(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 405 815**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2005** **E 10168909 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013** **EP 2251033**

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden paraoxonasa**

(30) Prioridad:

04.02.2004 JP 2004027727

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2013

(73) Titular/es:

MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION (100.0%)
2-10, Dosho-machi 3-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8505, JP

(72) Inventor/es:

ASAHARA, NAOMI;
HASHIMOTO, MOTONORI y
YUKI, SATOSHI

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 815 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

Composiciones farmacéuticas que comprenden paraoxonasa.

Campo técnico

La presente invención se refiere a paraoxonasa (en lo sucesivo también denominada en la presente memoria PON). Más precisamente, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden PON, a métodos para la purificación y estabilización de la misma y a nuevos usos medicinales de la misma.

Técnica precedente

La paraoxonasa (también denominada paraoxonasa sérica humana o PON1) es una glicoproteína dependiente de Ca^{2+} que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa que existe como uno de los componentes proteínicos que constituyen la lipoproteína de alta densidad (HDL) en la sangre. La PON es conocida como una enzima sérica que degrada oxona, compuestos organofosforosos y ácidos carboxílicos aromáticos tales como sarina, que es un gas neurotóxico, y se puede usar como un antídoto para estas sustancias. En los últimos años, se están esclareciendo las actividades fisiológicas de la PON. Por ejemplo, se han presentado una acción antiarteriosclerótica, una acción antioxidante y similares (Documentos no relacionados con las patentes 1 y 2, Documento de patente 1).

En cuanto a la purificación de la PON, se presentaron métodos para emplear un tratamiento con agarosa azul y un tratamiento con intercambiadores aniónicos de tipo DEAE en combinación (Documentos no relacionados con las patentes 3 y 4). Según estos informes, la PON se purificó bajo la coexistencia de glicerol y tensioactivos no iónicos de tipo alquil-fenil-éter de polioxietileno (específicamente, Emulgen y Nonidet P-40, ambos son nombres comerciales). Sin embargo, los documentos no divulgan el uso de otras sustancias tales como, por ejemplo, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (posteriormente en la presente memoria también denominado CHAPS). Además, se presentó que el CHAPS se añadía en un espécimen de suero que contenía PON para mantener la actividad enzimática (Documento de patente 2). Sin embargo, este informe no está relacionado con PON purificada.

Se realizaron algunos informes que sugieren aplicaciones medicinales de PON. Por ejemplo, se realizó un informe que sugiere relaciones entre una cantidad de PON in vivo y la angina de pecho, el infarto de miocardio y el infarto cerebral (Documento de patente 2). El Documento de patente 3 es un informe que se refiere a un trastorno resultante de la isquemia-reperfusión en relación con Apo-A1. En el informe, se sugiere que la PON es eficaz para el trastorno resultante de la isquemia-reperfusión como Apo-A1, sin embargo, no se divulgaba específicamente el efecto de la misma.

Como se describió anteriormente, en la actualidad meramente se sugiere que la PON tenga alguna utilidad medicinal. Casi no se han realizado informes sobre medios para suministrar establemente PON para usos médicos.

Documento de patente 1: Publicación de Patente Internacional WO00/30425

Documento de patente 2: Publicación de Patente Japonesa No Examinada (KOKAI) nº 2000-333674

Documento de patente 3: Publicación de Patente Internacional W003/97696

Documento no relacionado con las patentes 1: J. Clin. Invest., Vol. 101, pp. 1581-1590, 1998

Documento no relacionado con las patentes 2: Nature, Vol. 394, pp. 284-287, 1998

Documento no relacionado con las patentes 3: Drug Metabolism and Disposition, Vol. 19, nº 1, pp. 100-106, 1991

Documento no relacionado con las patentes 4: Biochemistry, Vol. 30, pp. 10133-10140, 1991

Documento no relacionado con las patentes 5: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp. 7187-7191, 1995

Documento no relacionado con las patentes 6: J. Lipid Research, Vol. 42, pp. 951-958, 2001

Documento no relacionado con las patentes 7: Stroke, Vol. 20, pp. 1037-1043, 1989

Documento no relacionado con las patentes 8: Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, Vol. 20, pp. 1311-1319, 2000

Divulgación de la invención

Objetivo a alcanzar por la invención

Se esperaría que fuera difícil recuperar eficazmente una PON altamente purificada mediante los métodos convencionales. Además, los tensioactivos usados convencionalmente, p. ej., los tensioactivos no iónicos tipo alquil-

fenil-éter de polioxietileno, no eran satisfactorios para estabilizar las actividades de la PON. Además, entre estos tensioactivos, los que tienen un alto peso molecular no se pueden retirar mediante diálisis o similares. Según esto, si se concentra PON purificada mediante cromatografía para la administración a animales y similares, los tensioactivos también se concentran conjuntamente, y preocupan sus efectos adversos sobre los organismos vivos.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios técnicos para purificar y formular PON a fin que sea clínicamente aplicable. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos usos medicinales de la PON.

Medios para conseguir el objetivo

Los inventores de la presente invención efectuaron diversas investigaciones teniendo en cuenta las circunstancias que se describen anteriormente. Como resultado, han encontrado que la pureza, la expresión, la recuperación y la estabilidad de las actividades de PON se mejoraban satisfactoriamente mediante la adición de CHAPS en el momento de la purificación y/o el almacenamiento de PON.

Además, los inventores de la presente invención verificaron que la PON era eficaz en un modelo animal de isquemia-reperfusión.

Las presentes invenciones son como sigue:

(1) Una formulación farmacéutica que comprende PON, que contiene PON para uso en el tratamiento terapéutico del infarto cerebral y CHAPS a la concentración de 0,001 a 0,1% p/v.

(2) La formulación farmacéutica según (1), que además contiene un poliol.

(3) La formulación farmacéutica según (2), en la que el poliol es glicerol.

(4) PON para uso en el tratamiento terapéutico del infarto cerebral.

(5) PON para uso en el tratamiento terapéutico según (4), que se usa para mejorar el pronóstico, los síntomas neurológicos o la disfunción motora resultantes del infarto cerebral.

(6) PON como un agente para uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad resultante de la isquemia-reperfusión y/o el infarto cerebral, que además comprende CHAPS.

(7) El agente según (6), que se usa para mejorar el pronóstico, los síntomas neurológicos o la disfunción motora resultantes del infarto cerebral.

(8) El agente según (6) o (7), que además contiene un poliol.

(9) El agente según (8), en el que el poliol es glicerol.

(10) Un método para mejorar el pronóstico, los síntomas neurológicos o la disfunción motora resultantes del infarto cerebral, que comprende administrar una cantidad eficaz de PON.

(11) Uso de PON para la fabricación del agente para mejorar el pronóstico, los síntomas neurológicos o la disfunción motora resultantes del infarto cerebral.

Efecto de la invención

Se puede proporcionar un nuevo medicamento útil para el tratamiento del infarto cerebral.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los cambios con el tiempo en las mejoras de los síntomas neurológicos de un animal de un modelo de isquemia-reperfusión, cuando se administraba inicialmente PON inmediatamente después de la reperfusión. El eje horizontal representa los días de observación, esto es, los días después de la reperfusión (día), y el eje vertical representa puntuaciones de los síntomas neurológicos. Los símbolos, □, △ y ○, utilizados en la gráfica representan puntuaciones de síntomas neurológicos cada día de observación. Cada dato está representado como media ± EEM. Entre las combinaciones de símbolos y líneas poligonales, la combinación de □ y una línea de puntos representa los resultados de un grupo de referencia (grupo normal), la combinación de △ y una línea de puntos representa los resultados de un grupo tratado con vehículo (grupo con enfermedad) y la combinación de ○ y una línea continua representa un grupo con administración de PON. El símbolo * significa la presencia de una diferencia significativa con una tasa crítica menor de 5% en comparación con el grupo tratado con vehículo determinada mediante la prueba de Wilcoxon.

La Fig. 2 muestra los cambios con el tiempo en las mejoras de la función motriz de un animal de un modelo de isquemia-reperfusión, cuando se administraba inicialmente PON inmediatamente después de la reperfusión. Las definiciones del eje horizontal, los esquemas de indicación de datos y las combinaciones de símbolos y líneas poligonales son iguales que los de la explicación de la Fig. 1. El eje vertical representa el tiempo de marcha en

Rotarod (segundos). Los símbolos □, △ y ○, utilizados en la gráfica representan los tiempos de marcha en Rotarod cada día de observación. El símbolo ** significa la presencia de una diferencia significativa con una tasa crítica menor de 1% en comparación con el grupo tratado con vehículo determinada mediante la prueba de la t.

La Fig. 3 muestra los cambios con el tiempo en las mejoras de los síntomas neurológicos de un animal de un modelo de isquemia-reperfusión, cuando se administraba inicialmente PON después de 3 horas desde la reperfusión. Las definiciones del eje horizontal, los esquemas de indicación de datos y las combinaciones de símbolos y líneas poligonales son iguales que los de la explicación de la Fig. 1. El símbolo * significa la presencia de una diferencia significativa con una tasa crítica menor de 5% en comparación con el grupo tratado con vehículo determinada mediante la prueba de la t.

La Fig. 4 muestra los cambios con el tiempo en las mejoras de la función motriz de un animal de un modelo de isquemia-reperfusión, cuando se administraba inicialmente PON después de 3 horas desde la reperfusión. Las definiciones del eje horizontal, los esquemas de indicación de datos y las combinaciones de símbolos y líneas poligonales son iguales que los de la explicación de la Fig. 1. Las definiciones del eje vertical y los símbolos son iguales que los de la explicación de la Fig. 2. La definición del símbolo * es igual que en la explicación de la Fig. 3.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Material de partida

El material de partida usado en la presente invención no está particularmente limitado con tal de que el material sea una solución que contenga PON. Ejemplos del mismo incluyen sangre, plasma, suero, plasma del que se retira la fibrina, una fracción sobrenadante obtenida a partir de plasma mediante la técnica de fraccionación con etanol frío de Cohn, Eff. I y similares. Además, la solución que contiene PON se puede preparar utilizando tecnologías de ADN recombinante. Específicamente, se puede utilizar una solución que contiene PON recombinante expresada en células CHO, células de insecto o similares mediante tecnologías de ADN recombinante (p. ej., caldo de cultivo, sobrenadante de cultivo y similares) (véanse los Documentos no relacionados con las patentes 5 y 6).

Purificación

El método de purificación se caracteriza por someter a la solución que contiene PON a un tratamiento con soporte hidrófobo y a continuación a un tratamiento con intercambiador aniónico en presencia de un poliol y CHAPS. Alternativamente, el método de purificación se caracteriza por someter una solución que contiene PON a un tratamiento con soporte hidrófobo y a continuación a un tratamiento con intercambiador aniónico en presencia de CHAPS.

Tratamiento con soporte hidrófobo

El soporte hidrófobo es un soporte insoluble unido a un grupo hidrófobo. Ejemplos del soporte insoluble incluyen agarosa (Sepharose (nombre comercial) y similares), dextrano reticulado (Sephadex (nombre comercial) y similares), polímeros vinílicos hidrófilos (TOYOPEARL (nombre comercial) y similares) y similares. Además, ejemplos del grupo hidrófobo incluyen un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo que tiene de 4 a 18 átomos de carbono (p. ej., un grupo butilo, un grupo octilo, un grupo octadecilo y similares), un grupo fenilo y similares. El grupo hidrófobo puede estar unido al soporte insoluble mediante un método conocido. El soporte hidrófobo también se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

Como métodos de tratamiento con soporte hidrófobo, específicamente, una solución que contiene PON se pone en contacto con un soporte hidrófobo de modo que la PON se adsorba al soporte hidrófobo, y a continuación la PON se recupera eluyéndola con una solución apropiada. Las condiciones de adsorción incluyen un pH de aproximadamente 6 a 8 y una concentración de sal de aproximadamente 0,01 a 0,2 M. Además, se pueden añadir de aproximadamente 0,1 a 2 mM de una sal cálcica. Específicamente, se puede ejemplificar una solución salina fisiológica (0,15 M de cloruro sódico) que contiene 1 mM de cloruro cálcico y similares. Cuando se realiza un lavado después de la adsorción, se puede realizar bajo las mismas condiciones que la adsorción.

Se usa para la elución un alquilenglicol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (p. ej., etilenglicol y similares) de 30 a 70% p/v, preferiblemente de aproximadamente 40 a 60% p/v. Además, se pueden añadir de 0,1 a 2 mM de una sal cálcica. Específicamente, se puede ejemplificar una solución acuosa que contiene 50% p/v de etilenglicol y 1 mM de cloruro cálcico y similares.

Tratamiento con intercambiador aniónico

El intercambiador aniónico es un soporte insoluble unido a un grupo de intercambio aniónico. Ejemplos del soporte insoluble incluyen agarosa (Sepharose (nombre comercial) y similares), dextrano reticulado (Sephadex (nombre comercial) y similares), polímeros vinílicos hidrófilos (TOYOPEARL (nombre comercial) y similares) y similares. Además, ejemplos del grupo de intercambio aniónico incluyen un grupo dietilaminoetilo (tipo DEAE), un grupo amonio cuaternario (tipo Q), un grupo aminoetilo cuaternario (tipo QAE) y similares. Preferiblemente, se usa un grupo fuertemente básico tal como un grupo amonio cuaternario y un grupo aminoetilo cuaternario. El grupo de

intercambio aniónico se puede unir al soporte insoluble mediante un método conocido. El intercambiador aniónico también se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

El tratamiento con intercambiador aniónico se realiza bajo la coexistencia de un poliol (p. ej., glicerol y similares) y CHAPS (N,N-dimetil-N-(3-sulfopropil)-3-[[(3α,5ß,7α,12α)-3,7,12-trihidroxi-24-oxocolan-24-il]-amino]-1-propanamio o 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato). La cantidad del poliol que se va a añadir es, por ejemplo, de aproximadamente 10 a 40% p/v, preferiblemente de aproximadamente 20 a 30% p/v. La cantidad de CHAPS que se va a añadir es, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a 1% p/v. Cuando se realiza una purificación adicional después del tratamiento anterior, cualquier purificación se debe realizar bajo la coexistencia de un poliol y CHAPS.

El tratamiento con intercambiador aniónico también se puede realizar en presencia de CHAPS. Cuando se realiza una purificación adicional después del tratamiento anterior, cualquier tratamiento se puede realizar en presencia de CHAPS.

Como métodos del tratamiento con intercambiador aniónico, específicamente, una solución que contiene PON se pone en contacto con un intercambiador aniónico de modo que la PON se adsorba al intercambiador aniónico, y a continuación la PON se recupera mediante elución con un disolvente que tiene una alta concentración de sal. Las condiciones de adsorción incluyen un pH de aproximadamente 6 a 9 y una concentración de sal de aproximadamente 0,001 a 0,1 M. Además, se pueden añadir de aproximadamente 0,1 a 2 mM de una sal cálcica. Específicamente, se puede ejemplificar un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contiene 1 mM de cloruro cálcico, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS y similares. Cuando se realiza un lavado después de la adsorción, el procedimiento se puede realizar bajo las mismas condiciones que las de la adsorción. Las condiciones de elución incluyen un pH de 6 a 9 y una concentración de sal de aproximadamente 0,1 a 2 M. Además, se pueden añadir de aproximadamente 0,1 a 2 mM de una sal cálcica. Específicamente, se puede ejemplificar un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contiene de 0,1 a 1 M de cloruro sódico, 1 mM de cloruro cálcico, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS y similares. La elución se puede realizar bien mediante métodos de incremento por etapas de una concentración de sal o bien mediante métodos de incremento continuo de la misma (método del gradiente de concentración).

Concentración (ultrafiltración)

Después del tratamiento con intercambiador aniónico, la solución que contiene PON se puede concentrar usando una membrana de ultrafiltración que tiene un peso molecular umbral de aproximadamente 10 a 30 kDa.

Tratamiento con concanavalina A (también denominada posteriormente en la presente memoria ConA) inmovilizada

La ConA inmovilizada es un soporte insoluble unido a ConA. Ejemplos del soporte insoluble incluyen agarosa (Sepharose (nombre comercial) y similares), dextrano reticulado (Sephadex (nombre comercial) y similares), polímeros vinílicos hidrófilos (TOYOPEARL (nombre comercial) y similares) y similares. La ConA se puede unir al soporte insoluble mediante un método conocido. La ConA inmovilizada también se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

Como métodos para el tratamiento con ConA inmovilizada, específicamente, una solución que contiene PON se pone en contacto con ConA inmovilizada de modo que la PON se adsorba a la ConA inmovilizada, y a continuación la PON se recupera mediante elución con un disolvente que tiene una alta concentración de sal o una solución apropiada. Las condiciones de adsorción incluyen un pH de aproximadamente 6 a 9 y una concentración de sal aproximadamente de 0,1 a 0,5 M. Además, se pueden añadir aproximadamente de 1 a 20 mM de una sal cálcica y aproximadamente de 1 a 10 µM de una sal (p. ej., sales de metales alcalinotérreos tales como sales sódicas y sales potásicas) de EDTA. Específicamente, se puede ejemplificar un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contiene 10 mM de cloruro cálcico, 0,2 M de cloruro sódico, 5 µM de sal trisódica de EDTA, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS y similares. Cuando se realiza un lavado después de la adsorción, el procedimiento se puede realizar bajo las mismas condiciones que las de la adsorción.

Las condiciones de elución incluyen un pH de 6 a 9 y una concentración de sal de aproximadamente 1 a 5 M. Alternativamente, se usan de aproximadamente 0,1 a 0,5 M de α-metilmanósido bajo los mismos pH y concentración de sal que los de las condiciones de adsorción. Además, se pueden añadir aproximadamente de 1 a 20 mM de una sal cálcica y aproximadamente de 1 a 10 µM de una sal (p. ej., sales de metales alcalinotérreos tales como sales sódicas y sales potásicas y similares) de EDTA. Específicamente, se pueden ejemplificar un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contiene 10 mM de cloruro cálcico, de 1 a 4 M de cloruro sódico, 5 µM de sal trisódica de EDTA, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS, un tampón de Tris-ácido clorhídrico 25 mM (pH 7,5) que contiene de 0,1 a 0,5 M de α-metilmanósido, 10 mM de cloruro cálcico, 0,2 M de cloruro sódico, 5 µM de sal trisódica de EDTA, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS y similares. La elución se puede realizar bien mediante métodos de incremento por etapas de la concentración de sal o la concentración de α-metilmanósido o bien mediante métodos de incremento continuo de la misma (método de gradiente de concentración). El tratamiento con ConA inmovilizada se puede realizar como se requiera, y el tratamiento se puede omitir si se desea.

Tratamiento con intercambiador aniónico (segunda vez)

Este tratamiento con intercambiador aniónico se puede realizar repitiendo el primer tratamiento con intercambiador aniónico del mismo modo.

A fin de mejorar adicionalmente la pureza de la PON, se puede realizar un tratamiento con agarosa azul en combinación como una técnica conocida. En cuanto a las condiciones del tratamiento, el tratamiento se puede realizar según un método conocido. Sin embargo, como se describió anteriormente, el tratamiento se realiza bajo la coexistencia de un poliol y CHAPS. Alternativamente, este tratamiento se puede realizar en presencia de CHAPS.

Ejemplos específicos del método de purificación incluyen métodos que comprenden los siguientes tratamientos.

Tratamiento con soporte hidrófobo → tratamiento con intercambiador aniónico → tratamiento con ConA inmovilizada → tratamiento con intercambiador aniónico (segunda vez)

Tratamiento con soporte hidrófobo → tratamiento con intercambiador aniónico → tratamiento con intercambiador aniónico (segunda vez)

Según el método de purificación, se puede preparar PON altamente purificada hasta de 100 a 2000 U/A_{280}, preferiblemente aproximadamente de 500 a 1800 U/A_{280}. Una unidad (1 U) de actividad de PON significa que se hidroliza 1 nmol de paraoxona hasta 4-aminofenol de la misma cantidad molar por minuto. Los detalles son como se describen en el Ejemplo de referencia 1.

Formulación farmacéutica

Se prepara una formulación farmacéutica usando la PON purificada. Como la PON purificada, se pueden usar las preparadas mediante el método de purificación susodicho. Además, también se pueden usar las preparadas mediante métodos de purificación conocidos. Ejemplos de los métodos incluyen los que comprenden un tratamiento con agarosa azul y un tratamiento con intercambiador aniónico en combinación (Documento de patente 2, Documentos no relacionados con las patentes 3 y 4) y similares.

Un ejemplo de una concentración de PON en la formulación farmacéutica incluye, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 100 mg/ml (de 1.800 a 180.000 U/ml). Un ejemplo de un pH incluye, por ejemplo, aproximadamente de 6 a 9, y un ejemplo de una concentración de sal incluye, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 100 mM. Ejemplos de aditivos incluyen un poliol, CHAPS y similares. Ejemplos del poliol incluyen glicerol y similares. Un ejemplo de una concentración del poliol que se va a añadir incluye, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 5% p/v, y un ejemplo de la de CHAPS incluye, por ejemplo, aproximadamente de 0,001 a 0,1% p/v. Además, se pueden usar una sal cálcica tal como cloruro cálcico, un agente quelante tal como EDTA, y un tampón tal como Tris. Un ejemplo de una concentración de la sal cálcica que se va a añadir incluye, por ejemplo, aproximadamente de 0,01 a 1 mM, un ejemplo de la del agente quelante incluye, por ejemplo, aproximadamente de 0,1 a 1 µM, y un ejemplo de la del tampón incluye, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 10 mM.

Si es necesario, se pueden añadir diversos aditivos a la solución que contiene PON, y se pueden preparar formulaciones farmacéuticas que contienen PON mediante esterilización con filtración, envasado en tamaños pequeños, liofilización y similares.

Administración y dosificación

La preparación farmacéutica que comprende PON obtenida según la presente invención se puede utilizar para usos medicinales conocidos. Ejemplos de los mismos incluyen el uso como un antídoto y la aplicación a la arteriosclerosis. Además, como nuevos usos farmacéuticos, la preparación se puede aplicar al tratamiento terapéutico del infarto cerebral. Una vía de administración puede ser bien la administración oral o bien la administración parenteral. Ejemplos de la administración parenteral incluyen inyecciones tales como inyección intravenosa y similares. La dosis se puede incrementar o disminuir apropiadamente dependiendo de los síntomas, el sexo, la edad y el peso corporal de un paciente y similares. Específicamente, un ejemplo de la dosis incluye, por ejemplo, aproximadamente de 0,1 a 1.000 mg/kg de peso corporal.

En particular, la preparación se puede usar para, específicamente, la mejora del pronóstico, los síntomas neurológicos o la disfunción motora resultantes del infarto cerebral. Además, la PON se puede usar para el tratamiento terapéutico de un trastorno de la consciencia resultante de un infarto cerebral, así como síntomas neurológicos, discapacidad motriz, en particular, discapacidad para las actividades cotidianas, un trastorno funcional y similares.

Ejemplos específicos de métodos de administración para usar PON para el tratamiento terapéutico del infarto cerebral incluyen una administración una vez al día, es decir una vez o diariamente durante de 1 a 14 días, preferiblemente de 1 a 7 días, en donde la administración se empieza en menos de 48 horas, preferiblemente en menos de 24 horas, más preferiblemente en menos de 12 horas, lo más preferiblemente en menos de 3 horas, después del comienzo del infarto cerebral.

Ejemplos

Para una explicación más detallada de la presente invención, se describirán los siguientes ejemplos y ejemplos de prueba. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

Ejemplo de referencia 1

A. Medida de la actividad de PON

1) Preparación del sustrato

Un volumen de 7 µl de una solución madre de sustrato (paraoxona, también denominada p-nitrofenilfosfato de dietilo, Sigma) se disolvió en 52 µl de DMSO y a continuación se diluyó 100 veces con tampón de hidrocloruro de Tris 0,1 M, 2 mM de cloruro cálcico (pH 8, 25ºC). El susodicho tampón con heparina añadida (0,5 mg/ml) se usó para este sistema de medida según se requiriera.

2) Medida (realizada a temperatura ambiente)

Un volumen de 20 µl de una muestra (que contenía PON) y 200 µl de la solución de sustrato preparada en 1) se añadió a una microplaca de 96 pocillos y se mezclaron (la concentración final de paraoxona era 5 mM). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un modo cinético durante 30 minutos, y los resultados se calcularon usando Softmax Versión 2.35. La muestra se diluyó con el mismo tampón que el usado para la preparación del sustrato.

3) Método para calcular la actividad

La actividad se calculó usando la $V_{máx}$ en mDO/min obtenida en 2) según la siguiente ecuación. Se usaron los valores con un coeficiente se correlación de $V_{máx}$ de 0,95 o más.

Ecuación 1

Actividad de PON (U/m = nmol/min/ml) = $V_{máx}$ en mDO/min/17.000/0,6 x 0,22 x 1000 x 50

B. El nivel de antígeno para PON se midió mediante el método de ELISA tipo sándwich.

Ejemplo 1

Se purificó PON usando suero preparado a partir de plasma humano reunido. El suero humano se aplicó a una columna de fenil-agarosa (Phenyl Sepharose, Amersham Pharmacia) equilibrada con solución salina que contenía 1 mM de cloruro cálcico. La columna se lavó con el mismo disolvente, y continuación la PON adsorbida se eluyó con una solución acuosa que contenía 50% p/v de etilenglicol y 1 mM de cloruro sódico. Esta solución se desaló y se concentró usando una membrana de ultrafiltración (30 kDa) con un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contenía 1 mM de cloruro cálcico, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS, y se aplicó a una columna de agarosa de tipo amonio cuaternario (Q-Sepharose, Pharmacia) equilibrada con la misma solución. Después de que la columna se lavara con la misma solución, se realizó una elución con una concentración de cloruro sódico que se incrementaba por etapas en el orden de 0,1 M → 0,15 M → 0,2 M → 0,25 M → 1 M. Las fracciones eluidas con de 0,2 M a 0,25 M de cloruro sódico se recogieron y se concentraron usando una membrana de ultrafiltración (10 kDa).

Ejemplo 2

La solución que contiene PON preparada en el Ejemplo 1 se aplicó a una columna de agarosa de tipo ConA (ConA Sepharose, Amersham Pharmacia) equilibrada con un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contenía 10 mM de cloruro cálcico, 0,2 M de cloruro sódico, 5 µM de sal trisódica de EDTA, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS. La columna se lavó con la misma solución, y a continuación la PON se eluyó con la misma solución que contenía 3 M de cloruro sódico. La solución se concentró usando una membrana de ultrafiltración (10 kDa). Esta solución se aplicó a una columna de agarosa de tipo amonio cuaternario (mencionada anteriormente) del mismo modo que en el Ejemplo 1, y se recogió la fracción eluida con cloruro sódico 0,25 M. La relación de recuperación de la actividad era 95% después del susodicho tratamiento con agarosa tipo amonio cuaternario (segunda vez). Además, cuando la PON purificada se analizaba mediante SDS-PAGE (bajo una condición reducida), la PON se detectaba como una banda sustancialmente simple (peso molecular: 45 kDa).

Ejemplo 3

El experimento se realizó del mismo modo que en el Ejemplo 1, excepto que la concentración de cloruro sódico en el momento de la elución en el tratamiento con agarosa tipo amonio cuaternario (Q-Sepharose) se incrementaba por etapas en el orden de 0,15 M → 0,2 M → 0,25 M → 1 M. La fracción eluida con cloruro sódico 0,25 M se recogió y se concentró usando una membrana de ultrafiltración (10 kDa).

Ejemplo 4

La solución que contiene PON preparada en el Ejemplo 3 se aplicó de nuevo a la columna de agarosa tipo amonio cuaternario del mismo modo que en el Ejemplo 1, y se recogió una fracción eluida con cloruro sódico 0,2 M. Cuando la PON purificada se analizaba mediante SDS-PAGE (bajo una condición reductora), la PON se detectaba como una banda sustancialmente simple (peso molecular: 45 kDa).

El comportamiento de purificación de la PON en cada etapa de purificación se muestra en las siguientes tablas. El Ejemplo 1 corresponde a las Tablas 1 y 2, el Ejemplo 2 corresponde a la Tabla 3, el Ejemplo 3 corresponde a la Tabla 4 y el Ejemplo 4 corresponde a la Tabla 5.

Tabla 1

Espécimen	Volumen (ml)	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Suero	144	100	100	2,14
Después del tratamiento con soporte hidrófobo	250	4,2	66,4	31,93

Tabla 2

Espécimen	Volumen (ml)	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Solución tratada con soporte hidrófobo	10	100	100	32,91
Después del tratamiento con intercambiador aniónico (fracción eluida con cloruro sódico 0,2 M)	25	16,8	65,2	126,88
Igual que anteriormente (fracción eluida con cloruro sódico 0,25 M)	25	5,9	26,1	139,06

Tabla 3

Espécimen	Volumen (ml)	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Solución tratada con intercambiador aniónico	4	100	100	182,7
Después del tratamiento con ConA inmovilizada	4,9	7,4	31,4	777,4

Tabla 4

Espécimen	Volumen (ml)	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Solución tratada con soporte hidrófobo	286	100	100	32,41
Después del tratamiento con intercambiador aniónico	250	8,6	62,9	266,04

Tabla 5

Espécimen	Volumen (ml)	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Solución tratada con intercambiador aniónico	12	100	100	266,04
Después del 2º tratamiento con intercambiador aniónico	25	14,0	57,0	1.800,00

Ejemplo 5

Se preparó una preparación de PON que tenía una composición de 10 mg/ml de PON purificada (preparada en el Ejemplo 4) y un hidrocloruro de tris 2,5 mM (pH 7,5) que contenía 2,5% p/v de glicerol, 0,05% p/v de CHAPS, 0,1 mM de cloruro cálcico, 20 mM de cloruro sódico y 0,5 µM de EDTA·3Na.

Ejemplo experimental 1

El eluato obtenido después del tratamiento con un soporte hidrófobo (fenil-agarosa, también usada en los siguientes Ejemplos experimentales y Ejemplo de referencia 2) en el Ejemplo 1 se usó para probar los efectos de diversos detergentes (alquil-fenil-éter de polioxietileno (nombre comercial: Triton X-100), éster de ácido graso de polioxietilensorbitán (nombre comercial: Tween 80), octiltioglucósido, CHAPS) y la relación de actividad remanente. Se usó un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contenía 1 mM de cloruro cálcico y 25% p/v de glicerol. Las mezclas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, y a continuación se midió la actividad de PON. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Tipo de detergente	Concentración de tensioactivo añadido (%)	Relación de actividad remanente (%)
Inmediatamente antes		100
Triton X-100	0,1	70
Tween 80	0,1	65
Octiltioglucósido	0,25	80
CHAPS	0,5	98

Se encontró que se observaba una relación de actividad remanente superior con CHAPS en comparación con Triton X-100, Tween 80 y octiltioglucósido, y así el CHAPS tenía un efecto de estabilización superior.

Ejemplo de referencia 2

El eluato obtenido después del tratamiento con soporte se aplicó a una columna de intercambio aniónico (agarosa tipo DEAE) equilibrada con tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,4) que contenía 1 mM de cloruro cálcico, 25% p/v de etilenglicol y uno de diversos detergentes (alquil-fenil-éter de polioxietileno (nombre comercial: Triton X-100), éster de ácido graso de polioxietileno (nombre comercial: Tween 80), octilglucósido), y la PON se eluyó con cloruro sódico 0,15 M. Las concentraciones de Triton X-100 y Tween 80 añadidas eran 0,1% p/v y la concentración de octilglucósido añadida era 0,5% p/v. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Espécimen		Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Triton X-100	Solución tratada con soporte hidrófobo	100	100	30,61
	Después del tratamiento con intercambiador aniónico	14,6	95,0	149,44
Tween 80	Solución tratada con soporte hidrófobo	100	100	28,83
	Después del tratamiento con intercambiador aniónico	35,6	54,3	121,74
Octilglucósido	Solución tratada con soporte hidrófobo	100	100	36,08
	Después del tratamiento con intercambiador aniónico	30,5	49,6	58,43

Aunque el grado de purificación (actividad específica) observado con Tween 80 era comparable al observado con Triton X-100, la relación de actividad recuperada era la mitad que la observada con Triton X-100. El grado de purificación y la relación de actividad recuperada observados con octilglucósido eran ambos ligeramente inferiores que los observados con Triton X-100 y Tween 80. Cuando se usaba octiltioglucósido, el grado de purificación y la relación de actividad recuperada eran ambos comparables a los observados con octilglucósido (datos no mostrados).

Ejemplo experimental 2

El eluato obtenido después del tratamiento con soporte hidrófobo se aplicó a una columna de intercambio aniónico (agarosa tipo amonio cuaternario) equilibrada con un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contenía 1 mM de cloruro cálcico, 25% p/v de glicerol y 0,5% p/v de CHAPS, y se eluyó con cloruro sódico de 0,2 a 0,25 M para confirmar el comportamiento de elución de PON. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Tensioactivo	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Solución tratada con soporte hidrófobo	100	100	32,91
0,5% de CHAPS	22,7	80	129

Cuando se usaba CHAPS, el grado de purificación y la relación de actividad recuperada eran similares a los obtenidos con Triton X-100 en el Ejemplo de referencia 2. Además, incluso después de que esta composición se almacenara a 4°C durante 1 mes, la actividad se mantenía.

Ejemplo experimental 3

El eluato obtenido después del tratamiento con soporte hidrófobo se aplicó a una columna de intercambio aniónico (agarosa tipo amonio cuaternario) equilibrada con un tampón de hidrocloruro de Tris 25 mM (pH 7,5) que contenía 1 mM de cloruro cálcico, 5 µM de EDTA·3Na, 0,5% p/v de CHAPS y 25% p/v de glicerol, y se eluyó con cloruro sódico

de 0,2 a 0,25 M para confirmar el comportamiento de elución de PON. Como un control, se usó la solución que no contenía glicerol. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Aditivo	Relación de recuperación A_{280} (%)	Relación de actividad recuperada (%)	Actividad específica (U/A_{280})
Solución tratada con soporte hidrófobo	100	100	32,91
CHAPS + glicerol	22,7	80	129
CHAPS	13,4	64	152

Se observaba una relación de actividad recuperada inferior cuando no se añadía glicerol. Además, en cuanto a la estabilidad de la muestra aplicada y las fracciones obtenidas, se observaba aproximadamente 50% de disminución en la actividad después del almacenamiento durante 1 semana.

Ejemplo experimental 4

El efecto de la PON purificada en un modelo de infarto cerebral (isquemia-reperfusión) de rata se evaluó basándose en el volumen de la lesión por infarto como un índice.

Método experimental

1. Sustancia de prueba y método de preparación de la misma

Se usó PON disuelta en un disolvente a una concentración de 10 mg/ml del mismo modo que en el Ejemplo 5. Como el disolvente, solo se usó el disolvente usado para la sustancia de prueba.

2. Se usaron como los animales ratas CD (SD) macho (peso corporal: aproximadamente 300 g, 8 semanas de edad).

3. Se evaluó el volumen de la lesión por infarto.

4. Tipo de grupo y dosis

Como un grupo de control, el disolvente se administró a las ratas (n = 6) desde la vena caudal inmediatamente después de la isquemia. Como un grupo tratado con PON, 10 mg/kg de peso corporal se administraron a las ratas (n = 5) desde la vena caudal inmediatamente después de la isquemia.

5. Método

Preparación de un modelo de isquemia-reperfusión

Se realizó un modelo de isquemia-reperfusión cerebral según el método divulgado en el Documento no relacionado con patentes 7. Esto es, los animales fueron fijados en la posición dorsal bajo anestesia con halotano, se afeitó el cuello y se realizó una incisión mediana en la piel del cuello. La arteria carótida común se separó de los tejidos circundantes, la arteria carótida externa derecha y la arteria carótida común se ligaron con un hilo de seda. Se puso un hilo sobre la arteria carótida interna, a continuación una sutura revestida con silicio en un diámetro de 0,45 mm (hilo de nailon 4-0, Kyowa Tokei Kogyo) a lo largo de aproximadamente 2 cm en el extremo se insertó 18 mm desde la ramificación de la arteria carótida interna y la arteria carótida externa, se ligó y se fijó con el hilo de seda junto con la arteria carótida interna para hacer isquémica la región de perfusión de la arteria cerebral media (MCA) derecha. La parte con incisión se suturó, y los animales se despertaron de la anestesia. Después de isquemia durante 2 horas, la parte con incisión se abrió de nuevo. Se realizó reperfusión para la región de perfusión de la MCA retirando la sutura a lo largo de aproximadamente 1 cm, y la parte con incisión se suturó de nuevo.

Medida del volumen de la lesión por infarto

Veinticuatro horas después de la reperfusión, cada animal se decapitó, se realizó una craneotomía a lo largo de la sutura de la calavera, y los tejidos cerebrales se extrajeron y se cortaron transversalmente a 3 mm y 1 mm hacia adelante (+) desde la bregma y 1 mm, 3 mm y 5 mm hacia atrás (-) desde la bregma usando una cortadora de cerebros (RBM-4000C, Brain Matrix) para preparar secciones coronarias. Cada sección de cerebro se incubó posteriormente en tampón de fosfato 0,1 M que contenía 2% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC, Nacalai) durante aproximadamente 10 minutos. La sección de cerebro se recogió y se fotografió después de que se eliminara ligeramente la humedad. Se distinguían regiones positivas teñidas con TTC y regiones negativas. Las áreas con lesión por infarto se midieron a partir de ellas usando un analizador de imágenes (Simple PCI, C-IMAGING Systems) para calcular el volumen de las lesiones por infarto.

6. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

	Número de animales	Volumen de infarto cerebral (mm^2)
Grupo de control	6	422,5±36,4
Grupo tratado con PON	5	290,4±42,6*

El símbolo * significa que se observaba una diferencia significativa con una relación crítica menor de 5%.

Se confirmaba por primera vez en un experimento en animales que una enfermedad resultante de isquemia-reperfusión y/o infarto cerebral se inhibía significativamente mediante la administración de PON.

Ejemplo experimental 5

1) Síntomas neurológicos

Modelo de isquemia-reperfusión de la arteria cerebral media (MCA)

Los animales se anestesiaron mediante inhalación con sevoflurano y se fijaron en la posición dorsal sobre una esterilla calentada (SMS-2000J, Medical System Inc., graduada a 37°C). Después de la incisión del medio del cuello, la arteria carótida externa derecha y la arteria carótida común derecha se ligaron. Una sutura revestida con silicio en un diámetro de 0,19 a 0,20 mm a lo largo de aproximadamente 2 cm en el extremo (sedal nº 0.2 para pesca en ríos de montaña, Owner Co., Ltd) se insertó aproximadamente 0,9 cm a lo largo de la arteria carótida interna derecha desde la ramificación de la arteria carótida interna y la arteria carótida externa para hacer isquémica la MCA. La parte del cuello con incisión se suturó, y los animales se despertaron de la anestesia. Una hora después de la isquemia, los animales fueron anestesiados del mismo modo que se describe anteriormente, y la sutura se retiró para permitir la reperfusión de la MCA. Se confirmaba si el modelo se preparaba satisfactoriamente por los síntomas neurológicos inmediatamente antes de la reperfusión, más específicamente, verificando si la pata delantera izquierda se flexionaba y el tronco se flexionaba hacia la izquierda cuando el animal era colgado por la cola. Además, como un grupo de operación de referencia, se prepararon animales en los que solo se ligaban la arteria carótida externa derecha y la arteria carótida común derecha y no se insertaba la sutura.

Puntuación de síntomas neurológicos (puntuación de gravedad neurológica modificada (NSS))

Los animales se evaluaron con puntuaciones según el método descrito en el Documento no relacionado con patentes 8. Específicamente, cuando se observaban los siguientes síntomas, se añadía 1 punto para cada elemento, y la puntuación se obtuvo como en número de puntos total.

Las observación se realizó 1, 3, 5, 7, 9, 14, 19 y 23 días después de la reperfusión.

Síntomas contabilizados como 1 punto:

Cuando se cuelga por la cola, la para delantera izquierda se flexiona.

Cuando se cuelga por la cola, la pata trasera izquierda se flexiona.

Cuando se cuelga por la cola, el tronco se flexiona hacia la izquierda.

Cuando se pone sobre el suelo, el animal no puede caminar recto.

Cuando se pone sobre el suelo, el animal gira hacia la izquierda.

Cuando se pone sobre el suelo, el animal se inclina hacia la izquierda.

Falta de movimiento.

Temblor.

Ataque.

Administración del agente

Se administró PON (preparada en el Ejemplo 5) inmediatamente después de la reperfusión y una vez al día 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días después de la reperfusión. La dosis de cada administración era 10 mg/10 ml/kg de peso corporal. Como un control, se administró en el mismo volumen solamente un vehículo que no contenía PON (grupo del vehículo).

En cuanto al número de animales, el grupo de referencia consistía en 5 animales, el grupo de vehículo consistía en 3 animales y el grupo tratado con PON consistía en 4 animales. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

2) Función motriz

La función motriz se midió usando una cinta sin fin Rota-rod disponible comercialmente para ratones (MK-600, Muromachi Kikai Co., Ltd.). Específicamente, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 19 y 23 días después de la reperfusión, se hizo que animales caminaran sobre un cilindro que giraba a una velocidad constante (graduada al nivel 1) en la dirección opuesta a la rotación del cilindro, y se midió el tiempo desde el comienzo de la marcha hasta la caída desde el cilindro. El tiempo de marcha se midió hasta 200 segundos. Los ratones practicaban la marcha previamente durante 5 días antes de la prueba, y solo los animales que podían caminar durante 200 segundos el día antes de la prueba se usaban para la preparación del modelo de isquemia-reperfusión de la arteria cerebral media (MCA). Otros procedimientos eran iguales que en 1). Los resultados se muestran en la Fig. 2.

A partir de estos resultados, se revelaba que los síntomas neurológicos y la función motriz se mejoraban administrando PON al modelo de isquemia-reperfusión de MCA inmediatamente después de la reperfusión. Más específicamente, se confirmaba el efecto de mejora del pronóstico de la PON en el modelo de isquemia-reperfusión de MCA.

Ejemplo experimental 6

Se realizó un experimento del mismo modo que en el Ejemplo experimental 5, excepto que se administró inicialmente PON 3 horas después de la reperfusión, y se observaron los síntomas neurológicos. En cuanto al número de animales, el grupo de referencia consistía en 5 animales, el grupo del vehículo consistía en 3 animales y el grupo tratado con PON consistía en 4 animales. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

Además, se observó de modo similar la función motriz. En cuanto al número de animales, el grupo de referencia consistía en 4 animales, el grupo del vehículo consistía en 5 animales y el grupo tratado con PON consistía en 4 animales. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

A partir de estos resultados, se revelaba que los síntomas neurológicos y la función motriz también se mejoraban administrando PON al modelo de isquemia-reperfusión de la MCA 3 horas después de la reperfusión. Más específicamente, también se confirmaba el efecto de mejora del pronóstico de la PON en el modelo de isquemia-reperfusión de la MCA en los animales en los que la administración inicial de PON era 3 horas después de la reperfusión.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se pueden proporcionar formulaciones farmacéuticas que comprenden PON para uso en el tratamiento terapéutico del infarto cerebral.

Esta solicitud está basada en la Solicitud de Patente Japonesa nº 2004-27727 (fecha de presentación: 4 de febrero de 2004).

REIVINDICACIONES

1. Paraoxonasa para uso en el tratamiento terapéutico del infarto cerebral.

2. Paraoxonasa para uso en el tratamiento terapéutico del infarto cerebral según la reivindicación 1, que se usa para mejorar el pronóstico, los síntomas neurológicos o la disfunción motora resultantes del infarto cerebral.

3. Una formulación farmacéutica que comprende (a) paraoxonasa para uso en el tratamiento terapéutico del infarto cerebral; y (b) 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato a la concentración de 0,001 a 0,1% p/v de la preparación farmacéutica.

4. La formulación farmacéutica para uso según la reivindicación 3, que además contiene un poliol.

5. La formulación farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en la que el poliol es glicerol.

Fig. 1

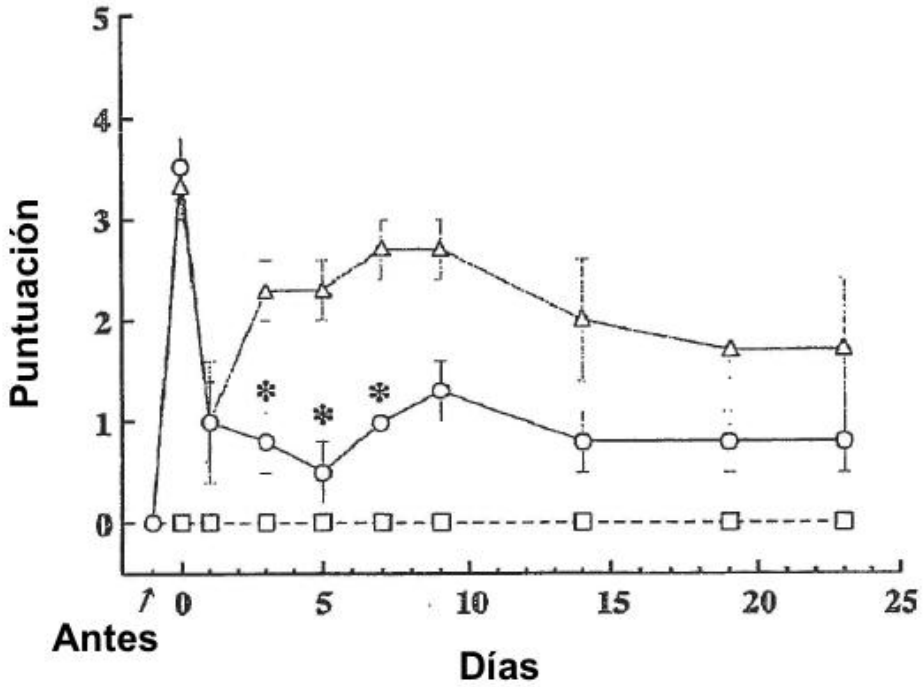

Puntuación
5
4
3
2
1
0
*
*
*
Antes
0
5
10
15
20
25
Días

Fig. 2

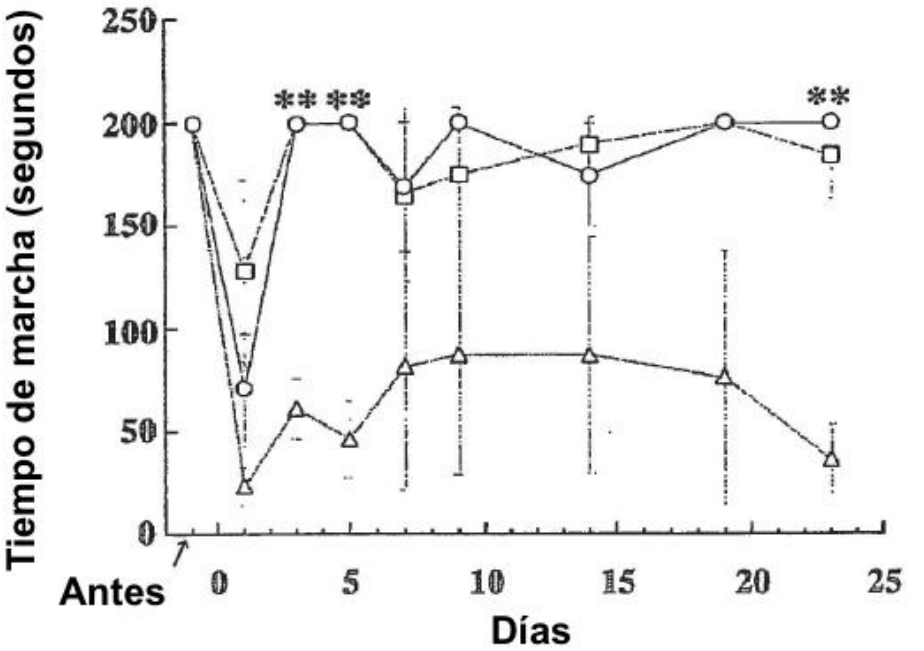

Tiempo de marcha (segundos)
250
200
150
100
50
0
** **
**
Antes
0
5
10
15
20
25
Días

Fig. 3

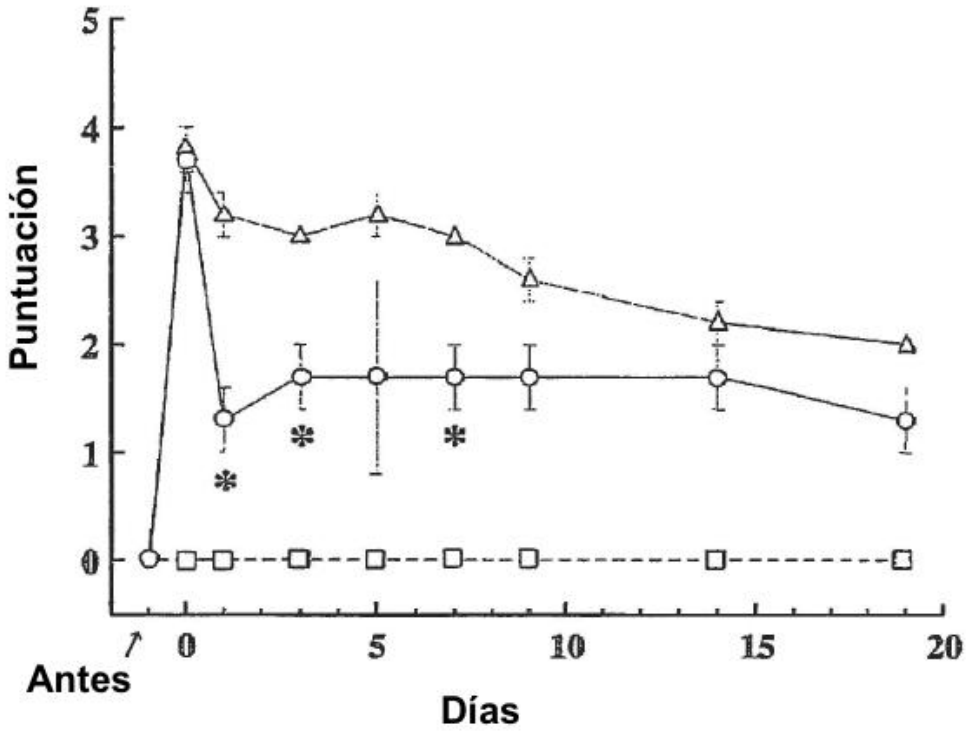
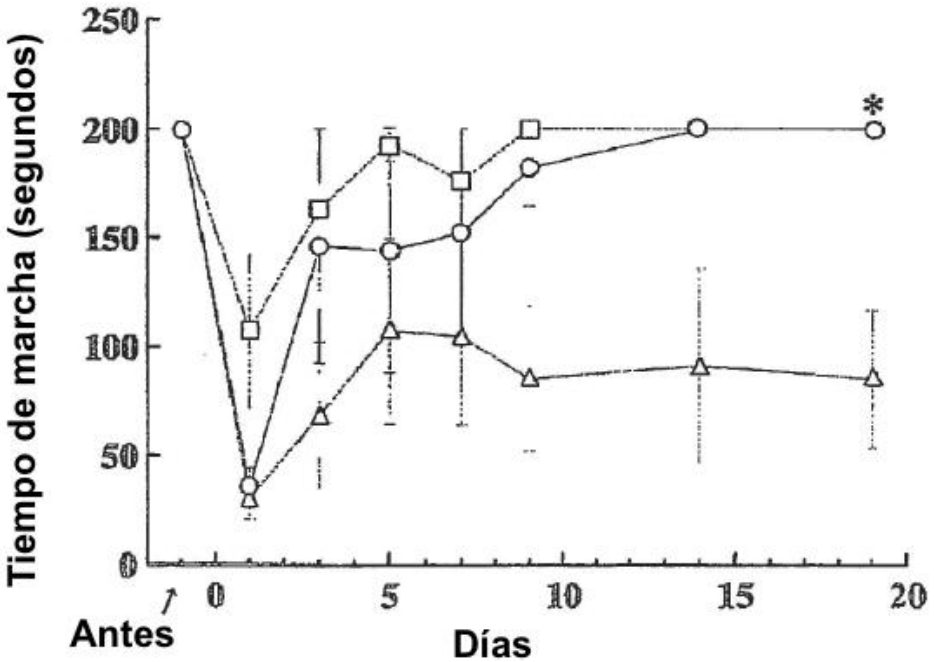

Puntuación
5
4
3
2
1
0
*
*
*
Antes
0
5
10
15
20
Días

Fig. 4


Tiempo de marcha (segundos)
250
200
150
100
50
0
*
Antes
0
5
10
15
20
Días