



PATENTE Nº. 86 191

"Processo de preparação controlada de glucosaminoglicanos de baixo peso molecular e de composições farmacêuticas"

para que

LABORATORI DERIVATI ORGANICI e MEDICLANUM FARMACEUTICI Srl, pretendem obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

Processo de preparação controlada de glucosaminoglicanos de baixo peso molecular através do tratamento de glucosaminoglicanos de alto peso molecular convencionais no estado sólido ou em solução, com um feixe rectilíneo de raios gama em doses de 2,5 a 20 Mrad, fornecidos em passos sucessivos de irradiação com intervalos de arrefecimento entre um passo de irradiação e o seguinte, na fase dinâmica.

A mistura obtida é submetida a fraccionamento, purificação, neutralização e liofilização. Os glucosaminoglicanos obtidos têm um peso molecular entre 1000 e 35000 daltons e são usados na preparação de composições farmacêuticas com actividade antitrombótica, fibrinolítica, antiaterogénica e de activação do cofactor II da heparina.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVA

Este invento refere-se a um processo de preparação controlada de glucosaminoglicanos de baixo peso molecular e de composições farmacêuticas correspondentes.

O referido processo é especificamente baseado no tratamento da glucosaminoglicanos convencionais com raios gama em doses adequadas, de forma a obter glucosaminoglicanos de peso molecular controlado, de preferência entre 1000 e 35000 daltons.

O processo de acordo com o invento é aplicável a glucosaminoglicanos em geral, e em particular a heparina, heparina de fluxo lento, heparina de fluxo rápido, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de queratano, ácido hialurónico, ácido algínico e mesoglicano, isoladamente ou em misturas dos vários compostos.

Sabe-se que as heparinas convencionais são agentes antitrombóticos eficazes, mas o seu uso é limitado devido a um nível de complicações hemorrágicas relativamente alto.

Por esta razão, a atenção científica e clínica tem sido dirigida nos últimos anos para o estudo de formas particulares de heparinas dispolimerizadas, as quais têm revelado possuir, na investigação farmacológica, características antitrombóticas e fibrinolíticas interessantes associadas a um baixo poder hemorrágico, como descrito por exemplo em J. F., Cade, Thrombosis Research, 613-625 (1984).

No que diz respeito aos outros glucosaminoglicanos, a redução do peso molecular altera a absorção oral e melhora a actividade farmacológica.

Um grande número de patentes e publicações descreve processos de preparação de heparinas de baixo peso molecular.

Estes processos baseiam-se no tratamento químico ou enzimático de heparinas convencionais.

O tratamento químico inclui por exemplo o tratamento

-3-

com oxidantes como peróxido de hidrogénio, ácido nítrico, peróxido de sódio e permanganato de potássio, ou com derivados da piridina; ou alternativamente a desesterificação e reesterificação, desaminação e reanimação, e sulfuração.

Este tratamento está descrito por exemplo na USP 4500519; USP 4351938 e patente francesa 2538404.

No tratamento enzimático, foram usadas várias enzimas purificadas (heparinase) ou não purificadas (extractos pancreáticos), como se descreve por exemplo na USP 3766167.

Os processos de dispolimerização da heparina conhecidos têm como problema a impossibilidade de controlo da divisão molecular de modo a manter as estruturas activas. Assim estes processos conduzem à formação de uma série não reprodutível de derivados que têm de ser separados por purificação e fraccionamento sucessivos, de acordo com os pesos moleculares de interesse terapêutico.

A técnica anterior descreve também o tratamento de heparina com raios gama, por exemplo em Chawla e Hayward (Pharmacology 20, 224, 1980) e Edwards (Carbohydr. Polymers 5, 473, 1985).

Este tratamento inclui a produção de membranas de heparina com acetato de N,N-dietilaminoetilcelulose e a esterilização das soluções de heparina. As conclusões destes trabalhos reivindicam um baixo nível de divisão molecular e uma perda mínima de actividade anticoagulante.

Surpreendentemente, descobrimos que tratando os glucosaminoglicanos com raios gama pelo processo de acordo com o invento, as alterações de peso molecular dos glucosaminoglicanos pretendidas são obtidas, mantendo embora suficiente estabilidade nas estruturas activas sulfatadas, isto é, são obtidos agregados moleculares específicos de glucosaminoglicanos caracterizados pela presença de grupos com uma alta actividade antitrombótica, uma actividade anticoagulante reduzida, um efeito hemorrágico baixo e uma actividade de agregação plaquetária baixa.

-4-

Na prática, estas características são determinadas pela redução do peso molecular e pela preservação dos grupos funcionais, activos em relação à antitrombina III e ao cofactor II.

O processo de preparação controlada de glucosaminoglicanos de baixo peso molecular de acordo com o presente invento é caracterizado pelo tratamento de glucosaminoglicanos convencionais de alto peso molecular, no estado sólido ou em solução, com um feixe rectilíneo de raios gama em doses entre 2,5 Mrad e 20 Mrad, fornecidos em etapas sucessivas de irradiação, com intervalos de arrefecimento entre uma etapa de irradiação e a seguinte, sujeitando então a solução obtida a fraccionamento químico de maneira a eliminar as fracções de alto peso molecular, purificando a fracção base desejada por osmose inversa, fraccionando ainda a solução purificada através de uma coluna de resina Sephacryl, transferindo as fracções obtidas para resinas catiónicas, neutralizando-as com soluções alcalinas e liofilizando-as.

Estas e outras características e vantagens do processo de acordo com o presente invento serão mais evidentes a partir da descrição detalhada apresentada seguidamente, relativo às concretizações preferidas do processo e da da a título de exemplo não limitativo.

O processo de acordo com a invenção pode utilizar heparinas produzidas industrialmente possuindo características estruturais variáveis com uma actividade anticoagulante variando entre 100 U/mg e 250 U/mg USP. Esta diferença de actividade anticoagulante é uma função da pureza e integridade molecular e depende das operações utilizadas na separação dos glucosaminoglicanos da matriz proteica e dos métodos de remoção dos componentes contaminantes.

No que diz respeito aos outros glucosaminoglicanos, podem ser usados compostos com características físicas e químicas normais, por exemplo, dermatano de P. M. 24000-35000 daltons e heparano de P. M. 13000-16000 daltons.

-5-

Estas matérias primas podem ser usadas no estado só lido na forma de pó, ou como soluções aquosas, eventualmente tamponadas a pH 2-8 de maneira a que, quando necessário, se evite a formação de um meio ácido que interfira no arranjo estrutural da molécula.

As concentrações da matéria prima em solução situam-se entre 1% e 30% (p/v) consoante o tipo de produto usado.

Antes do tratamento, as soluções são desarejadas e purgadas com azoto puro de forma a eliminar o ar residual.

O tratamento com raios gama é conduzido em recipientes de vidro pyrex para evitar a característica mudança de cor, para acastanhada ou castanha, que teria lugar durante o tratamento com o vidro comercial vulgar.

Podem usar-se vários radionuclídeos como fonte de raios gama, como o Co^{60} , Am^{241} , Cs^{137} e Ra^{226} . Usa-se preferencialmente o Co^{60} , que emite raios de alta energia (1,25 MeV) de trajectória rectilínea. Estes raios são de alta frequência, monocromáticos e não induzem fenómenos de radio-activação nos compostos sujeitos à sua acção.

Os raios gama são aplicados numa sucessão de tratamentos parciais a doses de 2-3 Mrad com vários intervalos entre o fim de um tratamento e o início do seguinte, de modo a obter uma dose total de irradiação de 2,5 a 20 Mrad, fornecidos na fase estática ou preferencialmente na fase dinâmica.

A razão do intervalo entre um tratamento e o seguinte é evitar que o sistema sobreaqueça, o que conduziria a alterações indesejáveis nas características químicas e físicas do produto. O processo é consequentemente conduzido a uma temperatura entre 20 e 55°C e preferencialmente entre 20 e 40°C.

No final do tratamento de irradiação, as soluções são sujeitas a fraccionamento químico de modo a eliminar as fracções de alto peso molecular. Esta operação é conduzida em soluções diluídas em água a 2-5% (p/v), por tratamento

-6-

com solventes como o metanol, etanol ou acetona numa quantidade de 10-30% (v/v) relativamente à solução. As fracções precipitadas são separadas por decantação e o líquido decantado é alimentado com mais solvente de modo a recuperar a fracção base desejada.

O precipitado base, depois de dissolvido em água, é purificado por osmose inversa até à remoção total das fracções de baixo peso molecular, inferiores a 500, e dos componentes salinos.

A solução purificada é posteriormente fraccionada através de colunas Sephacryl S.200 ou Sephadex 50 na presença de salinidade cuja concentração varia de acordo com o glucosaminoglicano em questão.

As fracções activas recolhidas após esta passagem através da resina são finalmente despirogenadas, filtradas em condições de esterilidade e liofilizadas.

Alternativamente, as fracções activas recolhidas após esta passagem através da resina podem ser transferidas para resinas catiónicas Castel C/300 ou C/20 e depois neutralizadas com soluções alcalinas de Na, Ca, K, Mg, ou Li de modo a converter os glucosaminoglicanos nos sais correspondentes.

As soluções obtidas são purificadas por osmose inversa com eliminação dos compostos de peso molecular inferior a 500, de modo a eliminar os elementos alcalinos em excesso.

As fracções recolhidas, são finalmente despirogenadas filtradas em condições de esterilidade e liofilizadas.

Operando sob as condições descritas, formam-se, com boa reprodutibilidade fracções moleculares de glucosaminoglicanos que possuem uma actividade farmacológica bem definida.

Em particular, operando sob as condições descritas, o grau de despolimerização aumenta em função do aumento da dose de raios gama administrada, e correspondentemente obtém-se uma redução da actividade anticoagulante juntamen-

-7-

te com um aumento da razão anti-Xa/APTT, isto é, a razão entre a actividade anti-Xa e tempo de tromboplastina parcialmente activa.

Os resultados obtidos quando se opera nas condições descritas sobre heparinas de valores iniciais de U/mg USP variados, são apresentados como ilustração nas tabelas 1, 2 e 3 seguintes

TABELA 1 - ACTIVIDADE ANTICOAGULANTE EM USP

<u>Mrad</u>	<u>0</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>7,5</u>	<u>10</u>	<u>12,5</u>	<u>15</u>	<u>17,5</u>
HP 1	160	145	130	94	80	75	65	55
HP 2	167	136	120	88	75	64	53	47
HP 3	156	130	120	103	78	63	53	42

TABELA 2 - PESOS MOLECULARES (valores $\times 10^3$)

<u>Mrad</u>	<u>0</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>7,5</u>	<u>10</u>	<u>12,5</u>	<u>15</u>	<u>17,5</u>
HP 1	15	13,6	12,1	11	9,1	7,5	7,3	6,6
HP 2	15,6	14,3	12,7	10,9	8,5	7,3	6,6	5,7
HP 3	15,2	14	12,3	10,9	8,1	7,7	6,6	5,1

TABELA 3 - ACTIVIDADE BIOLOGICA DAS FRACÇÕES
PURIFICADAS, TRATADAS COM 17,5 Mrad

	<u>APTT</u>	<u>anti-Xa</u>	<u>Razão</u>
HP 1	12	108	9
HP 2	13	98,8	7,6
HP 3	15	120	8

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A figura 1 apresenta os valores relativos à variação da actividade (USP) das heparinas com a irradiação em Megarads.

-8-

A função matemática significativa adequada à interpolação da correlação entre estes parâmetros é uma linha recta, com um coeficiente de correlação de significância P.001 (linearidade excelente).

A figura 2 mostra os valores relativos à variação do peso molecular com a irradiação em Megarads.

A função matemática mais adequada à interpolação da correlação é uma linha recta com coeficiente de correlação R da significância P.001 (linearidade excelente).

A acção das heparinas despolimerizadas com raios gamma de acordo com o invento foi avaliada através do tempo de hemorragia por confronto com o das heparinas convencionais.

Os testes foram realizados seguindo o método descrito por Dejana et al. / Thromb. Haemostasis (1982) 48,108 / em ratas anesthesiadas às quais se cortaram 2 mm da ponta da cauda.

Mediu-se o tempo que decorria até que a cauda deixasse de sangrar (sem que voltasse a sangrar nos 30 segundos imediatos).

As heparinas foram administradas 15 minutos antes do corte na cauda.

Os resultados são apresentados na tabela 4.

TABELA 4 -		TEMPO DE SANGRAMENTO (MINUTOS)		
DOSE	HEPARINA	HEPARINA DESPOLIN.	CONTROLO	
0,25 mg/Kg	8	4		
0,5 mg/Km	12	5		
1 mg/Kg	25	7,5		
CONTROLO			5	

No. de animais por dose = 10

Foram obtidos resultados análogos aos apresentados, aplicando a despolimerização e purificação descritas a soluções de vários glucosaminoglicanos tais como sulfato de

-9-

heparano, sulfato de dermatano condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, ácido hialurônico e ácido algínico.

No caso do sulfato de dermatano, extensão da despolimerização em função da irradiação em Mrad, confirma a validade do sistema.

A Tabela 5 mostra os pesos moleculares obtidos para intensidades de irradiação diferentes.

TABELA 5 -	SULFATO DE DERMATANO DESPOLIMERIZADO						
	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15
Mrad							
P.M. (x 1000)	31,2	24,8	18	12	10,4	8,5	5

A Figura 3 mostra a função estatisticamente representativa relativa à relação entre P. M. e Mrads como sendo uma linha recta com um coeficiente de correlação R de significância P.001.

Isto constitui um sinal evidente de boa linearidade entre a redução do peso molecular e a irradiação em Mrad.

A despolimerização dos glucosaminoglicanos, incluindo a heparina, pode ser levada a cabo tratando com raios gamma a matéria prima no seu estado sólido na forma de pó, de modo a obter produtos despolimerizados com o peso molecular pretendido.

Os glucosaminoglicanos despolimerizados de acordo com o presente invento, tendo um peso molecular de 1000 a 35000 daltons e na forma de sais de Na, Ca, K, Mg ou Li, quer só-zinhos quer em associação com outros produtos, são úteis na prevenção do tratamento de trombozes incluindo patologias oculares. São também úteis como agentes fibrinolíticos, anti-inflamatórios, anticomplemento e antiaterogénicos e como activadores do cofactor II da heparina.

Os referidos glucosaminoglicanos são usados terapêuticamente como componentes de composições farmacêuticas na preparação de comprimidos, cápsulas, gotas, soluções para administração oral, colírios, supositórios, pomadas, formas

-10-

para injeção intravenosa intradérmica e intramuscular e de preparações especiais para absorção intradérmica com liberação controlada.

Os exemplos seguintes são dados como ilustrações não limitativas da preparação de glucosaminoglicanos de acordo com o presente invento.

EXEMPLO 1

Dissolvem-se 16 g de heparina de sódio da mucosa intestinal possuindo 170 U/mg USP e um peso molecular de 14000 daltons numa quantidade suficiente de solução tampão de fosfato de pH 7 para obter um volume total de 100 ml.

A solução é transvazada para um recipiente de vidro pyrex de 150 ml, desarejada sob vácuo e purgada com azoto puro.

O recipiente é fechado hermeticamente e sujeito a tratamentos sucessivos de 2,5 Mrad até um total de 17,5 Mrad, por exposição a raios gama emitidos pelo nuclídeo radioativo Cobalto⁶⁰.

Depois da irradiação, a solução, é diluída a 5% com água destilada e lentamente tratada com 15 ml de etanol sob agitação enérgica. Depois de uma noite a +5°C, o líquido sobrenadante é decantado e clarificado por filtração. Sendo adicionados 25 ml de metanol ao filtrado sob agitação, e a suspensão obtida é mantida durante 12 horas a +5°C.

O precipitado recolhido após decantação é seco sob vácuo a 40°C.

O pó obtido é dissolvido em água a uma concentração de 2% (p/v) e a solução é purificada por osmose inversa, através de uma membrana MWCO 500, por concentração, diluição e nova concentração.

O concentrado é diluído em água a 1% (p/v) da heparina e adiciona-se NaCl até uma concentração de 1M.

-11-

A solução é passada através de uma coluna de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura contendo 5 Kg de Sephadex 50 e a um caudal de 50 ml/h.

São recolhidas várias fracções de acordo com leituras efectuadas a 230 nm e com as actividades APTT e anti-Xa.

As fracções activas são misturadas, despirogenadas durante uma noite a alta temperatura, filtradas através de um filtro de membrana C,45 e liofilizadas.

A quantidade de produto obtida é de 5 g.

Alternativamente, passam-se as fracções activas misturadas através de uma resina catiónica C/20 e neutralizam-se na forma de sais alcalinos de Ca, K, Mg ou Li.

As soluções neutralizadas são purificadas por osmose inversa com 500 MWCO, concentradas, despirogenadas, filtradas sob condições de esterilidade e liofilizadas.

O sal de sódio obtido tem as seguintes características:

- Actividade heparínica	20 U/mg USP
- Actividade APTT	15 U/mg
- Actividade anti-Xa	135 U/mg USP
- Razão	9
- Enxofre orgânico	10,8%
- Ácidos urónicos	24,7%
- Poder rotatório	+49°
- Peso molecular	5000 daltons

Exemplo 2

Dissolvem-se 5 g de sulfato de dermatano, correspondente a uma banda única após electroforese, com um poder rotatório específico de -67° e um peso molecular de 32000 daltons, numa solução tampão de fosfato de pH 7,5 usando uma quantidade suficiente para que o volume total seja de 100 ml.

Esta solução é depois tratada como no exemplo 1

-12-

obtêm-se cerca de 2,5 g de dermatano despolimerizado com as seguintes características químicas:

- Enxofre orgânico	7,2%
- Ácidos urónicos	28 %
- Razão de sulfato/carboxilo	1,45
- Poder rotatório	-63°
- Peso molecular	6 300 daltons

EXEMPLO 3

Dissolvem-se 15 g de sulfato de heparina, correspondente a uma banda única após electroforese, com um poder rotatório de +50° e um peso molecular de 13000 a 16000 daltons, numa solução tampão de fosfato de pH 6,5 usando uma quantidade suficiente para que o volume total seja de 100 ml.

Esta solução é depois tratada como no Exemplo 1. Obtêm-se cerca de 9 g de heparano despolimerizado com características electroforéticas idênticas às do material de partida mas com peso molecular de cerca de 6000 daltons.

EXEMPLO 4

Dissolvem-se 5 g de sulfato de condroitina, correspondente a uma banda única após electroforese, com poder rotatório de -29°, numa solução tampão de fosfato de pH 7 usando uma quantidade suficiente para que o volume total seja de 100 ml. Segue-se então o procedimento do exemplo 1.

Obtêm-se cerca de 3 g de um produto com as características electroforéticas e químicas da substância de partida mas com um peso molecular de cerca de 7000 daltons.

EXEMPLO 5

Dissolvem-se 16 g de mesoglicano com a seguinte composição:

-13-

- Heparina de fluxo lento	$10 \pm 5\%$
- Sulfato de heparano	$52 \pm 5\%$
- Sulfato de dermatano	$30 \pm 5\%$
- Sulfato de condroitina	$8 \pm 2\%$

obtido como descrito na USP 4 489 066 de 18.12.84 e contendo 8% de enxofre orgânico e 24% de ácidos urónicos, em 100 ml de tampão de fosfato de pH 7,5. A solução é irradiada e fraccionada unicamente por tratamento alcoólico, como no exemplo 1.

O produto purificado e liofilizado (10 g) tem 7,8% de enxofre orgânico e 22,8% de ácidos urónicos.

-14-

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação controlada de glucosaminoglicanos de baixo peso molecular, caracterizado por se tratar glucosaminoglicanos convencionais de alto peso molecular no estado sólido ou em solução, com um feixe rectilíneo de raios gama em doses entre 2,5 e 20 Mrad, fornecidos na fase estática ou preferencialmente na fase dinâmica, através de passos sucessivos de irradiação com intervalos de arrefecimento entre um passo de irradiação e o seguinte, após o que se sujeita a solução obtida a fraccionamento químico de modo a eliminar as fracções de alto peso molecular, purificando a fracção base pretendida por osmose inversa, fraccionando a solução purificada através de Sephacryl ou outro tipo de resina em coluna, transferindo as fracções obtidas para resinas catiónicas e neutralizando-as com soluções alcalinas e liofilizando-as.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os glucosaminoglicanos usados como matéria-prima serem heparinas com uma actividade anticoagulante de 100 a 250 U/mg USP.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os glucosaminoglicanos usados como matéria-prima compreenderem heparina de fluxo lento, heparina de fluxo rápido, sulfato de heparano, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de queratano, ácido hialurónico, ácido algínico ou mesoglicano, quer sózinhos quer em mistura.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto do referido tratamento com raios gama se realizar com glucosaminoglicanos em solução aquosa, eventualmente tamponada a pH 2-8.

-15-

5 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido tratamento com raios gamma ser conduzido em soluções aquosas de glucosaminoglicanos, de concentração 1-30% (p/v), desarejadas e purificadas com azoto.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de cada um dos sucessivos passos de ir radiação mencionados fornecer uma dose de 2-3 Mrad.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os intervalos de arrefecimento serem intercalados entre o fim de um passo de irradiação e o início do passo seguinte.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido tratamento com raios gamma ser conduzido a uma temperatura de 20 a 55°C e preferencialmente entre 20 e 40°C.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido fraccionamento químico ser conduzido numa solução aquosa 2-5% (p/v) por tratamento com solventes tais como, metanol, etanol, e acetona numa quantidade de 10 a 30% (v/v).

10 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a referida purificação da fracção base ser conduzida por osmose inversa até se conseguir a eliminação total das fracções de baixo peso molecular inferior a 500 (cutoff) e dos compostos salinos.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se realizar o fraccionamento da solução purificada em colunas de Sephacryl, Sephadex 50 ou de outro tipo de resinas.

-16-

12 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto da referida neutralização ser efectuada com soluções alcalinas de Na, Ca, K, Mg ou Li.

13 - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 12, caracterizado por os glucosaminoglicanos terem um peso molecular entre 1000 e 35000 daltons e possuírem uma actividade anticoagulante entre 10 e 250 U/mg USP e uma relação anti-Xa/APTT entre 1 a 15, ou superior.

14 - Processo de preparação de composições farmacêuticas à base de glucosaminoglicanos, quando preparados de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se associarem os seus sais de Na, Ca, K, Mg ou Li com excipientes farmacêuticos, de modo a obter composições farmacêuticas activas como agentes antitrombóticos, fibrinolíticos, anti-inflamatórios, anticomplemento ou antiaterogénicos ou como activadores do cofactor II da heparina.

15 - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por as composições farmacêuticas serem preparadas na forma de comprimidos, cápsulas, gotas, soluções para administração oral, colírio, pomadas, formas para injeções intravenosas, intradérmicas ou intramusculares e preparações especiais para absorção intradérmica com libertação controlada.

Lisboa, 20. NOV. 1987

Por LABORATORI DERIVATI ORGANICI e
MEDIOLANUM FARMACEUTICI Srl

Val - C AGENTE OFICIAL -

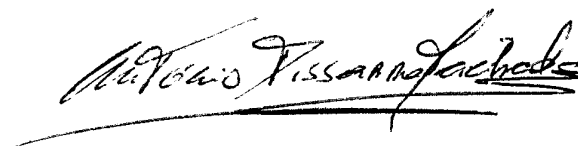


FIG 1

EQUAÇÃO : $y = 6,71x - 153,44$
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO: $R = 0,982$

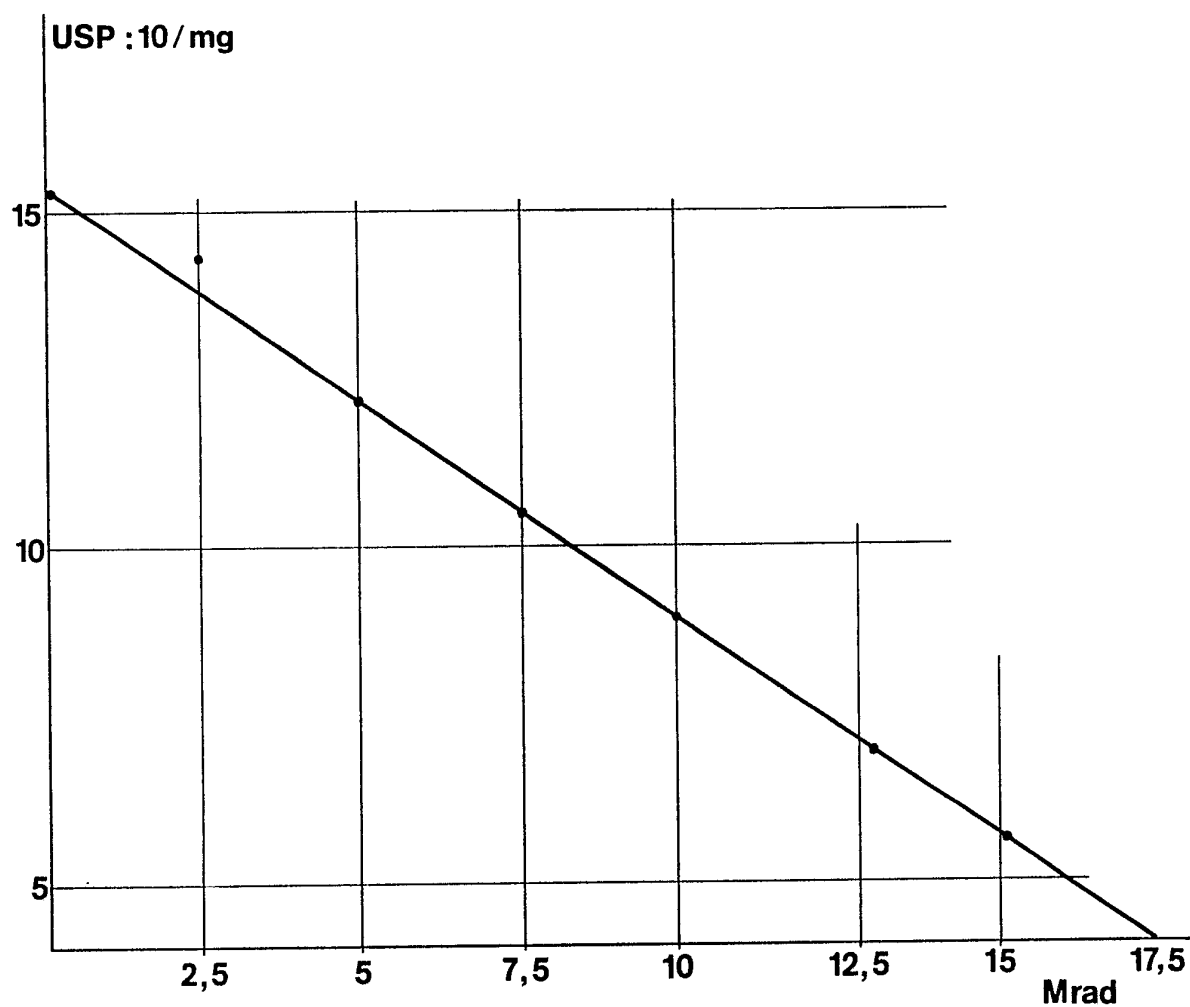


FIG 2

[Handwritten signature]

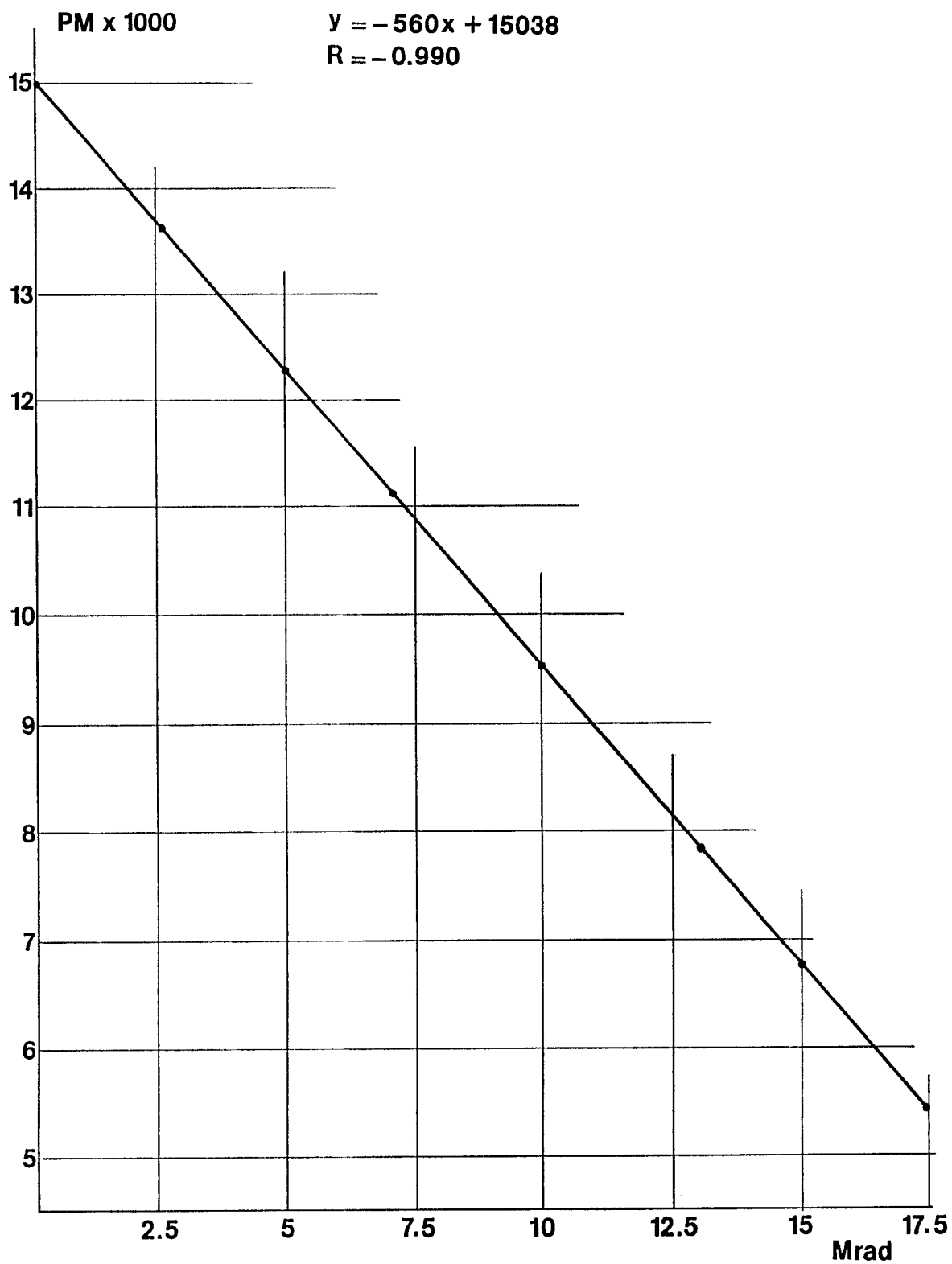


FIG 3

$$y = -1608x + 26800$$
$$R = -0.955 \quad 5\%$$

