

(11) *Número de Publicação:* PT 89835 B

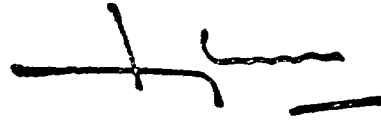
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

A61K037/24 A

A61K047/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.02.24	(73) <i>Titular(es):</i> GENENTECH, INC. 460 POINT SAN BRUNO BOULEVARD SOUTH S.FRANCISCO, CALIF.94080 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.02.26 US 160797 1989.01.27 US 303779	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.10.04	(72) <i>Inventor(es):</i> DAVID C. CIPOLLA US TUE H. NGUYEN US STEVEN J. SHIRE US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 07/93 1993.07.19	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VITOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i> PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE RELAXINA HUMANA	
(57) <i>Resumo:</i>	



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de uma composição farmacêutica que consiste em se formular relaxina humana a um pH ácido desde cerca de 4 até menos de aproximadamente 7.

=====

GENENTECH, INC.

" PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE RELAXINA HUMANA "



A composição, útil no trabalho de parto e na inibição do parto prematuro, inclui um tampão capaz de manter o pH da composição dentro de uma gama pretendida e pode também incluir um agente para tornar a composição isotónica e um agente estabilizador, se necessário. Um exemplo específico é uma relaxina humana formulada num tampão citrato, pH aproximadamente 5,0, na presença de cloreto de sódio, numa força iónica de cerca de 0,15 μ .

Fundamento do invento

Campo do invento

Este invento está relacionado com uma formulação estável e homogénea de relaxina humana biologicamente activa e com um método para o tratamento de mamíferos em tal formulação.

Descrição de trabalhos anteriores

A relaxina humana madura é um peptídeo hormonal do ovário com aproximadamente 6000 daltons que se sabe ser responsável pela remodelação do aparelho reprodutor antes do parto, facilitando assim o processo do nascimento. Hisaw, F.L., Pros. Soc. Exp. Biol. Med., 23, 661-663 (1926); Scwabe, C. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 75: 503-570 (1977); James, R. et al., Nature, 267: 544:546 (1977).

Esta proteína parece modular a reestruturação dos tecidos conjuntivos nos órgãos alvo para se obter as alterações necessárias na estrutura dos órgãos durante a gravidez e parto. Alguns dos papéis importantes da relaxina como hormona da gravidez incluem inibição do trabalho de parto prematuro e amadurecimento cervical no parto.

Apesar de ser predominantemente uma hormona da gravidez, a relaxina também foi detectada em mulheres não grávidas e no homem. Bryant-Greenwood, G.D., Endocrine Reviews, 3: 62-90 (1982) e Weiss, G., Ann. Rev. Physiol., 46: 43-52 (1984).



A relaxina tem sido purificada a partir de uma variedade de espécies animais incluindo porco, rato, cavalo, tubarão, tigre, rato, cão e homem e apresenta homologia, pelo menos primária e secundária, com a insulina e com o factor de crescimento tipo insulina. No homem a relaxina encontra-se em maior abundância no corpo luteo (CL) da gravidez.

Através da utilização de sondas do gene da relaxina do porco, foram identificados por clonagem genómica duas formas do gene humano (Hudson, P. et al., Nature, 301: 628-631 [1984] e Hudson, P. et al., The EMBO Journal, 3: 2333-2339 [1984]), apesar de apenas uma destas formas de genes (H2) ser transcrita em CL.

É pouco claro se o outro gene é expresso num outro sítio do tecido ou se representa um pseudo-gene. Os dois genes da relaxina humana apresentam considerável homologia de nucleotídeos e aminoácidos um em relação ao outro, particularmente nos peptídeos B e C. No entanto, existem algumas regiões com importantes divergências de sequência, particularmente na região amino-terminal das cadeias A e B.

De modo idêntico em todas as espécies examinadas, o produto primário da tradução da relaxina H2 é uma prorelaxina consistindo numa sequência sinal de 24 aminoácidos seguido de uma cadeia B de cerca de 29 aminoácidos, um peptídeo de ligação de 104-107 aminoácidos e uma cadeia A de cerca de 24 aminoácidos.

O facto de a relaxina H2 ser sintetizada e expressa no ovário sugere que esta é a sequência que está envolvida na fisiologia da gravidez.



Quando a relaxina (H2) sintética humana e certos análogos da relaxina humana foram testados quanto à actividade biológica, os testes revelaram um núcleo de relaxina necessário à actividade biológica assim como certas substituições de aminoácidos que não afectaram a actividade biológica. Johnson et al., em Peptides: Structure and Function, Proc. Ninth American Peptide Symposium, Deber, C.M. et al., (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985).

Foram publicados vários métodos para a aplicação ou introdução de relaxina de porco como droga, incluindo administrações intravenosas e intramusculares. Birnberg and Abitol, Obstet. & Gynecol., 10: 366-370 (1957); Eichner et al., Am. J. Obstet. Gyn., 71: 1035-1048 (1956).

Em adição a relaxina de porco tem sido usada topicamente em ensaios clinicos com humanos para amadurecimento do canal cervical e indução do trabalho de parto. MacLennan et al., Obstetrics & Gynecology, 68: 598-601 (1986); MacLennan et al., The Lancet, i: 220-223 (1980); MacLennan et al., Obstetrics & Gynecology, 58: 601-604 (1981); MacLennan et al., Aust. NZ J. Obstet. Gynaec., 25: 68-71 (1985).

Nestes estudos a relaxina de porco em água destilada foi misturada com grânulos de metilcelulose soluveis em água para fazer um gel viscoso. Observou-se que uma dose de 2 mg era eficaz no aumento do amadurecimento cervical. MacLennan et al., (1981), supra.

Em adição, a relaxina de porco foi moldada em pastilhas feitas com polietilenoglicol e usada para amadurecer o canal cervical humano. Evans et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 147: 410-414 (1983).



A relaxina de porco também tem sido formulada por suspensão em gel K-Y estéril e em tampão salino de fosfatos e administrado por infusão na abertura cervical através de uma pipeta de inseminação estéril. A dilatação do canal cervical aumentou dentro de 8 horas após infusão de 3000 unidades de relaxina na abertura cervical. Peresgrovas and Anderson, Biology of Reproduction, 26: 765-776 (1982).

A Publicação da Pat. Europeia Nº 101309 publicada em 22 de Fev. 1984 e Pat. U.S. Nº 4 758 516 publicada em 19 de Julho de 1988 divulgam respectivamente a clonagem molecular e caracterização da sequência de um gene codificador da relaxina H1 humana e da relaxina H2 humana e seus análogos.

Publ. Pat. Europeia Nº 260 149, publicada em 16 de Março de 1988, descreve as formulações da pe-ro-relaxina humana. Pat. U.S. Nº 4 267 101 publicada em 12 de Maio de 1981, descreve um processo para obtenção da relaxina humana a partir de membranas fetais. A Publ. Pat. Europeia Nº 251 615 publicada em 7 de Jan. de 1988, descreve como combinar a cadeia A de relaxina humana reduzida ou análogo com a cadeia B de relaxina humana reduzida ou análogo em condições que incluem um pH superior a cerca de 7,0.

Na Pat. U.S. nº 4267 101 está divulgado um processo para a obtenção de relaxina humana a partir de membranas fetais. Sherwood em The Physiology of Reproduction, ed. por Knobil e Neill, (New York, Raven Press, 1988), p. 585-673, descreve na pág. 587 que quase todos os processos para a extracção e isolamento da relaxina tiram vantagem da estabilidade da relaxina em solventes acídicos.

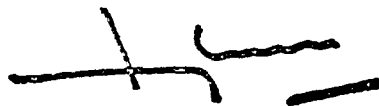


Em adição, na página 588 é mencionado que um meio fortemente ácido para a extracção de relaxina minimiza a proteólise quer pelo pH baixo per se quer pela precipitação de proteases de alto peso molecular. Eldridge and Fields, Endocrinology, 117: 2512-2519 (1985) divulgaram que a relaxina de coelho tem um ponto isoeléctrico, conforme determinado por isoelectrofocagem, de aproximadamente 6,5. Isto contrasta com os resultados de Fields et al., Ann. NY Acad. Sci., 380: 75(1982), que descobriram um ponto isoeléctrico muito mais alto para a relaxina de coelho.

Ainda, a Patente U.S. Nº 2 964 448, publicada em 13 de Dezembro, 1960, descreve composições de relaxina injectáveis compreendendo relaxina num óleo injectável, de preferência de acidez baixa, juntamente com um sal de ácido gordo de alumínio.

Constitui um objectivo do presente invento proporcionar uma formulação biologicamente activa, estável e homogénea de relaxina humana para uso terapêutico, i.e., aplicações tópicas ou parenterais. Um outro objectivo deste invento é proporcionar uma formulação que permita o armazenamento durante um período longo num estado líquido, facilitando assim o armazenamento e embalagem e transporte antes da administração.

Ainda um outro objectivo é reduzir a agregação e degradação da relaxina humana e proporcionar uma sua formulação que seja resistente à degradação resultante de flutuações da temperatura. Ainda um outro objectivo é a formulação de relaxina humana como gel para aplicações cervicais. Um outro objectivo é proporcionar uma formulação de relaxina humana que tenham vantagens fisico/químicas e terapêuticas adicionais.



Estes e outros objectivos deste invento serão aparentes a partir desta especificação como um todo.

Sumário do Invento

Assim, o presente invento proporciona uma composição farmaceutica biologicamente activa útil na modulação da fisiologia da reprodução de mamiferos, compreendendo uma quantidade eficaz de relaxina humana num tampão que mantem o pH da referida composição entre cerca de 4 e menos de 7, de preferência 4,5 - 5,5. Adicionalmente, a formulação é de preferência isotónica.

A composição pode estar na forma de liquido, liofilizado, liquido congelado ou gel. Se a composição estiver na forma de um gel de preferência contem ainda um polissacárido soluvel em água ou polietilenoglicol, de preferência metilcelulose.

Numa outra execução, este invento está relacionado com um método de modulação da fisiologia reprodutora de mamiferos compreendendo a administração ao mamifero de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição aqui tratada.

Até este invento não foi apreciado que em condições ácidas as velocidades de degradação da relaxina humana conforme testado por HPLC são mais lentas num nivel óptimo. Portanto, a imunogenicidade da formulação pode ser reduzida e a sua segurança aumentada. Como resultado desta observação, a formulação de relaxina humana pode ser preparada de modo a reter actividade biológica, ter uma vida de

prateleira elevada e poder ser administrada terapeuticamente com ou sem liofilização. De preferência a relaxina é formulada a cerca de pH 5 com uma vida de prateleira (assumindo uma redução aceitável de 10% na área do principal pico de HPLC) a 5°C de pelo menos 2 anos.

Breve descrição dos desenhos

Figs. 1a-1e representam gráficos da fracção do principal pico de RP-HPLC para a relaxina humana em função do tempo para cinco formulações diferentes variando entre pH 3 e 7,5 a diferentes temperaturas.

Fig. 2 representa um gráfico da velocidade de degradação de formulações de relaxina humana em função do pH da formulação, conforme medido por PP-HPLC a diferentes temperaturas.

Figs. 3a-3e representam gráficos da actividade de relaxina humana em função do tempo para cinco formulações diferentes variando de pH 3 a 7,5 a três temperaturas diferentes.

Fig. 4 representa um gráfico de barras da velocidade de degradação a 25°C do principal pico de HPLC fase reversa numa formulação de citrato de pH 5 a que foram adicionados diferentes agentes estabilizadores.

Fig. 5 representa um gráfico da concentração no soro versus tempo para relaxina curta em coelhos prenhes após administração intravenosa, subcutânea e intravaginal.



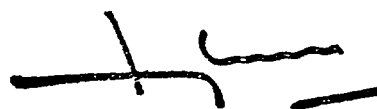
Fig. 6 representa um gráfico da concentração no soro versus tempo para relaxina curta em coelhos prenhes após administração subcutânea com e sem benzopurpurina.

Descrição das realizações preferidas

Conforme aqui é usado, relaxina humana significa uma proteína funcional tendo funções hormonais específicas, tais como, por exemplo, a modulação da fisiologia reprodutora de seres humanos e possivelmente outros mamíferos, incluindo, mas não estando limitados a manutenção da gravidez, realização do trabalho de parto, e aumento da mobilidade dos espermatozoides como auxiliar da fertilização.

Incluem-se como exemplos específicos de tais utilizações a efectuação de numerosas funções reprodutoras relacionadas com a gravidez assim como outras funções biológicas tais como preparação do canal de nascimento através, por exemplo, de efeitos na sínfise púbica ou ligamento púbico e rearranjo dos filamentos de colagénio assegurando assim o parto; efeitos de compressão do miométrio; preparação do endométrio para a implantação; papel na luteólise; crescimento e diferenciação das glândulas mamárias; aumento da mobilidade do esperma; e possível aumento da capacidade do esperma em penetrar no cervix humano.

A funcionalidade da relaxina humana ou das suas variantes é testada através da observação de um efeito positivo na sínfise púbica de murganhos num bioensaio in vitro ou de um aumento nos níveis de cAMP num ensaio in vitro usando uma linha celular uterina. O termo "biologicamente activo" para definir composições farmacêuticas é aqui usado no contexto estabelecido atrás para a relaxina humana.



A relaxina humana e os seus métodos de preparação, incluindo síntese em culturas de células recombinantes são conhecidos (e.g., EP 101.309 e 112.149).

Incluídas no âmbito do termo "relaxina" estão as relaxinas humanas derivadas de fontes recombinantes ou nativas assim como variantes de relaxina, tais como variantes da sequência de aminoácidos.

Encontrou-se por ionização espectroscópica de massa usando bombardeamento com átomos rápidos que as espécies predominantes de relaxina humana no corpo lúteo e soro é a forma de relaxina H2 com uma cadeia B truncada, i.e., relaxina H2 (B29 A24), em que os quatro aminoácidos C-terminais da cadeia B estão ausentes de modo a que a cadeia B termine com uma serina na posição 29. Esta forma predominante (aqui designada como "relaxina curta" em oposição à "relaxina longa" contendo uma cadeia B de 33 aminoácidos) é a preferida para ser usado aqui.

Dentro do âmbito do termo "relaxina humana" estão incluídos outras inserções, substituições ou deleções de um ou mais resíduos de aminoácidos, variantes de glicosilação, relaxina humana não glicosilada, sais orgânicos e inorgânicos, derivados covalentemente modificados da relaxina humana, prepro-relaxina humana e pro-relaxina humana.

Através do uso da tecnologia de DNA recombinante podem ser preparados variantes de relaxina por alteração do DNA de base. Todas estas variações ou alterações na estrutura da molécula de relaxina resultando em variantes estão incluídas dentro do âmbito deste invento desde que a actividade funcional (biológica) da relaxina humana seja mantida.



As variantes de relaxina humana tendo a actividade funcional descrita podem ser facilmente identificados usando os ensaios in vitro atrás referidos.

Podem ser preparados variantes das sequências codificadoras da relaxina que estejam alterados de uma ou mais maneiras para introduzir codões codificadores de ácido aspártico em posições específicas dentro do gene selecionado. As proteínas variantes resultantes podem ser tratadas com ácido diluído para libertar uma proteína ou peptídeo pretendido, tornando assim a proteína mais isolável ou purificável.

A relaxina pode também ser preparada através da produção de uma proteína de fusão da cadeia de relaxina e ubiquitina e usando uma ubiquitina-hidrolase para clivar a proteína. Em adição, pode ser empregue um sistema de expressão em levedura para a pro-relaxina usando um vector codificador de proteína de activação trans.

A relaxina aqui tratada pode ser preparada por síntese das cadeias A e B e purificação e montagem delas, como descrito em EP 251 615, publicado em 7 de Janeiro de 1988. Para a relaxina sintética é geralmente empregue uma proporção molar de 4:1 da cadeia A para B. O produto resultante é então purificado por quaisquer processos conhecidos, incluindo, por exemplo, HPLC de fase reversa, cromatografia de permuta iónica, filtração em gel, diálise ou similares ou quaisquer combinações de tais processos.

A quantidade eficaz de relaxina para ser formulada na composição é seleccionada com base em várias variáveis, incluindo a condição específica a ser tratada, a história médica do paciente e a via terapêutica e protocolo a ser utilizado.



Os estados a ser tratados incluem a expulsão difícil de um feto no fim do tempo, a inibição de trabalho de parto prematuro e o tratamento de certas perturbações do tecido conjuntivo tais como esclerodorme. A via terapêutica inclui administração parenteral, como seja, e.g. administração subcutânea, intraperitoneal, intravenosa e intramuscular.

A dosagem média corrente para o tratamento de um problema de gravidez varia dependendo de numeros indícios conhecidos do médico, incluindo a via e protocolo de administração, a fase da gestação, o tipo de relaxina, o estado do paciente a ser tratado, a forma da composição e outras considerações conhecidas do médico. Como exemplo, em clinica, a quantidade eficaz para administração tópica é adequadamente cerca de 5 a 10 ml de gel contendo cerca de 1 a 3 mg de relaxina humana. As doses médias administradas intravenosamente estão na gama de cerca de 0,1 μ g por quilograma a 1500 mg por quilograma para funções reprodutoras eficazes como seja a preparação do canal de nascimento.

O pH da formulação é mantido entre cerca de 4 e menos de 7, mais preferido cerca de 4 a 6, ainda mais preferido cerca de 4,5 a 5,5, de preferência cerca de 5. Por sua vez, o pH óptimo dependerá da força iónica e temperatura de armazenamento da formulação.

A formulação é de preferência isotónica e de preferência a força iónica da formulação é de pelo menos cerca de 0,1 μ , mais preferido cerca de 0,1 a 0,2 μ , ainda mais preferido cerca de 0,15 μ e a osmolaridade da formalação é de preferência cerca de 200 a 300 mmol/kg, de preferência cerca de 240-260 mmol/kg.



Se a temperatura de armazenamento for de cerca de 40°C , o pH é preferencialmente cerca de 4 a menos de 7. Se a temperatura de armazenamento for de aproximadamente 25°C , o pH é de preferência cerca de 4 a 5.

De preferência o pH da solução aqui tratada é mantido através do uso de um tampão capaz de manter o pH dentro da gama pretendida. Se um tampão particular pode ser empregue dependerá da sua capacidade de tampão e mais especialmente do seu valor de pK . Exemplos incluem certos tampões de ácidos orgânicos e histidina.

Tampões de ácidos orgânicos adequados (tampões de ácidos orgânicos e seus sais) incluem e.g. tampões citrato (e.g. mistura de citrato mono-sódico e de citrato di-sódico, mistura de ácido cítrico e citrato tri-sódico, mistura de ácido cítrico e citrato mono-sódico, etc), tampões succinato (e.g. mistura de ácido succínico e succinato mono-sódico, mistura de ácido succínico e hidróxido de sódio, mistura de ácido succínico e succinato di-sódico, etc), tampões tartrato (e.g., mistura de ácido tartárico e tartrato de sódio, ácido tartárico e tartrato de potássio, mistura de ácido tartárico e hidróxido de sódio, etc), tampões malato, tampões gluconato (e.g. mistura de ácido glucónico e gluconato de sódio, mistura de ácido glucónico e hidróxido de sódio, mistura de ácido glucónico e gluconato de potássio, etc), tampões borato, tampões imidazole, tampões lactato (e.g. mistura de ácido láctico e lactato de sódio, mistura de ácido láctico e lactato de potássio, etc), tampões acetato (e.g. mistura de ácido acético-acetato de sódio, mistura de ácido acético e hidróxido de sódio, etc).

Os tampões mais preferidos aqui usados são tampões citrato e acetato, de preferência citrato. Deve-se salientar que tampões, tais como, tampões de fosfatos



e tris que têm sido usados tradicionalmente não mantêm o pH da formulação no nível pretendido.

A formulação aqui tratada tem de preferência a isotonicidade e osmolalidade correctas para poderem ser usadas em aplicações parenterais, particularmente via intravenosa. Se a força iónica e a osmolalidade não estiverem dentro das gamas preferidas atrás mencionadas e se pretenda ajustá-las àquelas gamas, pode-se adicionar um agente à formulação que ajuste adequadamente a osmolaridade.

Tais agentes incluem, por exemplo, sais de metais alcalinos e sais de metais alcalino terrosos tais como haletos, por exemplo, cloreto de sódio e potássio, brometo de magnésio, etc. e alcoois de açucares poli-hídricos tais como manitol. O agente mais preferido é o cloreto de sódio.

Também se pode adicionar à formulação um agente farmacêuticamente aceitável para estabilização e liofilização da formulação. Os exemplos incluem alcoois de açucares poli-hídricos tais como álcoois tri-hídricos ou superiores, de preferência glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol, assim como alcoois de cadeia linear tais como e.g., etanol e propilenoglicol.

Estes agentes podem ser usados sózinhos ou combinados. De preferência o agente é formulado numa quantidade de cerca de 1 a 25% por peso, e de preferência 2 a 10% por peso, tendo em consideração as quantidades dos outros ingredientes.

Em adição, a composição aqui descrita contém adequadamente um agente para aumentar a absorção pelo cervix ou vagina se a preparação for tópica.



São exemplos de tais estimuladores da adsorção moléculas que tenham uma estrutura semelhante a do colestrol tais comoglicocolato, e.g., glicocolato de sódio, colato, e.g., colato de sódio e ácido fusídico e seus derivados, incluindo sais e ésteres tais como 24,25-tauro-di-hidrofusidato; tensioactivos não iónicos; derivados de ácidos gordos tendo cerca de 7 a 25 átomos de carbono, como seja o ácido oleico; niacinamida; ácido nicotínico ou salicílico ou os seus sais ou ésteres; e azona.

A composição líquida preferida neste caso é relaxina humana num tampão citrato 10 mM a pH 5, com cloreto de sódio presente para uma força iónica total de cerca de 0,15 μ , representando a osmolalidade correcta.

A formulação aqui descrita pode ser na forma líquida, congelada ou de gel, ou pode ser liofilizada e reconstituída. Uma entendido na matéria será capaz de determinar o tipo e quantidade de qualquer excipiente adicional como seja um álcool de açúcar, que possa ser necessário para optimizar a liofilização.

O manitol é um desses aditivos preferidos. A formulação aqui descrita é estável durante períodos de tempo prolongados e pode ser guardada num estado líquido a várias temperaturas. De preferência, a formulação líquida é guardada em vidro e não em plástico.

Em adição, a formulação pode ser congelada, descongelada, congelada novamente e outra vez descongelada sem efeitos adversos. Uma temperatura de armazenamento preferida varia entre cerca de 2 e 8°C. A formulação na forma líquida manterá a actividade biológica durante pelo menos 30 dias e a estabilidade física durante pelo menos 2 anos conforme extrapolado a partir dos dados de 1 ano.



Para a obtenção de uma formulação em gel, a composição líquida é tipicamente misturada com uma quantidade eficaz de um polissacárido solúvel em água ou polietilenoglicol para formar um gel com a viscosidade correta para ser aplicado topicamente.

O polissacárido que pode ser usado inclui, por exemplo, derivados de celulose tais como derivados de celulose esterificados, incluindo alquil-celuloses, hidroxi-alkil-celuloses e alqui-hidroxiceluloses, por exemplo, metilcelulose, hidroxietil-celulose, carboximetilcelulose, hidroxipropil-metilcelulose e hidroxipropilcelulose; amido e amido fraccionado; agar, ácido alginico e alginatos; goma arábica; pululano; agarose; carragenano; dextranos; dextrinas; fructanos; inulina; mananos; xilanos; arabinanos; quitosanos; glicogénios; glucanos; e biopolímeros sintéticos; assim como gomas tais como goma xantano; goma guar; goma de alfarroba; goma arábica; goma tragacanta; e goma de Karaya; e seus derivados e misturas.

O agente de gelificação preferido neste caso é um que seja inerte para os sistemas biológicos, não tóxico, simples de preparar, e não demasiado fluido ou viscoso e que não desestabilize a relaxina nele contida.

De preferência o polissacárido é um derivado esterificado da celulose, mais preferencialmente um que seja bem definido, purificado e que faça parte da lista da USP, e.g. derivados de metilcelulose e a hidroxialquil-celulose tais como, hidroxipropilcelulose, hidroxietilcelulose e hidroxipropil-metilcelulose. O mais preferido é metilcelulose.



O polietilenoglicol usado na gelificação é tipicamente uma mistura de polietilenoglicóis de baixo e alto peso molecular para se obter a viscosidade correcta. Por exemplo, uma mistura de um polietilenoglicol de peso molecular 400 - 600 com um de peso molecular 1500, será eficaz para esta finalidade quando misturados na proporção correcta para se obter uma pasta.

O termo "solúvel em água" conforme aplicado aos polissacáridos e polietilenoglicóis pretende incluir soluções coloidais e dispersões. Em geral, a solubilidade dos derivados de celulose é determinada pelo grau de substituição dos grupos éter e os derivados estabilizadores aqui usados deverão ter uma quantidade suficiente de tais grupos éter por unidade de anidroglicose na cadeia de celulose para tornar os derivados solúveis em água. Um grau de substituição de éter pelo menos 0,35 grupos éter por unidade de anidroglicose é geralmente suficiente. Adicionalmente, os derivados de celulose podem estar na forma de sais de metais alcalinos, por exemplo, os sais de Li, Na, K ou Co.

Se se empregar metilcelulose no gel, de preferência constitui cerca de 2 - 5% do gel e a relaxina está presente numa quantidade de cerca de 100 - 1000 µg por ml de gel. Mais preferencialmente, a metilcelulose compreende cerca de 3% do gel e a quantidade de relaxina é de cerca de 300 - 1000 µg por ml de gel.

Também, se a formulação for um gel que seja sensível à luz, de preferência contem um ou mais agentes tais como anti-oxidantes, de preferência ácido ascórbico (de preferência pelo menos 0,5%) e/ou co-solventes, de preferência glicerol e/ou etanol (de preferência a cerca de 20%), mais preferencialmente glicerol para inibir ou evitar foto-oxidação se o gel for exposto à luz.



Por exemplo, o gel de metilcelulose é guardado num recipiente coberto com papel estanhado ou num recipiente com cor para evitar a entrada da luz.

Os exemplos que se seguem ilustram o presente invento mas não devem ser encarados como limitantes do âmbito do invento.

EXEMPLO I

Os estudos de estabilidade da relaxina humana foram efectuados em vários tampões 10 mM variando entre pH3 e 10 (Estudo 1). Os efeitos do aumento da força iónica na estabilidade das formulações foram também estudados (Estudo 2).

Preparação da amostra

Para os Estudos 1 e 2, a relaxina humana longa (forma H2 com cadeia B de 33 aminoácidos) foi obtida através da síntese das cadeias A e B (divulgado em EP 112 149, supra) usando a metodologia de síntese em fase sólida de Barany, G. and Merrifield et al., (1980) em The Peptides, 2: 1-284, Gross, E. e Meienhofer, J., eds., Academic Press, New York.

As cadeias foram purificadas por HPLC (gradiente de ácido trifluoroacético (TFA/acetonitrilo) e montadas numa proporção de pesos de 4:1 de cadeia A:B a pH de aproximadamente 10,2 em tampão CAPS 0,2 - 1M (ácido 3-[ciclo-hexilamino] propanossulfónico, Cabliochem), hidrocloreto de guanidina 0,75 M, 10% (v/v) metanol (Burdick e



Jackson) e uma gama de proteína total de 0,25 a 2,0 µg/ml. A solução foi bastante gaseada com azoto e agitada durante a noite (12-18 horas) a 20°C.

A amostra é então dialisada contra um tampão adequado (tampão salino de fosfatos, 0,01% de Tween 20 ou 0,1% de ácido acético) e aplicada numa coluna de HPLC Vydac C-4 usando um gradiente de TFA /acetonitrilo. A fracção de relaxina foi identificada em HPLC e colhida num tampão TFA que foi removido da amostra com vácuo. A relaxina assim obtida foi liofilizada.

124 mg (cerca de 80% por peso como peptídeo) da relaxina longa foi empregue no Estudo 1 e 20 mg (cerca de 67% por peso de peptídeo) para o Estudo 2. Ambas as amostras consistiam em pós brancos liofilizados com até 15% por peso de ácido trifluoroacético (TFA). Adicionou-se suficiente água Milli-Q (água desionizada que foi passada através de um sistema de purificação de água consistindo em carvão activado e permuta de iões fabricado pela Millipore Inc.) para se obter uma concentração de cerca de 1 mg/ml de peptídeo.

A relaxina longa em água Milli-Q foi passada para o sistema tampão adequado à formulação por diálise a 5°C usando tubo de diálise Spectrator 7 (peso molecular de exclusão 3500). Este tubo foi pré-limpo em 2 litros de água Milli-Q contendo 1 ml de β-mercaptoetanol, 3,36 g de EDTA e 4,2 g de NaHCO₃ seguido de quatro lavagens em 2 litros de água Milli-Q a 60 - 70°C. A tubagem foi subsequentemente guardada em etanol 50% (p/v) a 5°C e lavada extensivamente antes da diálise.



As concentrações de todas as amostras imediatamente após a diálise foram determinadas por espectroscopia de absorção de ultravioleta usando um coeficiente de extinção de $2,18 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ conforme determinado pela análise quantitativa de aminoácidos num análogo de relaxina onde os resíduos de metionina foram substituídos por resíduos de lisina, corrigindo as concentrações para os efeitos de dispersão da luz.

Cada uma das amostras foi esterilizada por filtração numa haste de fluxolaminar através de filtros 0,2 M Millex GV-4 (área de 0,01 polegadas quadradas) para frascos de vidro estéreis em boro-silicato de 100 μl , 300 μl ou 1,5 ml (Wheaton) com rolhas com vedantes de Teflon e guardadas a 5, 25 e 40°C. As concentrações são indicações precisas do que foi filtrado para os frascos, pois experiências separadas indicam que a filtração a 1mg/ml não resulta num abaixamento significativo da concentração de proteína.

No Estudo 1, os frascos em triplicado para cada tampão foram guardados a cada uma das temperaturas para se obter estimativas de erro e para determinar se as amostras estavam contaminadas quando da amostragem repetida a partir do mesmo frasco.

Para o Estudo 3, empregou-se a relaxina H2(BB33 A24) Apyro-Glu¹, em que H2 se refere ao gene humano expresso no ovário humano, A e B referem-se às respectivas cadeias da relaxina humana, os números a seguir a A ou a B referem-se ao comprimento da cadeia, i.e., número de aminoácidos que constituem a cadeia A ou B e o "superscript" que precede o aminoácido designa a cadeia A ou B em que o aminoácido está situado e o expoente que se segue ao aminoácido refere-se à posição na cadeia.



A preparação deste análogo e a recombinação das cadeias estão descritas de um modo geral na Pub. EP Nº 251.615, supra. A proteína foi purificada como descrito atrás para os Estudos 1 e 2.

Cerca de 36 ml da relaxina piroglu humana a cerca de 4,65 mg/ml foi formulado em 10 mM citrato a pH 5,0 como descrito atrás e tornado isotónico pela adição de NaCl. Esta proteína foi diluída a 1 mg/ml (determinado espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção de 2,18). Um total de 1,4 ml de cada formulação foi esterilizado por filtração numa hote de fluxo laminar para frascos de vidro de 1,5 ml autoclavados equipados com rolhas de Teflon. Num estudo de efeitos de congelação/descongelação a proteína foi também diluída para 2 mg/ml e congelada e em seguida fizeram-se os estudos.

Protocolo de estabilidade

Estudo 1: Porções de vinte ml de relaxina longa a cerca de 1 mg/ml em água foram passados para 20 mM glicina (pH3), 10 mM citrato (pH5), 10 mM acetato (pH5), 10 mM histidina (pH6) e tampão 10 mM Tris (pH 7,5) com as composições exactas descritas na Tabela I, com os ingredientes do tampão citrato calculados para dar um pH de 5,0. Todos os tampões foram tornados isotónicos (0,154 μ) com a adição de NaCl.

As concentrações foram determinadas como previamente descrito, as amostras esterilizadas por filtração e os frascos cheios de acordo com o protocolo mostrado na Tabela II. Os 135 frascos resultantes de 100 μ l e os 90 frascos de 1,5 ml foram sujeitos a testes de estabilidade a 5, 25 e 40°C.



As amostras foram testadas aos 0, 7, 21 e 30 dias por ensaios de HPLC em fase reversa, ELISA e AMP cíclico. Além destes ensaios as amostras foram também testadas por dicroísmo circular perto do UV ("near UV CD"), e ultracentrifugação analítica (UC) nos dias 0 a 30. Em adição, a formulação de citrato foi analisada durante cinco meses por RP-HPLC a 5°C e durante sessenta dias por RP-HPLC a -20°C.

Estudo 2: Porções de 1 ml de relaxina longa a cerca de 1mg/ml em água foram passadas por diálise para tampões 10 mM acetato, citrato e succinato a pH5 sem sal adicional, 0,1 M ou 0,5 M NaCl (composições dos tampões dadas na Tabela I). As nove amostras resultantes foram esterilizadas por filtração, divididas por três volumes iguais e introduzidas em frascos esterilizados de 300 µl em vidro.

Os 27 frascos resultantes contendo cerca de 9 mg foram colocados a 5,25 e 40°C durante até 40 dias para testar a estabilidade. As amostras foram testadas por um ensaio de ELISA e um ensaio de HPLC em fase reversa C4 nos dias 0, 7, 14, 28 e 40. As restantes 3 ml de relaxina foram mantidos em água Milli-Q a 5°C e usadas como material de referência.

Os resultados no Estudo 1 e nos subsequentes estudos de estabilidade mostraram que esta relaxina é estável em água, demonstrado por HPLC, durante pelo menos cinco meses a 5°C. Estas observações foram repetidas em amostra referência usadas em subsequentes estudos de estabilidade.



TABELA I

FORMULAÇÕES LIQUIDAS PROTOTIPO PARA A RELAXINA A 1,0 MG/ML

FORMULAÇÕES PARA O ESTUDO 1

<u>Formulação</u>	<u>Composição por ml</u>
10 mM Glicina, pH 3,0	0,74 mg Glicina-HCl (6,66 mM) 0,25 mg Glicina (3,34 mM) 8,87 mg NaCl (0,152M)
10 mM Acetato, pH 5,0	0,25 Acetato de Sódio (2,96 mM) 7,0 µL 1,0M Acido acético (7,04mM) 8,60 mg NaCl (0,147M)
10 mM Citrato, pH 5,0	0,69 mg Acido Citrico Mono-hidra- tado (3,3 mM) 1,97 mg Citrato de sódio Di-hi- dratado (6,7 mM) 7,25 mg NaCl (0,124 M)
10 mM Histidina, pH 6,0	1,12 mg Histidina-HCl (5,32 mM) 0,73 mg Histidina (4,68 mM) 8,66 mg NaCl (0,148M)
10 mM Tris, pH 7,5	1,32 mg Tris-HCl (8,36 mM) 0,20 mg Tris Base (1,64 mM) 8,52 mg NaCl (0,146 mM)

* Todas as formulações são isotônicas (0,154 µ, a força iônica sendo completada pela adição de NaCl).

FORMULAÇÕES PARA O ESTUDO 2

<u>Formulação</u>	<u>Composição por ml</u>
10 mM Acetato, pH 5,0	0,54 mg Acetato de Sódio (3,42 mM) 3,42 µL 1,0 M Acido Acético (6,58mM)
10 mM Succinato, pH 5,0	0,51 mg Acido Succinico (4,25 mM) 1,55 mg Succinato di-Sódico Hexa- -Hidratado (5,75 mM)
10 mM Citrato, pH 5,0	0,53 mg Acido citrico (2,78 mM) 2,12 mg Citrato de Sódio di-hidra tado (7,22 mM)
Os 3 tampões + 0,1 M NaCl	5,84 mg NaCl
Os 3 tampões + 0,5 M NaCl	29,22 mg NaCl

TABELA II

VOLUME (μ L) DA FORMULAÇÃO POR FRASCO NECESSÁRIO PARA CADA EN-
SAIO NO ESTUDO 1 DA ESTABILIDADE DA RELAXINA

Tempo	ELISA	UV	HPLC	AMP Cíclico	"Near UV CD"	UC
0 dia	10	100	10	10	500	50
7 dias	10	-	10	10	-	-
14 dias	10	-	10	10	-	-
21 dias	10	-	10	10	-	-
1 mês	10	100	10	10	500	50
2 meses	10	100	10	10	500	50
3 meses	10	100	10	10	500	50
4 meses	10	100	10	10	500	50
5 meses	10	100	10	10	500	50
6 meses	10	100	10	10	500	50

100 μ l da proteína formulada para os
ensaio de ELISA, HPLC e AMP cíclico nos dias 7^o, 14^o e 21^o
foram colocados em frascos esterilizados de 100 μ l (3 fras-
cos/ensaio $\times$ 5 formulações $\times$ 3 temperaturas = 45 frascos).

As amostras de 1^o, 2^o e 3 meses foram
agrupados de modo semelhante (45 frascos) e as amostras de
4, 5 e 6 meses foram agrupados de modo semelhante em mais 45
frascos, resultando em 135 frascos de 100 μ l para estes três
ensaio.



A restante proteína formulada foi distribuída por frascos de 1,5 ml de modo a cada frasco contar 0,9 ml, o que foi volume suficiente para os ensaios de CD, UV e UC.

Isto resultou num total de 90 frascos de 1,5 ml (5 formulações x 3 temperaturas x 6 pontos do tempo).

Estudo 3: As formulações com o análogo de relaxina a serem avaliadas foram as seguintes:

1. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl.
2. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl dialisado contra um tampão citrato isotônico preparado de fresco. (Isto serve como controle).
3. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com manitol (5,07%) dialisado contra um tampão citrato 10 mM, 5,07% de manitol (sem NaCl).
4. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 5% de etanol absoluto.
5. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 10% de etanol absoluto.
6. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 5% de glicerol.
7. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 10% de glicerol.



8. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 5% de propilenoglicol.
9. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 10% de propilenoglicol.
10. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que foi adicionado 0,02% de EDTA (sal disódico).
11. Tampão citrato 10 mM tornado isotônico com NaCl a que se adicionou 5% de manitol.

Estas formulações foram colocadas em triplicado a 5, 25 e 40°C.

Em adição, 1 ml de relaxina a 2 mg/ml no tampão citrato isotônico (NaCl) original foi introduzido, em condições de esterilidade, em 27 frascos de 1,5 ml e congelado a -20°C. No dia 0, três frascos foram descongelados e testados; nos dias subsequentes três frascos foram descongelados e testados.

Métodos de ensaio

Ensaio de HPLC: Obtiveram-se cromatogramas em colunas de fase reversa VydacTM C4 usando as condições de coluna que se seguem: caudal 1 ml/min., solução A: 0,1% TFA, solução B: 0,1% TFA, 90% acetonitrilo, gradiente de 20% A a 50% B a 1%/minuto.

No Estudo 1, as áreas totais dos cromatogramas mantiveram-se constantes dentro do erro das medições, i.e., o decréscimo da área do pico principal foi acompanhado de um aumento das áreas dos picos laterais.



A regeneração subsequente da coluna de HPLC revelou que a maior parte da relaxina eluiu nas condições de gradiente. Este comportamento contrasta com o que foi observado no Estudo 2 e onde a área total determinada pelo ensaio de HPLC não foi constante ao longo do tempo. Uma vez que o material foi purificado num grau maior, a estabilidade conforme medido por HPLC aumentou.

Ensaio de ELISA: As amostras foram diluídas no tampão de diluição para os ensaios de ELISA de modo a que a concentração esperada caísse na gama média da porção linear da curva padrão. O principal anticorpo para o ensaio de ELISA é um anticorpo policlonal de coelho purificado por afinidade induzido contra o peptídeo sintético da relaxina humana em que a cadeia A da relaxina humana tem um piro-Glu na posição 2 da cadeia.

As concentrações conforme determinado por ELISA foram normalizadas por uma referência que foi submetida juntamente com as amostras de estabilidade. Os valores determinados por ELISA foram geralmente superiores aos valores esperados baseados na espectroscopia de UV, mas após normalização, foram cerca de 20% inferiores aos valores esperados. No Estudo 1 as amostras em triplicado foram submetidas para cada ponto do tempo por diluição das amostras de cada um dos três frascos.

Ensaio de AMP cíclico: As amostras foram diluídas num tampão de ensaio de células e incubadas com células uterinas de Macaco Rhesus. A suspensão de células resultante foi testada para AMP cíclico usando o processo de ensaio de fabricante da duPont de Nemours, Inc., Wilmington, Del. Usou-se uma curva padrão para relacionar concentração de AMP cíclico com concentração de relaxina.



Esta concentração é teoricamente "bio-activa" ao contrário da ELISA, que mede uma concentração "imuno-reactiva". Uma amostra referência de concentração conhecida foi submetida juntamente com amostras de estabilidade e usada para normalizar as concentrações determinadas de relaxina.

Ensaio de Sinfise Púbica de Ratinho: O bioensaio in vivo do ligamento da sinfise púbica de ratinho mede o efeito re-modulador da relaxina sobre o tecido conjuntivo. Ver Steinetz B.G. et al (1960) Endocrinology, 67: 102.

Dicroísmo Circular Perto do UV: Amostras de relaxina a cerca de 1 mg/ml foram diluídas a 1:1 com dialisato e o espectro obtido numa cuvete cilíndrica termostaticada de 0,5 cm de passo, a 20°C de 320 a 240 nm num espectropolarímetro Cary 60 modificado Aviv Tm. Após colheita dos resultados de CD a amostra foi removida da célula de CD e diluída cinco vezes em tampão salino de fosfatos.

A concentração foi então determinada como antes usando espectroscopia de absorção de UV. O sinal de CD em elipticidade (miligraus) foi convertido em elipticidade média do peso de resíduos conforme descrito por Adler et al., Meth. Enzymol., 27: 675 (1973) usando um peso médio de resíduo de 112,9 g para a relaxina humana.

Ultracentrifugação Analítica: As amostras de estabilidade da relaxina foram diluídas quatro vezes com o dialisato adequado e aplicadas em células de ultra-centrifuga de duplo-sector, as quais foram colocadas num rotor analítico An-F de 4 furos. A centrifugação foi efectuada numa ultracentrifuga analítica Beckman modelo E a 3200 rpm a 20,0°C durante 18 horas.

Em experiências separadas determinou-se que 18 horas foi o tempo suficiente para obter equilíbrio na sedimentação. O gradiente de concentração na célula foi determinado por absorção de UV a 280 nm usando um varredor óptico fotoelétrico. Os traçados das curvas foram introduzidos num computador Macintosh usando uma almofada de desenho MacintizerTM. O peso molecular médio está relacionado com o gradiente de concentração na célula usando a equação (Teller, Meth. Enzym., 27: 346 [1972]):

$$M_w = 2RT / [w^2(1-vp)] \, d\ln c / dr^2$$

onde M_w é o peso molecular médio, T é a temperatura, R é a constante dos gases, W é a velocidade angular em radianos, v é o volume específico parcial da proteína, p é a densidade da solução, c é a concentração de proteína e r é a distância radial a partir do centro de rotação. A equação assume uma solução ideal e parece ser adequada à sedimentação da relaxina nas condições de tampão escolhidas.

A análise de regressão de mínimos quadrados do $\ln c$ versus r^2 dá o peso molecular médio como média relativamente à gama de concentrações na célula. Os dados foram também tratados com um polinómio de terceira ordem e os valores para $d\ln c / dr^2$ obtidos para cada concentração foram medidos na célula da centrifuga.

O volume específico parcial de 0,731 ml/g para a relaxina foi deduzido a partir da composição em aminoácidos usando valores para os resíduos de aminoácidos individuais de acordo com Cohn e Edsall, "Proteins and Peptides as Ion and Dipolar Ions" (Hafner: New York, 1985), pág. 157-175.

Resultados

Estudo 1: A degradação da relaxina em função do tempo foi controlada por HPLC de fase reversa. Como a área total de todos os picos de HPLC permaneceram constantes ao longo do tempo, a percentagem da área total foi usado para investigar a cinética da degradação da relaxina.

A fração do pico principal que permaneceu foi calculada a partir de amostras em triplicado (quando disponíveis) e foram determinadas curvas de primeira ordem da cinética de degradação do principal pico de HPLC para as cinco formulações apresentadas na Tabela I (variando entre 3,0 e 7,5). As cinéticas foram seguidas medindo a velocidade de desaparecimento do pico principal da relaxina por HPLC de fase reversa.

As Figuras 1a-1e são gráficos da fração do pico principal de HPLC versus tempo para as cinco formulações a estas três temperaturas, indicando a velocidade de degradação. A Fig. 1a é relaxina em 10 mM glicina (pH 3,0), a Fig. 1b é relaxina em citrato 10 mM (pH 5,0), a Fig. 1c é relaxina em histidina 10 mM (pH 6,0), a Fig. 1d é relaxina em acetato 10 mM (pH 5,0) e a Fig. 1e é relaxina em 10 mM Tris (pH 7,5).

Em cada um dos gráficos os triângulos indicam 5°C, os círculos 25°C e os quadrados 40°C. Estas figuras mostram que a degradação da relaxina pode ser analisada por análise de cinética de primeira ordem. A Fig. 2 mostra o gráfico das constantes de velocidade de primeira ordem determinada para a degradação do pico principal versus pH para as cinco formulações a 5°C (quadrados abertos), 25°C (diamantes) e 40°C (quadrados fechados).



Os dados na Figura 2 mostram que a relaxina humana é mais estável a pH de cerca de 4 a 6 e mais particularmente a pH 5.

Estudo 2: Nas formulações de succinato, acetato, e citrato, a estabilidade da relaxina conforme medida por RP-HPLC e ELISA não é significativamente afectada por variações da força iónica conforme obtido usando 0,0 M; 0,1 M e 0,5 M NaCl. A proteína foi formulada a cerca de 0,15 u de força iónica numa osmolabilidade de cerca de 250 mmol/kg para se ser capaz de usar a formulação para injeção intravenosa e intramuscular.

Estudo 3: As Tabelas III e IV mostram, respectivamente, os dados de HPLC em fase reversa relativamente à formulação de citrato a pH 5,0, guardada a 5°C durante 1 ano (a 1 mg/ml de concentração da relaxina) e a -20°C durante 60 dias (a 2 mg/ml de concentração da relaxina). Os dados na Tabela III podem ser extrapolados para calcular a estabilidade a 5°C durante pelo menos 2,0 anos (i.e. não mais do que cerca de 10% da degradação), assumindo cinética de primeira ordem. Ambas as Tabelas indicam que as formulações são estáveis às respectivas temperaturas.

TABELA III

HPLC FASE REVERSA

ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO CITRATO GUARDADA A 5°C

Tempo (dias)	Tempo de Ret. (min.)	Area (pico principal) x 10	Area total x 10	Fracção do pico principal
0	20.95	2.84	2.84	.998
0	19.85	2.96	2.98	.995
0	<u>20.88</u>	<u>2.89</u>	<u>2.94</u>	<u>.985</u>
média	20.6 ± 0.6	2.90 ± .06	2.92 ± .07	.993 ± .007
14	19.78	2.68	2.75	.977
14	<u>19.72</u>	<u>2.51</u>	<u>2.52</u>	<u>.997</u>
média	19.8 ± .03	2.60 ± .09	2.64 ± .01	.987 ± .01
30	20.2	2.57	2.68	.959
30	<u>21.8</u>	<u>2.36</u>	<u>2.47</u>	<u>.955</u>
média	21.0 ± .8	2.47 ± .1	2.58 ± .1	.957 ± .002
97	20.2	2.62	2.69	.974
97	<u>20.2</u>	<u>2.57</u>	<u>2.61</u>	<u>.984</u>
média	20.2	2.60 ± .03	2.65 ± .04	.979 ± .005
150	20.7	2.84	2.98	.957
150	20.7	2.81	2.92	.961
150	<u>20.7</u>	<u>2.82</u>	<u>2.96</u>	<u>.955</u>
média	20.7	2.82 ± .02	2.95 ± .03	.958 ± .003

Constantes de Velocidade de Primeira Ordem para a Degradação do Principal Pico de RP-HPLC da Relaxina Humana após um ano a 5°C. Os resultados de cada ponto de tempo são a média de triplicados (quando disponíveis) e tratados: $\ln(\text{fracção do pico principal}) = A - Kt$

intercepção	K(dias ⁻¹)	R	t.9	t1/2(yr)
-0,027 ± 0,007	-0,00008 ± 0,00004	.746	72 yrs	72



TABELA IV

HPLC FASE REVERSA

ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO CITRATO GUARDADA A -20°C

Tempo (dias)	Tempo de Ret. (min.)	Area (pico principal) x 10	Area total x 10	Fracção do pico principal
0	19.70	4.25	4.29	.990
0	19.70	4.22	4.24	.995
0	<u>19.72</u>	<u>4.19</u>	<u>4.21</u>	<u>.993</u>
média	$19.71 \pm .01$	$4.22 \pm .03$	$4.25 \pm .04$	$.993 \pm .003$
30	20.22	4.31	4.35	.989
30	<u>20.20</u>	<u>4.29</u>	<u>4.32</u>	<u>.994</u>
média	$20.21 \pm .01$	$4.30 \pm .01$	$4.34 \pm .02$	$.989 \pm .005$
60	19.82	4.76	4.86	.979
60	19.87	4.61	4.67	.991
60	<u>19.85</u>	<u>4.59</u>	<u>4.63</u>	<u>.992</u>
média	$19.85 \pm .03$	$4.65 \pm .09$	$4.72 \pm .12$	$.987 \pm .007$

A estabilidade da relaxina em termos da sua bioactividade foi seguida usando um ensaio que mede a produção de AMP cíclico mediada pela interacção da relaxina com células uterinas de macacos rhesus. Os gráficos dos bio ensaios de AMP ciclico da concentração versus tempo estão apresentados nas Figuras 3a-3e, onde a Fig. 3a é relaxina em

glicina-HCl (pH 3,0), a Fig. 3b é relaxina em citrato (pH 5,0) a Fig. 3c é relaxina em acetato (pH 5,0), a Fig. 3d é relaxina em histidina (pH 6,0) e a Fig. 3e é relaxina em tampão Tris (pH 7,5).

Em todas as figuras os quadrados abertos são 5°C, os círculos fechados 25°C e os triângulos abertos 40°C e a linha recta é o valor esperado. Dentro dos erros da experiência parece que todas as amostras (pH de 3 a 7,5) têm bioactividade equivalente após 40 dias de armazenamento.

A estabilidade da relaxina relativamente à sua bioactividade foi também testada usando o ensaio da sínfise púbica de murganho. Uma comparação da bioactividade da relaxina não degradada em tampão citrato a pH 5 relativamente a uma amostra altamente degradada em tampão Tris a pH 7,5, revelou que dentro dos erros dos ensaios não existem diferenças na bioactividade.

Um ensaio de ELISA e um ensaio de di-croísmo circular foram usados para avaliar a conformação da proteína das formulações. Os dados demonstram que a estrutura terciária da relaxina fica inalterada após 1 ou 2 meses de armazenamento.

Investigou-se a potencial alteração na auto-associação da proteína usando a técnica de sedimentação por ultracentrifugação analítica de equilíbrio. A relaxina em acetato 10 mM, 0,1 M NaCl a pH 5 foi analisada por ultracentrifugação analítica a concentrações de aplicação de 0,1; 0,2 e 0,4 mg/ml. O peso molecular médio das três concentrações de aplicação é de cerca de 10000, demonstrando que a relaxina nestas condições forma dímeros.



Vários excipientes farmacêuticamente aceitáveis foram adicionados à formulação de citrato 10 mM, pH 5 para investigar o seu efeito na estabilidade da formulação. A Fig. 4 é um gráfico mostrando a velocidade de degradação do principal pico de relaxina em HPLC de fase reversa para as várias formulações às três temperaturas.

Da esquerda para a direita, amostras ultrafiltradas (cheio) e dialisadas (tracejado denso), foram comparadas com amostras a que se adicionou excipiente como se segue: uma quantidade isotônica (tracejado cruzado) ou 5% (tracejado médio) por peso de manitol, 5% (aberto) ou 10% (cheio) por peso de glicerol, 5% (horizontal) ou 10% (ponteado) por peso de etanol, 5% (tracejado leve) ou 10% (aberto) por peso de propilenoglicol e 0,02% (cheio) por peso de EDTA.

Cada uma delas foi guardada a 5, 25 ou 40°C. Como se pode ver, os excipientes têm um efeito negligível sobre a estabilidade quando comparado com as testemunhas ultrafiltradas e dialisadas, dentro do erro experimental. As amostras dialisadas e ultrafiltradas também não apresentam diferenças entre elas dentro do erro experimental.

Em adição podem ser preparadas formulações liofilizadas em que a relaxina será reconstituída como solução ácida. Mais especificamente, a relaxina longa foi dialisada contra citrato 10 mM, 0,507% de manitol, pH 5,0, após estar inicialmente presente no tampão da formulação citrato. Esta preparação foi então esterilizada por filtração para nove frascos de 3 ml, introduzindo o volume de 1 ml em cada um.



Estes frascos foram colocados num tabuleiro num liofilizador Lyovac Gt 20. As amostras de relaxina foram arrefecidas até -50°C e depois sujeitas a um primeiro ciclo de secagem de 25 horas a 0°C . Isto foi seguido de um segundo ciclo de secagem de 17,5 horas a 25°C . No fim da liofilização, um frasco foi reconstituído com um sal de água Milli-Q e ficou bastante limpo, sem turvidez, indicando uma boa reconstituição. Assim, os restantes frascos foram sujeitos a provas de estabilidade a 5°C e 25°C .

A relaxina longa que foi passada para tampão de liofilização, antes da liofilização foi usada como um controle de pré-liofilização. Além da amostra reconstituída no tempo zero, as amostras foram reconstituídas após 2 semanas, um mês e três meses de armazenamento a 5°C e 25°C . Todas as amostras foram analisadas quanto aos produtos de degradação por RP-HPLC conforme previamente descrito.

A média das injecções em triplicado foi feita sempre que possível. A % do pico principal ficou inalterada (ver Tabela IVa) para todas as amostras independentemente do tempo de armazenamento na forma liofilizada, indicando ausência de perda de estabilidade após 3 meses a 25°C .

Em adição, a análise espectrofotométrica de todas as amostras, indicou não haver aumento na % de dispersão da luz após 3 meses de armazenamento na forma liofilizada a 25°C .

TABELA IVa

<u>Amostra</u>	<u>% Pico Principal</u>
Testemunha pré-liofilização:	97,3%
Reconstituição tempo zero:	97,8 $\pm$ 0,7%
2 semanas, 5°C	98,3 $\pm$ 0,3%
2 semanas, 25°C:	98,1 $\pm$ 0,4%
1 mês, 5°C:	97,8%
1 mês, 25°C:	97,6%
3 meses, 5°C:	98,0 $\pm$ 0,5%
3 meses, 25°C:	98,8 $\pm$ 0,4%

Estudos preliminares de congelação-des congelação indicam que a proteína pode ser congelada numa formulação líquida a -20 e -60°C, numa concentração de 2 mg/ /ml a pH 5 sem se observar quaisquer alterações no ensaio de HPLC.

Em adição, a Tabela V proporciona os resultados de estabilidade de RP-HPLC para a formulação de citrato, pH 5,0, congelada, depois descongelada, retirando-se uma amostra, depois congelada imediatamente e mantida congelada durante 30 dias, depois descongelada durante 5 horas à temperatura ambiente. Não se observou alterações nos resultados de HPLC quando da descongelação.

TABELA V

HPLC FASE REVERSA (CONGELAÇÃO-DESCONGELAÇÃO)

ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO CITRATO GUARDADA A -20°C

Tempo (dias)	Tempo Ret. (min.)	Area (pico principal) x 10	Area total x 10	Fracção pico prin pal
AMOSTRA RECONGELADA TEMPO ZERO				
30	20,18	4,50	4,54	.989
30	20,18	4,51	4,56	.989
30	<u>20,20</u>	<u>4,48</u>	<u>4,53</u>	<u>.987</u>
MEDIA	$20,19 \pm .01$	$4,50 \pm .02$	$4,54 \pm .02$	$.988 \pm .001$

5 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE *

0	19,82	4,76	4,86	.979
0	19,87	4,61	4,67	.991
0	<u>19,85</u>	<u>4,59</u>	<u>4,63</u>	<u>.992</u>
MEDIA	$19,85 \pm .03$	$4,65 \pm .09$	$4,72 \pm .12$	$.987 \pm .007$
5 horas	19,88	4,60	4,65	.989

*: amostra congelada durante 60 dias a -20°C foi guardada durante 5 horas à temperatura ambiente e testada novamente.



Concluindo, a integridade estrutural da relaxina humana conforme medido por RP-HPLC é afectada pelo pH a que é formulada e a degradação ocorre a pH 7 e superior. O ensaio de HPLC revela que das cinco formulações investigadas, a relaxina é mais estável num tampão acetato ou citrato a pH 5 do que noutros tampões e o tampão citrato a pH 5 é mais estável a 5 e -20°C durante até cinco meses. A bioactividade é afectada.

EXEMPLO II

Numa comparação de relaxina H2 de porco e humana, os resultados do peso molecular médio mostraram que a relaxina humana se associa em solução a pH 5 num grau muito maior do que a relaxina de porco. Os dados da relaxina humana obtidos a diferentes concentrações de aplicação foram semelhantes, sugerindo que a agregação é uma auto-associação reversível. Os resultados também mostram que a auto-associação para a relaxina humana é menos extensiva a pH 3 do que a pH 5.

EXEMPLO III

Encontrou-se que a forma natural da relaxina é uma que tem uma cadeia B com 29 aminoácidos (relaxina curta) em vez de 33 aminoácidos (relaxina longa). A finalidade deste estudo foi determinar se a relaxina curta tem características de estabilidade e adsorção semelhantes quando comparadas com a forma longa.



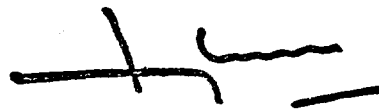
Em adição, as duas formas de relaxina foram comparadas relativamente aos seus coeficientes de extinção de UV a 200 nm e estrutura secundária usando CD afastado do UV.

A relaxina curta empregue nestas experiências foi obtida por proteólise limitada da relaxina longa (sintetizado no Exemplo 1) de modo a obter-se 29 aminoácidos na cadeia B. Após síntese da relaxina longa, esta foi aplicada numa coluna de HPLC usando um gradiente de TFA e depois coluna de permuta iónica mono S. Os fragmentos contendo relaxina foram então diafiltrados para um tampão de formulação.

Ao tampão (contendo 200 mg de relaxina) adicionou-se uma parte de trypsin para 2000 partes por peso de relaxina e a proteólise decorreu durante cerca de 40 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 µl de uma solução a 16,9 mg/ml de carboxipeptidase B (70 µ/mg) ao produto de digestão.

A solução resultante foi deixada durante 1 hora à temperatura ambiente, depois acidificada usando ácido cítrico e purificada por HPLC e colunas mono S. A relaxina assim purificada foi diafiltrada para citrato 10 mM isotónico com cloreto de sódio pH 5 a 1,0 mg/ml e guardado congelada a -60°C (1 ml em frasco de vidro Tipo I de 3 cm³). Uma porção deste lote foi também fornecida como líquido e designada como amostra não congelada.

Estabilidade e Temperatura: A estabilidade da relaxina em citrato 10 mM isotónico a pH 5 foi testada seguindo a cinética de primeira ordem da redução do principal pico de HPLC em fase reversa.



Obtiveram-se cromatogramas numa coluna de fase reversa SynChropakTM C4 usando as seguintes condições: caudal 1 ml/min., gradiente de 20% da solução A a 50% da Solução B durante trinta minutos (Solução A é 0,1% de ácido trifluoroacético e Solução B é 0,1% de ácido trifluoroacético, 90% de acetonitrilo).

A Tabela VI mostra uma comparação da cinética entre relaxina longa e relaxina curta. As constantes de velocidade de primeira ordem para a relaxina longa foram determinadas a partir dos dados de estabilidade relativos a 1 ano e as da forma curta a partir dos resultados de 6 meses para amostras congeladas-descongeladas e dados de 2 meses para amostras não congeladas.

Os valores de $t_{.9}$ e $t_{1/2}$ estão incluídos juntamente com as constantes de velocidade de primeira ordem determinadas. A estabilidade de forma curta é pelo menos tão boa quanto a da relaxina longa e pode ser melhor uma vez que não existe estabilidade superior a 2 anos a 25°C para a amostra congelada-descongelada. Conforme previamente observado para a relaxina longa, a congelação e descongelação não afecta a estabilidade da relaxina curta.

TABELA VI

Constantes de Velocidade de Primeira Ordem para a
degradação do Pico Principal de RP-HPLC de re-
laxina longa e curta

Média de triplicados usados para adaptar:

$$\ln(\text{fracção do pico principal}) = A - Kt$$

<u>Tampão</u>	<u>Intercepção</u>	<u>K(dias¹)</u>	<u>t.9(dias)</u>	<u>t1/2(dias)</u>
Forma longa				
5°C	-0.027±0.007	-0.000082±0.000037	>2 anos	>2 anos
25°C	-0.028±0.010	-0.000591±0.000055	178.2	>2 anos
40°C	-0.028±0.024	-0.002603±0.000132	40.5	266.3
Forma curta (Não congelada)				
5°C	-0.007±0.005	-0.000116±0.000132	>2 anos	>2 anos
25°C	+0.002±0.004	-0.000516±0.000106	204.1	>2 anos
40°C	-0.001±0.008	-0.003988±0.000194	26.4	173.8
Forma curta (congelada-descongelada)				
5°C	-0.005±0.003	-0.000037±0.000032	>2 anos	>2 anos
25°C	-0.005±0.006	-0.000478±0.000220	>2 anos	>2 anos
40°C	-0.001±0.007	-0.002773±0.000247	52.4	345.0



Estabilidade e Luz: Dois frascos de relaxina curta foram colocados numa caixa de luz com voltagem de 1600 pé-velas durante 7 dias. Um dos frascos foi protegido de luz com folha de alumínio e serviu como controle. Os tempos de retenção (R_t) dos picos principais de relaxina da relaxina longa foram normalizados para os da forma curta e estão apresentados na Tabela VII.

Todos os tempos de retenção dos picos de degradação foram então relacionados com este valor normalizado. Como se pode ver, os tempos de retenção normalizados para a relaxina curta e longa estão de acordo, sugerindo a ocorrência de vias semelhantes de degradação em ambas as proteínas. No entanto, a velocidade de degradação da relaxina longa parece ser maior do que a da relaxina curta.



TABELA VII

Estabilidade à luz da relaxina curta e longa

<u>Forma Longa</u>		<u>Forma Curta</u>	
<u>7 dias exposição à luz de 1600 velas</u>			
$R_t \#$	% Pico Principal Remanescente *	$R_t \#$	% Pico Principal Remanescente *
$19,34 \pm 0,01$	$64,07 \pm 0,53$	$19,34 \pm 0,01$	$78,56 \pm 0,64$
$17,62 \pm 0,08$	$7,38 \pm 0,20$	$17,67 \pm 0,02$	$8,56 \pm 0,16$
$17,20 \pm 0,08$	$11,26 \pm 0,19$	$17,38 \pm 0,01$	$4,90 \pm 0,022$
$15,49 \pm 0,03$	$4,68 \pm 0,13$		
<u>Testemunha</u>			
$R_t \#$	% Pico Principal Remanescente *	$R_t \#$	% Pico Principal Remanescente *
$19,33 \pm 0,02$	$97,16 \pm 0,37$	$19,33 \pm 0,02$	$97,09 \pm 0,26$
$19,13 \pm 0,02$	$1,88 \pm 0,15$	$19,02 \pm 0,02$	$2,03 \pm 0,16$
--			

Os tempos de retenção do pico principal estão normalizados relativamente ao de forma curta e os dos picos de degradação estão relacionados com o valor normalizado.

* Picos com áreas inferiores a 2% da área total foram omitidos por questões de clareza.



Estabilidade e Agitação: Um frasco de relaxina curta foi agitado à temperatura ambiente durante sete dias num agitador Glas-Col modelo S-500 regulado para 2,5 unidades. Um frasco testemunha foi mantido sem perturbações à temperatura ambiente. A estabilidade da relaxina foi testada por HPLC de fase reversa conforme descrito atrás para o ensaio de estabilidade e temperatura.

A Tabela VIII mostra a percentagem do pico principal de relaxina após sete dias de agitação. Estes dados indicam que não há alteração significativa detectada por HPLC de fase reversa na amostra agitada quando comparado com a testemunha não agitada, quer na relaxina longa quer na curta.

TABELA VIII

Estabilidade à agitação de relaxina curta e comprida

<u>Forma Longa</u>		<u>Forma Curta</u>	
<u>Rt</u>	<u>% Pico Principal</u> <u>Remanescente</u>	<u>Rt</u>	<u>% Pico Principal</u> <u>Remanescente</u>
<u>Testemunha</u>			
19,97 ± 0,02	97,84 ± 0,17	19,26 ± 0,04	98,50 ± 0,28
<u>Agitada</u>			
19,97 ± 0,02	98,53 ± 0,43	19,17 ± 0,03	98,45 ± 0,23



Estudo de adsorção: A relaxina foi diluída para cerca de 10 µg/ml determinado por espectrofotometria de UV em soro fisiológico normal. Dois pés de tubo Silastic^R de 0,02 polegadas de diâmetro interno x 0,037 polegadas de diâmetro externo foi ligado a uma bomba de infusão Harvard equipada com uma seringa de vidro de 5 ml e uma agulha de 22 G.

A infusão da relaxina fez-se a 100 µl/min. através do tubo com uma amostra de 100 µl colhida minuto a minuto durante os primeiros dez minutos, seguido de uma amostra de 100 µl entre cinco e cinco minutos e 30 em 30 minutos, para 900 µl de tampão de ensaio ELISA (EAB). Esta diluição de 1:10 foi diluída a 1:4000 por duas diluições subsequentes em EAB. A diluição de 1:4000 foi submetida a determinação da concentração de proteína por ELISA.

A relaxina adsorveu à tubagem. No entanto, após cinco minutos de infusão através da tubagem a concentração de relaxina manteve-se perto da concentração esperada de 10 µg/ml conforme determinado por ELISA. A integração da área sob as curvas mostrou uma perda de cerca de 5% da massa total de proteína devido à adsorção à superfície do tubo. Não parece haver uma diferença significativa na adsorção à tubagem de Silastic^R entre as duas formas de relaxina.

Determinação do Coeficiente de Extinção: Os coeficientes de extinção para as relaxinas longa e curta foram calculadas por análise quantitativa de aminoácidos a partir de duas determinações separadas como sendo 2,04 ou 2,14 cm²/mg para a relaxina longa e 2,25 ou 2,30 cm²/mg para a relaxina curta. Os coeficientes de extinção molares calculados para a relaxina longa e curta foram de 13000 ± 200 M⁻¹cm⁻¹.



Este resultado sugere que a remoção dos quatro aminoácidos do extremo C tem pouco efeito no ambiente imediato dos dois triptofanos e uma tirosina. Isto também sugere que as conformações das duas formas de relaxina sejam semelhantes.

Dicroísmo Circular: Os espectros de dicroísmo circular de 240 a 190 nm da relaxina longa (a 0,8 mg/ml) e da relaxina curta (a 1 mg/ml) em citrato 10 mM isotônico a pH 5 foram de terminados com um espectropolarímetro. As amostras foram termostatizadas em cuvetes de quartzo cilíndricas de 0,01 cm de passo.

O CD saído em miligramas foi convertido em elipticidade média de pesos de resíduos usando um peso de resíduo médio de 113 e concentrações de relaxina que foram obtidas usando absorção de UV a 278,4 nm. A concentração de relaxina foi determinada usando coeficientes de extinção de 2,04 e 2,25 cm²/mg para a relaxina longa e curta, respectivamente. Os cálculos da estrutura secundária foram determinados pelo método de Chang et al., Anal. Biochem., 91: 13-31 (1978).

A análise dos espectros de CD longe dos Uv pelo método de Chang et al., supra, resultou em 50% de hélice alfa, 47% de folha beta e 3% de enrolamento ao acaso para a relaxina curta. As diferenças nos espectros para a relaxina curta e comprida estão dentro do erro experimental e sugerem fortemente que a estrutura secundária da relaxina curta e longa seja muito semelhante.

Conclusão: A estabilidade térmica da relaxina curta é comparável e talvez exceda a da relaxina longa na formulação líquida. Ainda, a estabilidade relativamente à exposição à luz e agitação são também semelhantes nas duas proteínas.

As propriedades físicas tais como extinção molar, estrutura secundária e adsorção a superfícies também parecem ser idênticas.

EXEMPLO IV

Este exemplo ilustra a preparação e propriedades de formulações de relaxina em gel.

Preparação de Relaxina Líquida

A relaxina curta (com a cadeia B de 29 aminoácidos) preparada e formulada como descrito no Exemplo III foi usada nesta experiência. Assim, a relaxina estava numa concentração de 1,0 mg/ml, 1 ml em citrato 10 mM, isotónico com NaCl, pH 5,0. Esta formulação foi guardada congelada em frascos a -60°C até ser usada.

A relaxina destes frascos foi concentrada para mais de 2,4 mg/ml (conforme determinado por espectroscopia de UV, assumindo $e=2,04 \text{ ml/mg.cm}$) por centrifugação a 4000 rpm durante uma a duas horas num microconcentrador de 2 ml Amicon Centricon. (O tempo exacto depende do volume inicial de relaxina que precisa de ser concentrada).

Preparação do Gel a 4% de Methocel

Um gel de 4% de metilcelulose foi reconstituído a partir de pó de metilcelulose Methocel A 4M (dow Chemical) de acordo com o seguinte protocolo:



(a) 10 ml de tampão de formulação citrato (descrito no Exemplo I) foi aquecido até perto da ebulição ($\sim 90^{\circ}\text{C}$) num copo de 40 ml provido de barra magnética e depois retirado do calor.

(b) adicionou-se 0,8 g de pó Methocel ao copo, agitou-se durante alguns segundos para dispersar as partículas.

(c) O copo foi então colocado num agitador magnético na câmara fria a 5°C . Imediatamente antes do liquido começar a engrossar adicionou-se mais 10 ml de tampão de formulação citrato frio removendo quaisquer partículas secas das paredes do copo.

(d) Após 20 minutos de agitação continua, a viscosidade do liquido aumentou até se formar num gel homogéneo de 4% de metilcelulose.

(e) Para os dois últimos estudos de estabilidade, o gel de 4% de metilcelulose foi autoclavado, não só para esterilizar o gel, mas também para remover qualquer oxigénio dissolvido presente no gel. Após saída do autoclave o gel foi agitado sob azoto para re-homogenizar o gel sem introduzir mais oxigénio.

Preparação de Relaxina Tópica

Um gel homogéneo de 3% de Methocel com 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de relaxina foi obtido seguindo o protocolo abaixo:

(a) Duas seringas de 10 ml esterilizadas foram taradas na balança. A uma seringa adicionou-se 3 g do gel de 4% de Methocel. A outra seringa, adicionou-se a formulação de relaxina liquida a 2,4 mg/ml a um terço do volume do gel (1ml).



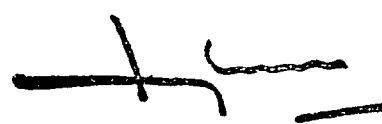
(b) Os êmbolos retornaram às duas seringas e estas foram ligadas por um dispositivo de ligação esterilizado Rainin 47-FLU, que comprime em direcção aos extremos das duas seringas.

(c) A solução de relaxina é dispersa na metilcelulose empurrando para dentro o êmbolo de uma seringa, seguido do êmbolo de outra seringa, 20-25 vezes até ao ponto em que se formou um gel homogêneo. (No entanto, nas duas ultimas experiências, o gel foi então transferido para tubos Eppendorf de 1,5 ml por facilidade de armazenamento e remoção da amostra). A concentração final de relaxina no gel foi de 600 µg/ml. O gel também continha 3% de metilcelulose, citrato 10 mM, pH 5,0 e isotónico com cloreto de sódio.

Ensaio de ELISA

As amostras de relaxina no gel foram diluídas com o mesmo diluente de ELISA usado no Exemplo I em passos sucessivos de 10 vezes para chegar a uma concentração de 6 µg/ml de relaxina. Pareceu não haver efeito até 0,25% de Methocel Gel sobre a concentração de relaxina conforme determinado por ELISA.

O ensaio de ELISA descrito atrás revelou que as concentrações de relaxina no gel foram 25% inferiores às esperadas, com base na espectroscopia de UV (assumindo um coeficiente de extinção de 2,04). Este resultado é devido ao ensaio padrão ser com a relaxina de cadeia B completa e as amostras testadas serem de relaxina de cadeia B encurtada.



Análise da Relaxina Tópica por HPLC

O método de RP-HPLC usado para análise da formulação de relaxina líquida, descrito no Exemplo I, foi modificado para usar com amostras de relaxina tópica. Devido à elevada viscosidade do gel, as amostras foram diluídas dez vezes com água, agitados com vortex durante ~ 5 minutos para homogenizar o gel e deixadas em repouso para as bolhas subirem.

A análise destas amostras foi efectuada por injeção de 250 μ l numa coluna (4,6 x 250 mm) SynChropak C4-300 à temperatura ambiente. O tampão de equilíbrio inicial foi 18% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético. A eluição foi efectuada fazendo correr um gradiente linear crescente de acetonitrilo a 1%/min. para uma concentração final de 45% de acetonitrilo após 30 minutos. O caudal foi mantido constante a 1,0 ml/min. e a absorvência foi controlada a 214 nm.

O passo de "abrandamento" (o tempo que demora a passar o gel viscoso para o sistema) foi aumentado de 36 para 270 minutos. Observou-se que antes de aumentar o passo de "abrandamento" significativamente menos de 250 μ l de gel estava de facto a ser injectado devido à sua elevada viscosidade.

No decurso destas experiências, a coluna SynChropak começou a perder a sua capacidade para resolver picos. Assim, as ultimas injeções foram feitas numa coluna Vydac C4-300.

Fizeram-se três experiências de estabilidade significativas para a formulação tópica de relaxina. A primeira foi medir a estabilidade destas preparações após serem deixadas à temperatura ambiente durante cinco semanas. A amostra permaneceu na seringa original, sujeito às flutuações de temperatura e luz.

A análise por RP-HPLC revelou que o pico principal de relaxina não degradada foi sujeito a quantidades crescentes de degradação com o tempo conforme evidenciado pelo decréscimo na % de área do pico principal e um aumento no número e % de área dos picos de degradação que eluem mais cedo. O decréscimo na % da área do pico principal foi quantificado e normalizado relativamente a % do pico principal no tempo zero (antes de se colocar a relaxina no gel). Um gráfico logaritmico do pico da fração principal normalizado versus tempo revelou que a relaxina tópica sofreu cinética de degradação de primeira ordem.

Tanto o principal pico de relaxina como o maior pico de degradação foram colhidos do efluente de HPLC e liofilizados sob vácuo no Savant Speed-vac durante ~ 1 hora. Estas amostras foram então reconstituídas em Tioglicerol e ácido acético, reduzidas na sonda para separar as cadeias A e B e analisadas por espectrometria de massa.

A análise de espectrometria de massa destas duas amostras revelou que o ião molecular para a cadeia A de ambas as amostras era idêntico e estava de acordo com o valor previsto de ~ 2657. No entanto, os iões moleculares das cadeias B eram diferentes. O ião molecular para a amostra do pico principal está de acordo com o valor teórico de ~ 3314.



O λ molecular para a cadeia B do pico de degradação foi de ~ 3330 . Este aumento de 16 corresponde exactamente ao que seria esperado se um residuo na cadeia B tivesse ficado oxidado.

A relaxina de porco derivada dos ovários de porco, a 6,6 mg, foi reconstituída em tampão de formulação citrato, centrifugada durante ~ 3 minutos para sedimentar material insolúvel e misturada a 3,19 mg/ml em 0,248 ml de tampão de formulação citrato com 4% de Methocel conforme descrito acima para dar um gel a 3% com 600 μ g/ml de relaxina de porco. Ao contrário da relaxina humana de cadeia B encurtada, a formulação de relaxina de porco degradou-se muito pouco quando sujeita à análise por HPLC como descrito atrás.

O segundo estudo foi uma medida da estabilidade da relaxina tópica em condições bem controladas a 5°C e 25°C. Em adição, o Methocel Gel para este estudo foi autoclavado para esterilização e remoção de qualquer oxigénio dissolvido no gel que possa causar oxidação. As amostras de relaxina tópica foram transferidas para quatro tubos Eppendorf, dois guardados a 5°C e dois guardados a 25°C.

Após 144 horas, a relaxina tópica a 5°C começou a degradar enquanto o material a 25°C manteve-se relativamente não degradado conforme determinado por análise de HPLC. A análise subsequente revelou que a luz na câmara fria a 5°C eram muitas vezes deixadas ligadas enquanto a caixa a 25°C estava completamente protegida de qualquer fonte de luz.

Para determinar se esta luz era responsável pela formação dos picos de degradação a 5°C, uma



das duas amostras foi embrulhada em folha de aluminio para se proteger da luz. Após mais 360 horas a 5°C a relaxina exposta tinha-se degradado completamente enquanto que a relaxina protegida se continuou a degradar a uma velocidade muito mais lenta, conforme determinado por HPLC.

Assim, a presença de luz pareceu afetar a estabilidade, com protecção de luz protegendo totalmente a relaxina tópica, mas a exposição à luz e protecção provocou continuação da degradação mas a uma velocidade mais baixa. A espectrometria de massa das colecções dos picos largos na relaxina tópica guardada durante 672 horas (tanto coberta como exposta à luz) revelou que a cadeia permaneceu inalterada mas que a cadeia B pareceu sofrer uma primeira e depois uma segunda oxidação.

A terceira experiência foi para comparar directamente a estabilidade da relaxina tópica relativamente à da relaxina na formulação líquida, ambas expostas e protegidas da luz. Após armazenamento durante 816 horas a 5°C, os cromatogramas de Rp-HPLC indicaram que quando protegida da luz a relaxina tópica era tão estável quanto a relaxina na formulação líquida tendo ambas 96% do pico principal.

No entanto, quando exposta à luz a relaxina tópica foi dramaticamente mais susceptível à degradação do que a relaxina na forma líquida.

Estudos de Eficácia

A finalidade deste estudo é determinar a eficácia da relaxina curta em relação ao amadurecimento do canal cervical de coelho. Escolheu-se o coelho porque estudos sugeriram que este animal é um modelo razoavelmente

bom para a investigação do comportamento mecânico do cervix e porque o cervix de coelho parece ser comparável ao cervix humano nas suas respostas fisiológicas.

Estudaram-se coelhos fêmea New Zealand prenhes maduros pesando 4,5 a 6,0 kg. No dia 26-27 da gravidez, os coelhos (4 por grupo) foram tratados com o gel da relaxina humana curta ou com o gel da relaxina humana curta ou com o gel da relaxina de porco preparado como descrito atrás num gel de 3% de metilcelulose. Tanto a relaxina humana curta como a relaxina de porco foram formuladas em doses de 100, 200, 300, 600 e 1000 µg/ml de relaxina por animal.

Ambas as hormonas foram aplicadas intravaginalmente por meio de uma seringa e de um cateter num volume de 0,5 ml. Os animais testemunha receberam apenas veículo. Após 16-18 horas os animais foram mortos usando uma dose letal de fenobarbital. O útero, o segmento inferior e o cal cervical foram removidos e fixados para exame histológico em 10% de NB Formalin. As secções de parafina foram cortadas e coradas com hematoxilina /eosina e "alcina blue PAS".

Avaliaram-se as secções quanto a morfologia geral e especificamente quanto ao grau de separação de tecido muscular e fibrilhas de colagénio na submucosa e quanto à presença de células gigantes positivas para PAS características, as quais são células multinucleadas de origem macrofágica que normalmente se infiltram no cervix durante o parto. A medição de células gigantes é conseguida usando o processo descrito por MacLennan et al., Am.J. Obstet. Gynecol., 152: 691-696 (1985).



Um estudo inicial que se usou uma concentração de 300 µg/ml de relaxina humana ou de porco numa formulação tópica sugeriu que nesta dose ambas as hormonas induzem alterações na morfologia do canal cervical prenhe consistente com o amadurecimento. Dezoito horas após aplicação no cervix, observou-se significativa dilatação e amadurecimento cervical.

A avaliação histológica de secções de cervix coradas mostrou separação marcada de mucosa muscularis com acumulação de material ligeiramente enriquecido em proteína nos espaços intercalados, separação dos feixes de fibras de colagénio (um decréscimo da densidade de colagénio), aumento da substância da base e edema submucosal com dilatação dos vasos linfáticos. Também células gigantes características positivas para PAS, as quais são raras nos animais testemunha, eram abundantes nos grupos tratados com relaxina.

Tais células eram vistas mais regularmente à volta dos vasos sanguíneos e na camada subepitelial, se bem que possam ser encontradas ao longo da profundidade do canal cervical. Estudos subsequentes em que tentou definir a dose mais baixa, e se possível mais alta, eficaz de relaxina mostraram-se discordantes em relação aos primeiros resultados, sem se ter observado eficácia a 300 ou 600 Mg/ml e a eficácia só foi claramente observada com a dose de 1 mg/ml.



Estudos de Farmacocinética

O objectivo deste estudo foi determinar a biodisponibilidade da relaxina curta em coelhos pr^{an}hes após administração singular intravenosa, subcutânea ou intra vaginal.

Os coelhos empregues foram coelhos br^{an}cos fêmeas New Zealand multiplos prenhes pela 16^a vez (Elkhorn), 4-5 kg. No dia 20 da gestação quatro animais (Grupo I) receberam 100 µg/kg de relaxina curta por bolus intravenoso (iv) através de um cateter Abbocath-T numa veia da orelha.

Três animais (Grupo II) receberam uma dose subcutânea de 100 µg/kg de relaxina curta em soro fisiológico na c^oxa. Três animais (Grupo V) receberam uma dose de 100 µg/kg de relaxina curta em 1% de benzopurpurina. Quatro animais (Grupo III) receberam uma dose intravaginal de 100 µg/kg de relaxina curta em 3-metilcelulose.

A concentração da solução da dose iv e se foi de 500 µg/kg de um liquido limpido de relaxina curta a 1 mg/ml de relaxina. As diluições foram feitas com soro fisiológico isotónico estéril ou 1% de benzopurpurina em (BPP) em soro fisiológico. O volume da dose foi aproximadamente 1 ml e foi calculado individualmente de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Volume da dose} = (100 \mu\text{g/kg}) (\text{kg}) / (500 \mu\text{g/ml}).$$



Para administração intravaginal um total de 3 mg de gel Methocal (4%) foi misturado com 0,487 ml de relaxina curta (descrito através) e 0,513 ml de tampão de formulação citrato seguindo o protocolo descrito atrás, para dar uma relaxina curta a 600 µg/ml, 3% de gel de metilcelulose. O volume de dose intravaginal foi de 0,5 ml.

Retiraram-se amostras de sangue (1 ml) de um cateter Viggo Secalon na artéria da orelha. Retiraram-se amostras de sangue nos tempos: (iv) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos; (sc e intravaginal) 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos. Deixou-se coagular as amostras de sangue e colheu-se o soro por centrifugação. As amostras foram congeladas em neve carbônica e guardadas a -70°C até serem testadas por ELISA. O ensaio varia entre 20 e 1280 pg/ml.

O parâmetros individuais de farmacocinética iv foram calculados por adaptação dos resultados individuais de concentração no soro imuno-reactiva-tempo a um modelo exponencial de grau 3 usando um programa de adaptação a curva não linear (NONLIN 84, Statistical Consultants, Inc., Lexington, KY). Os dados das vias de administração extravasculares foram adaptados, usando um programa RS-1 (Bolt, Bermak & Newman, Cambridge MA). A área sob a curva concentração no soro-tempo (AUC) foi calculada pelo método trapezoidal a partir de t+0 até à última concentração de soro mensurável.

A AVC a partir de C_t até ao tempo infinito foi calculado por extrapolação: C_t foi dividido pela constante de velocidade de eliminação terminal. A eliminação do soro ("CL") foi calculada pela equação $CL = \text{Dose} / \text{AVC}$ (iv). O volume inicial de distribuição (V_c) foi calculado a partir de: $V_c = \text{Dose} / C(0)$ foi a soma dos coeficientes da equação exponencial de grau 3 descrevendo os dados de concentração no soro - tempo.

O volume de distribuição no estado estacionário (" V_{dn} ") foi calculado como: $Cl * AUMC / \text{AVC}$, onde AUMC foi a área sob a curva momento, i.e., a curva (concentração no soro) * (tempo) vs. tempo. as semi-vidas no soro foram calculadas dividindo 0,693 pela respectiva constante de velocidade de disposição. A biodisponibilidade foi determinada pelo método da razão de áreas: $(AUC(\text{extravasacular}) / AUC(\text{iv}) * 100$.

Os perfis de concentração no soro - tempo para relaxina curta a 100 $\mu\text{g/kg}$ em coelhos prenhes após administração iv, sc, e intravaginal estão apresentados na Figura 5, onde os círculos fechados são iv, os quadrados abertos são sc e os círculos abertos são administração intravaginal.

A Figura 6 mostra uma comparação dos perfis de concentração no soro - tempo para a relaxina curta a 100 $\mu\text{g/kg}$, administrada subcutâneamente a coelhos prenhes com (círculos fechados) e sem (quadrados abertos) BPP. A Tabela X apresenta uma lista dos parâmetros farmacocinéticos calculados para todas as vias de administração. A eliminação do soro ("CL") após administração intravenosa foi de $2,95 \pm 0,88 \text{ ml/min./kg}$.



Os volumes de distribuição iniciais (V_c) e do estado estacionário (V_{dss}) foram de 89 ± 22 e 209 ± 30 mg/kg, respectivamente. Foram necessários três termos exponenciais para descrever os resultados de concentração no soro (iv) - tempo de modo a que as semi-vidas ($t_{1/2}$) foram de $8,4 \pm 2,7$, $59,1 \pm 8,7$ e 279 ± 128 min., respectivamente.

A administração subcutânea de relaxina humana resultou numa concentração de pico média no soro de $76,20 \pm 17,80$ ng/ml aos 180 minutos e uma biodisponibilidade de $76,0 \pm 20,6\%$ (com relaxina iv tendo 100% de biodisponibilidade). A relaxina humana administrada sc com BPP deu uma concentração de pico média no soro inferior ($41,67 \pm 16,32$ ng/ml) e mais tarde (420 min.) do que o observado com a relaxina humana administrada sc sózinha. A biodisponibilidade subcutânea com BPP foi de $59,4 \pm 6,7\%$.

A relaxina humana pareceu ser francamente absorvida sistematicamente após administração intravaginal. As concentrações sistêmicas do soro foram muito baixas ($0,34 \pm 0,16$ ng/ml aos 98 min.) e a biodisponibilidade resultante foi de apenas $1,0 \pm 0,8\%$.

TABELA X

Parâmetros farmacocinéticos para 100 ug/kg hRlx em coelhos
prenhes após administração iv, sc e intravaginal

Via	1) AUC (ng·min/ml)	2) CL (ml/min/kg)	3) Vc (ml/kg)	4) Vdss (ml/kg)
iv 1a	55.21	1.81	80	179
1b	31.77	3.10	69	188
1c	25.23	3.96	120	228
1d	34.19	2.93	85	241
média	36.60	2.95	89	209
SD	12.97	0.88	22	30
sc 2a	24.25			
2b	21.67			
2c	36.47			
média	27.46			
SD	7.91			
top 3a	0.20			
3b	0.80			
3c	0.33			
3d	0.14			
média	0.37			
SD	0.30			
sc+BPP5a	19.01			
5b	23.60			
5c	23.76			
média	22.12			
SD	2.70			

SD = desvio padrão

top = tópica

TABELA X (cont.)

Via	5) t _{1/2} (1) (min)	6) t _{1/2} (2) (min)	7) t _{1/2} (3) (min)	8) t _{1/2} Absorção (min)
iv 1a	10.1	69.3	439	
1b	5.8	51.1	168	
1c	11.3	52.7	184	
1d	6.5	63.3	325	
média	8.4	59.1	279	
SD	2.7	8.7	128	
sc 2a				45.6
2b				57.1
2c				85.9
média				62.9
SD				20.8
top 3a				55.8
3b				119.0
3c				37.1
3d				21.3
média				58.3
SD				42.9
sc+BPP5a				75.2
5b				76.9
5c				131.0
média				94.4
SD				31.7

SD = desvio padrão

top = tópica

TABELA X (cont.)

Via	9) $t_{1/2}(\text{term})^a$ (min)	10) C_{peak}^a (ng/ml)	11) T_{peak}^* (min)	12) $BA^\#$ (%)
iv 1a				
1b				
1c				
1d				
média				
SD				
sc 2a	73	95.30	120	66.4
2b	72	59.90	180	62.0
2c	176	73.40	240	99.7
média	107	76.20	180	76.0
SD	60	17.80		20.6
top 3a	479	0.26	240	0.6
3b	1484	0.55	75	2.2
3c	504	0.38	120	0.9
3d	582	0.18	75	0.4
média	762	0.34	98	1.0
SD	483	0.16		0.8
sc+BPP5a	229	40.80	240	51.9
5b	266	58.40	420	61.5
5c	490	25.80	420	64.9
média	328	41.67	420	59.4
SD	141	16.32		6.7

^a pico médio da concentração no soro

* tempo médio para o pico médio da concentração no soro

biodisponibilidade;

@ $t_{1/2}$ terminal aparente para a dose extravascular

SD = desvio padrão

top = tópico

Após completadas as experiências de farmacocinética (12 hr.), os animais foram mortos e o sistema reprodutor removido e preparado para exame histológico. Os tecidos foram fixados em 10% NBF, embebidos em parafina e corados com os corantes H & E e PAS/Alcian Blue. As seções histológicas dos cervíces de coelho foram examinados sem conhecimento do grupo de tratamento.

Para fins deste estudo, os principais critérios avaliados foram (1) compacticidade relativa da lâmina própria e muscularis (2) presença de células gigantes e (3) localização na região cerviceal. As cervícas foram divididas em três categorias: Positiva, para lâmina própria frouxa e soljacente muscular com aumento obvio das células gigantes; Questionável para a presença de algumas alterações mas num grau menos marcado ou localização não cervical e Negativa para cervix sem alterações.

A conclusão tirada dos estudos histológicos é que não existe uma clara associação entre o tratamento e a alteração histológica.

Efeito de Antioxidantes e Co-solventes

Este estudo destina-se a testar a capacidade de várias formulações de adjuvantes para estabilizar a relaxina em gel de metilcelulose. Uma vez que a degradação ocorre via foto-oxidação, estudaram-se antioxidantes tais como ácido ascórbico e metabissulfito de sódio.

Em adição, devido a uma possível fonte de radicais livres sã os peróxidos da metilcelulose, estudaram-se co-solventes, tais como glicerol e etanol, para determinar se eles estabilizam a formulação através do decréscimo de interacção entre metilcelulose e relaxina.

Finalmente, foi estudado o efeito da activação do gel sobre a oxidação da relaxina por exposição do gel à luz antes da sua utilização na preparação da formulação.

Preparação do Gel: Preparou-se quatro por cento (p/v) de gel de metilcelulose através da adição de 4 g de pó Methocel (Dow Chemical) a 100 ml de citrato 10 mM, tampão pH5 (tornado isotónico com NaCl). Após o pó ter sido disperso no tampão a 85°C, a solução foi autoclavada a 121,5°C durante 30 minutos. No final colocou-se sobre o gel azoto e deixou-se durante a noite na câmara de 5°C para hidratar.

Para formulações que contêm glicerol e etanol os co-solventes foram adicionados directamente ao tampão de formulação. O gel "activado" foi preparado colocando a 4% autoclavado na caixa de luz fluorescente a 34°C durante 24 horas antes de ser misturado com relaxina.

Protocolo de Estudo: A Tabela XI faz uma lista das condições, ingredientes e composições para cada formulação estudada.



TABELA XI

Composição de Formulações de Relaxina usadas neste estudo

<u>Formulação</u>	<u>Metilcelulose</u>	<u>Outro Ingrediente</u>	<u>Exposição à luz</u>
1	3%	---	-
2	3%	---	+
3	3%	---	+
4	3%	0,5% ácido ascórbico stock de ácido ascórbico (Aldrich Chem Co.)	+
5	3%	0,2% metabissulfito (Fischer Scientific Corp)	+
6	3%	20% glicerol (Mallinckrodt)	
7	3%	20% etanol (Mallinckrodt)	
8	3% (ativado)	---	-

A solução de relaxina foi fornecida a 1 mg/ml e concentrada para 2 mg/ml via uma unidade de ultra-filtração Amicon. As amostras foram preparadas misturando o concentrado de relaxina a 2 mg/ml em tampão citrato 10 mM pH 5 e 4% de gel Methocel de acordo com uma proporção de volumes de 1:4. A solução e o gel a 4% foram distribuídos por duas seringas separadamente e a mistura foi conseguida empurrando o conteúdo ao longo das seringas para a frente e para trás, 20 vezes através de um ligador de entrosamento, conforme descrito acima.

Na solução de relaxina foram incorporados ácido ascórbico e metabissulfito antes da mistura com



o gel. A preparação de gel final foi distribuída e autoclavada em frascos de vidro de HPLC de 1,5 ml em porções de aproximadamente 0,25 ml. Os frascos foram tapados, selados e colocados diretos na câmara fria a 5°C sob luz fluorescente. As amostras nas formulações # 1 e # 8 foram envolvidas em folha de estanho enquanto que as amostras na formulação 3 foram desgaseadas brevemente e cheias em azoto.

A degradação da relaxina do gel foi quantificada por RP-HPLC. Uma vez que a viscosidade do gel evita a aplicação directa das amostras no HPLC, diluiu-se 5 vezes com tampão de formulação antes da injeção. As condições do método de cromatografia foram as seguintes:

Instrumento: HP 1090L

Coluna: Vydac C4-300, 4,6 x 150 mm

Caudal: 1 ml/min.

Comprimento de onda: 214 nm

Volume de injeção: 200 ul

Temperaturas: Ambiente

Fase móvel: (A) 0,1% TFA (B) 90% acetonitrilo, 0,1% TFA

Velocidade de Gradiente: 20% B aumentado para 50% B em 30 minutos.

Resultados: A Tabela XII apresenta os resultados iniciais do estudo que mostra a percentagem do pico principal detectada nos respectivos pontos de tempo.

TABELA XII

Estabilidade de Relaxina em diferentes formulações de gel:
% Pico Principal de Relaxina a vários pontos de tempo

Formulação	% Pico Principal		
	T = 0	T = 5	T = 11 (dias)
Testemunha-luz	100	97	95,9
Testemunha + luz	98,7	33,3	0
Testemunha + luz com N ₂	99,1	38,6	0
Testemunha + luz + ácido ascórbico	100	73	54,4
Testemunha + Luz + 20% glicerol	100	95,5	89,4
Testemunha + luz + 20% etanol	100	85	59,7
Gel Activado - Luz	100	95,8	90,9

Após 11 dias o controle que estava protegido da luz manteve 96% da área do seu pico principal enquanto que o controle exposto à luz se de gradou completamente. O azoto não retardou a degradação 0,5% de ácido ascórbico e 20% de etanol pareceram estabilizar a relaxina aproximadamente no mesmo grau. Ao fim de 11 dias a percentagem de relaxina remanescente era de 55 a 60%.



O melhor resultado foi obtido com a formulação de 20% de glicerol: 90% do pico principal foi recuperado após 11 dias de exposição à luz. A amostra de gel "activado" apresentou uma perda de 9% na proteína activa, mesmo quando protegido da luz. Comparado com o controle negativo (a formulação de gel protegida de luz) é evidente que a "activação" do gel acelerou a degradação da proteína.

Isto implica que a exposição excessiva à luz não é recomendada durante a produção do próprio gel. O resultado da formulação contendo metabissulfito não é apresentada devido ao pico da relaxina não se poder detectar nestas amostras e ter sido subsequentemente retirado do estudo. E possível que o metabissulfito tenha reagido com relaxina resultando em perda de proteína total.

E obvio, a partir destas experiências que a exposição à luz desempenhe um papel essencial na iniciação do processo de degradação. A inclusão de 20% de glicerol na formulação foi o que mais eficazmente protegeu a relaxina da oxidação induzida pela luz. Num grau menor o ácido ascórbico e o metanol também estabilizam a formulação.

O efeito do etanol neste estudo pode ser subestimado devido a uma porção significativa adicionada poder ter-se evaporado durante a dispersão do pó de metilcelulose. Combinações de glicerol, etanol e ácido ascórbico podem proporcionar mais estabilização.

Os resultados acima mostram que a foto-oxidação da relaxina no gel de metilcelulose pode ser eficazmente retardada pela incorporação de glicerol, etanol ou ácido ascórbico. Uma formulação final com uma vida de prateleira aceitável poderá ser projectada tirando partido destes adjuvantes e protegendo o produto da exposição excessiva à luz.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica biologicamente activa, caracterizado por se incluir na referida composição uma quantidade eficaz de relaxina humana num tampão capaz de manter o pH da composição desde aproximadamente 4 até abaixo de aproximadamente 7.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o pH variar de cerca de 4 a 6.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o tampão ser tampão citrato ou acetato.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado por se incluir ainda na referida composição um sal de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso ou um álcool de açúcar.

5a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se incluir ainda na referida composição um álcool de açúcar poli-hídrico, etanol ou polipropilenoglicol.

6a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por se preparar uma composição que se apresenta na forma de um gel.

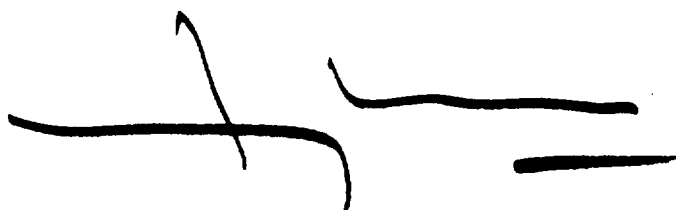
7a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se incluir ainda na referida composição um polissacarídeo solúvel em água ou polietileno-glicol.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o polissacarídeo ser metilcelulose numa quantidade de aproximadamente 2-5% e a relaxina estar presente numa quantidade de aproximadamente 100-1000 µg por ml de gel.

9a. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 6 a 8, caracterizado por se incluir ainda na referida composição um antioxidante ou co-solvente ou uma mistura deles.

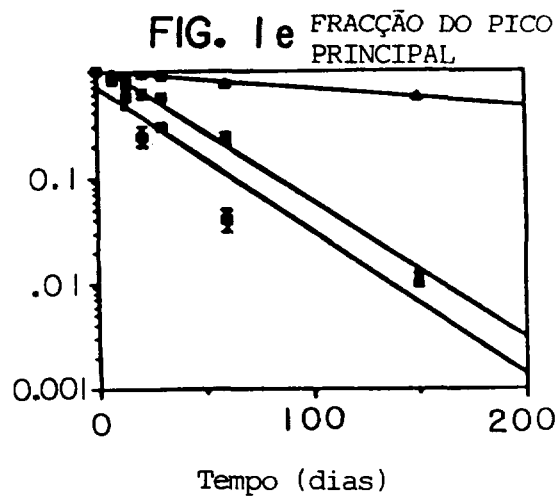
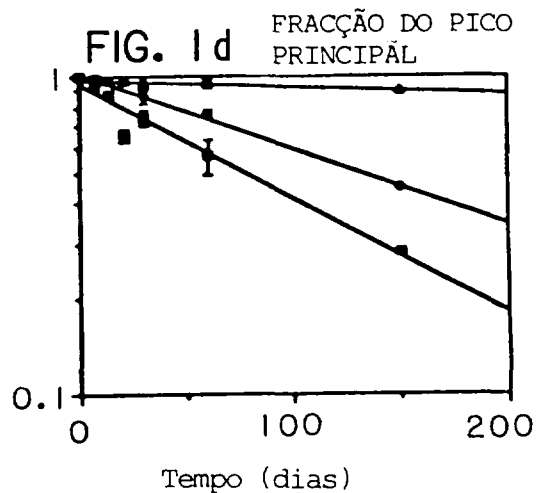
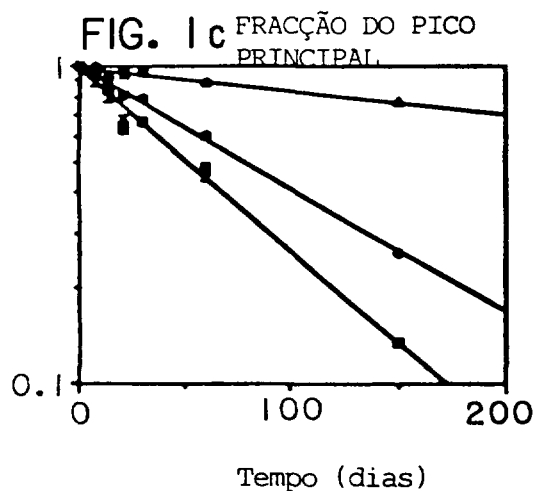
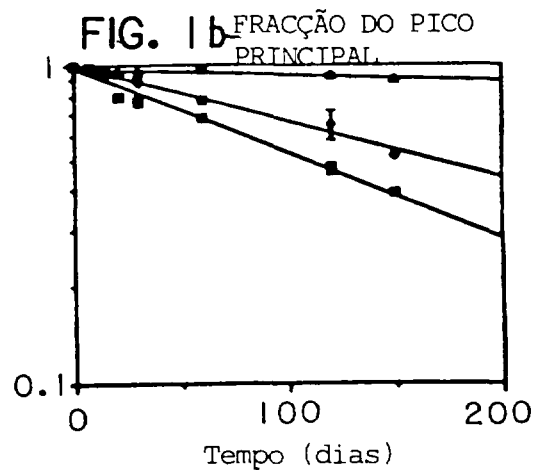
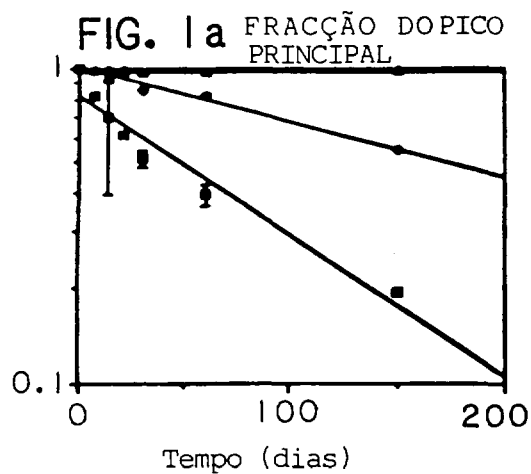
10a. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o antioxidante e/ou co-solvente ser ácido ascórbico, etanol ou glicerol ou uma mistura deles.

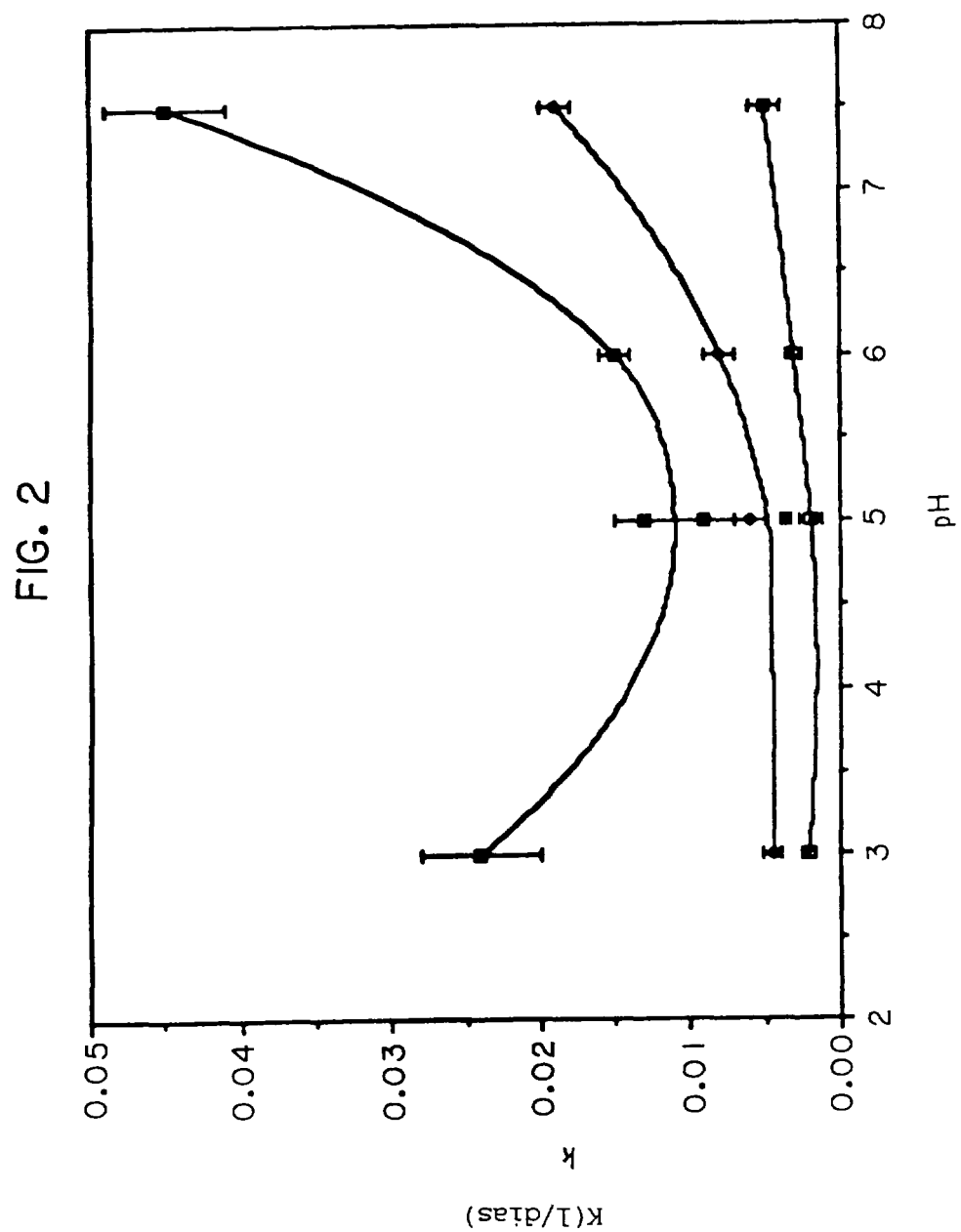
Lisboa, 24 de Fevereiro de 1989



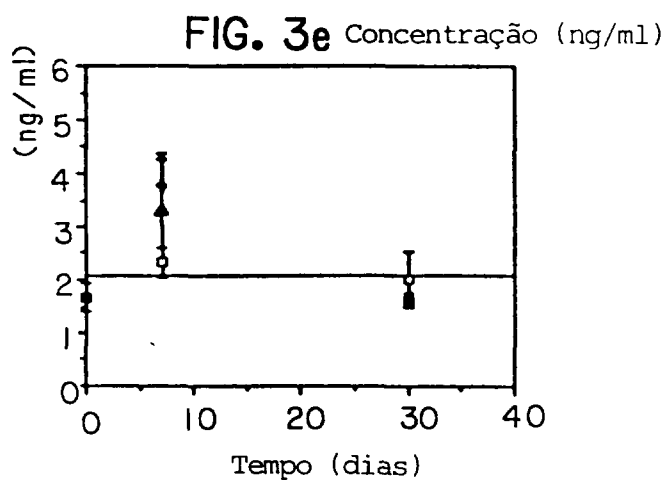
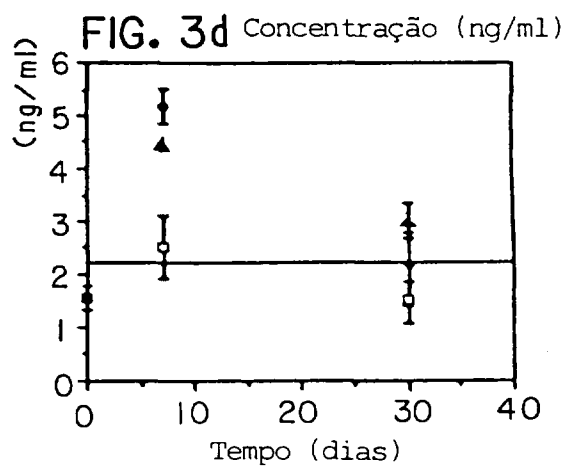
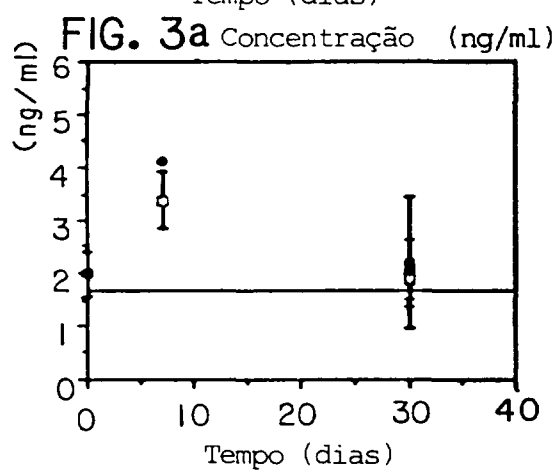
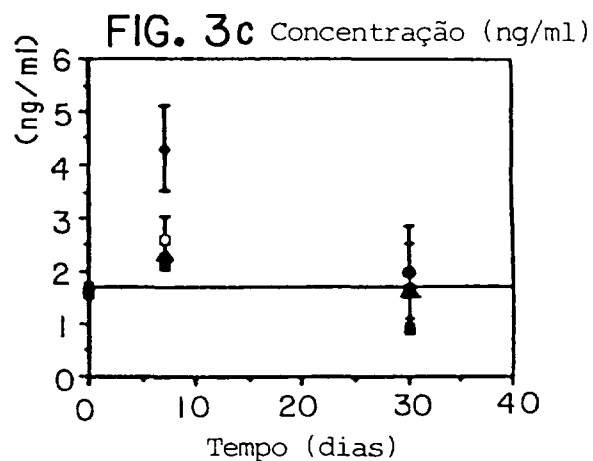
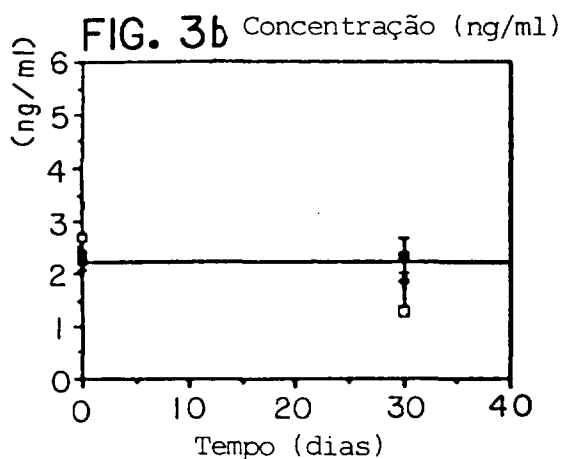
J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

[Handwritten signature]





[Handwritten signature]



11

FIG. 4

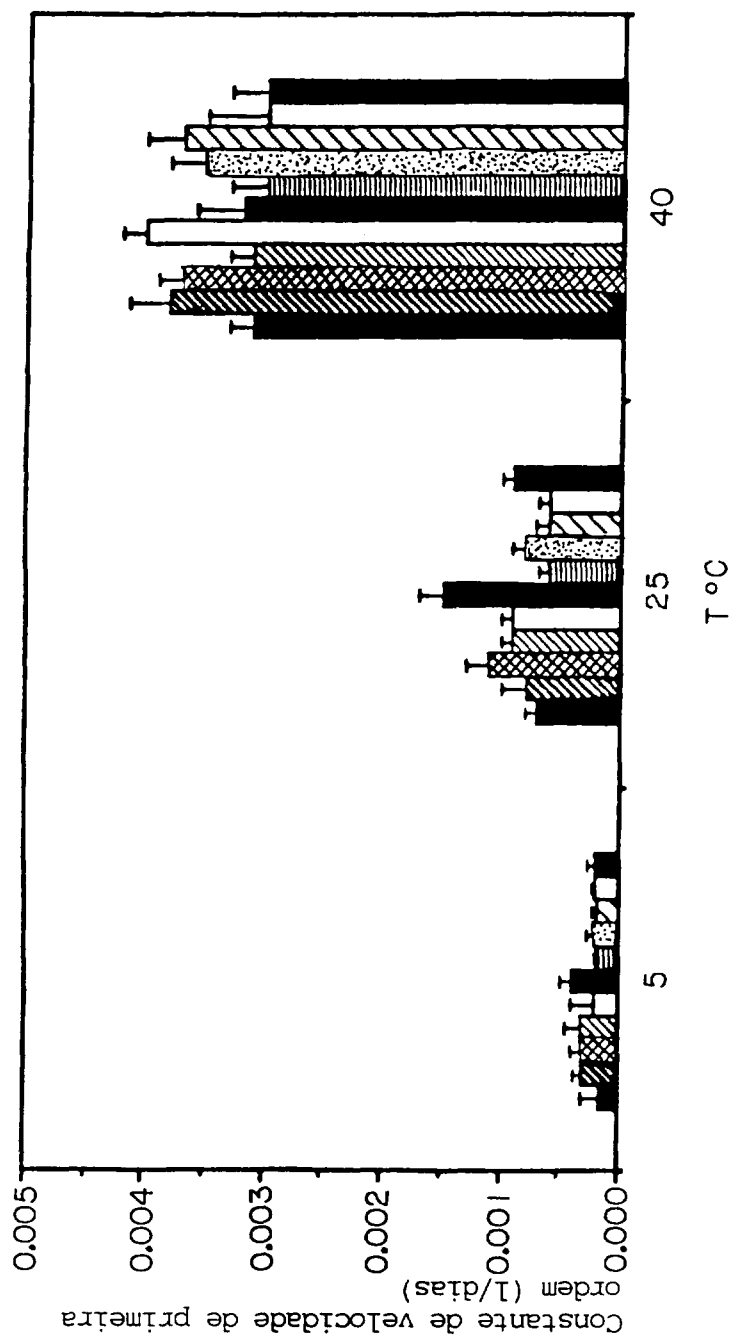


FIG. 5

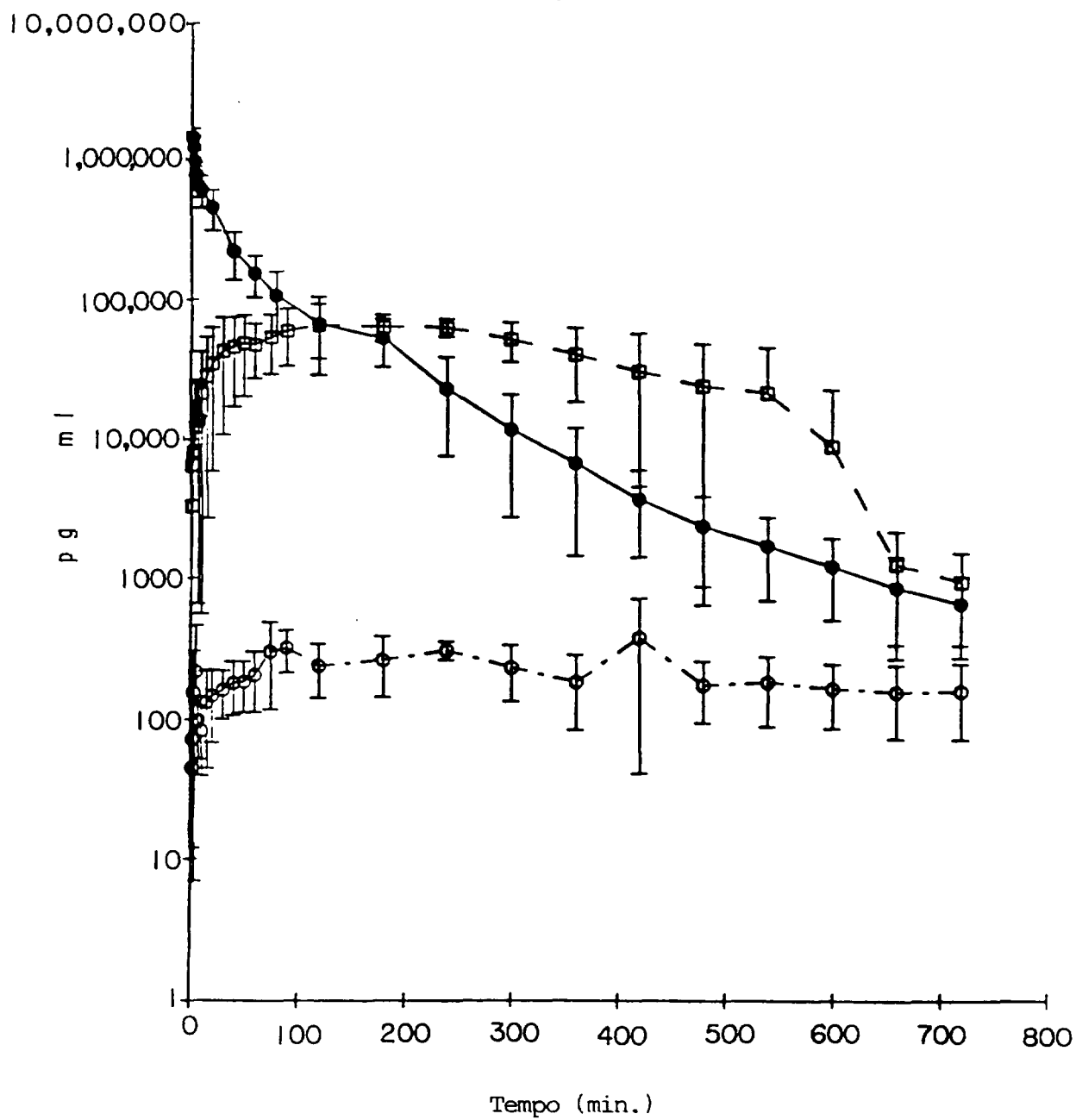


FIG. 6

