Bernardo Nadal Ginard. This work will establish the performance of the cells and determine the best cell line to use in the experiments of dosage effectiveness

in human cells. The same experiment will be repeated in the future in order to assess the lines generated in the course of PT 4.

Experiments will be conducted using 25 immunodeficient rats divided into five groups of four animals. One group of five will serve as the control group and will be injected with PBS. Each experimental animal is injected with 5×10^5 stem cells at the edge of the infarct resulting from ligation of the coronary artery DAI. Each group will be injected with different clones and the clone presenting the greatest regenerative capacity will be selected.

PT 7 Test of the tumorigenesis of the CSCs.

Participants and principle roles:

- [REDACTED] Cell production
- External contractor: Access to small animals

Resources

- [REDACTED] 1 medical student, fungibles, means of cultivation.
- External contractor: Access to small animals and expert in animal modelling.

In order to demonstrate the reliability of this therapy a trial of Tumorigenesis in mice will be undertaken with a scientific contractor having experience in these models.

Tumorigenesis tests: 50 mice in groups of 10 immunodeficient animals each, injected subcutaneously with 0.1M, 5M, 10M and 20M respectively. Follow-up of 12 months or until the death of the animals that develop tumours. This task will be conducted with the help of an external centre. In principle, that of [REDACTED]

PT 8 Analysis of the immunosuppression capacity of the hCSCs.

Participants and main roles:

- [REDACTED]

Resources

- [REDACTED]: 1 medical student, fungible, reactives.

Recently many researchers have identified an immunoregulatory capacity in embryonic and mesenchymal stem cells. On one hand these cells have an immunosuppressive function *in vitro*, reducing the alloreactivity and proliferation of lymphocytes *in vitro* in direct correlation with the dosage. At the same time they are capable of generating tolerance *in vivo*, a factor that theoretically would allow them to survive in non-identical HLA individuals, without the need for immunosuppression. Moreover, this tolerance extends to the cells or tissues co-transplanted with the stem cells, as has been shown in several clinical contexts.

At present there is no information on the immunoregulatory capability of CSCs in general or human CSCs in particular. To characterise this aspect of hCSCs is important for a number of reasons: a) to better understand the mechanisms of therapeutic effect by distinguishing the stimulatory paracrine effect of endogenous CSCs from the anti-inflammatory and/or direct contribution of the transplanted cells to the regenerative process; b) possible use of transplanted hCSCs in the treatment of cardiomyopathies having an inflammatory component that is usually of unknown origin; c) possible use of the treatment in other pathologies having a chronic inflammatory component such as autoimmune diseases, rejection of transplanted organs,

etc.; d) identification of the molecules responsible could lead to the production of molecular medication that is active in phenomena of inflammatory rejection and/or reparation/regeneration of tissues.

In cases where the immunoregulatory activity of stem cells has been shown, such activity requires prior stimulation of the cells by activated lymphocytes, i.e. said activity is induced by pro-inflammatory signals and depends on the secretion of a soluble factor or factors for which interferon is one of the candidates. The secretion of γ interferon by lymphocytes induces the expression of the indoleamine enzyme 2,3 dioxxygenase (IDO), which is also responsible for the immunomodulatory effect. The IDO catalyses the tryptophan in kynurenine, which permits measurement of IDO activity in HPLC cell cultures, which in turn allows measurement of IDO activity in cell cultures by means of HPLC. It will be of particular interest in determining the level of expression of IDO in isolation from individuals of different ages, with or without associated pathologies, and in monitoring the levels of this enzyme in the different phases of the cells *in vitro*.

By testing the stimulation of the proliferation of the PBL *in vitro* we will also be able to determine the evolution of the immunoregulatory ability of the hCSCs to the extent that they differ *in vitro*.

2.4 Developing a regenerative therapy by means of cytokines

PT 9 Clinical formulation for local administration of cytokines in the myocardium.

Participants and main roles:

- [REDACTED]

The growth factors described should be administered locally limiting their concentration in the systemic circulation and avoiding possible neoplasias. The vehicle should also be biodegradable within a reasonable time period while it discharges the active ingredient in order not to create safety problems. To this end we specify a vehicle of micro capsules to be developed by the company [REDACTED]. The specification for this vehicle is described in the Annex to the contract made between [REDACTED] and dated 15 October 2007.

PT 10 Establishing a system of fast assessment of cytokines

Participants and main roles:

- [REDACTED] preparation of the system of administration.

Resources

- [REDACTED] 1 medical student, fungible, Merck microcapsules, cytokines, biofilizador / freezer.

While development of the vehicle mentioned in PT 8 is underway it will be necessary to have an alternative offering rapid administration to allow evaluation of the cytokines and thus test different dosages and combinations quickly and economically.

800606627

To achieve this, suspensions of polymeric microspheres [REDACTED] will be prepared, of the same type as those used for chromatography, having a pore [REDACTED] and negatively charged. This method is applicable in the experimental model and

should approximate in terms of efficiency to the system employed by Ingeniatrias, although evidently it lacks an adequate safety profile. Using this vehicle allows various different cytokine cocktails to be prepared.

PT 11 Safety assessment of the means of activating the system of administering cytokines

Participants and main roles:

- [REDACTED] preparation of the system of administration.
- [REDACTED] Access to animals and personnel expert in the animal model.

Resources

- [REDACTED]: Medical student, fungibles, Merck microcapsules, cytokines, liofilizador/freezer.

While the vehicle described on PT8 is being developed it will be necessary to have an alternative rapid means of administration to assess the effect of the cytokines under different dosages and combinations in a manner that is both swift and economic.

To achieve this, suspensions of polymeric microspheres of [REDACTED] will be prepared, using the same type as those employed in chromatography, with a pore of [REDACTED] and negatively charged. This method is applicable in the experimental model and should be similar in terms of effectiveness to the [REDACTED] system although, clearly, it will lack an adequate safety profile. Using this vehicle a variety of cytokine cocktails can be prepared.

2.5 Experimental assessment of the therapeutic effect of the CSCs

PT 12 Concept test of the therapeutic effect of pig CSCs and optimisation of their administration

Participants and main roles:

- [REDACTED]: Animal experiments. General pathological anatomy
- [REDACTED]: Cell cultivation. Detailed pathological anatomy

Resources:

- [REDACTED]: 21 medical student, fungibles, means of cultivation.
- [REDACTED]: Access to animals and personnel expert in the animal model.

The prime target of this exercise is to carry out a concept test on the ability of stable cell lines of heterologous porcine CSCs to activate the endogenous CSCs of the myocardium when administered in the ischemic area immediately following an infarction. The second purpose is to evaluate the extent to which the cells 'nest' following injection and how much this depends on the method of administration employed.

It is understood that the transplanted cells will be eliminated by the immune system of the host within 7 to 14 days following transplant. It is expected that the production of growth and cytokines within this period is sufficiently robust as to trigger the endogenous cells. Also, the production of a large number of anti-apoptotic factors should reduce the number of cells lost during the acute phase of infarction. Assessment of cell nesting and activation will be carried out by means of protocol P12 without using resonance tests.

Concept test

Group 1.a. The concept test consists of administering 1×10^8 of cells in 10 ml of inactivated porcine serum administered via the left descending anterior coronary artery just beneath the place of occlusion at a rate of 1 ml per minute following the infarction. Valid results to be obtained in six animals that will be sacrificed three weeks later after having applied to them the quantification protocol of the PT2.

Optimising the administration route

Experiments will be conducted on two groups of animals using different approaches:

Group 1b. Injection of 1×10^8 of cells in 10 ml of inactivated porcine serum administered via the front descending left coronary artery just beneath the point of occlusion at a rate of 1 ml per minute. Two animals will be sacrificed 30 minutes after the operation and another two 24 hours after.

Group 1c. Injection of 1×10^8 of cells in 10 ml of inactivated porcine serum administered via the front descending left coronary artery just beneath the point of occlusion at a rate of 1 ml per minute while the coronary sinus is blocked by a second balloon catheter. Three animals to be sacrificed 30 minutes after the operation and another two 24 hours after the operation.

The reason for the second group is to prolong the extravasation of the cells to allow them to abandon the coronary circulation and enter the tissue where they can carry out the task we expect of them.

PT 13 Study of the relation dosage effect of the administration of porcine CSCs.

Participants and main roles:

- [REDACTED] Animal experimentation. General pathological anatomy
- [REDACTED] Cell production. Detailed pathological anatomy

Resources:

- [REDACTED] 1 medical student, fungible, means of cultivation.
- [REDACTED] Access to animals and personnel expert in the animal model.

In order to determine the dosage-effect relation, the experiment will involve four groups of three animals each with dosages of 50, 100 and 300 million cells, plus a control group, sacrificed after eight weeks.

Resonances will be carried out at the following points: pre-operative, post-operative, after one day, four days and eight weeks.

PT 14 Demonstration of the therapeutic effect of human CSCs in pigs

Participants and main roles:

- [REDACTED] Animal experimentation and general pathological anatomy.
- [REDACTED] Cell production. Detailed pathological anatomy.

Resources:

- [REDACTED] medical student, fungibles, means of cultivation.
- [REDACTED] Access to animals and personnel expert in the animal model.

Once the ideal clone is selected, an experiment on pigs with human cells will be undertaken to demonstrate their indirect regenerative capacity (paracrine effect).

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

In order to determine the dosage-effect ratio, the above protocol will be repeated. The experiment will take place with four groups of three animals with dosages of 50, 100 and 300 million cells, plus a control group, sacrificed at eight weeks.

Resonances will be taken at the pre-operative, post-operative, after one day, after 4 weeks and after 8 weeks.

800606628

2.6 Experimental assessment of the therapeutic effect of the cytokines

PT 15 Study of the dosage-effect relation in the administration of encapsulated cytokines.

Participants and main roles:

- [REDACTED]: Animal experiments. General pathological anatomy
- [REDACTED]: Cellular production. Detailed animal pathology.

Resources:

- [REDACTED]: 1 medical student, fungibles, means of cultivation.
- [REDACTED]: Access to animals and personnel expert in the animal model.
- [REDACTED]: Clinical formulation when ready.

Using the formula of [REDACTED] or, if not, the rapid assessment vehicle, the effective dose of the encapsulated factors will be determined. The starting dose will be determined on the basis of the effectiveness of the encapsulation and in comparison with preliminary studies conducted by Bernardo Nadal Ginard.

The experiment will take place on three groups of three pigs at the starting dosage (1x), and at twice (2x), and four times (4x) this dosage. The animals will be sacrificed at six weeks. For the three doses of microparticles the same volume of excipient will be employed, with the result that a single control group will be sufficient. The control group will consist of four pigs, two to be sacrificed at three weeks and four at six weeks.

Once the dosage-effect curve is established, the following experiments will be undertaken:

- 3 animals at the optimal dosage to be sacrificed at 6 weeks,
- 4 animals with the optimal dosage to be re-injected at three weeks and sacrificed at 8 weeks
- 2 control animals with the optimal dosage to be re-injected with saline at three weeks and sacrificed at 8 weeks
- 4 animals with the optimal dosage (with or without re-injection depending on the previous experiment).

Resonance studies will be undertaken prior to operations, post-operation, at one day, at four and eight weeks.

In this way there will be a group of 7-8 animals with optimum dosage and a protocol of reinjection if this proves necessary.

PT 16 Study of combined therapy

Participants and main roles:

- [REDACTED]: Animal experimentation. General pathological anatomy.

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]

12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto: "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

- [REDACTED] Cell production. Detailed pathological anatomy.

Resources:

- [REDACTED] 1 medical student, (ingibles, means of cultivation.
- [REDACTED] Access to animals and personnel expert in the animal model.
- [REDACTED] Clinical formulation where this is available.

Once the most effective therapeutic range is identified both for the cells and for the factors, an experiment will be undertaken with six animals being administered at the same time the optimum cellular protocol and optimum factor protocol.

Resonance studies will be carried out pre-operatively, post-operatively, at 1 day, at 4 days and at 8 weeks.

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE STAMP]

[PRINTED STATE CREST]
With superimposed by hand, the stamp of the
Madrid mayor MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA before the Latin motto "Nihil
PRUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

Id.	PT	Task	Time	2008												2009					
				Seq.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
1		1 Detecting active CSC	28 wks																		
2		3 Isolat. & cult. CSCp	5 wks																		
2		4 Isolat. & cult. CSCh	22 wks																		
4		5 CMCh secretions	60 days																		
8		6 Select. CSCh clone	3 mms																		
9		7 Gen. CSCh tumour	12 mths																		
10		8 Act. immune system	3 mms																		
11		9 Clinical formulation	175 days																		
12		9.1	12 wks																		
13		9.2	9 wks																		
14		9.3	10 wks																		
15		9.4 Production (optional)	4 wks																		
15		10 Fast evaluation system	4 wks																		
17		11 Formula security	4 wks																		
18		12 CSCh in pig	21 wks																		
19		2 Size of infect. RMC	4 wks																		
20		13 Dosis effect. CSCh (12c)	70 days																		
24		14 Dosis effect. CSCh (12c)	70 days																		
28		15 Cyto. dosis effect.	110 days																		
32		16 Combined therapy	60 days																		
35		Resonancia available	0 days																		

[Notarial stamp]

[PRINTED STATE STAMP]

[PRINTED STATE CREST]

[Document protocol number]

12/2007

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTÉ
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE:" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

800606629

2.7.2. Planned Budget for Project Coretherapix

The table at the foot of this page gives the estimated budget for undertaking this project using Coretherapix, separating the work into R&D and management charges. The budget is itemised on the basis of the tasks completed in 2007 and 2008.

Coretherapix Budget				
Item	Notes	07-08	2007	2008
R&D				
PT1	Detecting CSC activity	14,616	8,616	6,000
PT2	Extent of RMC infarct in PT12-PT16	0	0	0
PT3	Isolation and culture of CSCp	16,458	16,458	0
PT4	Isolation and culture of CSCh	20,000	0	20,000
PT5	CSCh secretions	50,000	0	50,000
PT6	Selection CSCh clone	25,276	0	25,276
PT7	CSCh tumorigenesis	39,953	0	39,953
PT8	Activating immune system	4,000	0	4,000
PT9	Clinical Formulation	75,272	7,057	68,215
PT10	Fast assessment system	1,000	0	1,000
PT11	Formula security	12,744	0	12,744
PT12	CSCp in pig	113,796	18,000	95,796
PT13	CSCp effective dose	82,152	0	82,152
PT14	CSCh effective dose	93,557	0	93,557
PT15	Cytokine effective dose	121,236	0	121,236
PT16	Combined therapy	77,882	0	77,882
MANAGEMENT CHARGE				
Coretherapix overheads				
Personnel and other specific costs				
IT and office materials		2,189	81	2,108
Travel				
Standard administration				
External consultancy costs				
Financial expenses				
Services and Invoices Genetrix				
Genetrix Services				

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE." (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

		0	
TOTALS			

3 PARTICIPATING RESEARCHERS

The institutions and research teams that will undertake the project are detailed below.

3.1.1 [REDACTED]

- a. [REDACTED] (lead researcher)
- b. [REDACTED]
- c. [REDACTED]
- d. [REDACTED]

3.1.2 [REDACTED]

The [REDACTED] has two teams of experts from the [REDACTED] the cardiologist of [REDACTED] the department of cardiology of the [REDACTED] who has ample experience in the experimentation with animals, particular in the cardiovascular field, and in heart operations via catheter. [REDACTED] has places at the disposal of the project the following installations and a team of eight persons, including cardiologists, nursing staff and veterinary surgeons.

Installations

- Operating theatres equipped with the following items
 - Operating tables
 - General anaesthetic DRAGUER JULIAN
 - Radiosurgical CGR Road Fluorostact 9900
- Hospitalisation of animals
- Histology and anatomical pathology laboratory
- Clinical analysis service
- Electronic microscopy service
- Radiological service (Magnetic Resonance, TAC - TOMOSCAN M, Ecographs)
- University farm (pigs subjected to strict health controls)

Personnel

- [REDACTED] (head researcher)
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

3.1.3 [REDACTED]

[REDACTED] recently established technological company dedicated to developing solutions relating to micro-fluids and encapsulation. It has developed [REDACTED] as described in the attached contract between [REDACTED] head of research.

Possible external consultants

- [REDACTED]
- [REDACTED]

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]

12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RICARTE
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

- [REDACTED]
- [REDACTED]
The details of the work to be undertaken by [REDACTED] and the [REDACTED] are described
in the contracts Inbiomed has signed with both institutions.

[PRINTED STATE STAMP]

{Document protocol number}
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTÍN MARIA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS HIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

800606630



[PRINTED STATE STAMP]

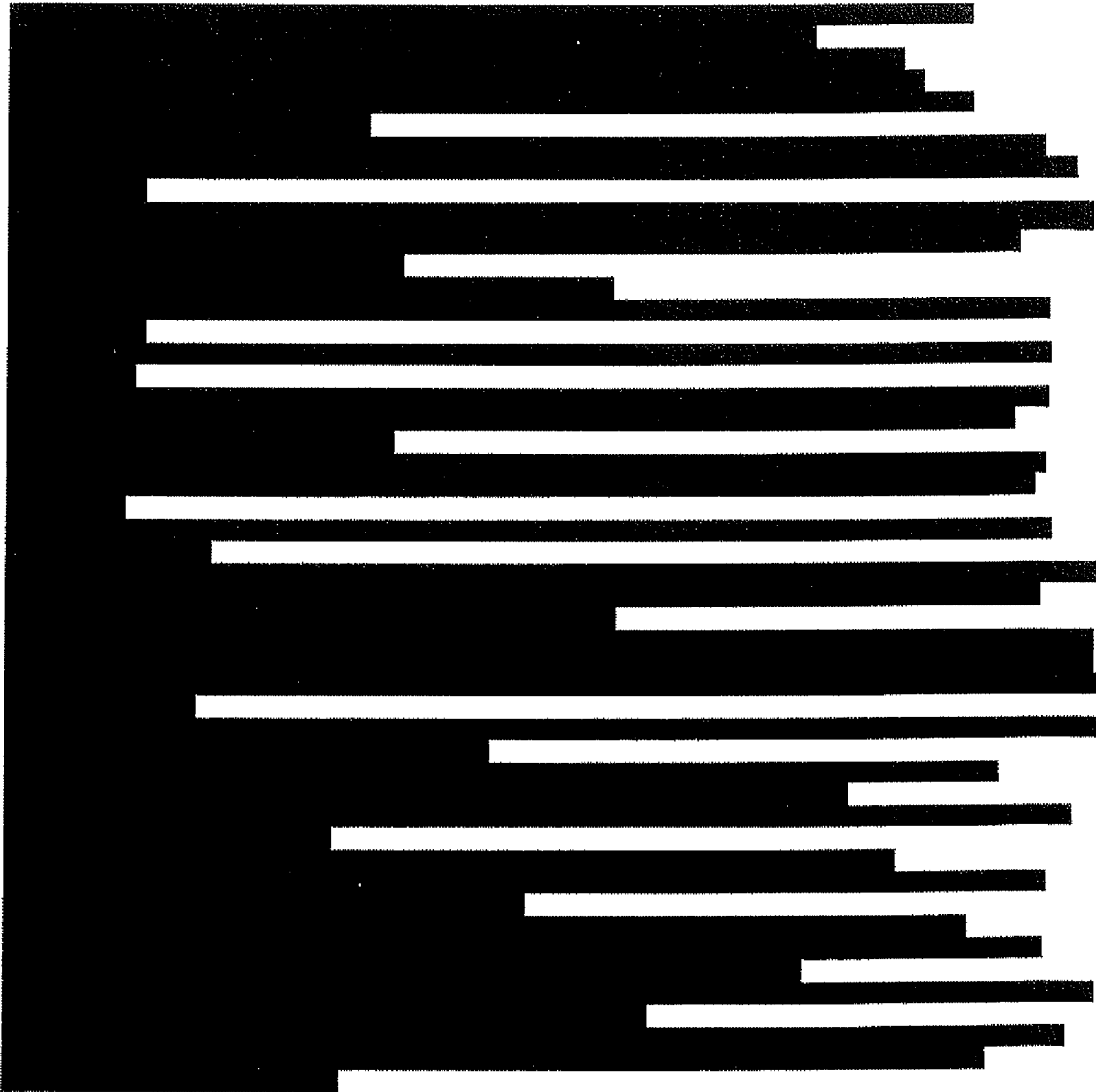
[Document protocol number]

12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTI
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHI
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY) of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]



[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]
12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTTE
CASARDOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

800606631

APPLICATION OF DUTY AS PER ADDITIONAL DISPOSITION 3 OF LAW 8/89

Basis of calculation: VALUE DECLARED

Duty Numbers: 2, 4, 7, AND 8.

DUTY LIABLE: € 349.19

THIS IS THE EXACT FIRST COPY of the original document, on which the issue is noted. I issue it for
THOSE PRESENT AS STATED on twenty-five sheets of State stamped paper for notarial use, numbers
800606607, 800606608, 800606609, 800606610, 800606611, 800606612, 800606613, 800606614,
800606615, 800606616, 800606617, 800606618, 800606619, 800606620, 800606621, 800606622,
800606623, 800606624, 800606625, 800606626, 800606627, 800606628, 800606629, 800606630,
800606631, the last to be used for notes made by registrars and public offices, and which I sign and seal.
In MADRID, on the fourth day of March, in the year two thousand and eight. I SWEAR.

[Seal of the General Council of Spanish Notaries, overstamped and signed by
the notary concerned.]

[PRINTED STATE STAMP]

[Document protocol number]

12/2007

[PRINTED STATE CREST]

With, superimposed by hand, the stamp of the
Madrid notary MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA bearing the Latin motto, "NIHIL
PRIUS FIDE" (NOTHING SURPASSES
LOYALTY), of the Spanish Notarial College

[Printed consecutive sheet number]

12/2007

[Stamp of the notary, Martin María Recarte Casanova]

This sheet is appended to allow room for registrars' notes.

800606607

12/2007

[illegible]

ESCRITURA DE PROTOCOLIZACION Y ELE-
VACION A PUBLICO DE DOCUMENTO CONTRAC-
TUAL PRIVADO ENTRE GENETRIX, S.L., DON BER-
NARDO NADAL GINARD Y LA SOCIEDAD CORET-
HERAPIX, S.L.U. -----

NUMERO CUATROCIENTOS OCHENTA Y NUEVE,----

EN MADRID, a veinticinco de febrero del dos mil
ocho. -----

Ante mí, MARTIN MARIA RECARTE
CASANOVA , notario de esta Capital y de su Ilustre Cole-
gio, -----

-COMPARECEN:

De una parte.- DOÑA CRISTINA GARMENDIA
MENDIZÁBAL mayor de edad, casada, vecina a estos efec-
tos en la calle [REDACTED]

Très Cantos (Madrid), con DNI/NIF número:

Y de otra.- DON BERNARDO NADAL GINARD, mayor de edad, de nacionalidad española, casado, con domicilio en 334 Hammond Street, Chestnut Hill, MA 02467,

EEUU-USA, con DNI/NIF número: 41.334.816-K.-----

INTERVIENEN.-----

La primera en nombre y representación de: -----

1.-) En nombre y representación de la Sociedad GENETRIX, S.L. Dicha sociedad, con CIF número B-82826546, está domiciliada en Tres Cantos (Madrid), calle

Fue constituida por tiempo indefinido en escritura otorgada ante el Notario de Madrid Don Jaime Recarte Casanova el día 13 de noviembre de 2000 con el número 2.710 de su protocolo; y figura inscrita en el Registro Mercantil de esta provincia al tomo 15.909, libro 0, folio 140, sección 8ª, hoja M 268899.-----

FACULTADA PARA ESTE OTORGAMIENTO en virtud de su cargo de CONSEJERA DELEGADA de la citada Sociedad, cuyo cargo se encuentra debidamente inscrito en el Registro Mercantil de Madrid, según me acredita la compareciente, y en virtud del cual tiene delegadas todas las facultades del Consejo de Administración, salvo las indelegables por Ley o Estatutos Sociales.-----

Manifiesta la compareciente la vigencia actual del cargo y facultades con las que interviene, juzgándola yo el Notario en base a su citado cargo con facultades suficientes para el presente otorgamiento.-----

12/2007



2.-) En nombre y representación de la Sociedad CORETHERAPIX, S.L.. Dicha Sociedad, con CIF número B-64282650, está domiciliada en Tres Cantos (Madrid), Plaza de la Encina, número 10-11 (Edif. La Encina), Núcleo 1, Planta 3ª, CP 28760. -----

Fue constituida por tiempo indefinido en escritura otorgada ante el Notario de Madrid Don Jaime Recarte Casanova el día 5 de Julio del 2.006 con el número 2.493 de su protocolo; y figura inscrita en el Registro Mercantil de Barcelona, al tomo 38942, folio 203, hoja B-339284. -----

FACULTADA PARA ESTE OTORGAMIENTO en virtud de su cargo de representante persona física del Administrador Unico, la sociedad Genetrix, S.L., para cuyos respectivos cargos que se encuentran debidamente inscrito en el Registro Mercantil de Barcelona, según me acredita la compareciente, fueron nombrados en la escritura de constitución antes citada. -----

Yo el Notario juzgo a la compareciente en base a su citado cargo con facultades suficientes para el presente. -----

Manifiesta la compareciente la vigencia actual del cargo y facultades con las que interviene. -----

Y el último en su propio nombre y derecho, de aquí en adelante, será referido como el "Investigador".-----

Asimismo, GENETRIX, el Investigador, y CORETHERAPIX, de aquí en adelante, podrán ser referidos conjuntamente como las "Partes". Y, GENETRIX y el Investigador, de aquí en adelante, podrán ser referidos como los "Socios". -----

TIENEN a mi juicio los comparecientes según intervienen, la capacidad legal necesaria para este acto, y al efecto, -----

-----EXPONEN: -----

I. Que CORETHERAPIX es una sociedad de responsabilidad limitada, dedicada al desarrollo y comercialización de (i) terapias celulares para la regeneración miocárdica, y (ii) de terapias farmacológicas de administración local vascular para la regeneración o preservación tisular; está dotada con un capital social de [REDACTED] dividido en [REDACTED] participaciones sociales. -----

II. Que el Investigador es el legítimo titular de amplios conocimientos y datos experimentales relevantes para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el miocar-

800606609

12/2007



dio y para el desarrollo de terapias todavía no patentadas. Es razonablemente previsible que el adecuado desarrollo de tales conocimientos pueda conducir a una invención o invenciones idóneas para una explotación comercial o industrial, ya sean patentables o susceptibles de otras formas de propiedad industrial (la "Invención"). -----

III. Que GENETRIX es actualmente el socio único de CORETHERAPIX. GENETRIX forma parte de un grupo empresarial destinado a promover proyectos empresariales basados en la explotación de investigaciones médicas y biotecnológicas. -----

IV. Que es de interés de los Socios en colaborar en el desarrollo de las investigaciones necesarias que conduzcan a la Invención, al objeto de proceder posteriormente a su explotación comercial (el "Proyecto"). En este sentido, el Proyecto tiene una primera fase de investigación conducente a la obtención de la Invención (la "Investigación"), y una segunda fase, consistente en la explotación industrial o comercialización de tal Invención. -----

en todas las copias que de la presente se libren.-----

Dicho documento va extendido en diecisiete folios de papel común escritos a máquina por una sola cara, junto con su anexo extendido en 19 folios por una sola cara y firmados al final del mismo por los comparecientes. -----

SEGUNDA.- Los aquí comparecientes según intervienen, se ratifican en todas y cada una de las cláusulas que figuran en el documento protocolizado y elevado a público por medio de esta escritura. -----

TERCERA.- GENETRIX, S.L., asumirá los costes de preparación y registro de este Acuerdo así como los costes incurridos en la preparación y ejecución de la opción de compra de las participaciones sociales de CORETHERAPIX, S.L. por el Investigador. -----

CUARTA.- Los comparecientes según intervienen aceptan esta escritura en todas sus partes. -----

-----**OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION:**-----

Hice las reservas y advertencias legales, en especial las consignadas en las Leyes Fiscales, la obligación de autoliquidar esta escritura en el plazo de treinta días hábiles.-----

Yo, el notario, como responsable del fichero automatizado de Protocolo y documentación notarial y del fichero de administración y organización de la Notaría, garantiza el pleno cumplimiento de la normativa de

12/2007



Protección de Datos de Carácter Personal, y así, de acuerdo con la L.O. 15/99, los comparecientes quedan informados de la incorporación de sus datos a los ficheros automatizados existentes en la notaría a mi cargo, antes mencionados, así como del hecho de que tales datos pueden ser cedidos a aquellas administraciones Públicas que de conformidad con una norma con rango de Ley tenga derecho a ellos.-----

El notario garantiza los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, ejercitables por el interesado afectado, y a salvo los que legalmente han de estar a disposición de Administraciones Públicas, Jueces y Tribunales, o los que sean inexcusables para el ejercicio de la función notarial.-----

Leído cuanto antecede por los comparecientes, previa su elección, lo encuentran conforme con su voluntad y firman conmigo el Notario. -----

De haber identificado a los comparecientes por el medio supletorio de sus documentos de identidad, por los mismos presentados y al principio reseñados, de que el consen-

timiento ha sido prestado libremente, de que el otorgamiento se adecua a la legalidad y a la voluntad debidamente informada de los otorgantes e intervinientes, y en cuanto proceda de todo lo demás consignado en este instrumento público extendido en cinco folios de papel timbrado del Estado, exclusivo para documentos notariales, número y serie los del presente y los anteriores en orden correlativo, yo el Notario DOY FE.SIGUEN LAS FIRMAS DE LOS COMPARECIENTES.- SIGNADO: MARTIN MARIA RECARTE CASANOVA . -RUBRICADOS Y SELLADO.-----

Sigue Documentación Unida.-

12/2007



800606612

DOCUMENTO CONTRACTUAL PRIVADO CELEBRADO ENTRE

GENETRIX, S.L.,

D. BERNARDO NADAL GINARD

y

CORETHERAPIX, S.L.U.

Madrid, 25 de enero de 2008

DOCUMENTO CONTRACTUAL PRIVADO CELEBRADO ENTRE GENETRIX, S.L., D.
BERNARDO NADAL GINARD, Y CORETHERAPIX, S.L.U.

En Madrid, 25 de enero de 2008

COMPARECEN

De una parte, Dña. Cristina Garmendia Mendizábal, mayor de edad, con domicilio a estos efectos en Tres Cantos (Madrid), [REDACTED] y con DNI/NIF nº [REDACTED], interviene en nombre y representación como Consejera Delegada de GENETRIX, S.L., domiciliada en Tres Cantos (Madrid), [REDACTED] de Madrid, y con CIF nº B-82826546. GENETRIX, S.L., de aquí en adelante, será denominada "GENETRIX".

De otra parte, D. Bernardo Nadal Ginard, mayor de edad, de nacionalidad española, casado, con domicilio en 334 Hammond Street, Chestnut Hill, MA 02467, EEUU-USA y con DNI/NIF nº 41334816-K, interviene en su propio nombre y derecho. El Sr. Nadal, de aquí en adelante, será referido como el "Investigador".

Y de otra parte, Dña. Cristina Garmendia Mendizábal, mayor de edad, con domicilio a estos efectos en Tres Cantos (Madrid), [REDACTED] y con DNI/NIF nº [REDACTED], interviene en nombre y representación del representante legal del Administrador Único de CORETHERAPIX, S.L.U., GENETRIX, S.L., CORETHERAPIX, S.L.U. de aquí en adelante, será denominada "CORETHERAPIX".

Asimismo, GENETRIX, el Investigador, y CORETHERAPIX, de aquí en adelante, podrán ser referidos conjuntamente como las "Partes". Y, GENETRIX y el Investigador, de aquí en adelante, podrán ser referidos como los "Socios".

MANIFIESTAN

- I. Que CORETHERAPIX es una sociedad de responsabilidad limitada, dedicada al desarrollo y comercialización de (i) terapias celulares para la regeneración miocárdica, y (ii) de terapias farmacológicas de administración local vascular para la regeneración o preservación tisular; está dotada con un capital social de [REDACTED] dividido [REDACTED] participaciones sociales
- II. Que el Investigador es el legítimo titular de amplios conocimientos y datos experimentales relevantes para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el miocardio y para el desarrollo de terapias todavía no patentadas. Es razonablemente previsible que el adecuado desarrollo de tales conocimientos pueda conducir a una invención o invenciones idóneas para una explotación comercial o industrial, ya sean patentables o susceptibles de otras formas de propiedad industrial (la "Invención").

12/2007



800606613

- III. Que GENETRIX es actualmente el socio único de CORETHERAPIX. GENETRIX forma parte de un grupo empresarial destinado a promover proyectos empresariales basados en la explotación de investigaciones médicas y biotecnológicas.
- IV. Que es de interés de los Socios en colaborar en el desarrollo de las investigaciones necesarias que conduzcan a la Invención, al objeto de proceder posteriormente a su explotación comercial (el "Proyecto"). En este sentido, el Proyecto tiene una primera fase de investigación conducente a la obtención de la Invención (la "Investigación"), y una segunda fase, consistente en la explotación industrial o comercialización de tal invención.
- V. Que es de interés del Investigador participar en el Proyecto mediante la cesión a CORETHERAPIX de los conocimientos y datos experimentales que son de su titularidad (la "Información Inicial"), así como por medio de la asunción por su parte de la dirección científica del desarrollo de tales conocimientos hasta la consecución de la Invención (la "Dirección Científica"). GENETRIX, por su parte, está interesada en el Proyecto asumiendo la obligación de gestionar la obtención de la Financiación Inicial del mismo, aportar su apoyo de gestión empresarial y administrativa a CORETHERAPIX, y mediante la transferencia realizada previamente a CORETHERAPIX de un proyecto en medicina cardiovascular originado en [REDACTED]
- VI. Que los Socios desean que esta colaboración conjunta se desarrolle en el seno de CORETHERAPIX, y se formalice por medio del presente contrato (el "Acuerdo"). En concreto, es voluntad de ambos Socios que las patentes y cualesquiera otros activos de propiedad industrial que se generen durante y como resultado del Proyecto sean de titularidad de CORETHERAPIX. Asimismo, se manifiesta que CORETHERAPIX es el vehículo a través del cual GENETRIX desarrollará cualquier proyecto relacionado con terapias cardiovasculares.
- VII. Que los Socios han adoptado una serie de acuerdos o principios de gestión y gobierno de CORETHERAPIX, así como una opción de compra que otorga al Investigador el derecho a adquirir determinadas participaciones sociales de la CORETHERAPIX.

Que, en virtud de lo expuesto, las Partes

ACUERDAN

PRIMERA. OBJETO DEL ACUERDO.

El presente Acuerdo tiene por objeto regular los siguientes aspectos:

1. Las obligaciones que asumirá cada uno de los Socios con objeto de contribuir al Proyecto, consistente en la consecución de la Invención de titularidad de CORETHERAPIX y en su posterior explotación comercial e industrial.
2. La cesión por el Investigador a CORETHERAPIX de todos sus derechos sobre la propiedad de la Información Inicial, que habrá de ser utilizada en el proceso de Investigación conducente a la Invención, y en la consecución del Proyecto.
3. El pacto entre los Socios sobre determinados aspectos del gobierno de CORETHERAPIX, incluyendo una opción de compra a favor del Investigador sobre determinado número de participaciones sociales.

SEGUNDA. INFORMACIÓN INICIAL.

1. El Investigador, en virtud del presente Acuerdo, se obliga (i) a entregar de forma gratuita a CORETHERAPIX cualquier soporte material, y en particular, los soportes e informes necesarios en los que se encuentre la Información Inicial, y (ii) a facilitar la redacción de las correspondientes solicitudes de patentes a partir de dicha información, para posibilitar su presentación en la oficina de patentes elegida por GENETRIX, en el plazo máximo de dos (2) meses a partir de la firma de este Acuerdo.
2. A estos efectos, la Información Inicial será la que se refiera a las siguientes materias y en el estado de elaboración que se concreta a continuación:
 - a. Sobre el efecto terapéutico de los factores de crecimiento IIGF e IGF-1 en la activación de la población endógena de CMC durante el periodo post-agudo del infarto de miocardio en el cerdo.
 - b. Sobre el efecto terapéutico de la administración de una población seleccionada de células madre cardíacas heterólogas para la activación de la población endógena de CMC durante el periodo post-agudo del infarto de miocardio en el cerdo.
 - c. La información referida en los puntos 1.a. y 1.b. se aportará en soporte informático y en un formato acordado con el Departamento de Propiedad Industrial para facilitar la redacción de las solicitudes de patente necesarias.
3. El Investigador transmite a CORETHERAPIX la titularidad sobre la Información Inicial, sin perjuicio de la obligación de CORETHERAPIX de reconocer al Investigador como autor y creador de la misma.
4. El Investigador manifiesta que el conocimiento y datos que incluye la Información Inicial no ha sido facilitado con anterioridad por el Investigador a otras entidades o personas. Adicionalmente, manifiesta que no tiene conocimiento de que la entrega de la Información Inicial a CORETHERAPIX suponga infracción de derechos de terceros ni implique una infracción de las

12/2007



800606614

obligaciones que asume el Investigador por su pertenencia a otros centros de investigación.

5. El Investigador se obliga a no facilitar a terceros la Información Inicial y a no divulgarla por ningún medio, oral o escrito, sin el consentimiento previo y escrito de CORETHERAPIX.

TERCERA. OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN.

Las actividades que constituyen la Investigación objeto de este Acuerdo son las siguientes:

1. Evaluación del efecto terapéutico de formulaciones de citoquinas sobre la regeneración del miocardio.
2. Y, la evaluación de la eficacia terapéutica de la administración local de células madre sobre la regeneración del miocardio.

CUARTA. OBLIGACIONES DE GENETRIX PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.

1. GENETRIX se compromete a garantizar la aportación de hasta [REDACTED] para la ejecución del Proyecto definido en el Anexo I, donde se describen los plazos de ejecución del mismo, los hitos a cumplir y las correspondientes necesidades financieras (la "Financiación Inicial"). No obstante, se manifiesta que anteriormente a la fecha de la firma de este Acuerdo, GENETRIX ha anticipado el importe de [REDACTED] cuenta de la Financiación Inicial mediante: Un primer préstamo capitalizable de [REDACTED] emitido el 1 de Abril de 2007 con vencimiento el 31 de Marzo de 2008, y un segundo préstamo capitalizable de [REDACTED] emitido el 1 de Diciembre del 2007 con vencimiento el 30 de Noviembre de 2008.
2. El plazo máximo para aportar la Financiación Inicial será de seis (6) meses tras la presentación de las solicitudes de patentes descritas en la Cláusula 2.
3. A estos efectos, la referida Financiación Inicial podrá proceder de subvenciones o aportaciones gratuitas de terceros gestionada directamente por GENETRIX, así como de préstamos, capitalizables o no, otorgados por GENETRIX S.L. [REDACTED]
4. GENETRIX se compromete de forma gratuita a la identificación, solicitud y gestión de aquella parte de la Financiación Inicial que no provenga de sus propios fondos.
5. GENETRIX ofrecerá a CORETHERAPIX los servicios de soporte administrativo, empresarial y legal, en condiciones similares al resto de las

empresas del grupo. Los servicios concretos que GENETRIX se obliga a prestar son los siguientes:

- a. los servicios necesarios para optimizar la obtención de diferentes ayudas estatales, de comunidades autónomas, de la comunidad europea o de entidades privadas para el desarrollo de la invención para satisfacer el compromiso de la Financiación Inicial. Dichos servicios serán prestados por GENETRIX de forma gratuita.
- b. los servicios necesarios para optimizar la obtención de diferentes ayudas estatales, de comunidades autónomas, de la comunidad europea o de entidades privadas para el desarrollo de la invención para continuar financiando las actividades de CORETHERAPIX tras la aportación de la Financiación Inicial. Dichos servicios serán prestados por GENETRIX de forma remunerada, según las tarifas establecidas para este tipo de servicios.
- c. los servicios de asesoría de propiedad industrial necesarios para la redacción y tramitación de la solicitud o solicitudes de patentes para la protección de la propiedad industrial sobre la invención. Dichos servicios serán prestados por GENETRIX de forma remunerada por CORETHERAPIX, según las tarifas establecidas para este tipo de servicios.
- d. los servicios generales (compras, contabilidad, recursos humanos, legales, pago de impuestos, etc.) necesarios para la puesta en marcha y desarrollo de CORETHERAPIX hasta el momento en que la sociedad esté en condiciones de crear estos servicios. Dichos servicios serán prestados por GENETRIX de forma remunerada por CORETHERAPIX, según las tarifas establecidas para este tipo de servicios.

6. 

QUINTA. OBLIGACIONES Y RESPONSABILIDADES DEL INVESTIGADOR PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.

- 1 El Investigador desempeñará la función de Dirección Científica de CORETHERAPIX, al efecto de que esta sociedad desarrolle los objetivos de investigación previstos en la Cláusula Tercera. En particular, la actividad de Dirección Científica a desarrollar por el Investigador será la siguiente:
 - i. Participar en el Comité de Gestión de CORETHERAPIX en compañía de los representantes de GENETRIX.

12/2007



800606615

- ii. Presidir el Comité Científico Consultor de CORETHERAPIX y, en conjunción con el Director General de GENETRIX, seleccionar a los miembros de este comité.
- iii. Ser responsable de los objetivos y estrategia científica de CORETHERAPIX a corto, medio y largo plazo, para que la empresa crea y proteja un nicho propio en el campo de la medicina regenerativa, particularmente, en el campo de la medicina cardiovascular. Todo ello, con sujeción a los presupuestos y protocolos aprobados por los socios.
- iv. Ser responsable de la Dirección Científica de los proyectos de la empresa.
- v. Desarrollar y supervisar los diferentes protocolos necesarios para completar la fase pre-clínica de los proyectos, tanto si el trabajo se lleva a cabo en instalaciones y con investigadores de CORETHERAPIX, como si se desarrollan en entidades colaboradoras.
- vi. Participar y ser responsable de la interpretación de los resultados experimentales y su organización para presentaciones ya sea a entidades colaboradoras, potenciales socios financieros, órganos reguladores, solicitudes de ayudas para I+D, etc.
- vii. Desarrollar estrategias alternativas y/o complementarias para el desarrollo y mejora de los métodos disponibles actualmente para la regeneración miocárdica.
- viii. Explorar y desarrollar la base científica y métodos de aplicación para la extensión de los métodos y procedimientos para la regeneración miocárdica a otros tejidos sólidos.
- ix. Participar y proveer el "know how" científico para la protección de la propiedad industrial e intelectual de CORETHERAPIX, ya sea a través de la solicitud de patentes, registro, etc. A estos efectos, colaborar con los equipos técnicos y legales para redactar y registrar adecuadamente la patente, o cualesquiera otras formas de propiedad industrial o intelectual que se generen. No obstante, lo señalado en este epígrafe resulta independiente de lo previsto en la Cláusula Segunda de este documento, referente a la información inicial.
- x. Participar en la generación de los presupuestos para I+D de CORETHERAPIX generados por el Comité de Dirección.
- xi. Determinar las necesidades de personal científico, espacio de laboratorio e instrumentación necesaria para llevar a cabo los objetivos científicos de CORETHERAPIX para ser aprobados por el Comité de Dirección. Evaluar y seleccionar el personal científico que CORETHERAPIX considere reclutar.

xii. Evaluar los posibles colaboradores científicos de CORETHERAPIX y participar en las negociaciones para la firma de los contratos correspondientes para su presentación al Comité de Dirección.

- 2 El Investigador realizará esta función, bajo su responsabilidad y autonomía, alternando períodos de presencia en la sociedad o sus instalaciones con actuaciones no presenciales. Con la finalidad de evitar dudas, las Partes manifiestan que la Dirección Científica realizada por el Investigador, descritas en este acuerdo, no se realizará en el ámbito de una relación laboral con CORETHERAPIX. Las dos partes reservan el derecho de modificar esta relación de acuerdo con los intereses de CORETHERAPIX y por acuerdo de las dos partes.
- 3 El Investigador elaborará informes periódicos de contenido científico que sinteticen las investigaciones realizadas y orienten las investigaciones a realizar. Estos informes serán presentados periódicamente al Comité de Dirección de CORETHERAPIX. La titularidad de estos informes será de CORETHERAPIX. A estos efectos, el Investigador cede desde este momento a CORETHERAPIX todos los derechos sobre los resultados de sus investigaciones en los campos de actividad relacionados en la Cláusula Tercera que se produzcan como resultado de la ejecución del presente Acuerdo.
- 4 El Investigador prestará la colaboración necesaria para la ejecución de todas las tareas de redacción y presentación de las solicitudes de patente sobre la invención, así como para el adecuado desarrollo de las tareas de gestión del proceso de concesión de la patente, entre otras, las de formular observaciones, contestar oposiciones, y cualquier otra que resulte necesaria para la efectiva concesión de la patente en todos aquellos ámbitos territoriales en los que CORETHERAPIX decida solicitar la protección de la invención y subsecuentes invenciones que resulten del trabajo realizado por CORETHERAPIX su personal o sus colaboradores, de acuerdo con los respectivos contratos de colaboración.

SEXTA. FINANCIACIÓN INICIAL DE LAS ACTIVIDADES DE ESTE ACUERDO.

1. El Anexo I incorpora el presupuesto y calendario de las actividades a desarrollar en materia de investigación a los que se dedicará la Financiación Inicial. Cualquier modificación del mismo requerirá el consentimiento de ambos Socios.
2. GENETRIX asume la obligación de gestionar gratuitamente la obtención de la Financiación Inicial necesaria para la Investigación, hasta el [REDACTED] sin perjuicio de lo contemplado en los términos previstos en la Cláusula Cuarta 1.
3. Los fondos gestionados por GENETRIX se harán efectivos sobre la base del cumplimiento de hitos y resultados científicos de investigación que se detallan en el Anexo I.

12/2007



4. El Investigador recibirá de CORETHERAPIX una retribución mensual variable de [REDACTED] por día dedicado a la Dirección Científica de CORETHERAPIX. El importe de esta retribución tiene un máximo anual de [REDACTED] y estará condicionado a que el Investigador continúe desarrollando la Dirección Científica de CORETHERAPIX y solo podrá ser modificado por el acuerdo de las Partes. A la fecha de firma de este contrato se ha satisfecho un total de [REDACTED] por los gastos incurridos hasta Noviembre del 2007 incluido, que el Investigador ya ha recibido en conformidad. Esta retribución excluye los trabajos no remunerados de redacción y preparación de la Información Inicial descrita en la Cláusula Segunda.
5. El Investigador recibirá de CORETHERAPIX una compensación por los gastos de desplazamiento y estancia del Investigador desde su domicilio en [REDACTED] al destino que requiera la actividad de Dirección Científica cuando esta requiera un desplazamiento previa presentación al Comité de Gestión de la correspondiente liquidación de gastos y justificantes.
6. El Investigador tendrá derecho a ser compensado por CORETHERAPIX por los gastos de viaje en los que incurra el primero en ejecución de su obligación de colaboración para la preparación y gestión de la obtención de patentes, prevista en la Cláusula Segunda previa presentación al Comité de Gestión de la correspondiente liquidación de gastos y justificantes.
7. Los Socios no tendrán derecho a ser compensados o remunerados por CORETHERAPIX por razón de servicios o actividades realizadas por los primeros en ejecución de este Acuerdo o incurriendo en importes que no estén expresamente previstos y reconocidos en el mismo. En consecuencia, y a estos efectos, el Comité de Gestión de CORETHERAPIX no abonará a ningún Socio ninguna compensación o remuneración alguna que no esté prevista o sea superior a la contemplada en este Acuerdo. En este sentido, y al objeto de evitar dudas, se pone de manifiesto que no serán retribuidas las prestaciones de los Socios consistentes en la aportación y cesión de la Información Inicial, o en los servicios de gestión de ayudas y levantamiento de fondos para realizar la Financiación Inicial.

SÉPTIMA. SUPERVISIÓN Y SEGUIMIENTO EN EL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES DE LOS SOCIOS.

1. El Comité de Gestión de CORETHERAPIX será el órgano encargado de realizar un seguimiento permanente del cumplimiento de las obligaciones de los Socios. A estos efectos, supervisará que la actividad desarrollada por cada uno de ellos se adecua al programa de actividades y calendario previstos en el Anexo I.

Dicho Comité de Gestión estará formado por D. Eduardo González Martínez, D. Bernardo Nadal Girard, y Dña Cristina Garmendia Mendizábal.

Las reuniones que se mantengan por el Comité de Gestión tendrán carácter mensual, sin perjuicio, de que por cualquier causa sea necesario que se celebren con una frecuencia superior.

La toma de decisiones en el Comité de Gestión será por mayoría simple, excepto en los asuntos previstos en virtud del presente Acuerdo, esto es, aquellos supuestos establecidos en la Cláusula Décima. 3.

2. El Comité de Gestión de CORETHERAPIX comunicará a los Socios cualquier desviación en los calendarios o hitos previstos para el desarrollo de las investigaciones, de cualquier cumplimiento defectuoso de las obligaciones de un Socio y, en general, de cualquier novedad relevante que se produzca y que pueda tener incidencia o ser relevante en la Investigación o en la consecución de la Invención.
3. Si fuera necesario modificar el presupuesto o el calendario, incluidos en el Anexo I, el Comité de Gestión de CORETHERAPIX lo someterá a los Socios. La modificación propuesta solamente podrá ser aplicada cuando haya sido aprobada por ambos Socios.
4. Las cantidades que deban pagarse a los Socios por alguno de los servicios o conceptos previstos en este Acuerdo, entre otras compensaciones o retribuciones, deberán ser autorizadas expresamente por el Comité de Gestión de CORETHERAPIX, siempre que obedezcan a las partidas reflejadas en el presupuesto o acordadas por las partes.

OCTAVA. PROPIEDAD INDUSTRIAL SOBRE LA INVENCION.

1. Los derechos sobre la Invención, sean o no susceptibles de protección por propiedad industrial o intelectual, pertenecerán exclusivamente a CORETHERAPIX, sin que sea necesario otorgar ningún acuerdo o contrato adicional para el reconocimiento de dicha titularidad.
2. En la solicitud de patente se hará mención a los autores, quienes figurarán en calidad de inventores.
3. CORETHERAPIX hará frente al pago de los gastos derivados de la protección de la Invención, y en particular, los referidos al estudio de patentabilidad, la solicitud, obtención y mantenimiento de los derechos y cualquier otro derivado de la solicitud de protección de los derechos a que se refiere el presente Acuerdo.
4. Corresponderá exclusivamente a CORETHERAPIX decidir los ámbitos territoriales en los que haya de procederse a la protección de la Invención.
5. Lo dispuesto en este Acuerdo es también de aplicación a las patentes dependientes desarrolladas en el ámbito de la Investigación.

12/2007



800606617

6. El Investigador mantendrá indemne a CORETHERAPIX frente a cualquier reclamación de terceros que traiga causa de infracción de derechos de propiedad industrial o intelectual prioritarios en relación con el registro, ofrecimiento, fabricación, distribución o comercialización de la Invención o de la Información Inicial.
7. GENETRIX y CORETHERAPIX se abstendrán de participar en cualquier reclamación de terceros contra el Investigador que traiga causa de infracción de derechos de propiedad industrial o intelectual prioritarios en relación con el registro, ofrecimiento, fabricación, distribución o comercialización de la Invención o de la Información Inicial. No obstante, GENETRIX y CORETHERAPIX podrán participar en el procedimiento para defenderse de una eventual reclamación en el caso de que GENETRIX o CORETHERAPIX fueran demandadas directamente por el tercero.
8. Para publicar bajo cualquier formato o de cualquier manera difundir el alcance o los resultados parciales o finales del Proyecto, sean o no susceptibles de patentabilidad, el Investigador deberá solicitar previamente la autorización por escrito de el Comité de Gestión de CORETHERAPIX.
9. CORETHERAPIX dispondrá de un plazo para contestar a la solicitud referida en el párrafo anterior de treinta (30) días, transcurridos los cuales sin obtener respuesta afirmativa, se entenderá denegada la solicitud de autorización formulada por el Investigador.
10. El Investigador y GENETRIX se obligan a informar a CORETHERAPIX de cualquier violación de los derechos de propiedad intelectual o industrial a que se refiere este Acuerdo de que tengan conocimiento y vendrán obligados a colaborar en todos aquellos aspectos en los que sea necesaria su participación para la defensa de los derechos sobre la Invención.

NOVENA. CONTRATO DE OPCIÓN SOBRE PARTICIPACIONES SOCIALES.

1. GENETRIX otorga a favor del Investigador una opción de compra (la Opción) sobre [REDACTED] participaciones sociales en que se divide el capital social de CORETHERAPIX. Dicha Opción se extenderá sobre las participaciones, acciones o títulos que sean emitidos en sustitución de [REDACTED] de las participaciones en que se divide el capital social de CORETHERAPIX, por razón de cualquier tipo de operación societaria.
2. El precio al que el Investigador podrá adquirir cada una de las participaciones objeto de la Opción será el de [REDACTED] (el "Precio de la Opción").
3. El plazo para el ejercicio de la Opción será de un (1) mes, a contar desde la fecha en que Genetrix comunique por escrito a los socios de que se ha completado la aportación de la Financiación Inicial, extinguiéndose automáticamente desde entonces tal derecho, sin necesidad de preaviso alguno.

Se acuerda que el Comité de Gestión deberá informar de la completa aportación de la Financiación Inicial en el momento que ésta se efectúe.

4. El modo de ejercicio será el siguiente:

- a. El Investigador notificará a GENETRIX y a CORETHERAPIX su decisión de ejecutar la Opción, y de adquirir la propiedad de las participaciones objeto de la misma al Precio de Opción que sea aplicable (la Notificación). La Opción deberá ejecutarse obligatoriamente por la totalidad de las participaciones objeto de la misma, y no podrá tener lugar de forma parcial.
- b. La Notificación determinará el Notario de la provincia de Madrid que designe el Investigador, así como la fecha prevista para la firma de la compraventa, fecha que no será anterior a los diez (10) días naturales siguientes a la recepción por GENETRIX de la Notificación. La Notificación determinará igualmente el Precio total de la Opción a pagar por el Investigador, según las reglas de cálculo mencionadas con anterioridad.
- c. GENETRIX estará obligada a acudir al Notario y otorgar la correspondiente escritura de compraventa, que será notificada a CORETHERAPIX para que se tome nota del cambio de titularidad en el correspondiente Libro Registro de Socios.
- d. Si GENETRIX no acudiera ante el Notario en el día señalado, el Investigador ante Notario de Madrid declarará ejecutada la Opción, depositando el Precio total de la Opción ante el Notario a disposición de GENETRIX. En el momento de otorgamiento de esta declaración ante Notario, con el depósito del Precio total de la Opción, la propiedad de las participaciones objeto de la Opción pasará al Investigador.
- e. Los gastos de Notario incurridos para la ejecución de la opción, y en concreto, la celebración de la escritura de compraventa y del registro del cambio de titularidad de las acciones serán sufragados por CORETHERAPIX.

DÉCIMA GOBIERNO CORPORATIVO DE CORETHERAPIX.

1. El cargo de administrador único de CORETHERAPIX será ostentado por GENETRIX, y en su representación Dña. Cristina Garmendía, hasta la ejecución de la Opción, fecha en la cual, el gobierno corporativo se regulará según las normas que al efecto se establezcan y, en su defecto, se dará continuidad a aquellas normas que se han establecido en el presente Acuerdo para antes de la ejecución de la Opción.

12/2007



800606618

2. D. Bernardo Nadal Ginard, estará desde la firma de este Acuerdo hasta el



3. Sin perjuicio de lo establecido en el epígrafe anterior, y respecto a las siguientes decisiones relacionadas con la gestión de CORETHERAPIX, será necesario el acuerdo entre GENETRIX S.L. y D. Bernardo Nadal Ginard reunidos en un Comité de Gestión, que se constituirá desde el momento de la firma de este Acuerdo:

- i. La determinación de líneas de actividad e investigación a seguir dentro de los términos del presente Acuerdo.
- ii. La aprobación de los presupuestos.
- iii. Las modificaciones del plan de negocios establecido en Anexo I.
- iv. Nombramiento del personal y directivos de CORETHERAPIX, así como el otorgamiento de poderes de los mismos.
- v. La valoración de la compañía.
- vi. Cualquier negociación que tenga por objeto un pacto de nuevos accionistas y, en general, cualquier tipo de pacto cuyo objeto sea la entrada de inversores o accionistas en el capital social de CORETHERAPIX. No obstante, el Investigador estará obligado a colaborar de buena fe con GENETRIX en la negociación de los pactos de accionistas y, en su caso, a prestar su firma en los acuerdos con nuevos socios o inversores en CORETHERAPIX.
- vii. Las decisiones relativas a licencias de adquisición o venta de tecnología.
- viii. Las aprobaciones de los presupuestos de la compañía y las decisiones sobre desviaciones presupuestarias que afecten a más del veinte por ciento (20%) del presupuesto anual.
- ix. Las que el Investigador y GENETRIX acuerden.

4. Los Socios asumen un pacto específico de no competencia, en virtud del cual GENETRIX, en la medida de su capacidad de control, se obliga a no promover en el seno de su Grupo investigaciones que sean competitivas con las descritas en la Cláusula Tercera. En el mismo sentido, el Investigador se obliga a no realizar colaboraciones con terceras entidades, públicas o privadas, y en particular, tareas de asesoría, consultoría, publicitarias, que generen en tales

entidades derechos de cualquier tipo sobre los datos, informaciones o propiedad industrial incluidas en la Cláusula Tercera o aportar servicios de consultoría que pudieran dar lugar a competencia entre CORETHERAPIX y la entidad. En caso de conflicto de intereses, GENETRIX se abstendrá de participar en las decisiones que pudieran dar lugar a competencia entre las empresas participadas y CORETHERAPIX.

DÉCIMOPRIMERA. EXTINCIÓN DEL ACUERDO.

1. El Acuerdo podrá ser resuelto por cualesquiera de las partes siempre que la causa de resolución no haya sido generada por el incumplimiento o actuación de tal parte. A estos efectos, son causas específicas de resolución del presente Acuerdo las siguientes:
 - a. El incumplimiento de este Acuerdo por la otra parte, cuando habiendo sido requerido la parte incumplidora no hubiera subsanado tal incumplimiento en el plazo de treinta (30) días.
 - b. La existencia de evidencia o indicios objetivos de que la Investigación no podrá conducir a un resultado patentable o susceptible de explotación industrial. La no patentabilidad de la Investigación será determinada según el juicio emitido por un Agente de Patentes Europeo independiente con experiencia demostrada en el campo y proveniente una agencia que no haya tenido relación alguna en el pasado con las partes del Acuerdo. La no susceptibilidad de explotación industrial será determinada por un investigador no conectado con ninguna de las Partes y que haya participado en la comercialización de terapias y/o "devices" para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. La selección de estos expertos se hará por acuerdo entre las Partes.
 - c. La existencia de una resolución judicial o arbitral emitidas a instancia de un tercero que afirme tener derechos de titularidad, adquisición o preferencia de cualquier tipo sobre la Información Inicial o sobre la propiedad industrial generada en el curso de la Investigación, con independencia de que CORETHERAPIX haya obtenido o no una patente.
 - d. La existencia de una situación de bloqueo en la gestión de CORETHERAPIX. A estos efectos, se entenderá que existe bloqueo cuando concurran los siguientes requisitos:
 - i. Que hubieran transcurrido un (1) mes desde que uno de los socios hubiera requerido al otro por escrito para adoptar una determinada decisión sin que hubiera sido posible llegar a un acuerdo, o desde que un Socio hubiera requerido por escrito al otro Socio para adoptar determinada decisión en la Junta General.

12/2007



800606619

- ii. Que transcurrido el citado plazo de un (1) mes, hayan pasado quince (15) días desde que un Socio notifique a otro por escrito la existencia de una situación de bloqueo citando expresamente esta Cláusula.
2. Si se produjera la resolución de este Acuerdo por cualquiera de las causas indicadas anteriormente una vez el Investigador hubiera adquirido con una participación en CORETHERAPIX por razón del ejercicio del derecho de la opción, se aplicarán las siguientes normas:
- a. Si la resolución del Acuerdo se hubiera producido por el incumplimiento de un Socio, el otro Socio tendrá derecho a comprar la participación del otro a un tercio de su valor real calculado de acuerdo con lo descrito en el párrafo 2.b.i.
- b. Si la resolución del Acuerdo se decidiera válidamente por un Socio sin que exista un incumplimiento por el otro Socio, se procederá de la siguiente manera:
- i. Se acordará entre los Socios cual es el valor de CORETHERAPIX y, por tanto, el valor de cada participación social. A falta de acuerdo en el plazo de quince (15) días, se designará el valorador por sorteo entre las auditoras KPMG; PriceWaterhouse y Deloitte (el "Valorador"). Este sorteo se hará ante notario de Madrid y será instado por cualquiera de los Socios con notificación fehaciente al otro Socio. No obstante si en el momento del sorteo de las auditoras alguna de ellas ostentara o haya ostentado el cargo de auditor en las Sociedades CORETHERAPIX y GENETRIX, durante los cinco (5) años anteriores, dicho auditor será omitido del sorteo. El Valorador tendrá un (1) mes para presentar un informe a los Socios, y su coste será con cargo a CORETHERAPIX.
- ii. Recibida la valoración, el Socio que no ha iniciado la resolución dispondrá de quince (15) días para decidir si compra la participación del otro. Pasado tal plazo, si este Socio no hubiera tomado decisión alguna, el Socio que ha iniciado la resolución deberá comprar la participación del otro Socio. En todos los casos descritos en este apartado, la venta de las participaciones tendrá lugar al valor determinado por el Valorador.
3. Respecto a lo contemplado en la presente cláusula, para el caso de que se produjera un bloqueo en la sociedad, en particular, la adopción de decisiones que imposibiliten la marcha y continuación de la ejecución de este Acuerdo, siempre que el Investigador no haya adquirido todavía la titularidad de las participaciones sociales que pudieran corresponderle, en virtud del presente

Acuerdo, se seguirán las pautas contempladas en los epígrafes 1 y 2 de la presente Cláusula Undécima

4.

DECIMOSEGUNDA. DERECHO APLICABLE Y JURISDICCIÓN.

1. El presente Acuerdo queda sometido a Derecho Español.
2. Las partes acuerdan someter cualquier cuestión o conflicto que pueda suscitarse con relación a la aplicación, ejecución o interpretación del presente Acuerdo a los Juzgados y Tribunales de la ciudad de Madrid

DUODÉCIMOTERCERA. MISCELÁNEA.

1. Notificaciones

Cualquier notificación que deban hacerse las Partes por razón de este contrato se hará por medio de carta, fax u otro medio, incluso electrónico, que permita la constancia de la recepción. Las notificaciones se harán a las siguientes direcciones:

GENETRIX

A nombre de Dña Cristina Garmendia Mendizabal
Tres Cantos (Madrid), [REDACTED]
España

D. Bernardo Nadal Ginard
334 Hammond Street, Chestnut Hill, MA 02467,
EEUU-USA

CORETHERAPIX

A nombre de A nombre de Dña Cristina Garmendia Mendizabal
Tres Cantos (Madrid), [REDACTED]
España

2. Confidencialidad.

Este Acuerdo y su contenido serán confidenciales. Cualquier anuncio o comunicación sobre el mismo requerirá el consentimiento de los Socios. Ningún Socio podrá facilitar información sobre el mismo sin consentimiento expreso del otro, salvo en el caso de requerimiento judicial o de autoridad administrativa en el uso de sus competencias.

3. Gastos

800606620

12/2007



Cada una de las Partes asumirá los costes, gastos, impuestos, tasas, arbitrios o impuestos de cualquier naturaleza en que incurran relativos a los servicios de asesoramiento jurídico, tributario, laboral, etc. que pudieran acontecer para la ejecución del presente Acuerdo. GENETRIX asumirá los costes de preparación y registro de este Acuerdo así como los costes incurridos en la preparación y ejecución de la opción de compra de las participaciones sociales de CORETHERAPIX por el Investigador.

4. Extinción de acuerdos previos.

El presente Acuerdo deja sin efecto cualesquiera otros acuerdos previos existentes entre los Socios o las Partes, de forma que desde esta fecha solamente regirá entre ellas lo previsto en el presente Acuerdo.

Por todo lo expuesto, los intervinientes firman el presente documento, en tres ejemplares por una sola cara, en el lugar y fecha indicados en el encabezamiento.

Por GENETRIX

Edo.:

Dña. Cristina Garmendia Mendizábal

Por D. Bernardo Nadal Ginard

Edo.:

D. Bernardo Nadal Ginard

Por CORETHERAPIX, S.L.U.

Fdo.:

Dña. Cristina Garmendia Mendizábal

12/2007



800606621

ANEXO I

Proyecto de Investigación en Regeneración del Miocardio
Mediante el Transplante Alogénico de Células Madre Cardíacas Adultas
y Factores de Crecimiento

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
2	METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO	4
2.1	Descripción del modelo animal	4
2.2	Puesta en marcha de protocolos para la experimentación animal	5
PT 1	Puesta en marcha del protocolo de detección de la activación de las CMCs endógenas	5
PT 2	Protocolo para la determinación de la extensión infarto por resonancia magnética	6
2.3	Desarrollo de líneas celulares de CMCs para trasplante heterólogo	8
PT 3	Aislado, cultivo y evaluación de líneas de células madre cardíacas porcinas	8
PT 4	Aislado, cultivo y evaluación de líneas de células madre cardíacas humanas	9
PT 5	Análisis del secretoma de las CMCs humanas	9
PT 6	Evaluación y selección de clones de CMCs humanas	10
PT 7	Ensayo de tumorigénesis de las CMCs	10
PT 8	Análisis de la capacidad de inmunosupresión de las hCMCs	10
2.4	Desarrollo de una terapia regenerativa mediante citoquinas	11
PT 9	Formulación clínica para la administración local de citoquinas en el miocardio	11
PT 10	Puesta en marcha de un sistema de evaluación rápida de citoquinas	11
PT 11	Evaluación de la seguridad del modo de actuación del sistema de administración de citoquinas	11
2.5	Evaluación experimental del efecto terapéutico de las CMCs	12
PT 12	Prueba de concepto del efecto terapéutico de las CMC porcinas y optimización de su administración	12
PT 13	Estudio de la relación dosis efecto de la administración de CMCs porcinas	12
PT 14	Demostración del efecto terapéutico de las CMC humanas en el cerdo	13
2.6	Evaluación experimental del efecto terapéutico de las citoquinas	13
PT 15	Estudio de la relación dosis efecto de la administración de citoquinas encapsuladas	13
PT 16	Estudio de terapia combinada	13
2.7	Presupuestos y Cronogramas	15
2.7.1	Cronograma Estimativo	15
2.7.2	Presupuesto Estimativo para el Proyecto Coretherapix	16
3	INVESTIGADORES PARTICIPANTES	17
3.1.1		17
3.1.2		17
3.1.3		17
4	REFERENCIAS	18

12/2007 INTRODUCCIÓN

Este documento describe el proyecto que descrito en el contrato entre Bernardo Nadal Ginard y Genetrix S.L.

El objetivo del proyecto es la producción de suficientes datos científicos experimentales para realizar las solicitudes de patente que protejan el concepto de terapia regenerativa propuesta por Coretherapix y un dossier regulatorio que describa la viabilidad de estas terapias de una manera suficientemente detallada para su presentación ante la Agencia Española del Medicamento. Este dossier deberá facilitar la negociación de las condiciones para entrar en la clínica reduciendo el coste y duración del proceso.

Las terapias a desarrollar incluyen el transplante heterólogo de células madre cardíacas (CMCs) y el uso de citoquinas para promover la regeneración del miocardio.

El proyecto consiste de dos líneas terapéuticas (CMCs y citoquinas), el desarrollo de un vehículo de administración y la puesta en marcha de los protocolos técnicos necesarios para desarrollar la experimentación animal. Todos estos trabajos se harán en colaboración con centros de investigación subcontratados dirigidos científicamente por Bernardo Nadal Ginard. Los catorce paquetes de trabajo de este proyecto y los socios que trabajarán en cada uno de ellos se detallan a continuación:

Puesta en marcha de protocolos para la experimentación animal

- PT 1. Puesta en marcha del protocolo de detección de la activación de las CMCs endógenas.
- PT 2. Puesta en marcha del protocolo para la determinación de la extensión infarto por resonancia magnética.

Desarrollo de líneas celulares de CMCs para transplante heterólogo

- PT 3. Aislado y cultivo de CMCs porcinas.
- PT 4. Aislado y cultivo de CMCs humanas.
- PT 5. Análisis del secretoma de las CMCs humanas
- PT 6. Evaluación y selección de clones de CMCs humanas
- PT 7. Ensayo de tumorigénesis de las CMCs humanas
- PT 8. Ensayo de activación del sistema inmune

Desarrollo de una terapia regenerativa mediante citoquinas

- PT 9. Formulación clínica para la administración de citoquinas en el miocardio.
- PT 10. Puesta en marcha de un sistema de evaluación rápida de citoquinas.
- PT 11. Evaluación de seguridad del mecanismo de acción de las micro partículas

Evaluación experimental del efecto terapéutico de las CMCs

- PT 12. Prueba de concepto del efecto terapéutico de las CMC porcinas y optimización de su administración
- PT 13. Estudio de la relación dosis efecto de la administración de CMCs porcinas
- PT 14. Demostración del efecto terapéutico de las CMC humanas en el cerdo

Evaluación experimental del efecto terapéutico de las citoquinas

- PT 15. Estudio de la relación dosis efecto de la administración de factores de crecimiento encapsulados.
- PT 16. Estudio del efecto terapéutico de una terapia combinada (CMC & citoquinas)

La duración del trabajo se estima en 12 meses a partir de los trabajos ya comenzados en Septiembre de 2007.

realizará la contratación de los trabajos experimentales en animales con [REDACTED] y otros colaboradores

Toda la propiedad intelectual resultante de este proyecto será propiedad de Coretherapix S.L. [REDACTED] tendrá el derecho a una licencia gratuita para utilizar la propiedad intelectual resultante del proyecto con fines exclusivamente de investigación.

2 METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

A continuación se describen los 16 paquetes de trabajo a realizar durante la duración del proyecto además de una descripción del modelo animal. En la sección 3 del documento se adjunta un cronograma que describe la relación entre estos paquetes de trabajo.

2.1 Descripción del modelo animal

Se ha escogido el cerdo como animal experimental por el parecido entre su anatomía y fisiología cardiovascular y la del hombre. Dadas las similitudes con el humano, el cerdo se ha utilizado extensamente por distintos grupos para comprender la patofisiología de la arterotrombosis, la isquemia aguda y crónica, la evaluación de nuevos anticoagulantes y antiarrítmicos o la validación de nuevas tecnologías de imagen. Además el equipo cuenta con una larga experiencia trabajando con este modelo así como resultados preliminares con el modelo de infarto de miocardio. Una serie de características, hacen del cerdo un modelo ideal para este estudio: En primer lugar, la distribución de las arterias coronarias es similar a la de los humanos. En segundo lugar, tiene una red poco tupida de vasos colaterales y escasa capacidad de reclutar nuevos vasos colaterales durante un episodio isquémico agudo tal y como ocurre en el hombre sano sin enfermedad cardiovascular (esto no ocurre en el perro que sería el modelo experimental alternativo). Es necesario advertir que en el caso del paciente humano con enfermedad cardiovascular severa sí que se observa una red extensa de circulación colateral pero que al ser una proporción pequeña (menos del 30%) el modelo constituye una buena aproximación para la mayoría de los casos.

El tamaño del cerdo también permite juzgar la eficacia de los protocolos en un corazón similar al humano utilizando los mismos dispositivos quirúrgicos y protocolos. Esto ofrece la posibilidad de determinar cualitativa y cuantitativamente el destino de las células transplantadas, bien por su contribución directa a la regeneración del miocardio (que no esperamos ver utilizando células heterólogas), un incremento en la supervivencia de las células dañadas y / o la estimulación de las células endógenas a través de la producción de factores antiapoptóticos y de crecimiento. Como se ha mencionado con anterioridad, este tipo de información no está disponible a día de hoy a pesar del número de ensayos clínicos realizados o en curso. Sin este tipo de información, que esperamos obtener con este proyecto, es muy difícil interpretar el resultado de los ensayos clínicos y, aun más, no es posible proponer mejoras a los protocolos de manera racional ya que se carece de algunos parámetros relevantes que simplemente no se pueden obtener en humanos.

Nuestro modelo, comprobará la eficacia de tres modalidades regenerativas distintas (transplante celular, administración de factores y terapia combinada) para mejorar la anatomía y la fisiología del miocardio infartado y evitar o revertir el remodelado cardíaco. Además, antes de comenzar su aplicación en humanos, optimizaremos el momento ideal de intervención y el patrón de dosificación para producir los resultados buscados.

Aunque están indicados en los estudios coronarios de oclusión-reperusión, los modelos porcinos tienen mala reputación por su alta tasa de mortalidad. Sin embargo, nuestro modelo a tórax cerrado ha demostrado una gran consistencia en cuanto a la evidencia patológica de necrosis transmural y una baja mortalidad (entre el 15% y el 20%). La tasa de éxito total del modelo completo incluida la evaluación por RMC es de del orden del 90% excluyendo el índice de mortalidad. En un 3-5% de los animales no es posible ver el infarto por RMC o el infarto es demasiado pequeño para producir cambios hemodinámicos. Sospechamos que esto se debe a situaciones en las que ha habido una oclusión incompleta. Además en otro 3-5% de los animales se observan necrosis miocárdicas junto a la arteria coronaria derecha, presumiblemente por trombosis inducidas por el cateterismo.

Modelo porcino de infarto agudo de miocardio: Antes de inducir el infarto de miocardio, los animales se tratarán durante 3 días con 81mg de aspirina, 71mg de Plavix y Labetalol. La combinación de terapia oral antiplaquetaria y beta bloqueantes se mantendrá durante la semana siguiente a la intervención. Este tratamiento ayuda a mantener abierta la coronaria en la que se produce el infarto. Los animales son sedados (100mg telazol intramuscular) antes de comenzar cualquiera de las intervenciones (infarto experimental, inyección intracoronaria o estudios de imagen). Después de la sedación los animales son intubados y se induce su anestesia general mantenida mediante isoflurano (2-5% en O₂) que se ajusta según se necesite. Se utilizará ventilación mecánica cuando sea necesaria.

1.2.2. Metodología para la intervención con balón coronario se ha descrito por nosotros y otros grupos (Badimon L., 1987; Lee HW., 1998). Una vez el animal está totalmente anestesiado y estable se accede a la arteria femoral izquierda mediante un corte, colocando un introductor 6.5-8 French al mismo tiempo que se administran 70 unidades por kg de heparina intravenosa. Un catéter guía de 6 French AR-1 o AR-2 se introduce por el ostium de la coronaria izquierda y se inyecta contraste angiográfico. Se selecciona la coronaria media o proximal de la anterior descendente dependiendo de la anatomía con el objetivo de producir un infarto en una porción substancial del segmento anteroapical izquierdo o anteroapical de la pared ventricular libre. Una vez se ha seleccionado el lugar idóneo se inyectan 2mg/kg de lidocaína por vía intravenosa, se hincha el balón y se mantiene hinchado durante un periodo de 90 minutos. El balón utilizado es de 2.5 a 3.0 mm de diámetro y 15 mm de largo y el catéter es de 143 cm. de longitud. Se realiza otro angiograma para asegurarse de la localización del balón. Después de 90 minutos de oclusión, los catéteres se retiran y se realiza una nueva angiografía. Después de la última angiografía se repara el corte en la femoral. Para prevenir y tratar la aparición de arritmias cardíacas, se toman medidas de resucitación cardíaca incluyendo la administración de fármacos y de choques eléctricos transtorácicos.

2.2 Puesta en marcha de protocolos para la experimentación animal

PT 1 Puesta en marcha del protocolo de detección de la activación de las CMCs endógenas.

Participantes y roles principales

- Anatomía patológica fina
- Anatomía patológica gruesa

Recursos

- 1 becario doctoral, 1 técnico. Formación becario. Actualización equipos. Fungible y anticuerpos.
- Dentro del presupuesto.

Markado continuo con BrdU -

A fin de identificar y cuantificar todas las células miocárdicas nacidas antes de la administración de cada tratamiento, al comienzo de estos, se le implantará a cada animal una bomba osmótica subcutánea (Easypump de J-Flow / B. Braun). Estas bombas tienen un reservorio con una capacidad de 60ml que se puede recargar fácilmente. Se rellenarán con una solución 0,5M de BrdU para producir un marcado uniforme durante las 3 primeras semanas después de la intervención. Utilizando este sistema hemos marcado animales rutinariamente hasta 9 semanas sin efectos adversos. Creemos que de ser necesario este protocolo puede extenderse 16 semanas sin modificación.

Recolocación, fijado y procesado de las muestras de anatomía patológica -

Después de la última RMC se produce la eutanasia de los animales. Tras la aplicación de una anestesia general, se administra heparina a los animales, se expone la aorta torácica mediante laparotomía y se coloca un catéter en la aorta ascendente. Un litro de fluido de limpieza (0.1M PBS conteniendo Papaverina pH 7.4) se perfunde a través del catéter. Después se fija a presión con un litro de 4% paraformaldehído a 4° en 0.1 molar PBS, pH 7.4. Todas las perfusiones se hacen a 100mmHg. Tras la fijación el corazón y los grandes vasos se extraen, y se sumergen en fijador. Después de 24 horas de fijado se almacenan durante varios días en 0.1 M PBS frío antes de proceder.

Diseción y preparación histológica -

El corazón se limpia de sangre y se cortan la aorta y la arteria pulmonar a 2cm de su comienzo. El corazón se limpia de grasa epicárdica y se examinan los signos macroscópicos de infarto en la superficie exterior, se miden las dimensiones del infarto y se pesa el corazón. En este momento, se toman dos fotografías del aspecto anterior y posterior del corazón. Comenzando por el apex y llegando al anillo atrioventricular (mitral), se seccionan seis cortes paralelos de grosor uniforme de 8mm que se separan de la aurícula. Cada corte se examina para medir el tamaño y la extensión transmural del infarto. Se toman fotografías de cada uno de los cortes. Cada uno de los seis cortes se subdivide en segmentos correspondientes al ventrículo derecho, septo, ventrículo izquierdo y el ventrículo izquierdo se aparta para su procesamiento histológico. Los cortes del ventrículo izquierdo se subdividen en los segmentos antero lateral y posterior. El peso de cada corte del ventrículo izquierdo y el tamaño macroscópico del infarto se anotan.

Evaluación del tamaño del infarto -

Cinco secciones, desde la base al apex del ventrículo izquierdo se examinarán con microscopía óptica estándar. Las secciones que contendrán el grosor completo de la pared del ventrículo izquierdo y el septo se tefirán con actina α -sarcomérica para los miocitos, lectina para las células endoteliales, actina α -lisa para las células de músculo liso y vimentina para los fibroblastos. La pared se dividirá en dos en sentido longitudinal y en 60 campos consecutivos (30 desde el endo y 30 desde el epi-miocardio) que se examinarán por microscopía confocal calculando el área relativa ocupada por miocitos, células endoteliales, músculo liso, arteriolas coronarias y capilares. Estas áreas son equivalentes a los volúmenes que ocupa cada estructura. Se examinarán el área superficial de los capilares y arteriolas, sus longitudes y propiedades estructurales asociadas a la oxigenación. El muestreo para cada tipo celular se ajustará según la estadística de Poisson de tal manera que el error de muestreo quede por debajo del 10%. El volumen relativo de cada tipo celular multiplicado por el volumen total dará como resultado el volumen agregado de

cada tipo celular cardiaco. Las medidas del volumen de miocitos nos proporcionarán uno de los parámetros clave para determinar el tamaño del infarto.

Después del IM, tienen lugar dos procesos cuyas propiedades varían con el tiempo transcurrido. En primer lugar se da una reducción de la zona necrótica infartada con la formación de una cicatriz. En segundo lugar se observa la hipertrofia reactiva de los miocitos en la porción sana sobrecargada del ventrículo que aumenta la cantidad de miocardio superviviente. Estos fenómenos son difíciles de separar y medir de manera independiente complicando la evaluación del tamaño del infarto en distintos momentos después de la oclusión de la coronaria y su reperusión. El número de miocitos viables se reduce aun más por la muerte de células dispersas por el ventrículo. Por lo tanto, el número total de cardiomiocitos muertos que han quedado en el miocardio y la masa agregada de miocitos ventriculares nos darán una caracterización mas precisa de la magnitud del infarto y de la regeneración. La fracción de miocitos perdidos proporcionará una medida cuantitativa del verdadero impacto de la isquemia y la reperusión sobre la herida del infarto.

Imunohistoquímica --

Se utilizarán una serie de tinciones para identificar elementos específicos dentro la zona infartada y en la zona circundante mediante microscopia confocal. Las tinciones y el propósito de cada se describe a continuación

- BrdU + cKit: Generación de nuevas células madre cardiacas.
- BrdU + actina α -sarcomérica: Generación de nuevos cardiomiocitos.
- BrdU + vWF: Generación de nuevo tejido vascular.
- GFP: Paradero de las células madre cardiacas inyectadas. (Si es necesario incrementar la especificidad se realizará esta prueba mediante un anticuerpo anti-GFP).
- Colágeno: Evaluación de la cicatriz.

El porcentaje de células marcadas con BrdU y GFP en el miocardio se determinará promediando la cuenta en tres secciones dentro del área de interés.

PT 2 Protocolo para la determinación de la extensión infarto por resonancia magnética.

Participantes y roles principales

La RMC es una técnica altamente precisa, no invasiva, para la evaluación completa de la función, estructura y perfusión del corazón. Por esta razón cada animal sirve como su propio control. Los endpoints (puntos finales de decisión de un ensayo) incluirán no sólo medidas globales sino también regionales por segmentos como se ha descrito. Los animales se sacrificarán después del último examen y el corazón se procesará para su estudio histopatológico. Se procederá a realizar los ensayos histopatológicos, inmunohistoquímicos, y de la ultra estructura por microscopia confocal en las zonas infartadas, periféricas al infarto y en zonas no afectadas. Se realizará una comparación entre estas medidas y las resultantes de RM dando lugar a una calibración de los parámetros de RM. El carácter no invasivo permitirá la obtención de datos consecutivos de tal manera que cada animal servirá como su propio control respecto a la evolución del tratamiento y así se limitará el número de animales. El tamaño de la muestra en estudios anteriores (Meyer BJ. 1994; Spangrude GJ. 2003; Collins K., 2002) que han utilizado un modelo similar es de 10. Para asegurarnos la validez de la información utilizaremos 15 animales por grupo. A continuación se detalla el protocolo de RMC y las medidas que a lo largo del tiempo sería deseable tener disponibles para los ensayos animales y que al momento de redactar este anexo están sujetas a disponibilidad en León.

Evaluación del infarto de miocardio y de la función cardiaca mediante resonancia magnética.

Como se ha descrito anteriormente el animal es sedado y anestesiado (Propofol 3mg/kg/hr) y se le lleva a la sala de imagen. Se utiliza un ventilador compatible con la resonancia durante el transporte y durante la totalidad del proceso diagnóstico. El estudio se realizará en la posición supina con gating electrofisiológico. Se llevará a cabo un examen de 60 minutos para localizar y cuantificar la zona infartada. Una vez se haya completado el estudio se devuelve el animal a los establos después de una hora en observación. La imagen se obtendrá con una resonancia magnética de 3T utilizando una bobina *phased array* de cuatro elementos.

Evaluación del volumen y la masa del ventrículo izquierdo. El volumen y la función del ventrículo izquierdo son factores pronósticos importantes en pacientes con enfermedad coronaria. La resonancia magnética es la referencia para la evaluación no invasiva de los volúmenes y masas ventriculares (Chimenti C, 2003; Nadal-Ginard B, 2003). El método de adquisición preferido es el TrueFISP porque permite tiempos de adquisición más cortos, mejor reproducibilidad y un mejor contraste además de la disponibilidad de valores de referencia (Ohta H., 2003) Se adquirirán cortes del eje corto contiguos desde la base

12/03/07

del ventrículo izquierdo con gating retrospectivo del electrocardiograma (Figura 1). Los parámetros de imagen serán: TR=5.2msec, TE=1.6msec, 63°-90°, grosor del corte de 8mm sin espaciado, FOV=360x270mm, matriz=256x128 (resolución espacial en el plano de 2.2x1.4mm), 10-15 segmentos, 20 fases cardíacas, y un ancho de banda de 930Hz/px.

Las imágenes se transferirán a la estación de trabajo del sistema donde se trazarán de manera semi-automática los contornos telesistólicos y telediastólicos correspondientes al endocardio y epicardio del ventrículo izquierdo con corrección manual en cada corte del eje corto (Figura 1). La suma de las áreas de los contornos endocárdicos de cada corte multiplicada por el grosor del corte servirá para calcular los volúmenes telesistólicos y telediastólicos (Scholzen T. 2000). No se hará ninguna aproximación geométrica a fin de incluir anomalías anatómicas. El mismo método se utilizará para calcular el volumen del miocardio del ventrículo izquierdo comprendido entre los contornos endocárdicos y epicárdicos. Los músculos papilares se incluirán en el volumen ventricular (Dutta A, 1997; Blasco MA., 2002). Este volumen se ha de multiplicar por la densidad específica del miocardio (1.05g/cm³) para obtener la masa del ventrículo izquierdo (Dutta A, 1997). La alta reproducibilidad de esta técnica permite la evaluación de cambios en la evolución de la enfermedad isquémica y la respuesta a distintos tratamientos (Dutta A, 1997; Beausejour CM, 2003).

Función global del ventrículo izquierdo. A partir de los cálculos descritos anteriormente es posible cuantificar la fracción de eyección, el volumen de eyección y la descarga del ventrículo (multiplicando el volumen de eyección por la frecuencia cardíaca) que en la ausencia de regurgitaciones valvulares se correlaciona bien con las medidas hemodinámicas. La reproducibilidad de estos parámetros es excelente y superior al de otras modalidades (Kamihata H., 2001; Kamihata H, 2002). Como ejemplo, la detección de un cambio de un 3% en la fracción de eyección (con un intervalo de confianza del 90%) requiere 87 pacientes en el caso de la ecocardiografía pero tan sólo 11 con RMC.



Figura 1: Contornos telediastólicos y telesistólicos trazados a mano en dos ejes cortos,



Figura 2: Varias imágenes de un paciente con una aneurisma de grandes dimensiones en el ventrículo izquierdo a consecuencia de un infarto de miocardio: A. cuatro cámaras, B. dos cámaras y C. tres cámaras.

Evaluación de la función regional del ventrículo izquierdo. La evaluación de las anomalías de la pared se puede estimar de manera cualitativa o cuantitativa. La RM tiene una buena reproducibilidad y se ha mostrado superior a la ecocardiografía tanto en reposo como durante stress farmacológico probablemente por la mejor calidad de la imagen (Boyurn A. 1968). Para la evaluación de la función de la pared se revisarán las imágenes del eje corto conjuntamente con los tres ejes largos (dos, tres y cuatro cámaras) que también se adquirirán con TrueFISP. El ventrículo izquierdo se dividirá en 17 segmentos de acuerdo con la clasificación estándar (Plein S., 2001) (Figura 3). La evaluación cualitativa se llevará a cabo mediante el uso de la clasificación de función regional habitual y se computará un índice general a partir del promedio de todos los segmentos. La cuantificación absoluta del engrosamiento regional se realizará con la ayuda de un software específico (e.g. Argus). Se calculará el grosor telesistólico (en mm.), el engrosamiento (en mm.) y el porcentaje de engrosamiento (Eur. Heart J., 1998) (Figura 4).

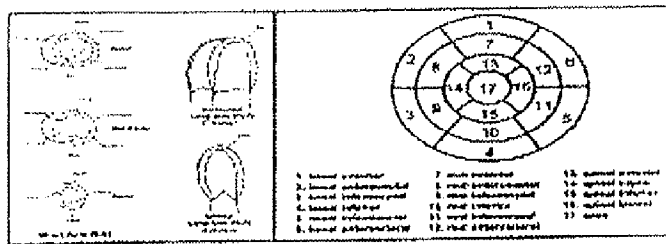


Figura 3: Clasificación de segmentos miocárdicos de acuerdo con la AHA.



Figura 4 Trazado del miocardio y segmentación de un eje corto de un cerdo con infarto agudo de miocardio. Contornos telediastólicos (izda.) y telesistólicos (dcha.) e informe mostrando la distribución del engrosamiento regional.

2.3 Desarrollo de líneas celulares de CMCs para trasplante heterólogo

PT 3 Aislado, cultivo y evaluación de líneas de células madre cardíacas porcinas.

Participantes y roles principales:

- [Redacted] Aislado y cultivo celular.

Recursos

- [Redacted] 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.

Aislado, cultivo y marcado de células madre cardíacas de origen porcino – Fundación Inbiomed

Para realizar la prueba de concepto y evaluación preliminar de la relación dosis efecto (PT10 y PT11) se utilizarán células de cerdo proporcionadas por Bernardo Nadal Ginard. Estas CMC se han aislado de las cavidades auriculares y ventriculares de cerdos sanos normales tanto de explantes como de biopsias por cateterismo. Cuatro de las seis muestras se recogieron usando una biopsia endomiocárdica por cateterismo con un Bipal bioprote (Cordis). Las células c-kit⁺ se separaron utilizando microesferas magnéticas y el dispositivo AUTOMACS (Miltenyi Biotec). La pureza de las células se determina por FACS. Para realizar el FACS, las células se tifen con FITC extravidin (SIGMA). El cultivo de las células c-kit⁺, se obtiene por plating de $1-2 \times 10^4$ células por ml durante 5-7 días en medio F12K conteniendo 10% FBS, 5% HS. Con este procedimiento es posible conseguir un gran número de células (hasta 1×10^6) en un periodo de 7-10 días después de comenzar el cultivo. La progenie de una sola célula ha dado lugar a una línea celular con pasajes continuos durante los últimos dos años y medio. Esta línea celular tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 horas, muestra un cariotipo normal y las características normales de una célula madre.

Dos tipos de marcado son necesarios para monitorizar el destino de las células transplantadas. Uno para seguirlas con la RM y otro para su identificación histológica y ser capaces de identificar la progenie si la hubiera. Para su identificación con RM es necesario mezclar un agente de contraste con los cultivos celulares para determinar la distribución de las células en el miocardio tras el trasplante. Para este fin, las células se cultivan entre 4 y 8 horas en presencia de una suspensión de partículas de óxido de hierro (10mg/L) a 37°C en 5% de CO₂ y se lavan con PBS antes de su inyección.

Además es necesario usar una marca genética que se transmita a la progenie para distinguir las células transplantadas y su progenie de aquellas que resulten de la activación de las células endógenas. En la actualidad, las células transplantadas llevan dos marcadores. Las células se derivan de un cerdo macho y se transplantan siempre en hembras de tal manera que el cromosoma Y sirve de marca y además el cultivo se transfecta con lentivirus que expresan la proteína eGFP de tal manera que se pueda tener un cultivo maestro que sea 99% GFP positivo.

El trabajo realizado por [Redacted] para la Prueba de Concepto para establecer un banco celular a partir de las células descritas anteriormente y el protocolo de marcado está descrito en el documento: *Ensayo preclínico para la utilización de células madre cardíacas en un modelo de cerdo infartado* (18.05.2007).

12/2007 *Aislado, cultivo y evaluación de líneas de células madre cardíacas humanas.*

Participantes y roles principales:

- [REDACTED] Aislado y cultivo celular

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.

Aislado, cultivo y marcado de células madre cardíacas de origen porcino – Fundación Inbimed

De la misma manera en que se ha establecido la línea celular porcina proponemos crear una serie de líneas celulares humanas para determinar la variabilidad inter-clon y seleccionar las células más eficaces para futuros ensayos preclínicos y clínicos. El aislamiento, expansión, caracterización y marcado de estas células se llevará a cabo en Inbimed bajo la supervisión de Bernardo Nadal Ginard Director Científico de Coretherapix.

PT 5 Análisis del secretoma de las CMCs humanas

Participantes y roles principales:

- [REDACTED] Secretoma preliminar por RT-PCR y GeneChip.
- Colaborador: Realización de estudio de proteómica.

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.

Para desarrollar protocolos óptimos de regeneración mediante la activación y multiplicación de las células madre intrínsecas del miocardio es necesario conocer aquellos factores a los que estas células responden y que son responsables de su supervivencia, crecimiento y diferenciación. Además, la mayoría de células madre, tanto adultas como embrionarias, y entre ellas las hCMCs, exhiben sistemas autocrinos y paracrinos a corta distancia (en el nicho) para regular su biología. Estas mismas moléculas frecuentemente ejercen actividades sobre las células vecinas. Por lo tanto es importante identificar los mecanismos auto- y paracrinos de las CMCs. Es de esperar que estos mecanismos cambien de acuerdo con el grado de diferenciación de las células.

Preparación y selección de poblaciones de CMCs en estadios específicos de su diferenciación

[REDACTED] Una de las clonas de hCMCs que ha mantenido un cariotipo y patrón de diferenciación estable durante los últimos 12 meses será transfectado con diferentes construcciones que permitan identificar y seleccionar un estado de diferenciación o determinación en un tipo celular específico. Estas construcciones tienen una anatomía uniforme. Cada una de ellas puede producirse como un lentivirus y lleva el gen de resistencia a un antibiótico, por lo que las células pueden seleccionarse en cultivo, el promotor del gen específico del tipo celular a seleccionar que dirige la expresión de una proteína fluorescente (generalmente eGFP), lo que permite seleccionar las células de interés mediante "cell sorting".

Las construcciones que se utilizarán llevan los promotores de genes que permiten seleccionar las siguientes poblaciones celulares: las CSCs más primitivas que expresan "stemness genes" y todavía no han inducido el fenotipo cardíaco; células que han inducido el fenotipo cardíaco pero todavía son multipotentes y capaces de producir miocitos, músculo liso y endotelio, células que expresan factores de transcripción específicos para uno u otro de los tres tipos celulares (miocitos, músculo liso, endotelio) pero siguen indiferenciadas, células que han iniciado su diferenciación.

Análisis del "secretoma" de las CMCs y su progenie: La batería de receptores de membrana expresada por estas diferentes tipos celulares ("secretoma") será determinado mediante "gene array" análisis utilizando técnicas convencionales. Este análisis será realizado por una unidad externa de genómica subcontratada. Los resultados obtenidos mediante los "arrays" serán confirmados por rtPCR. La expresión a nivel de proteína de las moléculas de interés será confirmado mediante citofluorescencia y western blots. Este análisis producirá el cuadro del "secretoma" de las CMCs y su evolución durante su diferenciación y especificación en los diferentes tipos celulares, lo que a su vez dará información sobre los mecanismos moleculares responsables para esta especificación.

Análisis del secretoma de las CMCs y su progenie: La batería de proteínas secretadas por las CMCs (secretoma) contiene factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, quimocinas, metaloproteínas y proteínas de la matriz extracelular, que determinan su biología y la de las células vecinas. Su identificación es necesaria para descubrir aquellas moléculas que afectan la biología del miocardio y son candidatos como agentes terapéuticos.

La caracterización del secretoma de las CMCs utilizará las mismas poblaciones celulares descritas para el "secretoma". En una primera fase, se identificarán todos aquellos genes expresados por las CMCs correspondientes a moléculas secretadas. Este análisis se llevará a cabo con los "gene arrays" en una unidad de genómica externa.

En una segunda fase, cada una de las poblaciones celulares de interés será cultivada en medio sin proteínas. Las proteínas secretadas en este medio serán caracterizadas mediante técnicas estándar de proteómica: 2D gel electroforesis, espectrometría de masas, etc. Este análisis será llevado a cabo en una unidad de proteómica externa.

Este trabajo también permitirá determinar la inclusión de nuevas citoquinas a ensayar en los PT13 y PT14.

PT 6 Evaluación y selección de clones de CMCs humanas

Participantes y roles principales:

- [REDACTED] Producción celular.
- Colaborador: Experimentación en ratas inmunodeficientes.

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- Colaborador: Acceso a animalario para animales inmunodeficientes y personal experto en modelo experimental.

Para preparar el dossier regulatorio es necesario anticipar la necesidad de la agencia de estudiar resultados sobre el comportamiento de las mismas células humanas a ensayar en la clínica y demostrar que su comportamiento es predecible.

En una primera fase se evaluará el comportamiento de 4 líneas celulares aportadas por Bernardo Nadal Ginard. Este trabajo establecerá el comportamiento de las células y determinará la mejor línea celular a utilizar en los experimentos de dosis efecto con células humanas. El mismo experimento se repetirá en el futuro para evaluar las líneas generadas durante el PT4.

Se experimentará sobre 25 ratas *nu/nu* (inmunodeficientes) en 5 grupos de 4 animales. Un grupo de 5 sirve de control y es inyectado con PBS. Cada animal experimental es inyectado con 5×10^5 células madre en el borde del infarto producido por ligadura de la DAI. Cada grupo será inyectado con células de clones diferentes y se seleccionará el clon que demuestre tener un impacto regenerativo mayor.

PT 7 Ensayo de tumorigénesis de las CMCs.

Participantes y roles principales:

- [REDACTED] Producción celular.
- Colaborador: Acceso a animalario de animal pequeño.

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- Colaborador: Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.

Para demostrar la seguridad de la terapia se llevará a cabo un ensayo de tumorigénesis en ratón en colaboración con un colaborador científico con experiencia en estos modelos.

Ensayos de tumorigénesis: 50 ratones en grupos de 10 animales inmunodeficientes inyectados subcutáneamente con: 0, 1M, 5M y 10M y 20 M respectivamente. Seguimiento de 12 meses o hasta la muerte de los animales que desarrollan tumores. Este trabajo se realizará en colaboración con un centro externo. En principio el equipo de [REDACTED].

PT 8 Análisis de la capacidad de inmunosupresión de las hCMCs.

Participantes y roles principales:

- [REDACTED]

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, reactivos.

Recientemente muchos investigadores han identificado una capacidad inmunoreguladora en las células madre embrionarias y mesenquimales. Por un lado, estas células ejercen una función inmunosupresora *in vitro*, reduciendo la aloreactividad y proliferación de linfocitos *in vitro* en correlación directa a la dosis. Por otro lado, son capaces de generar tolerancia *in vivo*, lo que teóricamente permitiría su sobrevida en individuos de HLA no-idéntico y sin necesidad de inmunosupresión. Además, dicha tolerancia se extiende a las células o tejidos co-transplantados con las células madre, como se ha demostrado en ciertos contextos clínicos.

En el momento actual no existe ninguna información sobre la capacidad inmunoreguladoras de las CMCs en general o de las hCMCs en particular. Caracterizar este aspecto de las hCMCs es importante por varias razones: a) entender mejor los mecanismos del efecto terapéutico desglosando el efecto paracrino estimulador de las CMCs endógenas del efecto anti-inflamatorio y/o contribución directa de las células transplantadas al proceso regenerativo; b) posible uso del trasplante de hCMCs para el tratamiento de cardiomiopatías con un componente inflamatorio que normalmente es de origen desconocido; c) posible uso en el

12/2007

tratamiento de otras patologías con un componente inflamatorio crónico, como son las enfermedades autoinmunes, rechazo de órganos transplantados, etc.; d) identificación de las moléculas responsables podría llevar a la producción de medicamentos moleculares activos tanto en fenómenos de inflamación/rechazo como de reparación/regeneración de tejidos.

En los casos en que ha demostrado la actividad inmunoreguladora de las células madre, esta actividad requiere la estimulación previa de las células por linfocitos activados; es decir dicha actividad es inducida por señales proinflamatorias y depende de la secreción de un factor o factores solubles entre los que destaca el γ y interferón. La secreción de γ y interferón por los linfocitos induce la expresión de la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) que a su vez es responsable del efecto inmunomodulador. La IDO cataoliza el triptófano en kinurina, lo que permite la medida de la actividad IDO en los cultivos celulares mediante HPLC. Será de particular interés determinar el nivel de expresión de IDO en hCMC aisladas de individuos de diferentes edades, con o sin patologías asociadas y monitorizar los niveles de esta enzima en los diferentes pases de las células in vitro. Utilizando en ensayo de estimulación de la proliferación de los PBL in vitro también determinaremos la evolución de la capacidad inmunoreguladora de las hCMCs a medida que se diferencian in vitro.

2.4 Desarrollo de una terapia regenerativa mediante citoquinas

PT 9 Formulación clínica para la administración local de citoquinas en el miocardio.

Participantes y roles principales:

- [REDACTED]

Los factores de crecimiento descritos se deben administrar de manera local limitando su concentración en la circulación sistémica y evitando posibles neoplasias. El vehículo además debe ser biodegradable en un plazo razonable mientras descarga el principio activo para no crear problemas de seguridad. Para este fin se ha especificado un vehículo de micro cápsulas a desarrollar por la empresa [REDACTED]. La especificación de este vehículo esta descrita en el Anexo al contrato entre [REDACTED] fechado el 15 de Octubre de 2007.

PT 10 Puesta en marcha de un sistema de evaluación rápida de citoquinas

Participantes y roles principales:

- [REDACTED] Preparación del sistema de administración.

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, microcápsulas Merck, citoquinas, liofilizador / congelador.

Mientras se desarrolla el vehículo descrito en PT8, es necesario disponer de una alternativa rápida de administración que permita evaluar el efecto de las citoquinas y así ensayar distintas dosis y combinaciones de las mismas de una manera económica y rápida.

Para conseguir este objetivo se prepararán suspensiones de microesferas poliméricas [REDACTED] del mismo tipo que las que se utilizan para cromatografía, [REDACTED] y cargadas negativamente. Este método es aplicable en el modelo experimental y debería ser similar en cuanto a eficacia al sistema de Ingeniatics aunque evidentemente carece de un perfil de seguridad adecuado. Con este vehículo se podrán preparar distintos cócteles de citoquinas.

PT 11 Evaluación de la seguridad del modo de actuación del sistema de administración de citoquinas

Participantes y roles principales:

- [REDACTED] Preparación del sistema de administración.
- [REDACTED] Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.

Recursos

- [REDACTED] 1 becario predoctoral, fungible, microcápsulas Merck, citoquinas, liofilizador / congelador.

Mientras se desarrolla el vehículo descrito en PT8, es necesario disponer de una alternativa rápida de administración que permita evaluar el efecto de las citoquinas y así ensayar distintas dosis y combinaciones de las mismas de una manera económica y rápida.

Para conseguir este objetivo se prepararán suspensiones de microesferas poliméricas [REDACTED] del mismo tipo que las que se utilizan para cromatografía, [REDACTED] y cargadas negativamente. Este método es aplicable en el modelo experimental y debería ser similar en cuanto a eficacia al sistema de [REDACTED] aunque evidentemente carece de un perfil de seguridad adecuado. Con este vehículo se podrán preparar distintos cócteles de citoquinas.

2.5 Evaluación experimental del efecto terapéutico de las CMCs

PT 12 Prueba de concepto del efecto terapéutico de las CMC porcinas y optimización de su administración

Participantes y roles principales:

- [REDACTED]: Experimentación animal. Anatomía patológica gruesa
- [REDACTED]: Cultivo celular. Anatomía patológica fina

Recursos:

- [REDACTED]: 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- [REDACTED]: Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.

El primer objetivo de este paquete de trabajo es llevar a cabo una prueba de concepto sobre la capacidad de las líneas celulares estables de CMC porcinas heterólogas para activar las CMC endógenas del miocardio cuando se administran en la zona isquémica inmediatamente después de producirse un infarto. El segundo objetivo consiste en evaluar el grado de anidamiento de las células poco después de la inyección y como esto depende del método de administración.

Se entiende que las células transplantadas se eliminarán por el sistema inmune del huésped en un periodo de 7 a 14 días después del trasplante. Se espera que la producción de factores de crecimiento y citoquinas durante este periodo sea lo suficientemente robusta como para dar lugar a una activación de las células endógenas. Además, la producción de una gran cantidad de factores antiapoptóticos debería reducir el número de células perdidas durante la fase aguda del IM. La evaluación del anidamiento y la activación celular se determinará según el protocolo del PT2 sin utilizar pruebas de resonancia.

Prueba de concepto

Grupo 1.a.- La prueba de concepto consiste en la administración de 1×10^8 de células en 10 ml de suero porcino inactivado administrado a través de la coronaria izquierda descendente anterior justo por debajo del lugar de oclusión a un 1ml por minuto después de producirse el infarto. Se obtendrán resultados válidos en seis animales que serán sacrificados 3 semanas después a los que se les aplicará el protocolo de cuantificación del PT2.

Optimización de la vía de administración

Se realizaran experimentos en dos grupos de animales tratados de distinta manera:

Grupo 1.b.- Inyección de 1×10^8 de células en 10 ml de suero porcino inactivado administrado a través de la coronaria izquierda descendente anterior justo por debajo del lugar de oclusión a un 1ml por minuto. Dos animales se sacrificarán a la media hora de la intervención y otros dos a las 24 horas.

Grupo 1.c.- Inyección de 1×10^8 de células en 10 ml de suero porcino inactivado administrado a través de la coronaria izquierda descendente anterior justo por debajo del lugar de oclusión a un 1ml por minuto, mientras el seno coronario se haya bloqueado con un segundo catéter de balón. 3 animales se sacrificarán a la media hora de la intervención y otros dos a las 24 horas.

La razón del segundo grupo es aumentar la extravasación de las células para que abandonen la circulación coronaria y pasen al tejido donde puedan llevar a cabo la función que esperamos.

PT 13 Estudio de la relación dosis efecto de la administración de CMCs porcinas.

Participantes y roles principales:

- [REDACTED]: Experimentación animal. Anatomía patológica gruesa
- [REDACTED]: Producción celular. Anatomía patológica fina

Recursos:

- [REDACTED]: 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- [REDACTED]: Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.

Para determinar la relación dosis efecto se experimentará con cuatro grupos de tres animales cada uno con dosis de: 50, 100 y 300 millones de células más un control, sacrificados a las ocho semanas.

Se realizarán resonancias en el pre-operatorio, post-operatorio, al día, a las 4 y 8 semanas.

12/2007

PT 14. Demostración del efecto terapéutico de las células humanas en el cerdo**Participantes y roles principales:**

- [REDACTED]: Experimentación animal. Anatomía patológica gruesa
- [REDACTED]: Producción celular. Anatomía patológica fina

Recursos:

- [REDACTED]: 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- [REDACTED]: Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.

Una vez seleccionado el clon óptimo se realizará un ensayo en cerdos con las células humanas para demostrar su capacidad regenerativa indirecta (efecto paracrino).

Para determinar la relación dosis efecto se repetirá el protocolo anterior. Se experimentará con cuatro grupos de tres animales cada uno con dosis de: 50, 100 y 300 millones de células más un control, sacrificados a las ocho semanas.

Se realizarán resonancias en el pre-operatorio, post-operatorio, al día, a las 4 y 8 semanas.

2.6 Evaluación experimental del efecto terapéutico de las citoquinas**PT 15 Estudio de la relación dosis efecto de la administración de citoquinas encapsuladas.****Participantes y roles principales:**

- [REDACTED]: Experimentación animal. Anatomía patológica gruesa
- [REDACTED]: Producción celular. Anatomía patológica fina

Recursos:

- [REDACTED]: 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- [REDACTED]: Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.
- [REDACTED]: Formulación clínica cuando este disponible.

Utilizando la formulación de [REDACTED] en caso contrario el vehículo de evaluación rápida. Se llevará a cabo la determinación de dosis efecto de los factores encapsulados. La dosis de partida se determinará en base a la eficacia del encapsulado y en comparación con los estudios preliminares realizados por Bernardo Nadal Ginard.

Se realizarán experimentos sobre tres grupos de 3 cerdos a la dosis de partida (1x), dos veces (2x) y cuatro veces (4x) esta dosis. Los animales serán sacrificados a las 6 semanas. Para las 3 dosis de micropartículas se utilizará el mismo volumen de excipiente, por lo que un único control será suficiente. El grupo control incluirá cuatro cerdos, dos sacrificados a las 3 y dos a las 6 semanas.

Este primer grupo de animales se sacrificarán a las 3 y 6 semanas en vez de 4 y 8 para poderlos comparar con los experimentos anteriormente realizados por Bernardo Nadal Ginard con citoquinas pero sin vehículo de administración. Se realizaran estudios de resonancia previamente a la intervención, en el post-operatorio, al día, a las tres y seis semanas.

Una vez se determine la curva de dosis efecto se realizaran los siguientes experimentos:

- 3 animales a la dosis óptima sacrificados a 6 semanas,
- 4 animales con dosis óptima reinyección a las tres semanas y sacrificio a las 8 semanas.
- 2 animales control con dosis óptima re-inyección salino a las tres semanas y sacrificio a las 8 semanas.
- 4 animales con dosis óptima (con o sin re-inyección dependiendo del experimento anterior)

Se realizaran estudios de resonancia previamente a la intervención, en el post-operatorio, al día, a las cuatro y ocho semanas. De esta manera se dispondrá de un grupo de 7-8 animales con la dosis óptima y protocolo de re-inyección si se demostrara necesario.

PT 16 Estudio de terapia combinada**Participantes y roles principales:**

- [REDACTED]: Experimentación animal. Anatomía patológica gruesa
- [REDACTED]: Producción celular. Anatomía patológica fina

Recursos:

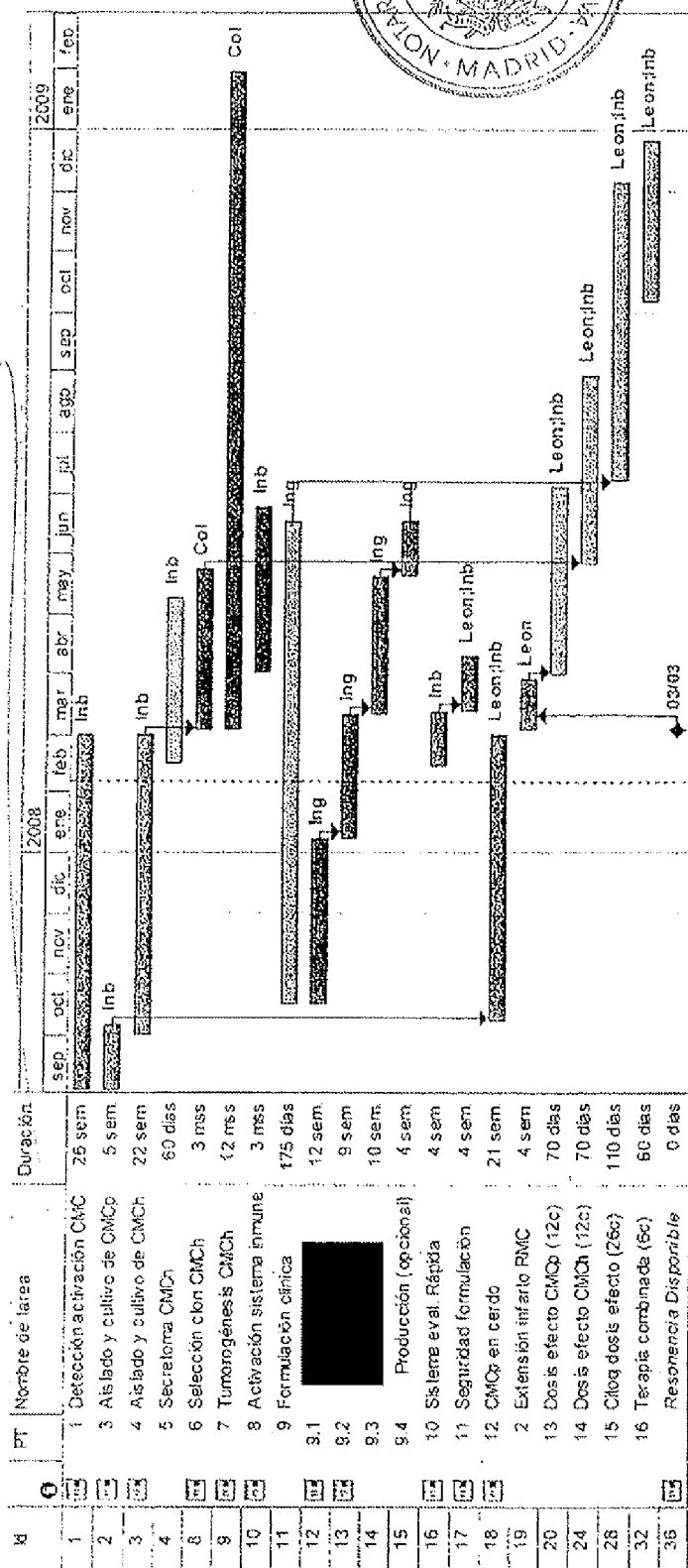
- [REDACTED]: 1 becario predoctoral, fungible, medios de cultivo.
- [REDACTED]: Acceso a animalario y personal experto en modelo animal.
- [REDACTED]: Formulación clínica cuando este disponible.

Una vez identificado el rango terapéutico más efectivo tanto para las células como para los factores se realizará un experimento con 6 animales administrando conjuntamente el protocolo óptimo celular y el protocolo óptimo de factores.

Se realizarán estudios de resonancia previamente a la intervención, en el post-operatorio, al día, a las cuatro y ocho semanas.

2.7.1 Cronograma Estimativo

2.7.1 Cronograma Estimativo



2.7.2 Presupuesto Estimativo para el Proyecto Coretherapix

La tabla al pie desglosa el presupuesto para llevar a cabo este proyecto desde Coretherapix separando el trabajo en I+D y las labores de Gestión. El presupuesto se desglosa en los trabajos ya desarrollados en 2007 y los de 2008.

Presupuesto Coretherapix				
Item	Notas	07-08	2.007	2.008
I+D				
PT1	Detección activación CMC	14.616	8.616	6.000
PT2	Extensión infarto RMC en PT12-PT16	0	0	0
PT3	Aislado y cultivo de CMCP	16.458	16.458	0
PT4	Aislado y cultivo de CMCh	20.000	0	20.000
PT5	Secretoma CMCh	50.000	0	50.000
PT6	Selección clon CMCh	25.276	0	25.276
PT7	Tumorigénesis CMCh	39.953	0	39.953
PT8	Activación sistema inmune	4.000	0	4.000
PT9	Formulación clínica	75.272	7.057	68.215
PT10	Sistema eval. Rápida	1.000	0	1.000
PT11	Seguridad formulación	12.744	0	12.744
PT12	CMCP en cerdo	113.796	18.000	95.796
PT13	Dosis efecto CMCP	82.152	0	82.152
PT14	Dosis efecto CMCh	93.557	0	93.557
PT15	Citoq dosis efecto	121.236	0	121.236
PT16	Terapia combinada	77.882	0	77.882
GESTION				
Internos Coretherapix				
Personal y gastos asociados				
IT & Material Oficina		2.189	81	2.108
Viajes				
Gestión ordinaria				
Gastos de Consultoría Externa				
Gastos financieros				
Servicios y Facturaciones Gtrix				
Servicios Genetrix				
Propiedad intelectual T.C.				
TOTALES				

12/2007

INVESTIGADORES PARTICIPANTES

Las instituciones y los equipos de investigadores que desarrollarán el proyecto se describen a continuación.

3.1.1

- a. [REDACTED] (investigador principal)
- b. [REDACTED]
- c. [REDACTED]
- d. [REDACTED]

3.1.2

[REDACTED] agrupa a dos equipos de profesionales de la [REDACTED] Departamento de Cardiología [REDACTED] Cardiólogo del [REDACTED] y que cuenta con amplia experiencia en experimentación animal especialmente en el terreno cardiovascular y en intervenciones por cateterismo a tórax cerrado. [REDACTED] pone a disposición del proyecto las siguientes instalaciones y un equipo compuesto por 8 personas entre cardiólogos, personal de enfermería y veterinarios.

Instalaciones:

- Quirófanos con el siguiente equipamiento:
 - o Mesas operatorias
 - o Anestesia inhaladora DRAGUER JULLAN
 - o Radioquirurgico CGR Road Fluorostact 9900
- Hospitalización de animales
- Laboratorio de histología y anatomía patológica.
- Servicio de análisis clínicos
- Servicio de microscopia electrónica
- Servicio de radiología (Resonancia Magnética, TAC - TOMOSCAN M, Ecografos)
- Granja de la Universidad (cerdos con elevado control sanitario).

Personal:

[REDACTED] (investigador principal), [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]: [REDACTED]
[REDACTED]

3.1.3

[REDACTED] es una empresa tecnológica de nueva creación enfocada en el desarrollo de soluciones de microfluidica y encapsulación. [REDACTED] desarrollará [REDACTED] según está descrito en el proyecto anexo al contrato entre [REDACTED] El equipo de [REDACTED] estará liderado por la [REDACTED] a, Directora de I+D.

Posibles Colaboradores Externos

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Los detalles de los trabajos a realizar por [REDACTED] están descritos en sendos contratos entre [REDACTED] y ambas instituciones.

[REDACTED]

121

19

**APLICACION ARANCEL DISPO. ADICIONAL 3ª
LEY 8/89**

Bases de cálculo: VALOR DECLARADO

Arancel Números: 2, 4, 7, Y 8ª

DERECHOS ARANCELARIOS: 349,19 €

ES PRIMERA COPIA exacta de su matriz donde queda anotada su expedición. La expido para LOS COMPARECIENTES SEGUN INTERVIENEN en veinticinco folios de papel timbrado del estado para documentos notariales, números 8O0606607, 8O0606608, 8O0606609, 8O0606610, 8O0606611, 8O0606612, 8O0606613, 8O0606614, 8O0606615, 8O0606616, 8O0606617, 8O0606618, 8O0606619, 8O0606620, 8O0606621, 8O0606622, 8O0606623, 8O0606624, 8O0606625, 8O0606626, 8O0606627, 8O0606628, 8O0606629, 8O0606630 y 8O0606631, el último para la consignación de notas por los registros y oficinas públicas que signo, firmo, rubrico y sello. En MADRID, el cuatro de marzo del dos mil ocho.
DOY FE. -----



800606631

12/2007



El presente folio se añade para la consignacion de notas, por los registros y oficinas publicas