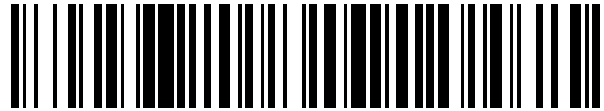


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 121**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10768844 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2488194**

54 Título: **Uso de una neuregulina para tratar una lesión nerviosa cavernosa**

30 Prioridad:

**16.10.2009 US 252161 P**  
**14.10.2009 US 251583 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.05.2016**

73 Titular/es:

**ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**420 Saw Mill River Road**  
**Ardsley, NY 10502, US**

72 Inventor/es:

**CAGGIANO, ANTHONY O.;**  
**BELLA, ANTHONY J. y**  
**IACI, JENNIFER F.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 569 121 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

### Descripción

Uso de una neuregulina para tratar una lesión nerviosa cavernosa

#### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a traumas o lesiones nerviosas. Más particularmente, al uso de una neuregulina o segmentos funcionales de la misma para prevenir, tratar o mejorar las lesiones de los nervios periféricos.

#### Antecedentes de la invención

10 Los nervios periféricos se lesionan con frecuencia con los traumas, tales como accidentes automovilísticos, accidentes de motocicleta, cirugías, heridas de cuchillos y proyectiles y lesiones en el parto tanto para los niños como para las madres. Las causas quirúrgicas comunes de las lesiones de los nervios incluyen la prostatectomía y la mastectomía. Otras lesiones comunes durante la cirugía son el resultado del posicionamiento de miembros a largo plazo o la inevitable o accidental compresión de los nervios. Después de una lesión de los nervios, hay una pérdida de la sensación y/o función en las regiones del cuerpo inervadas por el nervio dañado. Por ejemplo, después de una lesión nerviosa por prostatectomía, hay comúnmente disfunción eréctil. Después de la mastectomía, a menudo hay pérdida de la función correcta de la extremidad superior y/o escápula. Por otra parte, después de una lesión de nacimiento u otro trauma con daño al plexo braquial, hay una disfunción en la extremidad ipsilateral.

15 Cualquier terapia que pudiera impedir o limitar la extensión de la disfunción después de una lesión nerviosa tendría un impacto significativo en las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de las lesiones de los nervios periféricos. Hay una necesidad de terapias y tratamientos adicionales para las lesiones de los nervios periféricos.

#### Sumario de la invención

20 Las neuregulinas han sido implicadas en los efectos neuroprotectores y neurorestauradores de una variedad de modelos animales de enfermedades del sistema nervioso central y sus lesiones. Sin embargo, antes de la presente invención, las neuregulinas nunca se habían establecido como capaces de prevenir y/o tratar la lesión de los nervios periféricos. En consecuencia, la presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. También se describen en este documento métodos para tratar o mejorar la lesión de los nervios periféricos mediante la administración de neuregulina (por ejemplo, GGF2) o un segmento funcional de la misma a un sujeto que tiene una lesión de los nervios periféricos o está en riesgo de padecer una lesión de los nervios periféricos.

30 La presente invención demuestra que el tratamiento con neuregulina de las lesiones de los nervios periféricos puede atenuar la pérdida de la función del nervio periférico, mejorar o atenuar la pérdida de la función nerviosa periférica cuando se administra tanto antes como después de la lesión del nervio y, en algún caso, puede restaurar la función nerviosa periférica. En ciertas descripciones, se evita la lesión del nervio periférico. En ciertas descripciones, se elimina una lesión del nervio periférico existente. En ciertas descripciones, la lesión del nervio periférico no se elimina totalmente. En ciertas descripciones, la lesión del nervio periférico existente no se elimina totalmente.

35 El modelo de la disfunción eréctil en ratas se utiliza como un sistema in vivo para demostrar la eficacia de las neuregulinas en el tratamiento de la lesión del nervio periférico. En ciertos aspectos, la invención está dirigida a tratar la disfunción eréctil resultante de una lesión del nervio periférico, pero la presente invención no se limita sólo a la disfunción eréctil. La neuregulina puede ser eficaz como monoterapia para cualquier lesión del nervio periférico y no requiere el tratamiento conjunto con conductos o tratamientos conjuntos de los nervios naturales o artificiales con terapias celulares, tales como las células de Schwann.

40 Ciertas descripciones se dirigen a métodos para tratar las lesiones de los nervios periféricos, que comprende administrar una cantidad eficaz de la neuregulina a un sujeto que tiene una lesión de los nervios periféricos o un sujeto en riesgo de sufrir una lesión de los nervios periféricos. Ciertas descripciones se dirigen a métodos de profilaxis o prevención de lesiones de los nervios periféricos, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la neuregulina a un sujeto en riesgo de sufrir una lesión en los nervios periféricos. El término sujeto incluye mamíferos, y particularmente sujetos humanos.

45 En ciertas descripciones, la lesión del nervio periférico es consecuencia de un traumatismo incluyendo, sin limitación, accidentes automovilísticos, accidentes de motocicleta, cirugías, heridas y lesiones de cuchillos y proyectiles y en el parto. En ciertas descripciones, una lesión de los nervios periféricos es el resultado de una cirugía, tal como una prostatectomía, mastectomía o similares. En el contexto de esencialmente cualquier intervención quirúrgica, la lesión del nervio periférico puede ser el resultado directo de la disección del tejido, la resección del tejido y/o posterior a la colocación y/o compresión de extremidades. En una realización particular, la neuregulina se utiliza para tratar o prevenir la lesión del nervio periférico que daría lugar a la disfunción eréctil.

50 Otras descripciones están dirigidas al tratamiento de la disfunción eréctil que resulta de una lesión quirúrgica en los nervios periféricos relacionados con la función eréctil, tal como el nervio cavernoso y/o el nervio del pene. Las lesiones del nervio cavernoso se producen con frecuencia como resultado de la resección del cáncer de próstata; esta lesión puede causar disfunción eréctil (DE).

- Las intervenciones farmacéuticas actuales tratan el consiguiente déficit funcional resultante a una lesión al aumentar el flujo de sangre al cuerpo cavernoso para facilitar la erección del pene. Existen intervenciones de dispositivos médicos actuales que tratan el déficit funcional resultante de la lesión mediante el aumento del volumen del pene dando lugar a un estado similar a una erección del pene normal. Hay algunas desventajas para todas las intervenciones existentes que se utilizan para tratar la disfunción eréctil.
- La presente invención protege de forma aguda a los nervios en el momento de la lesión y/o mejora la recuperación del paciente por la disminución de la gravedad de cualquier déficit funcional.
- Un péptido de neuregulina 1 (GGF2) se ensayó en un modelo de aplastamiento bilateral en rata, que es un modelo aceptado de la lesión del nervio cavernoso; este modelo se ha utilizado para probar los fármacos Sildenafil y otros de la DE. Tal como se expone en el presente documento, el GGF2 mejoró los resultados funcionales cuando los nervios se electro-estimularon 5 semanas después de la lesión y se midió la presión inter-cavernosa (PIC).
- Ciertas descripciones están dirigidas al tratamiento con neuregulina de lesiones del nervio después de la mastectomía. Las lesiones de los nervios torácicos largos, intercostobraquiales y toracodorsales son comunes durante la mastectomía, aunque también pueden ser dañados otros nervios y la neuregulina se puede utilizar para prevenir o tratar tales lesiones. La neuregulina puede ser administrada antes y/o después de la mastectomía para proteger y restaurar la función nerviosa. Hay muchas medidas de uso comunes de la función de las extremidades superiores, incluyendo la fuerza, la sensibilidad, la amplitud del movimiento y los reflejos; siendo todos o algunos de los cuales apropiados para la determinación de la protección de la función nerviosa o la restauración. La presente invención se aplica igualmente a cualquier nervio lesionado en cualquier procedimiento médico o quirúrgico.
- Otras descripciones incluyen el tratamiento con neuregulina de lesiones nerviosas tras un traumatismo en el plexo braquial. La lesión del plexo braquial es un resultado común de un traumatismo contundente, trauma del nacimiento, accidente de tráfico, lesiones deportivas y que causa déficits motores y sensoriales de la extremidad afectada. La neuregulina puede administrarse a una persona con un plexo braquial para reducir el daño y restaurar la función del miembro. En situaciones que se prevén, tales como el parto, una composición de la invención se puede administrar profilácticamente. La función del miembro se puede medir por cualquier número de medidas neurológicas aceptadas de la función motora, la fuerza, la sensación, la amplitud de movimiento y/o los reflejos.
- Ciertos aspectos incluyen la administración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-10, 1-20, 10-20, 1-30, 1-40, 1-50, 10-20, 10-30, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 15-25, 15-40, 15-35, 15-50, 20-50, 20-40, 20-40, 25-35, 30-50, 30-60, 50-75, 50-100, 100, 1-100, 100-150, 150-200, 200, 1-200  $\mu\text{g}$  o  $\text{mg}$  del polipéptido de neuregulina o un péptido basado en la actividad de la neuregulina particular usada y el contexto médico como se aprecia por cualquier experto ordinario. Ciertos aspectos incluyen la administración de neuregulina antes y/o después de la cirugía.
- En ciertos aspectos, la neuregulina puede ser cualquier neuregulina de longitud completa codificada por los genes NRG1, 2, 3 ó 4. En un aspecto adicional, la neuregulina puede ser cualquier segmento funcional de un polipéptido de neuregulina. En ciertas realizaciones, el segmento funcional de la neuregulina contiene un dominio del tipo EGF.
- En ciertas realizaciones, la neuregulina puede ser cualquier péptido de los genes NRG1, 2, 3 ó 4 que se unen y activan los receptores erbB. En ciertas realizaciones, la neuregulina puede ser cualquier péptido modificado de un péptido tipo salvaje codificado por los genes NRG1, 2, 3 ó 4, de forma que el péptido modificado se una y active los receptores erbB.
- Las neuregulinas y los polipéptidos que contienen dominios similares a EGF de las neuregulinas pueden administrarse a sujetos con un diluyente farmacéuticamente aceptable, vehículo o excipiente, en forma de dosificación unitaria. La práctica farmacéutica convencional se puede emplear para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar tales composiciones a pacientes o animales de experimentación. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, por aerosol, oral o transdérmica o tópica (por ejemplo, mediante la aplicación de un dispositivo o un parche adhesivo que lleve una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo). Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.
- Por "neuregulina-1", "NRG-1" y "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB 1, 3 ó 4, y por el emparejamiento del receptor (dimerización) también a ErbB2. En una realización, la neuregulina es codificada por el gen del ligando p185erbB2 que se describe en las patentes de EE.UU. No. 5.530.109; 5.716.930; y 7.037.888.
- En una realización, la neuregulina es GGF2 o cualquier subsecuencia del mismo, o cualquier molécula que comprenda toda o una parte activa de la secuencia de GGF2.
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad eficaz" se pretende que signifique esa cantidad de neuregulina que provoca una respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico.

5 Un cambio terapéutico es un cambio en una característica bioquímica o fisiológica medida en una dirección que alivie la enfermedad o condición tratada, por ejemplo, una lesión de un nervio periférico. Más particularmente, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente que disminuya los síntomas asociados con una afección médica o enfermedad, para normalizar las funciones del cuerpo en la enfermedad o trastornos que resultan en la alteración de las funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejora en uno o más de los parámetros clínicamente medidos de una enfermedad o condición.

10 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solamente o cuando las alternativas sean mutuamente excluyentes. También se contempla que cualquier cosa que aparezca bajo el uso del término "o" también puede ser excluida específicamente de las otras opciones que se exponen.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que el valor está dentro de 85%, 90%, 95% o la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes desde hace mucho tiempo, las palabras "un" y "una", en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, denota uno o más, a menos que se indique específicamente.

15 En ciertas realizaciones de acuerdo con la invención, la neuregulina se utiliza profilácticamente previniendo o reduciendo mediante ello una lesión potencial.

En ciertas realizaciones de acuerdo con la invención, la neuregulina se utiliza terapéuticamente con el fin de afectar a una condición de alguna manera que disminuya o elimine un síntoma o signo de la afección o enfermedad que se está tratando.

20 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

Breve descripción de los dibujos

25 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente descripción. La invención puede entenderse mejor por referencia a alguno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

Figura. 1: Datos de cambio medio de la PIC.

Figura. 2: Datos normalizados respecto a las presiones aórticas.

30 Figura. 3: Marcaje fluoro-oro representativo de los ganglios pélvicos principales (GPP) a partir de 3 animales por grupo de tratamiento ((grupo A) normal (grupo B) aplastamiento, (grupo C) aplastamiento + GGF2). El fluoro-oro inyectado en el tejido del pene se transporta de forma retrógrada hacia atrás a través de los nervios intactos a los cuerpos celulares en el GPP. Grupo A: Los animales normales muestran la cantidad de marcaje retrógrado observado en ausencia de lesión del nervio. Grupo B: Los animales que han sufrido aplastamiento muestran una drástica reducción en las fibras nerviosas intactas de la lesión, ya que el marcador de fluoro-oro no es capaz de transportar todo el camino de vuelta al GPP. Grupo C: Los animales que han sufrido aplastamiento + GGF2 muestran un aumento del número de células GPP marcadas con fluoro-oro, lo que indica que hay más fibras nerviosas preservadas presentes después de una lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

40 Figura. 4: Cuantificación del marcaje con fluoro-oro en el GPP. Los resultados mostraron que los animales normales tenían un gran número de marcajes de cuerpos celulares en el GPP. Después de una lesión por aplastamiento el número de células marcadas se reduce drásticamente, como consecuencia de los daños de las fibras nerviosas y la incapacidad resultante de transportar retrógradamente el marcador de nuevo al GPP. Sin embargo, el tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro del tejido del pene al GPP de una manera retrógrada, lo que resultó en un mayor número de células marcadas.

45 Figura. 5: Tinción representativa de los niveles de nNOS. El nNOS cavernoso es un marcador bien conocido de la preservación del nervio cavernoso. Los resultados de este trabajo incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A). En comparación, hubo una pérdida significativa de la tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). La tinción de nNOS preservada de terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene mostró un aumento de las tasas de supervivencia de los nervios cavernosos tras la lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (grupo C). La densidad de tinción indica la conservación de la tinción de nNOS con el tratamiento de GGF2.

50 Figura. 6: Tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados en esta figura muestran en el grupo A la tinción de tejidos normales y en el grupo B una pérdida significativa de la tinción de TH después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso. El grupo C muestra la tinción preservada de TH de las terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene; este hallazgo se corresponde con una conservación

general o restablecimiento de la inervación del pene después de la lesión por aplastamiento que se produce por el tratamiento con GGF2. Por lo tanto, la densidad de tinción indica la preservación de la tinción con TH con el tratamiento de GGF2.

5 Figura. 7: Tinción representativa del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Los resultados muestran la tinción de tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción de VACHT después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). Por el contrario, la tinción preservada con VACHT de las terminaciones del nervio cavernoso en el cuerpo del pene mostrada en el (panel C) muestra que las tasas de supervivencia de los nervios cavernosos aumentan después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la preservación de la tinción con VACHT con el  
10 tratamiento de GGF2.

Descripción detallada de la invención

15 La lesión de los nervios periféricos es el resultado común de varios eventos, compresión, contusión, transacción, aplastamiento o estiramiento, causados, por ejemplo, por un traumatismo, un accidente o una cirugía. Aunque los factores externos que conducen a la lesión del nervio son variados, las manifestaciones a nivel del nervio tienen características comunes (para una revisión, véase, por ejemplo, Lee y Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8 (4), p. 243, 2008). Las lesiones traumáticas de cualquier etiología a menudo causan daño a la mielinización, epineuro, perineuro, endoneuro y a los axones. En los casos más favorables, la lesión se produce principalmente en la mielina y el epineurio, después de la cual se produce la recuperación completa espontáneamente a los varios días o semanas.

20 Muchas de las lesiones nerviosas, sin embargo, resultan en un daño al endoneuro y a los axones y dan lugar a una alteración de la función que no se recupera totalmente o se recupera en un período prolongado de tiempo.

25 Por otra parte, con una lesión del nervio periférico que involucre el daño de un axón, hay degeneración local de ese axón que se produce unas horas después de la lesión. En los siguientes días, el cuerpo celular de la neurona proximal y el axón sufren un proceso conocido como degeneración walleriana. Después de la degeneración del axón, las células de Schwann productoras de mielina mueren dejando restos y una inflamación. Esta muerte de las células de Schwann y la inflamación relacionada agravan el daño al nervio.

30 A diferencia del sistema nervioso central, puede producirse una cantidad significativa de regeneración en los nervios periféricos. Los axones crecen a lo largo de los canales del perineuro y re-inervan objetivos distales y las células de Schwann re-mielinizan los axones. Aunque haya regeneración de los nervios periféricos, por desgracia, este proceso no es perfecto; muchas neuronas que sufren degeneración nunca se regeneran o nunca encuentran su objetivo original y ocurre una disfunción o disfunciones permanentes. Esta disfunción puede comprender la pérdida de la función motora, la pérdida de la función sensorial, parestesias, la pérdida de reflejos, rigidez, contracturas o disminución del rango de movimiento.

35 Cualquier terapia que pudiera limitar el alcance de la disfunción después de una lesión del nervio tendría un impacto significativo en las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de las lesiones de los nervios periféricos.

Varias publicaciones demuestran que las neuregulinas mejoran la capacidad de que las neuronas se regeneren a través de conductos artificiales y funcionan como un tratamiento adyuvante con terapias celulares tales como los injertos de células de Schwann. Antes de la presente invención, no se sabía que las neuregulinas solas podían tratar, tal como mediante la protección y/o la restauración de la función, en la lesión del nervio periférico

40 El modelo empleado en estos estudios (modelo de disfunción eréctil en rata) es un modelo estándar, aceptado y bien publicitado de la lesión del nervio periférico. En este enfoque específico, el nervio cavernoso se lesiona por la compresión con fórceps. La misma lesión por compresión o aplastamiento puede ser utilizada como modelo en cualquier otro nervio periférico. En el modelo de lesión del nervio cavernoso, el déficit funcional está en la función eréctil. En vista de la fisiopatología común y consistente de la lesión nerviosa traumática, dicha lesión del nervio  
45 cavernoso es un excelente modelo para la lesión inducida por prostatectomía, así como un modelo general para todas las lesiones nerviosas periféricas traumáticas.

50 Las lesiones en los nervios periféricos inducen cambios dentro de los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales localizadas en el ganglio de la raíz dorsal (GRD); estos cambios promueven la supervivencia y la regeneración axonal. En condiciones favorables, por ejemplo, después de una lesión por aplastamiento, la mayoría de las fibras nerviosas se regeneran con éxito. Sin embargo, en muchas circunstancias clínicamente relevantes, la lesión traumática de los nervios o inducida por una enfermedad tiene un mal resultado con sólo una vuelta moderada de la función y, a menudo, con un retraso considerable. En tales casos, se pueden desarrollar estados de dolor neuropático o crónico.

55 El dolor se asocia normalmente con una lesión o daño del nervio sensorial y da como resultado la protección e inmovilización de la zona afectada. La nocicepción (la señalización neuronal que subyace a la sensación de dolor), por lo tanto, es concomitante a los mecanismos para la promoción de una curación rápida, aunque activen una

experiencia sensorial y emocional desagradable. Sin embargo, en muchas situaciones patológicas, las entradas nociceptivas pueden resultar en cambios funcionales que son activamente perjudiciales para el organismo.

5 La lesión del nervio causa la alteración de muchas de las propiedades de las neuronas aferentes primarias y de sus conexiones centrales en la médula espinal, que conducen a la alodinia (la percepción del dolor de un estímulo normalmente inocuo), hiperalgesia (una respuesta exagerada a cualquier estímulo doloroso dado) y una expansión del campo receptivo (es decir, el área que es "dolorosa" cuando se aplica un estímulo). La mayoría de las condiciones de dolor crónico surgen como resultado del daño tanto al tejido nervioso central como al periférico.

#### Disfunción eréctil

10 La impotencia, o también conocida como disfunción eréctil (DE), es un problema común que afecta a 20 millones de hombres en los Estados Unidos solamente. La erección del pene es un fenómeno neurovascular que depende tanto de la integridad neuronal como de los vasos sanguíneos funcionales. Tras la estimulación sexual, se liberan neurotransmisores (especialmente el óxido nítrico) de los terminales de los nervios cavernosos y de las células endoteliales. La relajación resultante de los músculos lisos de arterias y arteriolas aumenta el flujo arterial. La sangre atrapada dentro de los cuerpos cavernosos del pene lleva a un estado de erección.

15 La lesión del nervio cavernoso por cirugías pélvicas radicales, tales como para el cáncer de próstata, de vejiga o del recto, es una de las causas más comunes de la disfunción eréctil iatrogénica en este país. La DE es una fuente importante de morbilidad después de la prostatectomía radical. Por ejemplo, a pesar de la introducción de técnicas quirúrgicas para preservar los nervios, las tasas de potencia postoperatorias están en el intervalo del 30% y el 80% de los hombres que han sido sometidos a procedimientos de conservación del nervio cavernoso bilateral para el  
20 cáncer de próstata órgano-confinado (Wang, J Sex Med, 4: 1085-97, 2007).

Varias estrategias neuromoduladoras se han investigado hasta la fecha; sin embargo, no existen tratamientos disponibles, ya sea para la neuroprotección de los nervios cavernosos antes o en el momento de la lesión, o  
25 tratamientos después de la lesión para provocar la regeneración del nervio (Michel et al, J Urol. 176: 227-31, 2006; Burnett y Lue, J Urol 176: 882-7, 2006). A pesar de las modificaciones actuales para preservar los nervios frente a los tratamientos quirúrgicos y de radiación para tumores malignos de la pelvis hay una necesidad de nuevos medios para preservar y restaurar la función eréctil después del tratamiento.

30 Se observa un patrón bien definido de cambios celulares distales al sitio del daño, progresando desde la degeneración axonal y de la vaina de mielina, la invasión de macrófagos, la fagocitosis y la desdiferenciación de células de Schwann a la formación de bandas de Bungner. Estos cambios modifican el entorno del nervio lesionado y su potencial para la regeneración de los axones. La supervivencia neuronal se ve facilitada por factores tróficos, cuando los axones pasan de un modo de 'transmisión' a un modo de crecimiento, expresando proteínas (GAP-43, tubulina, actina), nuevos neuropéptidos y citoquinas. Nuevas estrategias de mejora del potencial de crecimiento son necesarias como soporte del muñón del nervio distal y la capacidad neuronal para regenerar no es indefinida (Fu y Gordon, Mol Neurobiol. 14: 67-116, 1997)

#### 35 Neuregulinas

Por "neuregulina", "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB1, ErbB 3 o ErbB 4 y por emparejamiento (dimerización) al receptor ErbB2. Por ejemplo, una neuregulina puede ser codificada por el gen del ligando p185erbB2 descrito en las patentes de EE.UU. No. 5.530.109; 5.716.930; y 7.037.888.

40 También puede ser codificada una neuregulina por los genes NRG-2, 3 y 4. La neuregulina puede ser GGF2 o cualquier fragmento activo del mismo; también puede ser una variante conservadora de GGF2 o una molécula que comprenda GGF2. En un cierto uso en la técnica, el término "neuregulina" está destinado a indicar solamente un dominio tipo EGF de una molécula de neuregulina completa; esto también se conoce como una proteína, péptido o polipéptido "tipo neuregulina".

45 Por proteína, péptido o polipéptido "tipo neuregulina" se entiende un polipéptido que posee un dominio del tipo EGF codificado por un gen de neuregulina. En una realización, una proteína, péptido o polipéptido "tipo neuregulina" produce un efecto terapéutico en un sujeto que tiene una lesión de los nervios periféricos o uno en riesgo de lesión del nervio periférico (por ejemplo, pacientes programados para cirugía o parto de tal manera que existe un riesgo de una lesión en los nervios periféricos relacionados).

50 La secuencia de aminoácidos de GGF2 (con una región que comprende su dominio del tipo EGF subrayado) es:

MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLLLLLGTAAALAPGAAAGNEAAPA  
 GASVCYSSPPSVGVSQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQGGALDRKAAAAAGEAGAWG  
 GDREPPAAGPRALGPPAEELLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPYLKVVHQVW  
 AVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHAPFSPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTRAPAAFRA  
 SFPPLETGRNLKKEVSRVLCKRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF  
 KWFKNGNELNRKNKPQNIQKPKGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKLGNDSSASA  
 NITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFT  
GDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID NO: 1) (Número de entrada del GenBank AAB59622)

En ciertos aspectos de la invención, un polipéptido de neuregulina o segmento del mismo es 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntico u homólogo a la secuencia de aminoácidos de GGF2. En ciertos aspectos de la invención, un polipéptido tipo neuregulina es 75, 80, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntico u homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio tipo EGF de GGF2.

Como se usa en el presente documento, una "proteína" o un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos diez residuos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, la proteína comprende la totalidad o parte del polipéptido GGF2. En algunas realizaciones, se emplea una versión tipo salvaje de una proteína o polipéptido, sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, se emplea una proteína modificada o polipéptido para tratar la lesión del nervio periférico. Los términos "péptido", "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento. Por conveniencia, el término péptido se utiliza en el presente documento para referirse a secuencias de aminoácidos de cualquier longitud.

Un "péptido modificado" se refiere a un péptido cuya estructura química, en particular su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto al péptido tipo salvaje respectivo. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un aminoácido modificado. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un D-aminoácido. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un aminoácido de origen no natural.

Sin limitación, en ciertas realizaciones, el tamaño de un péptido (de tipo salvaje o modificado) puede comprender cualquiera de (o cualquier intervalo derivable desde): 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 422, moléculas de aminoácidos o más, y cualquier intervalo derivable en el mismo, de una secuencia de amino correspondiente descrita o referida en el presente documento; en una realización tales proteína, polipéptido o rango de tamaño es relativo a GGF2. Se contempla que los polipéptidos pueden mutarse por truncamiento del amino terminal o carboxi terminal, haciéndolos más cortos que su forma tipo salvaje correspondiente, sino que también pueden ser alterados fusionando o conjugando una secuencia de proteínas heterólogas con una función particular (por ejemplo, para la orientación o localización, para propósitos de purificación, etc.).

Como se usa en este documento, una "molécula de ácido amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o mimético de aminoácido conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, los restos de la molécula de péptido son secuenciales, sin que ninguna molécula no-amino interrumpa la secuencia de restos de amino de la molécula. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de molécula no amino. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la molécula de péptido puede estar interrumpida por uno o más restos de molécula no amino.

Por consiguiente, la expresión "composición de péptido" comprende secuencias de aminoácidos; estos aminoácidos pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos comunes en las proteínas sintetizadas de forma natural o cualquier aminoácido modificado o inusual.

Las composiciones de péptidos se pueden preparar por cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo (i) la expresión de péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, (ii) el aislamiento de compuestos peptídicos a partir de fuentes naturales o (iii) la síntesis química. El nucleótido, así como las secuencias de péptidos de determinados genes de neuregulina se han descrito anteriormente, y se pueden encontrar en bases de datos informatizadas reconocidas. Uno de estas bases de datos es la base de datos GenBank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en Internet en [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)). Las regiones codificantes de estos genes pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas descritas en el presente documento o técnicas tales como serían conocidas por los expertos normales en la técnica.

Los péptidos modificados pueden incluir variantes de sustitución, inserción o delección. Las variantes de delección típicamente carecen de uno o más residuos de la molécula de tipo salvaje o nativa. Los residuos individuales se pueden eliminar o un número de aminoácidos contiguos se pueden eliminar. Un codón de parada se puede introducir (por sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico que codifica para generar una proteína truncada. Los mutantes por inserción implican típicamente la adición de material en un punto no terminal en el

péptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos. También se pueden generar adiciones terminales, a menudo llamadas proteínas de fusión o péptidos de fusión. Las variantes de sustitución típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro del péptido y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del péptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades, tales como la unión y la activación de receptores de neuregulina. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se sustituye con otro de forma y carga similar. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras de tal manera que pueda estar afectada una función o actividad del péptido. Los cambios no conservadores implican típicamente la sustitución de un residuo con otro que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado con un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.

Las "sustituciones conservadoras" son bien conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, por ejemplo, las sustituciones de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina o leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos C- o N-terminales adicionales, o secuencias 5' o 3', respectivamente, siempre que la secuencia cumpla los criterios funcionales establecidos en este documento, tales como el mantenimiento de la actividad biológica. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes flanqueantes tanto de las porciones 5' como 3' de la región de codificación.

#### Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de un péptido disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a composiciones que generalmente no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, a un ser humano, según sea apropiado. La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, como se ejemplifica por Remington Pharmaceutical Sciences, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para fines de administración en seres humanos se entenderá que las preparaciones deben cumplir con esterilidad, pirogénesis, seguridad general y pureza como se requiere, por ejemplo, en la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Por otra parte, como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye materiales tales como disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como es conocido para cualquier experto ordinario en la técnica a la vista de la presente descripción. Excepto en el caso de que algún portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Los compuestos farmacéuticos de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol y si necesita ser estéril para tales vías de administración como la inyección. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, por vía intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravascularmente, por vía mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, vía oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, aerosol). Además, la presente invención se puede administrar mediante inyección, infusión, infusión continua, baño de perfusión directamente a células diana, a través de un catéter, a través de un lavado, o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como será conocido por cualquier experto ordinario en la técnica.

La cantidad de dosificación efectiva de una composición de la presente invención administrada a un sujeto puede ser determinada por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la condición, el tipo de enfermedad a tratar, las intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la idiopatía del paciente y de la vía de administración. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determina la concentración del ingrediente o de los ingredientes activos en una composición adecuada y la dosis o las dosis para el sujeto individual.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos el compuesto activo a aproximadamente 0,1%. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% y aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% y aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50



microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, hasta aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En los ejemplos no limitativos de un intervalo derivable de los números que aparecen en el presente documento, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente de 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., se puede administrar, en base a los números descritos anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por conservantes tales como varios agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero no limitados a los parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

Los productos farmacéuticos se pueden formular en una composición en una forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición de péptido, o las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. También se pueden derivar de bases inorgánicas las sales formadas con los grupos carboxilo libres tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las que la composición está en una forma líquida, el vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprenda, pero no limitado a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; por el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de tales métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, las composiciones se preparan para su administración por vías tales como la ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina cubiertas duras o blandas), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Los vehículos preferidos para la administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral se puede preparar como un jarabe o un elixir. Un jarabe o elixir, y pueden comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un colorante, un conservante o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones preferidas, la composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o sus combinaciones; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, tal como, por ejemplo menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, aroma de naranja, etc.; o combinaciones de los mismos de los anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como revestimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas pueden revestirse con goma laca, azúcar o ambos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, opcionalmente, con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, cuando se requiera, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío o liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a

partir de un medio líquido previamente filtrado para la esterilización del mismo. El medio líquido debe estar adecuadamente tamponado si es necesario y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para la inyección directa, en la que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, entregando altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área.

Preferiblemente, la composición de la invención es estable bajo condiciones estándar de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación de endotoxina debería mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos que 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable puede ser provocada por las composiciones de la invención que comprenden agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Modelo de rata de lesión del nervio cavernoso

El modelo de rata de lesión del nervio cavernoso normalmente utiliza la siguiente metodología. Las ratas se anestesian con isoflurano. Los animales se colocan en una almohadilla caliente para mantener la temperatura corporal a 37°C. El abdomen se afeita y se frota con una solución antiséptica de Clinidin (povidona yodada). Se hace una abertura abdominal en la línea media inferior de la cavidad peritoneal, mostrando ambos nervios cavernosos y ganglio pélvico mayor (GPP). La lesión del nervio cavernoso es inducida por aplastamiento del nervio cavernoso con una pinza hemostática durante dos minutos por cada lado. En los estudios relacionados con la neuregulina, dos grupos de neuregulina fueron tratados 48 horas antes de la lesión.

El modelo de rata por aplastamiento proporciona una disminución simple, reproducible y extremadamente fiable de la función eréctil. Esta técnica se utiliza ampliamente y varios estudios han sido publicados usando esta técnica. No hay necesidad de probar la función eréctil después de la lesión por aplastamiento; la disminución de la función eréctil es predecible y, por lo general, se llevan a cabo pruebas funcionales en aproximadamente 5 semanas después de producir la lesión por aplastamiento.

Después de la lesión en el nervio cavernoso, la cavidad abdominal se cierra en dos capas con re aproximación de los músculos abdominales y la fascia (sutura absorbible) a través de 2-3 suturas interrumpidas. La piel se cierra con una sutura continua subcuticular (enterrada) para la piel con un material de sutura transpirable (PDS o vicrilo revestido). Se les da de forma preventiva el analgésico Buprenorfina (10 minutos antes de poner fin al procedimiento) y cada 6-12 horas después de la operación durante 48 horas para controlar el dolor.

A las 5 semanas después de la operación, las ratas se anestesian con ketamina (100 mg/kg IP) y xilazina (5 mg/kg). La crura cavernosa se expone a través de la misma incisión y se llevan a cabo estudios funcionales utilizando una aguja 23G insertada en la crura izquierda y se conecta a un programa de software diseñado específicamente para medir presiones intracavernosas. Antes de la medición, los nervios cavernosos se estimulan con un electrodo a 1,5 mA. La duración del procedimiento de medición es de aproximadamente 15 minutos. Las ratas se sacrifican con eutanil-intercardiaco antes de la recuperación anestésica y los tejidos (nervios cavernosos, GPP, pene, próstata) se recuperan para realizar la microscopía por luz y las evaluaciones moleculares e histológicas.

Tal como se presenta en las presiones intracavernosa (PIC), datos mostrados en la figura 1, la electroestimulación de los nervios cavernosos 5 semanas después de la lesión mostró una conservación significativa de la función nerviosa y de los órganos diana a través de ambos grupos tratados con neuregulina y esto fue aún más significativo a dosis más altas. Los datos se analizaron por primera vez por medidas ANOVA no repetidas con la prueba t de Bonferroni y el significado fue considerado a  $p < 0,05$ . Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los cambios también se mejoraron significativamente cuando se normalizaron con las presiones aórticas como se muestra en la figura 2.

Desde un punto de vista histológico, los datos indican que el tratamiento con NRG aumentaba el número de fibras nerviosas intactas basado en el marcaje transportado retrógradamente del fluoro-oro en el GPP y mejoraba la conservación de la óxido nítrico sintasa neuronal y el VAcHT de los tejidos nerviosos y del músculo liso del pene. Esto indica que son mecanismos de acción neuroprotectores y/o neuroregeneradores. La apoptosis del músculo liso también disminuyó en comparación con los animales con lesión por aplastamiento que no recibieron ninguna neuregulina.

Ejemplo 2: Métodos de histología de Fluoro-Oro

Para llevar a cabo este protocolo, se llevó a cabo la inyección intracorporal de fluoro-oro al 4%, y en una semana, se recogieron los tejidos de los ganglios pélvicos principales (GPP) y se fijaron en paraformaldehído al 4%, tampón fosfato 0,1 M, se fijaron durante la noche y luego se colocaron en 20% de sacarosa. El crioseccionamiento fue de 20

µm de espesor. Las imágenes fueron tomadas usando un sistema de visualización y una cámara Infinity, seguido del análisis ciego de los recuentos de las células mejoradas con fluoro-oro. Después de esto, se seleccionaron al azar portaobjetos de muestras de GPP (10 por animal) y se llevaron a cabo recuentos de células para determinar el número de neuronas intactas. (Véase, por ejemplo, Dail, WG, Trujillo, D., de la Rosa, D. y Walton, G.: "Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat". *Anat Rec*, 224: 94, 1989; Laurikainen A, Hiltunen J O, S Vanhatalo, Klinge E, Saarma M: "Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves" (*Cell Tissue Res* 2000, 302: 321-9).

Por lo tanto, se trataba de un protocolo de rastreo retrógrado utilizando fluoro-oro. Los resultados de este protocolo presentaron información que indicaba que el tratamiento con neuregulina ayudaba a la regeneración y a la proyección de su objetivo (los cuerpos cavernosos del pene) y/o a la neuroprotección de los nervios cavernosos.

Por consiguiente, se inyectó fluoro-oro en un órgano diana; en este caso, los cuerpos cavernosos del pene. A partir de entonces, se produjo la absorción de los terminales nerviosos del órgano final. Esta captación indica que las fibras nerviosas fueron conservadas y/o se convirtieron en el área inyectada. Una vez que hay absorción de fluoro-oro, el fluoro-oro se transporta de una manera retrógrada al axón del nervio y el marcador acumulado a las neuronas originales del GPP (ganglio pélvico principal).

La figura 3 muestra el marcaje de fluoro-oro representativo de los ganglios pélvicos principales (GPP) a partir de 3 animales por grupo de tratamiento ((grupo A) normal (grupo B) por aplastamiento, (grupo C) por aplastamiento + GGF2). Los animales normales (grupo A) muestran la cantidad de marcado retrógrado observada en ausencia de lesión del nervio. Los animales por aplastamiento (grupo B) muestran una drástica reducción en las fibras nerviosas intactas de la lesión, ya que el marcador de fluoro-oro no es capaz de transportar todo el camino de vuelta al GPP. Los animales por aplastamiento + GGF2 (grupo C) muestran un mayor número de células GPP marcadas con fluoro-oro, lo que indica que hay más fibras nerviosas conservadas presentes después de una lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

La figura 4 proporciona una cuantificación de marcaje con fluoro-oro en el GPP. Los animales normales tienen un gran número de cuerpos celulares marcados en el GPP. Después de una lesión por aplastamiento, el número de células marcadas se reduce drásticamente, como consecuencia de los daños de las fibras nerviosas y la incapacidad resultante de transportar retrógradamente el marcador de nuevo al GPP. El tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro del tejido del pene al GPP de una manera retrógrada, lo que resultaba en un mayor número de células marcadas.

### Ejemplo 3: Inmunohistoquímica

Se tiñeron criosecciones longitudinales de la parte proximal de los cuerpos para nNOS, VACHT. Todos los lavados se realizaron con tampón Tris que contenía 1% de Triton-X. Se bloquearon los tejidos 1 h con 5% de suero de cabra normal y después se incubaron durante la noche a 4°C con, respectivamente:

- a) nNOS (Sigma; 1/1000) o
- b) VACHT (Abcam; 1/150) o
- c) TH (Millipore; 1/5000).

Después de varios lavados, las secciones se incubaron durante 1 h en HRP de cabra anti-conejo y anti-cabra de burro (1/1000) y luego en una solución de DAB que contenía 0,2% de sulfato de amonio y níquel y peróxido de hidrógeno al 0,03% durante 10 min. Después del último lavado, las secciones fueron deshidratadas, despejadas en xileno y tapadas con cubreobjetos en Permount (Fisher Scientific).

### Tinción con nNOS:

El óxido nítrico (NO) liberado de las placas terminales axonales de los nervios cavernosos dentro de los cuerpos cavernosos, junto con el NO endotelial, provoca la relajación del músculo liso, iniciando cambios hemodinámicos de la erección del pene, así como contribuyendo a una tumescencia mantenida. Se entiende actualmente que el retorno a la potencia después de la lesión a los nervios cavernosos es dependiente, al menos en parte, de la regeneración axonal en los tejidos neurales restantes y de si es exitosa la re-inervación funcional del órgano objetivo (permitiendo la activación neuronal por NO). Son observados cambios patobiológicos bien definidos en estudios con modelos animales de pene después de un compromiso del nervio cavernoso. Estos cambios patobiológicos pueden variar desde neuropraxia al daño axonal letal y pueden incluir la apoptosis del músculo liso, la apoptosis del endotelio, la reducción de la densidad de los nervios de la óxido nítrico sintasa (NOS), la sobre-regulación de las citoquinas fibroproliferativas tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), la fibrosis del músculo liso o pérdida, o respuestas de señalización patobiológicas tales como la alteración de la proteína Sonic hedgehog.

Además, una ausencia crónica de la erección siguiente a una neuroapraxia nerviosa cavernosa durante la fase de recuperación prolongada se cree que acentúa el potencial de un mayor deterioro estructural del músculo liso

cavernoso debido a un fallo de la ciclación cavernosa normal entre los estados flácido y erecto (Bella AJ, Lin G, Fandel TM, Hickling DR, Morash C, Lue T F., "Nerve growth factor modulation of the cavernous nerve response to injury". *J Sex Med* 6 Suppl 3: 347-352, 2009).

5 El nNOS cavernoso es un marcador bien establecido de la conservación del nervio cavernoso. (Véase, por ejemplo, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full>) Los resultados de este protocolo indicaron un efecto neuroregenerativo y/o neuroprotector después de la lesión del nervio cavernoso bilateral en rata producida de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

10 Los resultados de la densidad de tinción (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionados al azar, observador ciego, basado en 5 animales por grupo) indicaron la conservación de la tinción con nNOS para sujetos tratados con neuregulina.

15 La figura 5 proporciona una tinción representativa de los niveles de nNOS. La densidad de tinción indica la presencia de nNOS. Los resultados de este trabajo incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A). En comparación, hay una pérdida significativa de la tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). La tinción con nNOS conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas del pene en el corpus muestra tasas mayores de supervivencia y/o la regeneración de los nervios cavernosos después de la lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (grupo C). La densidad de la tinción indica la conservación de la tinción de nNOS con el tratamiento de GGF2.

Tinción vesicular del transportador de acetilcolina (VACHT):

20 Las neuronas del ganglio pélvico que inervan el pene expresan marcadores nNOS y colinérgicos, mientras que la inervación simpática noradrenérgica del pene surge en gran medida a través de la cadena simpática y no atraviesa los nervios del pene o el ganglio pélvico. Los resultados de este protocolo proporcionaron información que indicaba que el tratamiento con neuregulina ayudaba a la regeneración y re-proyección en su diana (los cuerpos cavernosos del pene) y/o la neuroprotección de los nervios cavernosos en base a la tinción intracorporal para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Aunque la etiología de la disfunción eréctil primaria posquirúrgica es neurogénica, los estudios en roedores han revelado que también ocurren cambios morfológicos y funcionales dentro del tejido cavernoso del pene después de una lesión nerviosa. (Véase, por ejemplo, Keast J R. "Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation". *Int Rev Cytol* 2006; 248: 141-208; Andersson K E, P Hedlund, Alm P. "Sympathetic pathways and adrenergic innervation of the penis". *Int J Impot Res* 2000; 12: 55-12; Mulhall J M, Bella A J, Briganti A, McCullough A, G. Brock, *Erectile Function Rehabilitation in the Radical Prostatectomy Patient*, *J Sex Med* 7 (4), 1687-1698, 2010).

30 Los resultados de la densidad de tinción (secciones corporales proximales representativas, 5 diapositivas seleccionadas al azar, observador ciego, basado en 5 animales por grupo) indicaron la conservación de la tinción de VACHT en ratas que recibieron el GGF2.

35 La figura 7 proporciona la tinción inmunohistoquímica representante del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). La densidad de tinción indica la presencia de VACHT. Los resultados incluyen la tinción de los tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción VACHT después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). Por el contrario, la tinción con VACHT conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas en los cuerpos cavernosos del pene mostrada en el grupo C mostró un aumento de las tasas de supervivencia y/o de la regeneración de los nervios cavernosos después de una lesión por aplastamiento tratados con el tratamiento GGF2 (grupo C). La densidad de tinción indica la conservación de la tinción VACHT con el tratamiento de GGF2.

Tinción con TH:

45 El TH es un marcador de las fibras nerviosas adrenérgicas y se usa para apoyar la conservación de los nervios en el corpus. La porción proximal del corpus fue crio-seccionada longitudinalmente y se tiñeron con anticuerpos primarios dirigidos contra el marcador de la síntesis de catecolaminas, la tirosina hidroxilasa ("Impaired Cavernous Reinnervation after Penile Nerve Injury in Rats with Features of the Metabolic Syndrome", Matthew R. Nangle, BSc, PhD, Joseph Proietto, MBBS, PhD, y Janet R. Keast, BSc, PhD *J Sex Med* 2009; 6: 3.032 a 3.044).

50 Los resultados de la densidad de tinción indican la presencia de TH. Los resultados de la densidad de tinción de hecho logrados (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionadas al azar, observador ciego, basado en 5 animales por grupo) indican la conservación de la tinción de TH en animales tratados con GGF2. La Figura 6 proporciona la tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción de TH después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). El grupo C muestra una tinción de TH conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas del pene en el corpus que mejor corresponde a un aumento general en la conservación de la inervación del pene después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (grupo C). La densidad de tinción muestra tendencias hacia la conservación de la tinción con TH con el tratamiento de GGF2.

La figura 6 proporciona una tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción de TH después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). El panel C muestra la tinción de TH conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas del pene en el corpus mejor corresponde a un aumento general en la conservación de la inervación del pene después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento GGF2 (grupo C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la conservación de la tinción con TH con el tratamiento de GGF2.

#### Ejemplo 4: Realizaciones alternativas

La lesión nerviosa periférica puede ocurrir en casi cualquier contexto quirúrgico. La probabilidad de que la lesión del nervio se correlaciona con la localización y la extensión de la disección de los tejidos en cualquier cirugía. Por ejemplo, la cirugía de mastectomía tiene complicaciones frecuentes que resultan de la lesión del nervio periférico, incluyendo entumecimiento de la axila y el brazo (por ejemplo, el daño de la lesión del nervio intercostobraquial), el aleteo de la escápula (el daño por la lesión del nervio torácico largo), la parálisis del músculo dorsal ancho (lesión a la lesión del nervio toracodorsal). (Véase Watt-Boolsen et al., 1988; Aitken y Minton, 1983).

En consecuencia, la neuregulina se utiliza ya sea antes, después o tanto antes como después de la mastectomía para limitar la lesión a los nervios y/o mejorar la recuperación de la función nerviosa periférica. Los pacientes programados para someterse a la mastectomía se tratan aproximadamente 24 horas antes de la cirugía con una cantidad apropiada de neuregulina. Opcionalmente, los pacientes también son tratados por un período de hasta aproximadamente 6 semanas o más, después de la cirugía, para mejorar la recuperación neural. En realizaciones alternativas, los pacientes sólo se tratan antes o sólo se tratan después de la cirugía. Como se ha señalado en el presente documento, la neuregulina se utiliza para prevenir la lesión de los nervios como consecuencia de cirugías de resección del tumor (prostatectomía, mastectomía, tiroidectomía, etc). Se observa que las neuregulinas han sido implicadas como promotores y como supresores de la formación de células tumorales y su crecimiento (Atlas et al., 2003; Chua et al., 2009). El tratamiento con neuregulina puede o no puede estar contraindicado en pacientes con ciertos tumores. Las neuregulinas se utilizan en pacientes con tumores erbB positivos sólo cuando los estudios de seguridad suficientes demuestren que las neuregulinas no potencian el crecimiento de dicho tumor.

Por otra parte, el tratamiento de la lesión de los nervios a partir de la cirugía no se limita a la mastectomía y la prostatectomía. La lesión del nervio se produce con frecuencia en cualquier cirugía que implique una disección y/o resección significativa. Estas cirugías pueden incluir, pero no están limitadas, a cirugía de las extremidades superiores, cirugía de la mano, cirugía/reemplazo de rodilla, cirugía/reemplazo de cadera, cirugía/reemplazo de codo, la disección del cuello para cirugía arterial y venosa, cirugía de tiroides, amigdalectomía, cirugía del pie y de la mano. La lesión del nervio periférico es común en la cirugía de la pelvis, abdominal y la cirugía colorrectal. La lesión de los nervios también ocurre con las cirugías orales y faciales.

Además de la lesión directa en los nervios a través de la disección y la resección en la cirugía, la lesión del nervio frecuentemente resulta de la compresión o estiramiento de los nervios durante la cirugía debido a la posición del paciente, la compresión en los puntos de contacto o de las cortinas, las restricciones, clips, cinta o cualquier otro objeto que pueda comprimir el tejido. Estos pueden ser inevitables resultados de la cirugía o el resultado de una técnica inadecuada. Independientemente de cuál sea el ajuste o la etiología de la lesión del nervio periférico, se encuentra que las neuregulinas previenen y/o tratan dichas lesiones.

En los seres humanos, los ensayos clínicos muestran la eficacia de NRG para la prevención y el tratamiento de la lesión del nervio periférico con los datos de la evaluación de la función sensorial y/o motora de las regiones nerviosas afectadas con frecuencia en pacientes que son tratados con neuregulina o con un control de placebo. Por ejemplo, el entumecimiento de la axila puede ser probado por métodos neurológicos estándar de la función sensorial incluyendo pruebas de alodinia, hiperalgesia o agudeza umbral sensorial (la discriminación de dos puntos). Estos métodos son estándar en el campo. Los pacientes son seguidos por un período de varios meses después de la cirugía y las comparaciones estadísticas hechas entre los grupos de pacientes tratados con neuregulina y los tratados con un control. De conformidad con estas rutas, se encuentra que el tratamiento con NRG antes y/o después de un evento quirúrgico previene y/o trata la lesión del nervio periférico evaluado.

Ensayos análogos a los anteriores también evalúan en una fuerza motora similar, la amplitud de movimiento y la coordinación. De conformidad con estos ensayos, se encuentra que el tratamiento con NRG antes y/o después de un evento quirúrgico previene y/o trata la lesión del nervio periférico que resulta en el deterioro en una o más de la fuerza motora, la amplitud de movimiento o la coordinación.

**Lista de secuencias**

<110> CAGGIANO, ANTHONY O. BELLA, ANTHONY J. IACI, JENNIFER F.

<120> USO DE UNA NEUREGULINA PARA TRATAR UNA LESIÓN NERVIOSA PERIFÉRICA

<130> ACOR.P0207WO

5 <140> DESCONOCIDO  
<141> 2010-10-14

<150> 61/251,583  
<151> 2009-10-14

10 <150> 61/252,161  
<151> 2009-10-16

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 422

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg  
1 5 10 15

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu  
20 25 30

Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala  
35 40 45

Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser  
50 55 60

Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala  
65 70 75 80

Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala  
85 90 95

Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly  
100 105 110

Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro  
115 120 125

Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro  
130 135 140

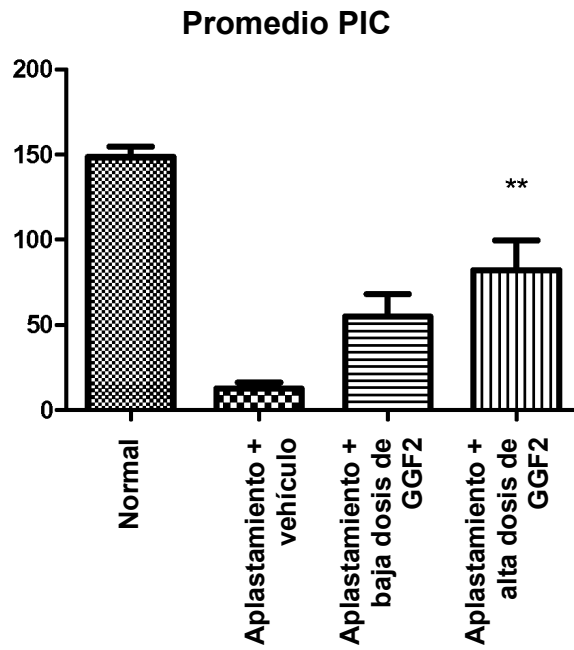
ES 2 569 121 T3

Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys  
 165 170 175  
 Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala  
 180 185 190  
 Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe  
 195 200 205  
 Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg  
 210 215 220  
 Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val  
 225 230 235 240  
 Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu  
 245 250 255  
 Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys  
 260 265 270  
 Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn  
 275 280 285  
 Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln  
 290 295 300  
 Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp  
 325 330 335  
 Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr  
 340 345 350  
 Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys  
 355 360 365  
 Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser  
 370 375 380  
 Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp  
 385 390 395 400  
 Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro  
 405 410 415  
 Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 420

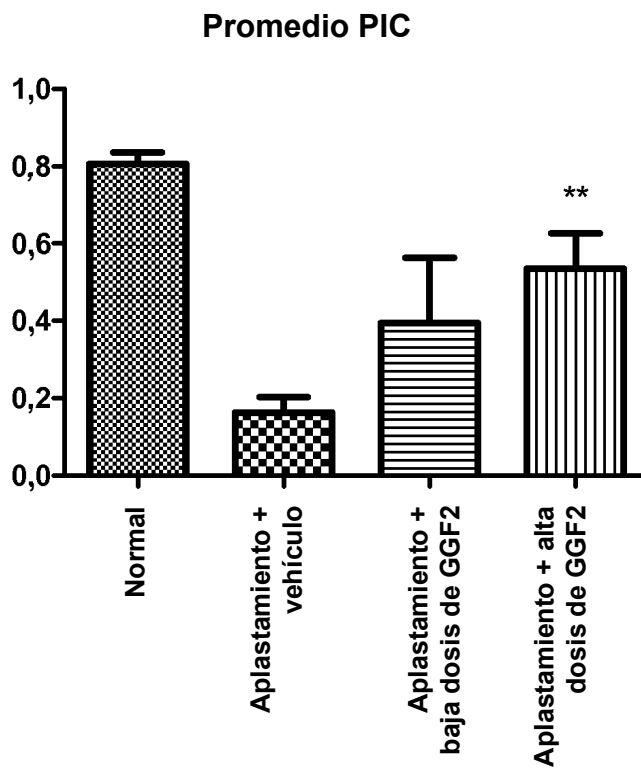
**REIVINDICACIONES**

1. Una neuregulina para uso en un método de prevención o tratamiento de una lesión del nervio cavernoso en un sujeto en riesgo de sufrir dicha lesión de un procedimiento médico o quirúrgico, en donde el método comprende administrar la neuregulina antes del procedimiento médico o quirúrgico.
- 5 2. Una neuregulina para el uso de la reivindicación 1, en donde el procedimiento es una cirugía pélvica radical.
3. Una neuregulina para el uso de la reivindicación 1 ó 2, en donde el procedimiento es una cirugía de resección de tumor, opcionalmente en donde el procedimiento es para un cáncer de próstata, un cáncer de vejiga o para un cáncer de recto.
4. Una neuregulina para el uso de la reivindicación 3, en donde la cirugía de resección es una prostatectomía.
- 10 5. Una neuregulina para el uso de la reivindicación 1, en donde la cirugía de los nervios cavernosos causa disfunción eréctil.
6. Una neuregulina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método incluye una dosis de 100 microgramos/kg de peso corporal a 10 miligramos/kg de peso corporal, opcionalmente a partir de 500 miligramos/kg de peso corporal a 5 miligramos/kg de peso corporal y preferiblemente de 500 mg/kg de peso corporal a 1 miligramo/kg de peso corporal por administración.
- 15 7. Una neuregulina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método no comprende la administración de neuregulina después del procedimiento.
8. Una neuregulina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende la administración 48 horas antes del procedimiento.
- 20 9. Una neuregulina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la neuregulina es GGF2 o uno de sus fragmentos activos.
10. Una neuregulina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la neuregulina comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo FCE).
- 25 11. El uso de una neuregulina en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de prevención o tratamiento de una lesión del nervio cavernoso en un sujeto en riesgo de sufrir dicha lesión de un procedimiento médico o quirúrgico, en donde el medicamento se va a administrar antes del procedimiento médico o quirúrgico.





**FIG. 1**



**FIG. 2**

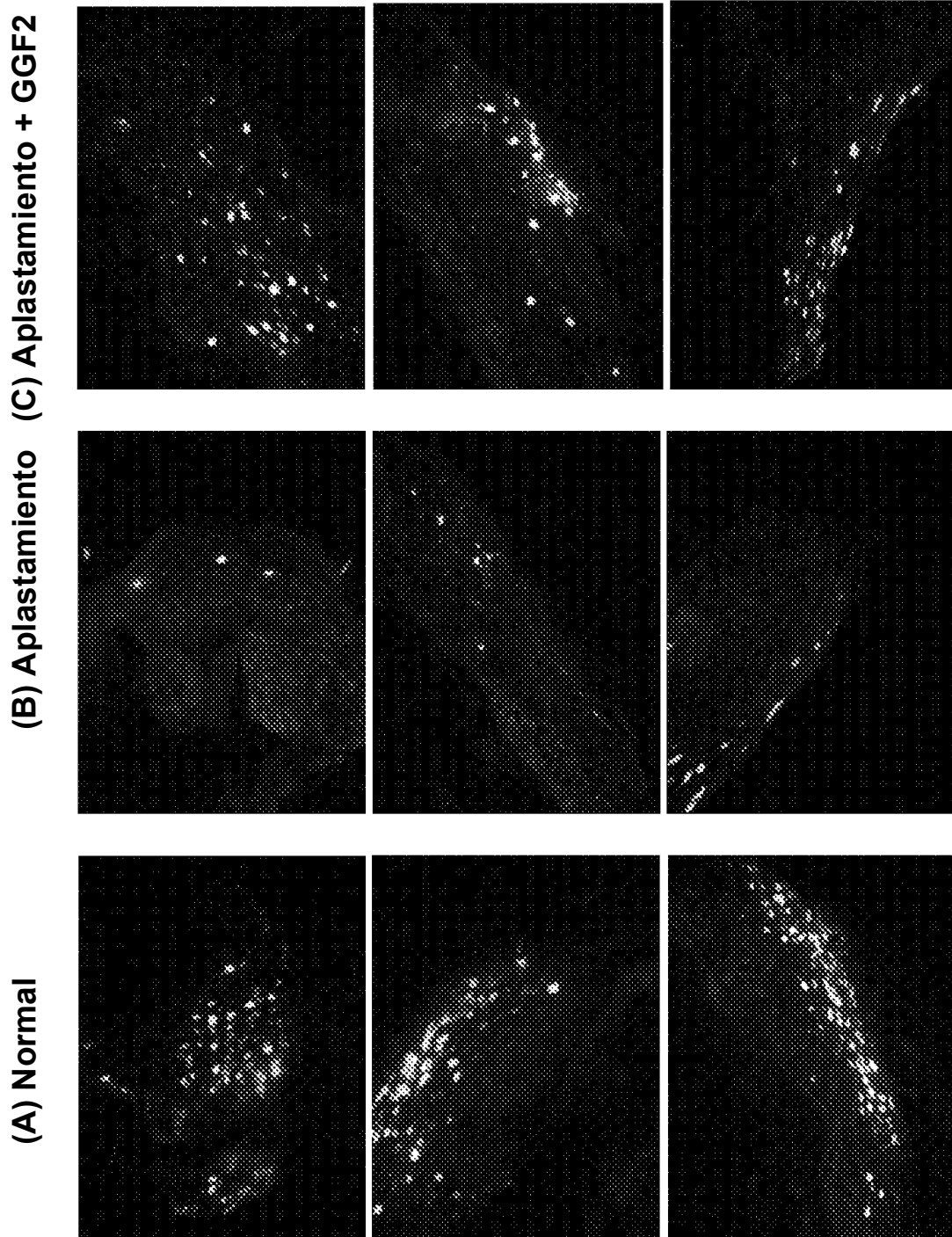
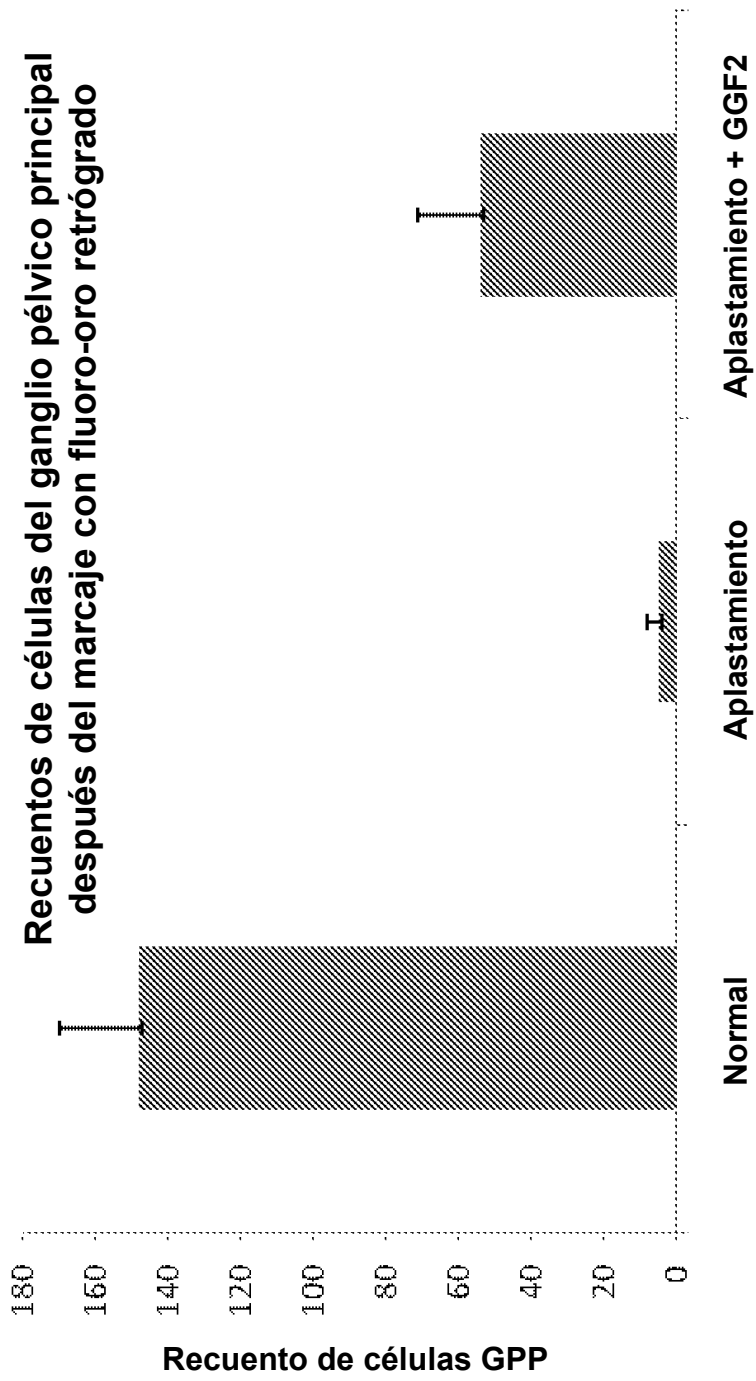
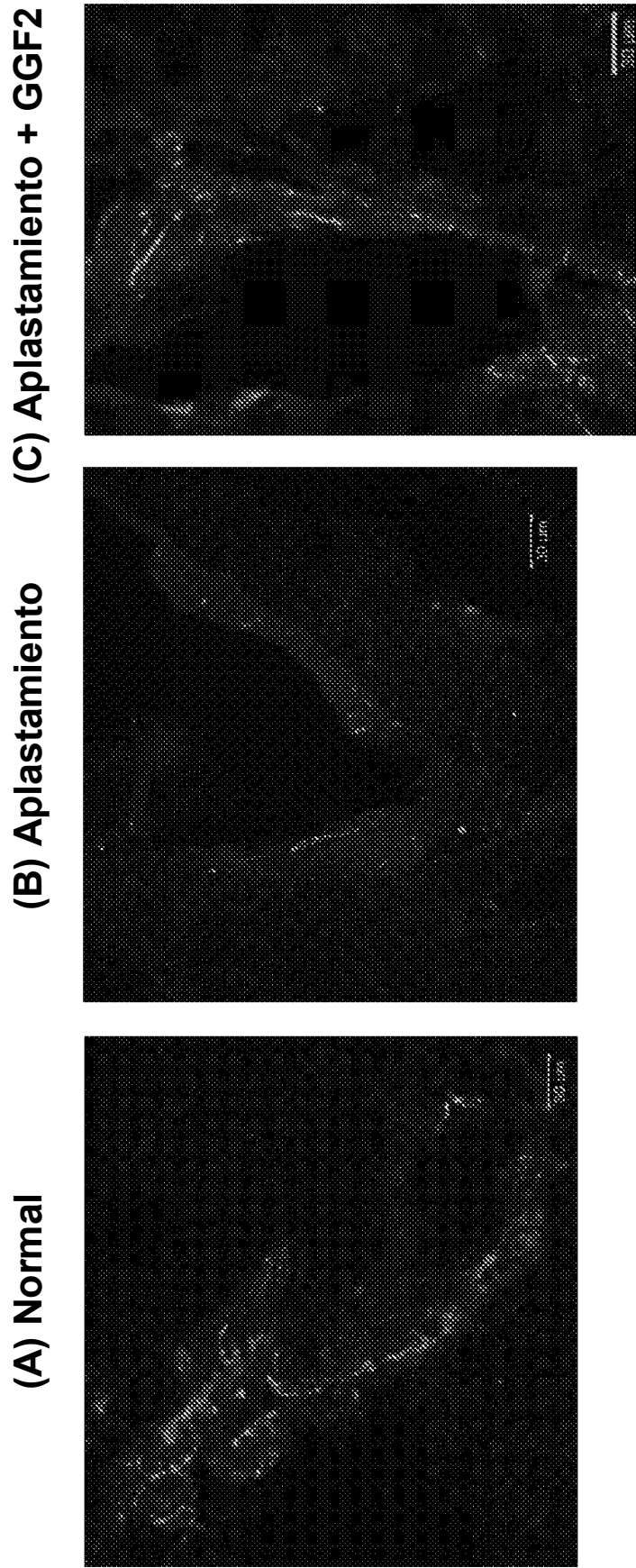


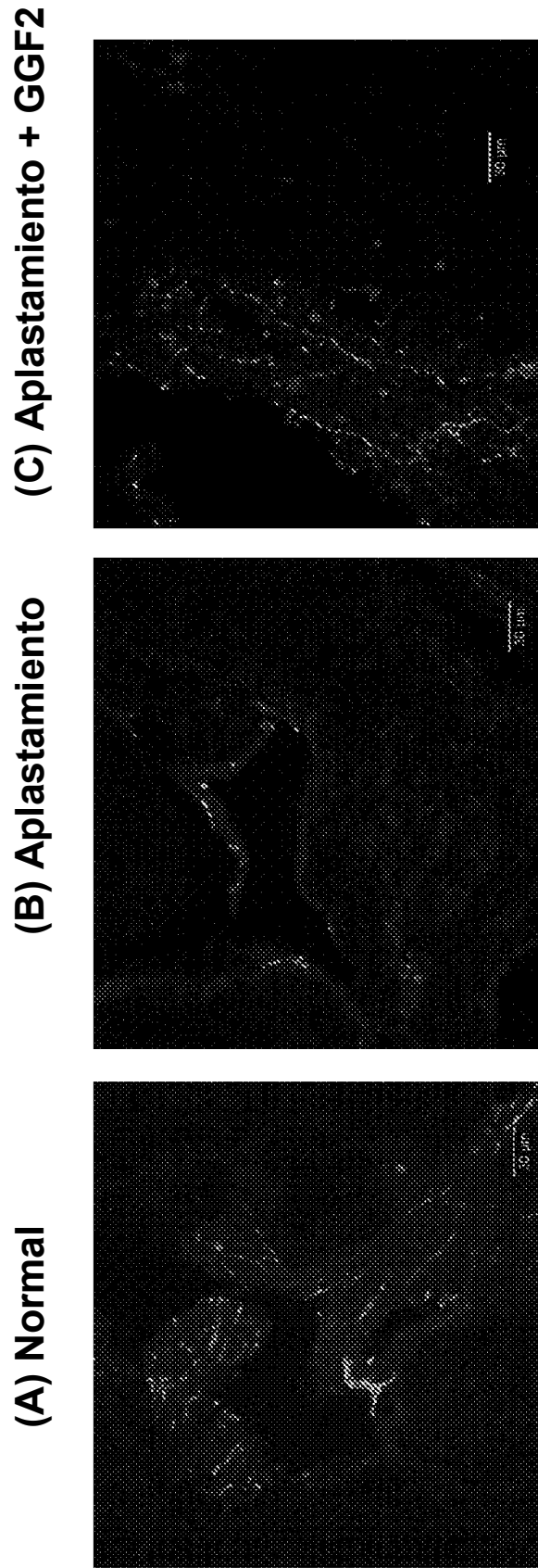
FIG. 3



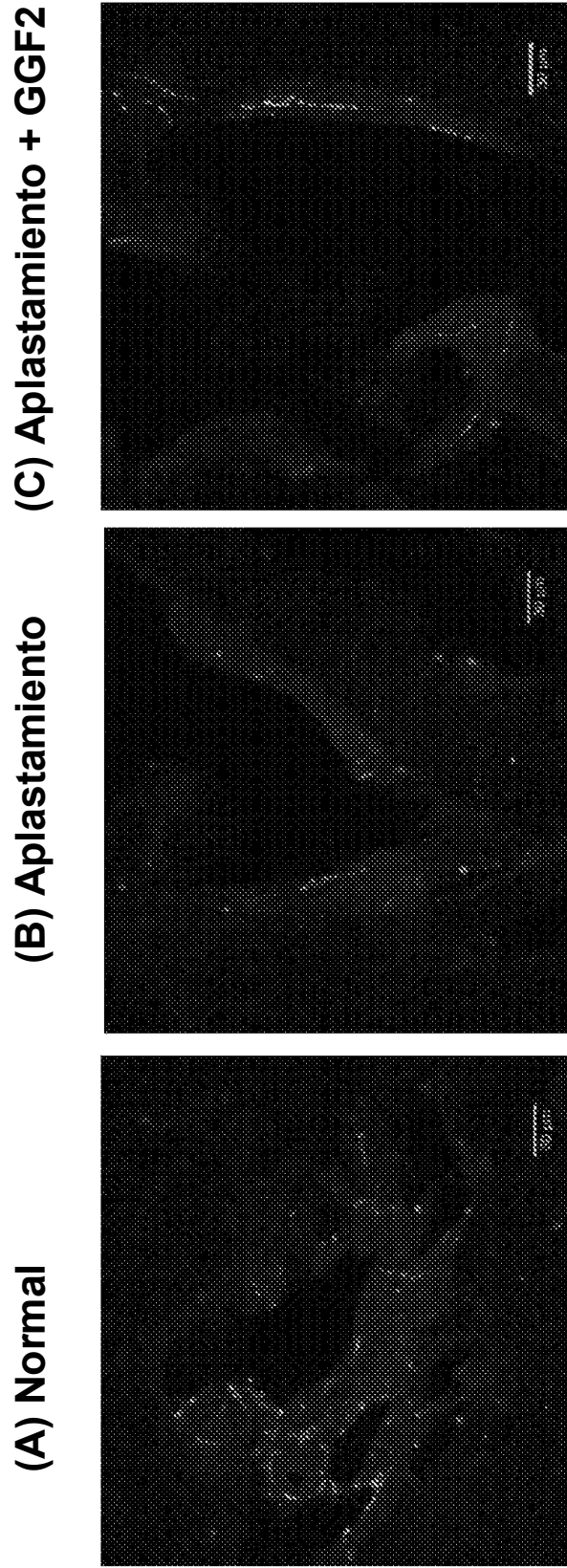
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**