

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 534**

51 Int. Cl.:

<b>C07H 21/02</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/113</b>	(2010.01)
<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/7105</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)		
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2016 PCT/JP2016/082164**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17073767**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016 E 16859995 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3369816**

54 Título: **Composición que contiene de manera estable una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que suprime la expresión del gen TGF-β1**

30 Prioridad:

**30.10.2015 JP 2015215207**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.11.2024**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (50.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku  
Tokyo 103-8666, JP y  
TAKEUCHI, HIROFUMI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YAMADA, TAIMU;  
TOYOFUKU, HIDEKAZU;  
TAHARA, KOHEI;  
ONODERA, RISAOKO y  
TAKEUCHI, HIROFUMI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 988 534 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Composición que contiene de manera estable una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que suprime la expresión del gen TGF-β1

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a una composición que contiene una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que inhibe la expresión de gen TGF-β1, la cual es una composición novedosa, en particular una composición farmacéutica, que muestra estabilidad mejorada de la molécula de ácido nucleico.

[Técnica anterior]

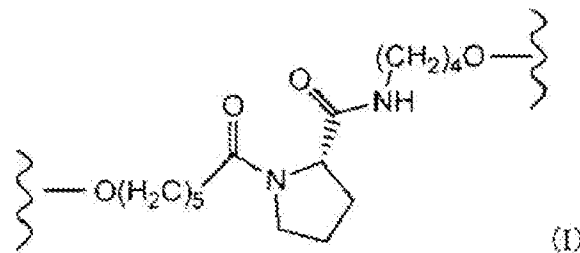
10 La fibrosis pulmonar es una enfermedad en la cual la fibrosis ocurre en el estroma del pulmón disparada por la lesión y el colapso de alveolos pulmonares. En muchos casos, la causa es desconocida. Cuando la causa no puede ser encontrada, la fibrosis pulmonar se denomina, en particular, fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés). A medida que la fibrosis progresa, los pulmones se endurecen y la capacidad de intercambio de oxígeno disminuye. En la actualidad no existe un método de tratamiento definitivo y su método de tratamiento es casi terapia sintomática.

15 TGF-β es conocido como una citocina que regula la proliferación y diferenciación celular y es considerada por jugar también un papel importante en la fibrilación del hígado o pulmón. Así, está atrayendo atención como un objetivo de tratamiento de fibrosis pulmonar.

20 Se espera que la medicina de ácido nucleico sea una tecnología de descubrimiento de fármacos de siguiente generación debido a que tiene tanto fácil capacidad de fabricación de productos farmacéuticos de bajo peso molecular como efectividad y seguridad de fármacos de anticuerpos. Sin embargo, el desarrollo de los productos farmacéuticos no está progresando como se esperaba debido a las barreras de la inestabilidad de moléculas de ácido nucleico en el cuerpo, efectos secundarios debidos a respuesta inmune innata potenciada, ausencia de desarrollo de sistema de entrega de fármacos eficiente (DDS, por sus siglas en inglés) y similares.

25 En el caso de enfermedades respiratorias, la fibrosis pulmonar es una enfermedad objetivo efectiva de medicina de ácido nucleico, debido a que es posible la administración tópica de fármacos al pulmón. Para lidiar con los problemas de una molécula de ácido nucleico tal como estabilidad en el cuerpo e inducción de respuesta inmune innata, se ha desarrollado una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla en la cual los extremos de un ácido nucleico de doble cadena de ARNpi o mi-ARN estén enlazados por diversos enlazadores (p. ej., documentos de patente 1-5). Hamasaki et al. informaron que síntomas fueron notablemente mejorados mediante la administración intratraqueal de una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que tiene la siguiente estructura que porta una secuencia inhibitoria de la expresión de TGF-β1 (a la que de aquí en adelante también se la aludirá como "PK-0051") para modelar ratones de fibrosis pulmonar y lesión pulmonar aguda (documento no de patente 1).

30 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUUAUACC (SEQ ID NO: 1) -P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC (SEQ ID NO: 2) -P-G-3 (Lo subrayado muestra una secuencia inhibitoria de expresión de TGF-β1. P es un enlazador derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I)).



35 El documento WO 2015/093495 (documento de patente 6) describe una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla para inhibir la expresión del gen TGF-β1 y una composición farmacéutica terapéutica para la fibrosis pulmonar o lesión pulmonar aguda que contiene esta molécula de ácido nucleico de cadena sencilla.

40 El documento WO 2008/040126 (documento de patente 7) describe una composición y un método para estabilizar ARN de muestras biológicas de modo que el ARN dentro de la muestra permanece estable a temperatura ambiente.

El documento US 2015/272886 (documento de patente 8) describe una formulación de liposomas. Su método de preparación y su aplicación en el tratamiento de enfermedades provocadas por una expresión anormal del gen.

45 El documento WO 2013/090648 (documento de patente 9) describe composiciones de formulaciones que comprenden moléculas de ácido nucleico modificado que pueden codificar una proteína, un precursor de proteína o una forma parcial o totalmente procesada de la proteína o precursor de la proteína.

El documento JP 2010/233505 (documento de patente 10) se refiere a métodos y kits para mantener el comportamiento de reactivos utilizados en reacciones de detección de la amplificación de ácidos nucleicos.

El documento WO 2007/121347 (documento de patente 11) se refiere a composiciones de ARN de interferencia para silenciar la tirosina quinasa del bazo (Syk) y para el tratamiento de una afección inflamatoria relacionada con Syk.

- 5 El documento EP 2436767 (documento de patente 12) describe una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que incluye una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana.

[Listado de documentos]

[Documentos de patente]

- Documento de patente 1: WO 2012/017919
- 10 Documento de patente 2: WO 2013/103146
- Documento de patente 3: WO 2012/005368
- Documento de patente 4: WO 2012/077446
- Documento de patente 5: WO 2013/133393
- Documento no de patente 6: WO 2015/093495
- 15 Documento no de patente 7: WO 2008/040126
- Documento no de patente 8: US 2015/272886
- Documento no de patente 9: WO 2013/090648
- Documento no de patente 10: JP 2010/233505
- Documento no de patente 11: WO 2007/121347
- 20 Documento no de patente 12: EP 2436767

[documento no de patente]

Documento no de patente 1: PLoS One, 2012, 7(8):e42655.

[SUMARIO DE LA INVENCION]

[Problemas a ser Resueltos por la Invención]

- 25 En general, debido a que los ácidos nucleicos son susceptibles a descomponerse en soluciones e inestables, la manipulación a temperatura ambiente es extremadamente difícil. Por lo tanto, se han adoptado generalmente el almacenamiento con liofilización y un método que incluye añadir etanol al 50 % a un tampón Tris-EDTA (TE) y almacenar el mismo sin congelación a -20 °C. Según las circunstancias, se desea el desarrollo de una preparación de ácido nucleico estable capaz de asegurar la presencia estable de un ácido nucleico como un ingrediente activo a
- 30 temperatura ambiente y excelente en propiedad de manipulación.

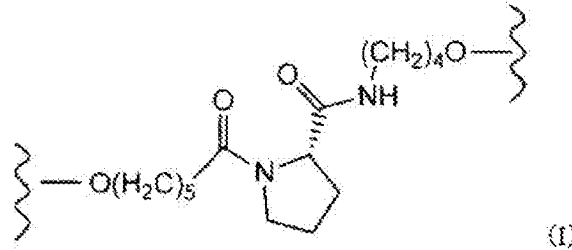
Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una composición, en particular composición farmacéutica, que contenga de manera estable una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla (PK-0051), que se confirma que tenga un efecto de tratamiento en la fibrosis pulmonar o lesión pulmonar aguda, como una solución a temperatura ambiente y un método de producción de la misma.

- 35 [Medios para Resolver los Problemas]

Los inventores de esta solicitud han realizado estudios intensivos en un intento por resolver los problemas antes mencionados y han encontrado de manera inesperada que la molécula PK-0051 puede ser almacenada de manera estable durante un largo periodo al disolver PK-0051 en un tampón y controlar el pH de la solución PK-0051 para caer dentro de un intervalo particular, lo cual resultó en la terminación de la presente invención.

- 40 Por lo tanto, la presente invención es como sigue.

[1] Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada por 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (en la secuencia, P es un enlazador derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I))



y un tampón y que tiene las siguientes características:

(a) está en la forma de una solución a temperatura ambiente; y

5 (b) un contenido de la molécula de ácido nucleico después de almacenamiento a 25 °C, humedad relativa de 60 % durante 4 semanas, de no menos de 80 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento, en donde el tampón ajusta el pH de la composición a no menos de 4,6 y a no más de 7,0.

[2] La composición de [1], en donde el tampón ajusta el pH de la composición a no menos de 5,5 y a no más de 6,5.

10 [3] La composición de [1] o [2], en donde el contenido de la molécula de ácido nucleico después del almacenamiento a 40 °C, humedad relativa de 75 % durante 4 semanas no es menor que 80 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento.

[4] La composición de uno cualquiera de [1] a [3], en donde el contenido de la molécula de ácido nucleico después del almacenamiento a 60 °C durante 4 semanas no es menor que 60 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento.

15 [5] La composición de [1], en donde el contenido de la molécula de ácido nucleico expuesta a la exposición a luz total de 1.2 millones de Lux•h no es menor que 80 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento.

20 [6] La composición de uno cualquiera de [1] a [5], en donde el tampón comprende uno o más agentes tampón seleccionados de hidrógeno-fosfato sódico, dihidrógeno-fosfato sódico, hidrógeno-fosfato disódico, cloruro sódico clorhidrato de arginina, citrato de sodio, citrato trisódico dihidrato, L-glutamato monosódico, acetato de sodio, carbonato de sodio, hidrógeno-carbonato de sodio, lactato de sodio, fosfato monopotásico, hidróxido de sodio, meglumina, glicina, ácido cítrico y ácido acético.

[7] La composición de uno cualquiera de [1] a [6], en donde el tampón comprende ácido cítrico y/o ácido fosfórico.

[8] La composición de uno cualquiera de [1] a [7], que comprende además un agente de isotonicidad.

25 [9] La composición de [8], en donde el agente de isotonicidad es uno o más seleccionados de D-sorbitol, cloruro sódico, glicerol, D-manitol, cloruro de potasio, lactitol y sacarosa.

[10] La composición de uno cualquiera de [1] a [11], para uso en la profilaxis o el tratamiento de fibrosis pulmonar o lesión pulmonar aguda.

30 [11] Un método para producir la composición de uno cualquiera de [1] a [9], que comprende disolver la molécula de ácido nucleico como se define en [1] en un tampón, ajustar un pH de la composición a no menos de 5,5 y a no más de 6,5 y almacenar la solución a temperatura ambiente.

[12] El método de [11], en el que el tampón comprende ácido cítrico y/o ácido fosfórico.

[13] Un método para estabilizar una molécula de ácido nucleico en una composición, que comprende disolver la molécula de ácido nucleico como se define en [1] en un tampón que ajusta a un pH de la composición a no menos de 5,5 y no más de 6,5 y almacenar la solución a temperatura ambiente.

35 [14] El método de [13], en el que el tampón comprende ácido cítrico y/o ácido fosfórico.

[Efecto de la Invención]

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse una composición farmacéutica novedosa y fácilmente manipulable que muestra estabilidad mejorada de una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla como un ingrediente activo y que no requiere volver a disolverse cuando está en uso.

40 [Breve Descripción de los Dibujos]

La Fig. 1 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 25 °C de solución de PK-0051 preparada usando

un tampón en cada pH.

La Fig. 2 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 40 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón en cada pH.

5 La Fig. 3 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón en cada pH.

La Fig. 4 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón citrato 0,05 M (pH 4,0-7,5).

La Fig. 5 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón citrato 0,1 M (pH 4,0-7,8).

10 La Fig. 6 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón fosfato 0,05 M (pH 4,0-7,9).

La Fig. 7 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,0 – 7,8).

15 La Fig. 8 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (5:5) (pH 4,0 – 7,8).

La Fig. 9 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (2:8) (pH 4,0 – 7,8).

La Fig. 10 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 40 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón citrato en cada concentración.

20 La Fig. 11 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60 °C de solución de PK-0051 preparada usando un tampón citrato en cada concentración.

La Fig. 12 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad de 1 mg/mL de solución de PK-0051 (pH 6,5).

La Fig. 13 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad de 10 mg/mL de solución de PK-0051 (pH 6,5).

La Fig. 14 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad de 1 mg/mL de solución de PK-0051 (pH 6,0).

25 La Fig. 15 muestra la cantidad relativa de hTGF-β1 en un tejido de pulmón de cada uno de los grupos de administración de PK-0051.

La Fig. 16 muestra la cantidad de hidroxil prolina en un tejido de pulmón de cada uno de los grupos de administración de PK-0051.

30 La Fig. 17 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad a 60°C de 10, 20, 40 y 80 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)).

La Fig. 18 muestra los resultados de un ensayo de fotoestabilidad de 1 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)). Se utilizó HPLC de intercambio iónico para la medición.

La Fig. 19 muestra los resultados de un ensayo de fotoestabilidad de 1 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)). Se utilizó HPLC de intercambio iónico para la medición.

35 La Fig. 20 muestra los resultados de un ensayo de fotoestabilidad de 1 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)). Se utilizó HPLC de intercambio iónico para la medición.

La Fig. 21 muestra los resultados de un ensayo de fotoestabilidad de 1 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)). Se utilizó HPLC de fase inversa para la medición.

40 La Fig. 22 muestra los resultados de un ensayo de fotoestabilidad de 1 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)). Se utilizó HPLC de fase inversa para la medición.

La Fig. 23 muestra los resultados de un ensayo de fotoestabilidad de 1 mg/mL de PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)). Se utilizó HPLC de fase inversa para la medición.

[Descripción de Realizaciones]

45 La presente invención proporciona una composición que contiene una molécula de ácido nucleico, la cual es capaz de almacenar de manera estable molécula de ácido nucleico de cadena sencilla PK-0051 que contiene una secuencia de nucleótidos que inhibe la expresión del gen TGF-β1 en la forma de una solución a temperatura ambiente (de aquí

en adelante a la que también se alude como "la composición de la presente invención"). Como se utiliza en la presente, la "temperatura ambiente" significa un intervalo de temperaturas de 15 – 30 °C y "almacenar de manera estable" significa que no menos de 80 % de la molécula de ácido nucleico en el momento de inicio del almacenamiento (tras la preparación de la composición) se almacena sin descomposición durante (1) no menos de 4 semanas, de preferencia (2) no menos de 24 semanas (aproximadamente 6 meses), más preferiblemente (3) no menos de 200 semanas (aproximadamente 3,7 años). Una estabilidad al almacenamiento de este tipo puede confirmarse o predecirse cada una a partir de los resultados del siguiente ensayo de estabilidad.

(1) El contenido de molécula de ácido nucleico en una composición después de almacenamiento a 25 °C, humedad relativa al 60 % durante 4 semanas no es menor que 80 % con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento.

(2) El contenido de molécula de ácido nucleico en una composición después de almacenamiento a 40 °C, humedad relativa al 75 % durante 4 semanas no es menor que 80 % con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento.

(3) El contenido de molécula de ácido nucleico en una composición después de almacenamiento a 60 °C durante 4 semanas no es menor que 60 %, de preferencia no menor que 70 %, más preferiblemente no menor que 80 % con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento.

De manera alternativa, el contenido de molécula de ácido nucleico en una composición después del almacenamiento a 105 °C durante 15 min o a 121 °C durante 15 min no es menor que 60 %, de preferencia no es menor que 70 %, más preferiblemente no es menor que 80% con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento.

La composición de la presente invención puede ser almacenada de manera estable bajo condiciones de alta temperatura. Además, puede almacenarse de manera estable incluso bajo condiciones de congelación-descongelación.

Además, "almacenada de manera estable" incluye, de preferencia, "almacenada de manera estable a la luz", "Almacenada de manera estable a la luz" significa que no menos de 80 % de la molécula de ácido nucleico en el momento de inicio del almacenamiento (tras la preparación de la composición) es almacenada sin descomposición incluso después de la exposición a la exposición de luz total de 1.2 millones de Lux•h. Una estabilidad al almacenamiento de este tipo puede confirmarse o predecirse a partir del hecho de que el contenido de molécula de ácido nucleico en una composición después de almacenamiento bajo una lámpara fluorescente de luz de día (iluminancia 1580 Lux) con una lámpara D65 como una fuente de luz durante 4 semanas no es menor que 80 % con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento.

Como se utiliza en la presente, el contenido de la molécula de ácido nucleico en la composición se determina al utilizar una solución (al 100 %) obtenida al disolver una molécula de ácido nucleico en la misma cantidad que una muestra de ensayo en agua para inyección y una solución obtenida al mezclar dicha solución y agua para inyección a relaciones de 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 (90 %, 80 %, 70 % y 60 %, respectivamente) como muestras de curva de calibración, aplicar 10 µL de cada una de las muestras de curva de calibración a HPLC para medir áreas pico, representar en una gráfica los valores medidos de muestras de curva de calibración respectiva con el contenido teórico (%) en el eje horizontal (X) y el área pico en el eje vertical (Y), obtener una línea de regresión ( $Y = aX + b$ ) (curva de calibración) mediante el método de mínimos cuadrados y aplicar el área pico de la muestra de ensayo medida mediante HPLC bajo las mismas condiciones a la curva de calibración para dar un contenido teórico (%). Las condiciones de medición de la HPLC antes mencionada son como sigue:

#### HPLC de fase inversa

Dispositivo de medición: sistema LC-10A SHIMAZU HPLC (RP-HPLC), fabricado por Shimadzu Corporation

Detector: espectrofotómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 254 nm) (fabricado por Shimadzu Corporation)

Columna: X-Bridge OST C18 (2,5 µm, 4,6 x 50 mm) (fabricada por Japan Waters)

Temperatura de la columna: 40 °C

Fase móvil A: TEAA 50 mM (pH 7,0), 0,5 % acetonitrilo

Fase móvil B: 100 % acetonitrilo

Alimentación de fase móvil: La relación de mezcla de fase móvil A y fase móvil B se cambió como sigue para controlar el gradiente de concentración.

Tabla 1

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (% vol)	Fase móvil B (% vol)
0→12	100→60	0→40
Caudal: 1,0 mL/min		

HPLC de intercambio iónico

- Dispositivo de medición: sistema LC-20A SHIMAZU HPLC (AEX-HPLC), fabricado por Shimadzu Corporation
- 5 Detector: espectrofotómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 260 nm)
- Columna: DNAPac PA-100 (4×250 mm)
- Temperatura de la columna: 80 °C
- Fase móvil A: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), urea 8 M, 10 % acetonitrilo
- Fase móvil B: fase móvil A, monohidrato de perclorato de sodio 700 mM
- 10 Alimentación de fase móvil: La relación de mezcla de fase móvil A y fase móvil B se cambió como sigue para controlar el gradiente de concentración.

Tabla 2

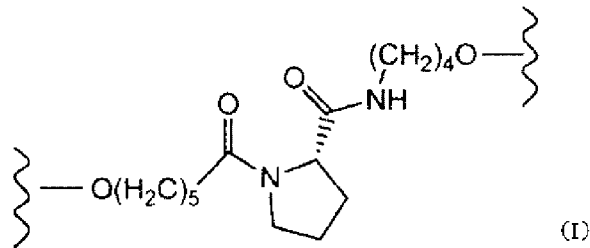
Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (% vol)	Fase móvil B (% vol)
0→20	90→60	10→40
Caudal: 1,0 mL/min		

1. Molécula de ácido nucleico

- 15 La molécula de ácido nucleico como un ingrediente activo a estar contenida en la composición de la presente invención se muestra mediante la siguiente secuencia de nucleótidos.

5'-AGCAGAGUACACACAGCAUUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3'

(en la secuencia, P es un enlazador derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I)).



- 20 En la secuencia de nucleótidos antes mencionada, la secuencia subrayada es una secuencia de nucleótidos complementaria a ARNm de TGF-β1 humano y es una secuencia inhibitoria de la expresión de TGF-β1 que se une al ARNm para exhibir una acción de ARN de interferencia.

- La molécula de ácido nucleico a estar contenida en la composición de la presente invención puede producirse mediante un método conocido per se. Por ejemplo, puede producirse de acuerdo con el método descrito en los documentos
- 25 WO2013/133393, PLoS One, 2012, 7(8):e42655.

Aunque el contenido de la molécula de ácido nucleico en la composición de la presente invención no está particularmente limitado, cuando la composición es una composición farmacéutica, generalmente es 0,0001 – 60 % en peso, de preferencia 0,001 – 15 % en peso, más preferiblemente 0,01 – 1 % en peso, con relación a la composición farmacéutica entera.

2. Tampón

La composición de la presente invención contiene un tampón. En la presente invención, el tampón se refiere a una solución (en particular solución acuosa) que tiene una acción tampón y se constituye al contener un agente tampón. El agente tampón en la presente invención significa un estabilizante del pH de una solución acuosa y puede seleccionarse uno generalmente utilizado en el campo de producción de medicamentos.

En la presente invención, la descomposición de la molécula de ácido nucleico en la composición puede prevenirse al usar un tampón.

La composición de la presente invención comprende un tampón que ajusta el pH de la composición a no menos de 4,6 y no más de 7,0. Es preferible un tampón que ajusta el pH de la composición a no menos de 5,5 y no más de 6,5-

El agente tampón puede comprender uno o más agentes tampón seleccionados de ácido ascórbico, L-aspartato de magnesio, sulfito de sodio, L-arginina, clorhidrato de L-arginina, ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido épsilon-aminocaproico, cloruro de amonio, cloruro de potasio, cloruro sódico, cloruro de glucosamina, ácido clorhídrico trietanolamina, ácido clorhídrico diluido, ácido cítrico, ácido cítrico anhidro, citrato de sodio anhidro, ácido cítrico hidrato, citrato de sodio hidrato, dihidrógeno citrato de sodio, citrato sódico, citrato disódico, citrato trisódico, citrato trisódico dihidrato, citrato de potasio, glicilglicina, glicina, glucono- $\sigma$ -lactona, ácido glucónico, gluconato de calcio hidrato, ácido L-glutámico, L-glutamato monosódico, creatinina, clorobutanol, hidrógeno fosfato disódico, dihidrógeno fosfato de sodio, ácido succínico, hexahidrato de succinato disódico, ácido acético, acetato de amonio, acetato de potasio, acetato de sodio hidrato, diisopropanolamina, dietanolamina, ácido tartárico, L-tartrato de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, taurina, carbonato de sodio, carbonato de sodio hidrato, hidrógeno-carbonato de sodio, triisopropanolamina, trietanolamina, trometamol, dióxido de carbono, ácido láctico, lactato de calcio hidrato, solución de lactato de sodio, L-histidina, 4-(2-hidroxietilo), ácido acético helado, glucosa, fumarato monosódico, propionato de sodio, cloruro de benzalconio, disolvente mixto de hidrocarburos aromáticos, borato de amonio, ácido maleico, acetato de sodio anhidro, carbonato de sodio anhidro, hidrógeno-fosfato disódico anhidrato, fosfato trisódico anhidrato, dihidrógeno-fosfato de sodio anhidrato, metafosfato de sodio, ácido metanosulfónico, ácido sulfúrico, hidrato de potasio de sulfato de aluminio, ácido fosfórico, monohidrógeno fosfato de sodio heptahidrato, fosfato trisódico, fosfato de sodio dibásico hidrato, hidrógeno-fosfato disódico hidrato, dihidrógeno fosfatos de sodio, dihidrógeno fosfato de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de sodio monohidrato. De estos, es preferible un tampón que contiene ácido cítrico o una sal del mismo o un hidrato del mismo, o ácido fosfórico o una sal del mismo o un hidrato del mismo como un agente tampón.

Por lo tanto, como un tampón a ser utilizado para la composición de la presente invención, puede mencionarse de preferencia un tampón que contiene ácido cítrico o ácido fosfórico.

En la presente invención, el tampón contiene preferiblemente un ácido ejemplificado como el agente tampón antes mencionado y una sal del mismo, o sales de dos o más tipos de ácidos ejemplificados como el agente tampón antes mencionado. Más preferiblemente, pueden mencionarse un tampón que contiene ácido cítrico y una sal del mismo (p. ej., ácido cítrico y citrato de sodio, ácido cítrico y citrato trisódico y similares), un tampón que contiene ácido fosfórico y una sal del mismo (p. ej., ácido fosfórico y dihidrógeno-fosfato de sodio y similares) y un tampón que contiene dos tipos de fosfatos (p. ej., hidrógeno-fosfato disódico y dihidrógeno-fosfato de sodio). Se prefiere o prefieren en particular un tampón que contiene ácido cítrico y una sal del mismo y/o un tampón que contiene dos tipos de fosfatos.

La cantidad de un tampón a ser utilizada para la composición de la presente invención puede ser cualquiera siempre y cuando pueda ajustarse a un intervalo de pH deseado. Por ejemplo, se puede determinar apropiadamente para hacer que el contenido del agente tampón en la composición caiga dentro del siguiente intervalo. Es decir, el contenido del agente tampón en la composición de la presente invención es generalmente 0,0001 – 40 % en peso, de preferencia 0,0005 – 20 % en peso, más preferiblemente 0,001 – 10 % en peso, con relación a la composición completa.

3. Otros aditivos

La composición de la presente invención puede contener, además, un disolvente. Ejemplos del disolvente incluyen disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables (p. ej., etanol, propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, etc.), agua, agua para inyección, solución salina fisiológica, solución de glucosa y similares. Uno o más tipos de disolvente pueden utilizarse en combinación.

En la presente invención, una molécula de ácido nucleico se disuelve de preferencia por adelantado en un disolvente y se mezcla con un tampón, debido a que la molécula de ácido nucleico puede disolverse en un corto tiempo. Como disolvente, es preferible agua. En la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique de otra manera, que "la molécula de ácido nucleico está disuelta en un tampón" significa que no solo una molécula de ácido nucleico como un sólido se disuelve directamente en un tampón sino que, como se mencionó antes, una molécula de ácido nucleico ya está disuelta en un disolvente tal como agua y similar y la solución obtenida se mezcla con un tampón.

En la presente invención, el contenido del disolvente generalmente no es menor que 0,0001 % en peso y menos de 100 % en peso, de preferencia no menos de 0,001 % en peso y menos de 100 % en peso, más preferiblemente no menos de 0,005 % en peso y menos de 100 % en peso, como la cantidad total en relación a la composición entera.



- 5 La composición de la presente invención contiene además, opcionalmente, un agente de isotonicidad. Ejemplos del agente de isotonicidad incluyen glucosa, D-sorbitol, cloruro sódico, glicerol, D-manitol, cloruro de potasio, lactitol, sacarosa, glucosa y similares. Agentes de isotonicidad preferibles son D-sorbitol, cloruro sódico, glicerol, D-manitol, cloruro de potasio, lactitol y sacarosa y más preferidos son cloruro sódico, cloruro de potasio y sacarosa. Uno o más tipos de agentes de isotonicidad pueden utilizarse en combinación.
- 10 Cuando se utiliza un agente de isotonicidad, la relación de presión osmótica de la composición de la presente invención (relación de osmolaridad de la composición de la presente invención a osmolaridad proporcionada por solución salina fisiológica) es de preferencia 0,6 – 1,4, más preferiblemente de 0,8 – 1,2, más preferiblemente de 1,0.
- 15 Cuando la composición de la presente invención es una composición farmacéutica, la composición se puede formular, por ejemplo, como líquido inhalante, inyección, líquido y similares mediante un método conocido y se administra mediante administración parenteral (p. ej., administración transnasal, administración intravenosa, instilación, administración intramuscular, administración subcutánea, etc.). Además, puede ser administrada oralmente en una forma de dosificación adecuada (p. ej., cápsula, etc.). Un método de administración preferible es la inhalación de partículas de gotitas al utilizar un nebulizador.
- 20 Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una inyección, también puede producirse como una preparación de liposomas que encapsula una molécula de ácido nucleico, al disolver la molécula de ácido nucleico en un tampón y poner en contacto la solución obtenida con una molécula constituyente de membrana lipídica. La preparación de liposomas puede utilizarse de preferencia como una inyección para administración sistémica, tal como inyección intravenosa, inyección intramuscular, y similares.
- 25 La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un aditivo farmacéuticamente aceptable según sea necesario, además de los componentes antes mencionados. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una inyección, ejemplos del aditivo incluyen agente de isotonicidad (p. ej., glucosa, D-sorbitol, cloruro sódico, glicerol, D-manitol, cloruro de potasio, lactitol, sacarosa, glucosa, etc.), agente calmante (p. ej., alcohol bencílico, etc.), conservante (p. ej., benzoato de metilo, paraoxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, etc.) y similares. Aditivos preferibles son benzoato de metilo, D-sorbitol, cloruro sódico, glicerol, D-manitol, cloruro de potasio, lactitol y sacarosa. Aditivos más preferibles son cloruro sódico, cloruro de potasio y sacarosa.
- 30 Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se formula como un inhalante, por ejemplo, una solución obtenida al disolver una molécula de ácido nucleico en un disolvente tal como agua y similares se mezcla con una solución acuosa añadida con un agente tampón (p. ej., ácido cítrico y una sal del mismo, ácido fosfórico y una sal del mismo), la mezcla se filtra para la eliminación bacteriana y la solución de fármaco obtenida es llenada en un recipiente sellado herméticamente tal como un vial, una ampolla, y similares para producir un inhalante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se mezcla con una solución acuosa que contiene agua y un agente tampón (p. ej., ácido cítrico y una sal del mismo, ácido fosfórico y una sal del mismo), disuelta mediante tratamiento por ultrasonidos, y similares, se filtra para la eliminación bacteriana y la solución de fármaco obtenida se llena en un recipiente herméticamente sellado, tal como un vial, una ampolla, y similares para producir un inhalante. Aunque un recipiente herméticamente sellado a utilizar es generalmente un recipiente de vidrio de borosilicato incoloro y transparente, también puede utilizarse un recipiente en el cual una parte de contacto de líquido en la parte interior de vidrio tiene propiedad de superficie similar a cuarzo.
- 35 La composición farmacéutica de la presente invención es útil para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que implican una promoción anormal de expresión de TGF- $\beta$ 1, en particular fibrosis pulmonar y lesión pulmonar aguda, ya que contiene, como un ingrediente activo, una molécula de ácido nucleico capaz de inhibir la expresión de TGF- $\beta$ 1. En la presente invención, "tratamiento" incluye el significado de mejora de la enfermedad y mejora del pronóstico y "profilaxis" incluye el significado de prevención del brote o retraso del brote.
- 40 La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención también varía dependiendo de la aceptabilidad de fármaco del sujeto de administración, la vía de administración, la gravedad de la enfermedad, y similares. Por ejemplo, cuando se administra como un agente terapéutico para fibrosis pulmonar como un líquido inhalante a un adulto, la dosis de la molécula de ácido nucleico como un ingrediente activo es aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de preferencia aproximadamente 0,005 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, el cual se puede administrar en una a varias porciones al día.
- 45 La presente invención también se refiere a un método para estabilizar la molécula de ácido nucleico en la composición, que comprende disolver la molécula de ácido nucleico en un tampón, ajustar un pH de la composición a no menos de 5,5 y no más de 6,5 y almacenar la solución a la temperatura ambiente. Como tampón utilizado para este método, se pueden mencionar los ejemplos antes mencionados de la composición de la presente invención.
- 55 La cantidad del tampón a añadir en el método de estabilización puede ser cualquiera, siempre y cuando el pH pueda ajustarse a un intervalo deseado. Por ejemplo, la cantidad del agente tampón puede determinarse apropiadamente para que caiga dentro del siguiente intervalo. Es decir, la cantidad del agente tampón a ser añadida en el método de estabilización es, en general, 0,0001 – 40 % en peso, de preferencia 0,0005 – 20 % en peso, más preferiblemente

0,001 – 10 % en peso, con relación a la composición completa obtenida por el método.

La presente invención se explica en más detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como limitantes.

**[Ejemplos]**

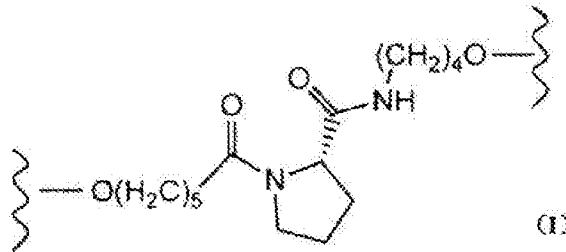
**5 Ejemplo de producción 1 (síntesis de molécula de ácido nucleico de cadena sencilla)**

Una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla PK-0051 que porta una secuencia inhibitoria de la expresión de TGF-β1 se sintetizó mediante un sintetizador de ácidos nucleicos (nombre comercial: ABI Expedite (marca registrada) 8909 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems) basado en el método de fosoramidita. Para la síntesis antes mencionada, ARN fosoramiditas (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm. Co., Ltd.) se utilizaron como ARN amidita (de aquí en adelante igual). La amidita antes mencionada fue desprotegida mediante un método convencional. El ARN sintetizado fue purificado mediante HPLC. Cada uno de los ARN después de la purificación se liofilizó.

Como la región enlazadora se utilizó L-prolinadiamida-amidita. Lo subrayado muestra una secuencia inhibitoria de la expresión del gen de TGF-β1 humano.



15 (P es un enlazador de derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I)).



**Ejemplo 1 (evaluación de influencia de pH sobre la temperatura de almacenamiento)**

Se evaluó la estabilidad térmica de la composición que contiene PK-0051 de un prototipo para inhalación de ácido nucleico.

20 1. Preparación de la composición de ensayo

La composición de ensayo 1 se preparó como sigue.

97,0 mL de ácido clorhídrico 0,04 M, 50 mL de cloruro de potasio 0,04 M y 53 mL de agua para inyección se mezclaron para preparar tampón de cloruro de potasio-ácido clorhídrico 0,04 M (pH 1,0). Utilizando el tampón, se preparó 0,1 mg/mL de PK-0051.

25 La composición de ensayo 2 se preparó como sigue.

10 mL de ácido fosfórico 0,04 M, 10 mL de ácido bórico 0,04 M y 10 mL de ácido acético 0,04 M se mezclaron y la mezcla se ajustó a pH 2,0 con NaOH 2 N para preparar tampón de Britton-Robinson 0,04 M. Utilizando el tampón, se preparó 0,1 mg/mL de PK-0051.

30 Las composiciones de ensayo 3 – 12 se prepararon mediante un método similar al de la composición de ensayo 2, excepto que el pH se ajustó a cada pH con NaOH 2 N.

Composición de ensayo 1: PK-0051 (tampón de ácido clorhídrico-cloruro de potasio 0,04 M (pH 1,5)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 2: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 2,0)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 3: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 3,0)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 4: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 4,0)), (0,1 mg/mL)

35 Composición de ensayo 5: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 5,0)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 6: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 6,0)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 7: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 7,0)), (0,1 mg/mL)

- Composición de ensayo 8: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 8,0)), (0,1 mg/mL)  
 Composición de ensayo 9: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 9,0)), (0,1 mg/mL)  
 Composición de ensayo 10: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 10,0)), (0,1 mg/mL)  
 Composición de ensayo 11: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 11,0)), (0,1 mg/mL)  
 5 Composición de ensayo 12: PK-0051 (tampón de Britton-Robinson 0,04 M (pH 12,0)), (0,1 mg/mL)

2. Método de evaluación

10 Las composiciones de ensayo 1 – 12 se colocaron respectivamente en cuatro viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada uno 1 mL de las mismas y un vial a partir de composiciones respectivas se almacenó en cámaras de ensayo de estabilidad (fabricadas por ESPEC CORP.) a 4 °C, 25 °C/60 % HR, 40 °C/75 % HR y 60 °C. Las composiciones de ensayo fueron muestreadas por 50 µL cada una y se midieron mediante HPLC cada semana durante 4 semanas. Se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento. El método de cálculo del contenido y método de medición se muestran más adelante.

15 El contenido de PK-0051 en la composición de ensayo se determinó utilizando una solución (al 100 %) obtenida al disolver PK-0051 en la misma cantidad que la composición de ensayo en agua para inyección y una solución obtenida al mezclar dicha solución y agua para inyección en relaciones de 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 (90 %, 80 %, 70 % y 60 %, respectivamente) como muestras de curva de calibración, aplicando 10 µL de cada una de las muestras de la curva de calibración a HPLC para medir áreas pico, representando en gráfica los valores medidos de muestras de curva de calibración respectivas con el contenido teórico (%) en el eje horizontal (X) y el área pico en el eje vertical (Y),  
 20 obteniendo una línea de regresión ( $Y = aX+b$ ) (curva de calibración) mediante el método de mínimos cuadrados y aplicando el área pico de la composición de ensayo medida mediante HPLC bajo las mismas condiciones a la curva de calibración para dar un contenido teórico (%).

Método de medición

25 Las muestras de curva de calibración (60 % - 100 %) y composiciones de ensayo se midieron bajo las siguientes condiciones de medición.

Detector: espectrofotómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 254 nm)

Columna: X-Bridge OST C18 (2,5 µm, 4,6 x 50 mm)

Temperatura de la columna: 40 °C

Fase móvil A: TEAA 50 mM (pH 7,0), 0,5 % acetonitrilo

30 Fase móvil B: 100 % acetonitrilo

Alimentación de la fase móvil: La relación de mezcla de la fase móvil A y la fase móvil B se cambió como sigue para controlar el gradiente de concentración (Tabla 3).

Tabla 3

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (% vol)	Fase móvil B (% vol)
0→12	100→60	0→40
Caudal: 1,0 mL/min		

35 3. Resultados

Los resultados se muestran en las Fig. 1 – Fig. 3. Una clara disminución en el contenido no se observó dentro del intervalo de pH de 5 – 7 bajo las condiciones más severas de almacenamiento a 60 °C durante 4 semanas.

40 En general, el ácido nucleico es fácilmente influenciado por la temperatura y se dice que es imposible el almacenamiento del mismo a temperatura ambiente o por arriba durante un largo tiempo. Los resultados han mostrado que el ácido nucleico de cadena sencilla puede ser almacenado durante un largo periodo incluso a temperatura ambiente o por arriba al controlar el pH de la solución.

**Ejemplo 2 (evaluación de la estabilidad a diferente pH utilizando tampón citrato y/o tampón fosfato)**

Se evaluaron diversos tampones de composiciones que contenían PK-0051 de un prototipo para inhalación de ácido nucleico y estabilidad en cada pH.

## 1. Composición de ensayo

5 Se prepararon las composiciones de ensayo 13 - 48 como sigue.

Se mezclaron una solución acuosa 0,1 M de citrato de sodio y una solución acuosa 0,1 M de ácido cítrico para preparar tampón citrato 0,1 M teniendo cada una los pH ajustados a pH 4,0 – 7,5. Se mezclaron 2,35 mg/mL de PK-0051 (2,13 mL), preparados con agua para inyección, agua para inyección (0,37 mL) y tampón citrato 0,1 M (2,5 mL) a cada pH para preparar 5 mL de cada una de las composiciones de ensayo 13 – 48 de 1 mg/mL.

10 Se prepararon las composiciones de ensayo 49 – 68 como sigue.

Se mezclaron una solución acuosa 0,1 M de citrato de sodio y una solución acuosa 0,1 M de ácido cítrico para preparar tampón citrato 0,1 M teniendo cada una los pH ajustados a pH 4,0 – 7,8. Se mezclaron 5,8 mg/mL de PK-0051 (0,086 mL), preparados con agua para inyección, y tampón citrato 0,1 M (4,914 mL) a cada pH para preparar 5 mL de cada una de las composiciones de ensayo 49 – 68 de 0,1 mg/mL.

15 Se prepararon las composiciones de ensayo 69 – 108 como sigue.

Se mezclaron una solución acuosa 0,1 M de dihidrógeno-fosfato de sodio y solución de hidrógeno-fosfato disódico 0,1 M para preparar tampón fosfato 0,1 M teniendo cada una los pH ajustados a pH 4,0 – 7,9. Se mezclaron 1,2 mg/mL de PK-0051 (0,495 mL), preparados con agua para inyección, agua para inyección (2,505 mL) y tampón fosfato 0,1 M (3,000 mL) a cada pH para preparar 6 mL de cada una de las composiciones de ensayo 69 – 108 de 0,1 mg/mL.

20 Se prepararon composiciones de ensayo 109 – 168 como sigue.

Se mezclaron una solución acuosa 0,1 M de citrato de sodio y una solución acuosa 0,1 M de ácido cítrico para preparar tampón citrato 0,1 M teniendo cada una los pH ajustados a pH 4,0 – 7,8. De manera similar, se mezclaron solución acuosa 0,1 M de dihidrógeno-fosfato de sodio y solución de hidrógeno-fosfato disódico 0,1 M para preparar tampón citrato 0,1 M, teniendo cada una los pH ajustados a pH 4,0 – 7,8. Se mezclaron tampón citrato 0,1 M:tampón fosfato 0,1 M, teniendo cada uno el mismo pH, a una relación de 8:2 (4 mL:1 mL), 5:5 (3 mL:3 mL) y 2:8 (1 mL:4 mL) para preparar tampón citrato-fosfato 0,1 M (8:2), tampón citrato-fosfato 0,1 M (5:5) y tampón citrato-fosfato 0,1 M (2:8), teniendo cada uno pH 4,0 – 7,8.

25 5.8 mg/mL de PK-0051 (0,1 mL) preparados con agua para inyección, agua para inyección (2,9 mL) y tampón citrato-fosfato 0,1 M (8:2) (3,0 mL) en cada pH se mezclaron para preparar 6 mL de cada una de las composiciones de ensayo 109 – 128 de 0,1 mg/mL. Las composiciones de ensayo 129 - 148 se prepararon mediante un método similar al de las composiciones de ensayo 109 – 128, excepto que se utilizó tampón citrato-fosfato 0,1 M (5:5) (3,0 mL) en lugar de tampón citrato-fosfato 0,1 M (8:2) (3,0 mL) en cada pH. Las composiciones de ensayo 149 – 168 se prepararon mediante un método similar al de las composiciones de ensayo 109 – 128, excepto que se utilizó tampón citrato-fosfato 0,1 M (2:8) (3,0 mL) en lugar de tampón citrato-fosfato 0,1 M (8:2) (3,0 mL) en cada pH.

35 1-1. Tampón citrato 0,05 M (pH 4,0 – 7,5)

Composición de ensayo 13: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,0)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 14: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,1)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 15: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,2)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 16: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,3)), (1 mg/mL)

40 Composición de ensayo 17: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,4)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 18: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,5)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 19: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,6)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 20: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,7)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 21: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,8)), (1 mg/mL)

45 Composición de ensayo 22: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 4,9)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 23: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,0)), (1 mg/mL)

## ES 2 988 534 T3

- Composición de ensayo 24: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,1)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 25: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,2)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 26: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,3)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 27: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,4)), (1 mg/mL)
- 5 Composición de ensayo 28: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 29: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,6)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 30: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,7)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 31: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,8)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 32: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,9)), (1 mg/mL)
- 10 Composición de ensayo 33: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 34: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,1)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 35: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,2)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 36: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,3)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 37: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,4)), (1 mg/mL)
- 15 Composición de ensayo 38: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 39: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,6)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 40: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,7)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 41: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,8)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 42: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,9)), (1 mg/mL)
- 20 Composición de ensayo 43: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 7,0)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 44: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 7,1)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 45: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 7,2)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 46: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 7,3)), (1 mg/mL)
- Composición de ensayo 47: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 7,4)), (1 mg/mL)
- 25 Composición de ensayo 48: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 7,5)), (1 mg/mL)
- 1-2. Tampón citrato 0,1 M (pH 4,0 – 7,8)
- Composición de ensayo 49: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 4,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 50: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 4,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 51: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 4,4)), (0,1 mg/mL)
- 30 Composición de ensayo 52: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 4,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 53: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 4,8)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 54: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 5,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 55: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 5,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 56: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 5,4)), (0,1 mg/mL)
- 35 Composición de ensayo 57: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 5,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 58: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 5,8)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 59: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 6,0)), (0,1 mg/mL)

## ES 2 988 534 T3

- Composición de ensayo 60: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 6,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 61: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 6,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 62: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 6,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 63: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 6,8)), (0,1 mg/mL)
- 5 Composición de ensayo 64: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 7,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 65: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 7,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 66: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 7,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 67: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 7,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 68: PK-0051 (tampón citrato 0,1 M (pH 7,8)), (0,1 mg/mL)
- 10 1-3. Tampón fosfato 0,05 M (pH 4,0 – 7,9)
- Composición de ensayo 69: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 70: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,1)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 71: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 72: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,3)), (0,1 mg/mL)
- 15 Composición de ensayo 73: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 74: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,5)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 75: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 76: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,7)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 77: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,8)), (0,1 mg/mL)
- 20 Composición de ensayo 78: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 4,9)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 79: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 80: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,1)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 81: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 82: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,3)), (0,1 mg/mL)
- 25 Composición de ensayo 83: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 84: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,5)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 85: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 86: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,7)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 87: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,8)), (0,1 mg/mL)
- 30 Composición de ensayo 88: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 5,9)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 89: PK-0051 (tampón de fosfato 0,05 M (pH 6,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 90: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,1)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 91: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 92: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,3)), (0,1 mg/mL)
- 35 Composición de ensayo 93: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 94: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,5)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 95: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,6)), (0,1 mg/mL)

## ES 2 988 534 T3

- Composición de ensayo 96: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,7)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 97: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,8)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 98: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 6,9)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 99: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,0)), (0,1 mg/mL)
- 5 Composición de ensayo 100: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,1)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 101: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 102: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,3)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 103: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 104: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,5)), (0,1 mg/mL)
- 10 Composición de ensayo 105: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 106: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,7)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 107: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,8)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 108: PK-0051 (tampón fosfato 0,05 M (pH 7,9)), (0,1 mg/mL)
- 1-4. Tampón citrato 0,05 M: tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,0 – 7,8)
- 15 Composición de ensayo 109: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 110: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 111: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 112: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 113: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 4,8)), (0,1 mg/mL)
- 20 Composición de ensayo 114: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 5,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 115: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 5,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 116: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 5,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 117: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 5,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 118: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 5,8)), (0,1 mg/mL)
- 25 Composición de ensayo 119: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 6,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 120: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 6,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 121: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 6,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 122: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 6,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 123: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 6,8)), (0,1 mg/mL)
- 30 Composición de ensayo 124: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 7,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 125: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 7,2)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 126: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 7,4)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 127: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 7,6)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 128: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (8:2) (pH 7,8)), (0,1 mg/mL)
- 35 1-5. Tampón citrato 0,05 M: tampón fosfato 0,05 M (5:5) (pH 4,0 – 7,8)
- Composición de ensayo 129: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (5:5) (pH 4,0)), (0,1 mg/mL)
- Composición de ensayo 130: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (5:5) (pH 4,2)), (0,1 mg/mL)





Composición de ensayo 167: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (2:8) (pH 7,6)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 168: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M:tampón fosfato 0,05 M (2:8) (pH 7,8)), (0,1 mg/mL)

## 2. Método de evaluación

5 Las composiciones de ensayo 13 – 168 se colocaron respectivamente en cinco viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada uno 1 mL de las mismas y se almacenaron en una cámara de ensayo de estabilidad (fabricada por ESPEC CORP.) a 60 °C. Las composiciones de ensayo se midieron mediante HPLC en la semana 4. Se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento. El método de medición y el método de cálculo fueron similares a los del Ejemplo 1.

## 3. Resultados

Los resultados se muestran en las Fig. 4 – Fig. 9. Independientemente del tampón utilizado, el contenido no fue menor que 80 % a alrededor de pH 4,6 – alrededor de pH 7,4 después de 4 semanas de almacenamiento a 60 °C.

### **Ejemplo 3 (evaluación de la estabilidad en tampón citrato y concentración del mismo)**

15 Se evaluó la estabilidad térmica de la composición que contiene PK-0051 de un prototipo para inhalación de ácido nucleico.

#### 1. Composición de ensayo

Se preparó la composición de ensayo 169 como sigue.

20 Una solución acuosa 0,1 M de citrato de sodio y una solución acuosa 0,1 M de ácido cítrico se mezclaron para preparar tampón citrato 0,1 M a pH 6,8. 20 mg/mL de PK-0051 (0,1 mL) preparados con agua para inyección, agua para inyección (9,9 mL) y tampón citrato 0,1 M (10 mL) a pH 6,8 se mezclaron para preparar 20 mL de composición de ensayo 169 de 0,1 mg/mL.

Se preparó la composición de ensayo 170 como sigue.

25 Una solución acuosa 0,1 M de citrato de sodio y una solución acuosa 0,1 M de ácido cítrico se mezclaron para preparar tampón citrato 0,1 M a pH 6,8. Esto se diluyó 10 veces para dar tampón de citrato 0,01 M a pH 6,8. 14,2 mg/mL de PK-0051 (0,0704 mL) preparado con agua para inyección, agua para inyección (4,9296 mL) y tampón citrato 0,01 M (5 mL) a pH 6,8 se mezclaron para preparar 10 mL de composición de ensayo 170 de 0,1 mg/mL.

Composición de ensayo 169: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,8)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 170: PK-0051 (tampón citrato 0,005 M (pH 6,8)), (0,1 mg/mL)

## 30 2. Método de evaluación

Las composiciones de ensayo 169 y 170 se colocaron respectivamente en nueve viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada uno 1 mL de las mismas y cuatro viales de composiciones respectivas se almacenaron en cámaras de ensayo de estabilidad a 40 °C/75 % HR y 60 °C y un vial de composiciones respectivas se almacenó a 4 °C. Las composiciones de ensayo se midieron mediante HPLC cada semana durante 4 semanas. El contenido de PK-0051 se calculó y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento. El método de medición y el método de cálculo del contenido fueron similares a los del Ejemplo 1.

## 3. Resultados

40 Los resultados se muestran en la Fig. 10 y la Fig. 11. Los resultados revelan que un claro cambio de contenido estuvo ausente a concentraciones de tampón citrato de 0,005 M y 0,05 M incluso a 60 °C, 4 semanas. De ahí se sugiere que el efecto de la estabilidad de ácido nucleico puede mantenerse al controlar la concentración del tampón citrato incluso cuando aumente la concentración del ácido nucleico de cadena sencilla.

### **Ejemplo 4 (evaluación de la estabilidad de la composición que contiene PK-0051 (pH 6,5))**

Se prepararon composiciones que contenían 10 mg/mL y 1 mg/mL de PK-0051 (pH 6,5) y se evaluó la estabilidad.

#### 45 1. Composición de ensayo

Se preparó una composición (pH 6,5) que contenía 10 mg/mL de PK-0051 como sigue.

Se disolvió ácido cítrico hidrato (21,0 g) en agua para inyección (1 L) para dar solución de ácido cítrico 0,1 M. De

manera similar, se disolvió citrato trisódico dihidrato (29,4 g) en agua para inyección (1 L) para dar solución de citrato de sodio 0,1 M. La solución de ácido cítrico 0,1 M se añadió a la solución de citrato de sodio 0,1 M para ajustar el pH a 6,5 para dar tampón citrato 0,1 M (pH 6,5). PK-0051 (10 g) sintetizado en el Ejemplo de Producción 1 se disolvió en agua para inyección (500 mL). A ello se añadió tampón citrato 0,1 M (pH 6,5) (500 mL) y la mezcla se agitó. La composición se hizo pasar a través de un filtro de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm para dar una composición que contiene 10 mg/mL de PK-0051 (pH 6,5).

La composición que contiene 1 mg/mL de PK-0051 (pH 6,5) se preparó mediante un método similar al método antes mencionado, excepto que se cambió PK-0051 a 1,0 g.

Utilizando composiciones que contenían 10 mg/mL y 1 mg/mL de PK-0051 (pH 6,5) como composiciones de ensayo 171 y 172, se evaluó la estabilidad.

Composición de ensayo 171: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 172: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)), (10 mg/mL)

## 2. Método de evaluación

Las composiciones de ensayo 171 y 172 se colocaron respectivamente en nueve viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada una 1 mL de las mismas y cuatro viales de composiciones respectivas se almacenaron en cámaras de ensayo de la estabilidad a 25 °C/60 % HR, 40 °C/75 % HR y 60 °C y un vial de composiciones respectivas se almacenó a 4 °C. Las composiciones de ensayo se midieron mediante HPLC cada semana durante 4 semanas. Se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento. El método de medición fue el mismo que en el Ejemplo 1.

El contenido de PK-0051 en la composición de ensayo se determinó al utilizar una solución (100 %) obtenida al disolver PK-0051 en agua para inyección para preparar a 1 mg/mL y una solución obtenida al mezclar dicha solución y agua para inyección a relaciones de 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 (90 %, 80 %, 70 % y 60 %, respectivamente) como muestras de curva de calibración, aplicando 10 µL de cada una de las muestras de la curva de calibración a HPLC para medir las áreas pico, representando en gráfica los valores medidos de muestras de curva de calibración respectiva con el contenido teórico (%) en el eje horizontal (X) y el área pico en el eje vertical (Y), obteniendo una línea de regresión ( $Y = aX + b$ ) (curva de calibración) mediante el método de mínimos cuadrados y aplicar el área pico de la composición de ensayo medida mediante HPLC bajo las mismas condiciones a la curva de calibración para dar un contenido teórico (%). El contenido de PK-0051 en la composición de ensayo 172 se determinó mediante un método similar al método antes mencionado, excepto que se utilizó 1 µL para HPLC.

## 3. Resultados

Los resultados se muestran en la Fig. 12 y la Fig. 13. Los resultados revelan que un claro cambio de contenido estuvo ausente incluso a 60 °C, durante 4 semanas. De ahí se demuestra que composiciones que contienen 1 mg/mL y 10 mg/mL de PK-0051 (pH 6,5) tienen una alta estabilidad.

### 35 **Ejemplo 5 (evaluación de la estabilidad de la composición que contiene PK-0051 (pH 6,0))**

Se preparó una composición que contiene 1 mg/mL de PK-0051 (pH 6,0) y se evaluó la estabilidad.

#### 1. Composición de ensayo

Se disolvió ácido cítrico hidrato (21,014 g) en agua para inyección (1 L) para dar solución de ácido cítrico 0,1 M. De manera similar, citrato trisódico dihidrato (29,41 g) se disolvió en agua para inyección (1 L) para dar solución de citrato de sodio 0,1 M. La solución de ácido cítrico 0,1 M se añadió a la solución de citrato de sodio 0,1 M para ajustar el pH a 6,0 para dar tampón citrato 0,1 M (pH 6,0). PK-0051 (347 mg) sintetizada en el Ejemplo de Producción 1 se disolvió en agua para inyección (5 mL). A esta solución (0,144 mL) se añadieron agua para inyección (4,856 mL) y tampón citrato 0,1 M (pH 6,0) (5 mL) y la mezcla se agitó. Se hizo pasar a través de un filtro de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm para dar una composición que contiene 1 mg/mL de PK-0051 (pH 6,0).

Utilizando 1 mg/mL de la composición que contiene PK-0051 (pH 6,0) como composición de ensayo 173, se evaluó la estabilidad.

Composición de ensayo 173: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (1 mg/mL)

#### 2. Método de evaluación

La composición de ensayo 173 se colocó en cinco viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada uno 1 mL de la misma y un vial se almacenó a 4 °C y cuatro viales se almacenaron en una cámara de ensayo de la estabilidad a 60 °C. La composición de ensayo se midió mediante HPLC cada semana durante 4 semanas. Se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido

en el momento de inicio del almacenamiento. El método de medición y el método de cálculo del contenido fueron similares a los del Ejemplo 1.

### 3. Resultados

5 Los resultados se muestran en la Fig. 14. Los resultados revelan que un claro cambio de contenido estuvo ausente incluso a 60 °C durante 4 semanas. De ahí se demuestra que la composición que contiene 1 mg/mL de PK-0051 (pH 6,0) tiene una alta estabilidad.

#### **Ejemplo 6 (efecto inhibitorio de la fibrosis pulmonar en ratón modelo de fibrosis pulmonar espontánea)**

10 Utilizando ratón modelo de fibrosis pulmonar espontánea (ratón transgénico de TGF- $\beta$ 1 humano descrito en Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2012, 46(3), 397-406 y PLoS One, 2012, 7(8):e42655, al que se alude de aquí en adelante como ratón TG), se confirmó un efecto inhibitorio de la fibrosis pulmonar de la composición de la presente invención. El efecto antes mencionado se confirmó utilizando una cantidad de hidroxil prolina en el tejido de pulmón como un índice y de acuerdo con el método descrito en PLoS One, 2012 (mencionado antes).

##### 1. Composición de ensayo

15 La composición que contiene 10 mg/mL de PK-0051 (pH 6,5) preparada en el Ejemplo 4 se diluyó con tampón citrato 0,05 M (pH 6,5) y se utilizó como una composición de ensayo. La dilución se realizó en base al peso corporal de ratón TG el día de la administración de la composición de ensayo.

##### 2. Agrupamiento y administración de composición de ensayo

20 Utilizando un aparato Micro CT (R\_mCT2, fabricado por Rigaku Corporation), se evaluó la fibrosis en el pulmón de ratón TG y los ratones fueron agrupados de manera que el nivel de fibrosis pulmonar y el peso corporal en el momento del agrupamiento fueran equivalentes entre grupos respectivos.

Los grupos de administración respectivos se muestran en lo que sigue. En cada uno de los grupos de administración se utilizaron 11 ratones macho. Bajo anestesia de isoflurano, la composición de ensayo se administró 4 veces en total en la tráquea de los ratones TG al utilizar Micro Sprayer (MSA-250-M: fabricado por PENNCENTURY).

##### • Grupo 1 de administración

25 Un tampón citrato 0,05 M (pH 6,5) se administró a ratón TG una vez/semana.

##### • Grupo 2 de administración

La composición de ensayo se administró a ratón TG a razón de 5 mg/kg de peso corporal una vez/dos semanas.

##### • Grupo 3 de administración

La composición de ensayo se administró a ratón TG a razón de 5 mg/kg de peso corporal una vez/semana.

### 30 3. Muestreo de tejido pulmonar

Se administró de manera intraperitoneal pentobarbital a ratones TG (1,22 mg/150  $\mu$ L/ratón – 1,62 mg/200  $\mu$ L/ratón) para anestesia, se recogieron muestras de sangre y se aislaron los pulmones bilaterales y se congelaron para muestras de homogeneizado.

##### 4. Cuantificación de hTGF- $\beta$ 1 en tejido pulmonar

35 Los pulmones bilaterales se homogeneizaron mediante el aparato Beads Cell Disrupter (MS-100, fabricado por TOMY SEIKO CO., LTD.) y una parte del sobrenadante se recuperó mediante centrifugación. El nivel de hTGF- $\beta$ 1 en el sobrenadante se determinó utilizando el conjunto Human TGF- $\beta$ 1ELISA (fabricado por BD).

##### 5. Cuantificación de hidroxil prolina en tejido pulmonar

40 Los pulmones bilaterales después de la homogenización se secaron mediante incubación a 110 °C durante la noche y se pulverizaron nuevamente utilizando el aparato Beads Cell Disrupter. A los pulmones bilaterales pulverizados se añadió HCl 6 N (1 mL) y la mezcla se incubó en una cámara de corriente de aire a 110 °C durante la noche. Posteriormente, la mezcla se incubó en una cámara de corriente de aire a 110 °C durante la noche. A ello se añadieron 2 mL de PBS y la mezcla se incubó a 60 °C durante 1 h y se hizo pasar a través de un filtro para dar una muestra para medir la cantidad de hidroxil prolina. La cantidad de hidroxil prolina se determinó mediante el método de PLoS One. 45 2012; 7(8):e42655.

### 6. Resultados

Los resultados se muestran en la Fig. 15 y la Fig. 16. La Fig. 15 es una gráfica que muestra la concentración de TGF-

$\beta 1$  en cada uno de los grupos de administración, en donde el eje vertical muestra el nivel de TGF- $\beta 1$  de tejido pulmonar. La Fig. 16 es una gráfica que muestra la cantidad de hidroxil prolina en cada uno de los grupos de administración, en donde el eje vertical muestra la cantidad de hidroxil prolina en tejido pulmonar. En el grupo 3 de administración de solución (0,1 mg/kg) de molécula de ácido nucleico/ratón TG, el nivel de TGF- $\beta 1$  y la cantidad de hidroxil prolina en el tejido pulmonar se inhibieron significativamente en comparación con el grupo 1 de administración de tampón citrato 0,05 M/ratón TG (pH 6,5).

A partir de ello se demuestra que PK-0051, la cual es una molécula de ácido nucleico en la presente invención, inhibe la expresión de TGF- $\beta 1$  diana también in vivo e inhibe la fibrosis pulmonar.

**Ejemplo 7 (evaluación de la estabilidad de composiciones que contienen 10, 20, 40 y 80 mg/mL de PK-0051 (pH 6,0))**

Se prepararon composiciones que contenían 10, 20, 40 y 80 mg/mL de PK-0051 (pH 6,0) y se evaluó la estabilidad.

1. Composición de ensayo

La composición de ensayo 174 se preparó como sigue. Se disolvió ácido cítrico hidrato (105,07 g) en agua para inyección (1 L) para dar solución de ácido cítrico 0,5 M. De manera similar, se disolvió citrato trisódico dihidrato (147,05 g) en agua para inyección (1 L) para dar solución de citrato de sodio 0,5 M. La solución de ácido cítrico 0,5 M se añadió a la solución de citrato de sodio 0,5 M para ajustar el pH a 6,0 para dar tampón citrato 0,5 M (pH 6,0). Se disolvió PK-0051 (840 mg) en agua para inyección (8 mL) y se utilizó como una solución madre. Se añadieron 4,02 mL de agua para inyección y 0,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) a 0,48 mL de la solución madre y la mezcla se agitó y se hizo pasar a través de un filtro de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22  $\mu$ m.

La composición de ensayo 175 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 174, excepto que se añadieron 3,55 mL de agua para inyección y 0,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) y se mezclaron con 0,95 mL de la solución madre.

La composición de ensayo 176 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 174, excepto que se añadieron 2,6 mL de agua para inyección y 0,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) y se mezclaron con 1,9 mL de la solución madre.

La composición de ensayo 177 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 174, excepto que se añadieron 0,69 mL de agua para inyección y 0,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) y se mezclaron con 3,81 mL de la solución madre.

Composición de ensayo 174: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (10 mg/mL)

Composición de ensayo 175: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (20 mg/mL)

Composición de ensayo 176: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (40 mg/mL)

Composición de ensayo 177: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (80 mg/mL)

2. Método de evaluación

Las composiciones de ensayo 174 - 177 se colocaron respectivamente en cuatro viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada uno 1 mL de las mismas y se almacenaron en una cámara de ensayo de la estabilidad a 60 °C. Las composiciones de ensayo se sacaron cada semana y se diluyeron 10 veces. Se midieron mediante HPLC 10  $\mu$ L de composición de ensayo 174, 5  $\mu$ L de composición de ensayo 175, 3  $\mu$ L de composición de ensayo 176 y 2  $\mu$ L de composición de ensayo 177. La medición se realizó hasta la semana 4. Se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción (%) de contenido con relación al contenido del momento de inicio del almacenamiento. El método de cálculo del contenido y el método de medición se muestran más adelante.

Usando una solución (100 %) obtenida al disolver 10 veces la composición de ensayo 174 almacenada por separado a 4 °C y las soluciones obtenidas al mezclar dicha solución y agua para inyección en las relaciones de 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 (90 %, 80 %, 70 % y 60 %, respectivamente) como muestras de curva de calibración, 10  $\mu$ L de cada una de las muestras de la curva de calibración se aplicaron a HPLC para medir las áreas pico. La línea de regresión ( $Y = aX + b$ ) (curva de calibración) se obtuvo mediante el método de mínimos cuadrados al representar en una gráfica los valores medidos de muestras de curva de calibración respectivas, con el contenido teórico (%) en el eje horizontal (X) y el área pico en el eje vertical (Y). El área pico de la composición de ensayo 174 medida mediante HPLC bajo las mismas condiciones se aplicó a la curva de calibración para determinar un contenido teórico (%). El contenido de composición de ensayo 175 se determinó mediante un método similar al método antes mencionado, excepto que cada una de las muestras de la curva de calibración (5  $\mu$ L) producidas utilizando la composición de ensayo 175 se utilizó para HPLC. El contenido de la composición de ensayo 176 se determinó mediante un método similar al método antes mencionado, excepto que cada una de las muestras de la curva de calibración (3  $\mu$ L) producida utilizando la composición de ensayo 176 se utilizó para HPLC. El contenido de la composición de ensayo 177 se determinó mediante un método similar al método antes mencionado, excepto que cada una de las muestras de la curva de calibración (2  $\mu$ L) producida

utilizando la composición de ensayo 177 se utilizó para HPLC.

Método de medición

Las muestras de la curva de calibración (60 % - 100 %) y composiciones de ensayo respectivas se midieron bajo las siguientes condiciones de medición.

- 5 HPLC de intercambio iónico
  - Dispositivo de medición: sistema LC-20A SHIMAZU HPLC (AEX-HPLC), fabricado por Shimadzu Corporation
  - Detector: espectrofotómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 260 nm)
  - Columna: DNAPac PA-100 (4×250 mm)
  - Temperatura de la columna: 80 °C
- 10 Fase móvil A: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), urea 8 M, 10 % acetonitrilo
  - Fase móvil B: fase móvil A, perclorato de sodio monohidrato 700 mM
  - Alimentación de la fase móvil: La relación de mezcla de la fase móvil A y la fase móvil B se cambió como sigue para controlar el gradiente de concentración (Tabla 4).

[Tabla 4]

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (% vol)	Fase móvil B (% vol)
0→20	90→60	10→40
Caudal: 1,0 mL/min		

15

3. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 5 y la Fig. 17. Después de almacenamiento a 60 °C durante 4 semanas, el contenido de PK-0051 fue de aproximadamente 97 % cuando la concentración de PK-0051 fue 10 mg/mL, de aproximadamente 95 % cuando la concentración fue 20 mg/mL, de aproximadamente 91 % cuando la concentración fue 40 mg/mL y de aproximadamente 85 % cuando la concentración fue 80 mg/mL. De ahí se demostró que la disminución en el contenido comparado con el del al inicio del almacenamiento aumenta a medida que aumenta la concentración. Por el contrario, cuando la concentración de PK-0051 fue 10 mg/mL o 20 mg/mL, la disminución en el contenido comparado con el del momento de inicio del almacenamiento es menor que 10 %. Además, aun cuando la concentración de PK-0051 fue 80 mg/mL, que fue el contenido más bajo, la disminución en el contenido fue de aproximadamente 15 %. Por lo tanto, se demostró que PK-0051 tiene una alta estabilidad aún bajo condiciones de almacenamiento severas de 60 °C, 4 semanas.

20

25

[Tabla 5]

Periodo de almacenamiento (semanas)	Contenido (%) de PK-0051			
	10 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL	80 mg/mL
0	100,20	100,05	99,67	98,50
1	98,42	99,39	99,34	101,43
2	99,41	99,20	98,38	94,01
3	97,63	97,79	95,81	91,48
4	96,63	94,95	91,35	84,94

30

**Ejemplo 8 (evaluación de la estabilidad (fotoestabilidad) de composición que contiene 1 mg/mL de PK-0051 (pH 5,5, 6,0 y 6,5))**

Utilizando viales de vidrio transparentes y viales de vidrio pardos llenados cada uno con composición que contiene PK-0051 y los empaquetados adicionalmente en cajas de papel, se evaluó la estabilidad de PK-0051 frente a la luz.

## 1. Composición de ensayo

Se preparó la composición de ensayo 178 como sigue. Se disolvió ácido cítrico hidrato (21,014 g) en agua para inyección (1 L) para dar una solución de ácido cítrico 0,1 M. De manera similar, se disolvió citrato trisódico dihidrato (29,41 g) en agua para inyección (1 L) para dar una solución de citrato de sodio 0,1 M. La solución de ácido cítrico 0,1 M se añadió a la solución de citrato de sodio 0,1 M para ajustar el pH a 5,5 para dar tampón citrato 0,1 M (pH 5,5). PK-0051 (210 mg) se disolvió en agua para inyección (10 mL) y se utilizó como una solución madre. 9,5 mL de agua para inyección y 10,5 mL de tampón citrato 0,1 M (pH 5,5) se añadieron a 1 mL de la solución madre y la mezcla se agitó y se hizo pasar a través de un filtro de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm.

La composición 179 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de composición de ensayo 178, excepto que la solución de ácido cítrico 0,1 M se añadió a la solución de citrato de sodio 0,1 M para ajustar el pH a 6,0 para dar tampón citrato 0,1 M (pH 6,0) y se añadieron 9,5 mL de agua para inyección y 10,5 mL de tampón citrato 0,1 M (pH 6,0) y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

La composición de ensayo 180 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 178, excepto que se añadió solución de ácido cítrico 0,1 M a la solución de citrato de sodio 0,1 M para ajustar el pH a 6,5 para dar tampón citrato 0,1 M (pH 6,5) y se añadieron 9,5 mL de agua para inyección y 10,5 mL de tampón citrato 0,1 M (pH 6,5) y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

Composición de ensayo 178: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 179: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (1 mg/mL)

Composición de ensayo 180: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)), (1 mg/mL)

## 2. Método de evaluación

Las composiciones de ensayo 178 – 180 se colocaron respectivamente en diez viales de vidrio transparente de 5 mL y diez viales de vidrio pardos de 5 mL (frascos transparentes y frascos sombreados). Además, los frascos transparentes y los frascos sombreados llenados de manera similar con composiciones de ensayo 178 – 180 fueron empacados en una caja de papel (paquete secundario de frasco transparente y paquete secundario de frasco sombreado). Estos se almacenaron en una cámara de ensayo de la estabilidad a 25 °C/60 % HR bajo una lámpara fluorescente de luz de día (iluminancia 1580 Lux), la cual utiliza una lámpara D65 como una fuente de luz, hasta que la exposición de luz total alcanzó 1,2 millones Lux•h (periodo de almacenamiento de 32 días, exposición de luz total de 1.213.743 Lux•h). Cuando la exposición de luz total alcanzó 0,3 millones de Lux•h, 0,6 millones de Lux•h, 0,9 millones de Lux•h y 1,2 millones de Lux•h, se sacaron las composiciones de ensayo y 10 µL de las mismas se midieron mediante HPLC de fase inversa y HPLC de intercambio iónico. Se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento. El método de cálculo del contenido y el método de medición se muestran más adelante.

La composición de ensayo 178 (100 %) preparada de manera similar a la anterior (frascos transparentes, frascos sombreados, paquete secundario de frasco transparente y paquete secundario de frasco sombreado) y almacenada en un lugar oscuro a 4 °C y agua para inyección, se mezclaron a relaciones de 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 y las soluciones (90 %, 80 %, 70 % y 60 %) se utilizaron como muestras de curva de calibración. Cada una de las muestras de curva de calibración (10 µL) se aplicó a HPLC de fase inversa y HPLC de intercambio iónico y se midió el área pico. La línea de regresión ( $Y = aX + b$ ) (curva de calibración) se obtuvo mediante el método de mínimos cuadrados al representar en una gráfica los valores medidos de cada una de las muestras de curva de calibración con el contenido teórico (%) en el eje horizontal (X) y el área pico en el eje vertical (Y). El área pico de la composición de ensayo 178 medida mediante HPLC de fase inversa y HPLC de intercambio iónico bajo las mismas condiciones, se aplicó a la curva de calibración para determinar el contenido teórico (%). Los contenidos de composiciones de ensayo 179 y 180 fueron determinados mediante un método similar al método mencionado antes.

## Método de medición

Muestras de curva de calibración (60 % - 100 %) y cada una de las composiciones de ensayo se midieron bajo las siguientes condiciones de medición. La medición por HPLC de intercambio iónico se realizó mediante un método de medición similar al del Ejemplo 7.

HPLC de fase inversa

Dispositivo de medición: sistema LC-10A SHIMAZU HPLC (RP-HPLC), fabricado por Shimadzu Corporation

Detector: espectrofotómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 260 nm)

Columna: X-Bridge OST C18 (2,5 µm, 4,6 × 50 mm)

Temperatura de la columna: 40 °C

Fase móvil A: TEAA 50 mM (pH 7,0), 0,5 % acetonitrilo

Fase móvil B: 100 % acetonitrilo

Alimentación de fase móvil: La relación de mezcla de fase móvil A y fase móvil B se cambió como sigue para controlar el gradiente de concentración (Tabla 6).

5 [Tabla 6]

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (% vol)	Fase móvil B (% vol)
0→12	100→60	0→40
Caudal: 1.0 mL/min		

### 3. Resultados

10 Los resultados se muestran en las Tablas 7 – 9 y las Figs. 18 – 23. Se aclaró que todas las composiciones de ensayo no mostraron cambio definitivo en el contenido mediante la determinación de HPLC de fase inversa o HPLC de intercambio iónico y son estables a la luz. A partir de los resultados, se considera que la composición de la presente invención está libre de una disminución en la calidad de la preparación debido a la luz incluso cuando se expone a la luz en la cantidad de 1,2 millones de Lux•h durante el periodo desde la producción hasta el uso y puede manipularse de la misma manera que los productos no expuestos. Adicionalmente, se considera que un vial de vidrio transparente, el cual es de menor costo, puede utilizarse en lugar de un vial de vidrio pardo.

15 [Tabla 7]

Ensayo de fotoestabilidad de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)

Nombre de la muestra	Lux•h	Contenido (%) de PK-0051	
		HPLC de intercambio iónico	HPLC de fase inversa
Frasco transparente, lugar oscuro a 4 °C	0	101,55	99,13
Frasco transparente tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)	30	101,10	100,95
	60	100,85	99,50
	90	100,28	96,83
	120	99,73	98,70
Paquete secundario de frasco transparente tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)	30	102,32	99,92
	60	102,30	100,77
	90	101,86	99,13
	120	102,76	99,68
Botella sombreada tampón de citrato 0.05 M (pH 5.5)	30	101,99	100,38
	60	101,79	100,26
	90	101,61	100,03
	120	102,23	100,60
Paquete secundario de frasco sombreado tampón citrato 0,05 M (pH 5,5)	30	101,79	100,35
	60	101,87	100,52
	90	102,43	99,70
	120	102,20	99,12

[Tabla 8]

Ensayo de fotoestabilidad de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)

Nombre de la muestra	Lux•h	Contenido (%) de PK-0051	
		HPLC de intercambio iónico	HPLC de fase inversa
Frasco transparente, lugar oscuro a 4 °C	0	102,83	98,35
Frasco transparente tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)	30	102,24	98,83
	60	101,65	97,75
	90	100,57	98,09
	120	102,62	97,93
Paquete secundario de frasco transparente tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)	30	102,41	98,21
	60	102,35	99,07
	90	103,23	98,07
	120	103,00	99,18
Frasco sombreado tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)	30	102,46	98,44
	60	102,17	98,60
	90	102,94	97,98
	120	104,15	99,33
Paquete secundario de frasco sombreado tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)	30	103,70	98,52
	60	102,12	98,68
	90	103,16	98,83
	120	104,11	98,65

[Tabla 9]

5 Ensayo de fotoestabilidad de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)

Nombre de la muestra	Lux•h	Contenido (%) de PK-0051	
		HPLC de intercambio iónico	HPLC de fase inversa
Frasco transparente, lugar oscuro a 4 °C	0	102,41	98,20
Frasco transparente tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)	30	102,57	98,53
	60	102,12	98,77
	90	103,14	97,82
	120	101,23	98,71
Paquete secundario de frasco transparente tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)	30	102,15	98,26
	60	101,71	98,92
	90	102,85	98,00
	120	102,54	98,20
Frasco sombreado tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)	30	101,83	99,63
	60	103,21	98,62
	90	103,97	99,12
	120	102,73	98,74
Paquete secundario de frasco sombreado tampón citrato 0,05 M (pH 6,5)	30	103,23	98,33
	60	103,04	98,36
	90	102,43	98,85
	120	101,85	98,37



**Ejemplo 9 (evaluación de estabilidad de composición que contiene PK-0051 con relación de presión osmótica ajustada mediante agente de isotonicidad)**

5 Utilizando diversos agentes de isotonicidad (NaCl, KCl, glicerol, D-manitol, lactitol, D-sorbitol y sacarosa), la relación de presión osmótica de composición que contiene PK-0051 se ajustó a  $1 \pm 0,1$  y se evaluó la estabilidad.

## 1. Composición de ensayo

10 La composición de ensayo 181 se preparó como sigue. Ácido cítrico hidrato (105,07 g) se disolvió en agua para inyección (1 L) para dar solución de ácido cítrico 0,5 M. De manera similar, citrato trisódico dihidrato (147,05 g) se disolvió en agua para inyección (1 L) para dar solución de citrato de sodio 0,5 M. La solución de ácido cítrico 0,5 M se añadió a la solución de citrato de sodio 0,5 M para ajustar el pH a 6,0 para dar tampón citrato 0,5 M (pH 6,0). 1 g de NaCl se disolvió en 10 mL de agua para inyección para dar una solución al 10 %. PK-0051 (210 mg) se disolvió en agua para inyección (140 mL) y se utilizó como una solución madre. 0,68 mL de solución de NaCl al 10 %, 11,82 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a 1 mL de la solución madre y la mezcla se agitó y se hizo pasar a través de un filtro de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22  $\mu\text{m}$ .

15 La composición de ensayo 182 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que se utilizó KCl en lugar de NaCl y 0,85 mL de solución de KCl al 10 %, 11,65 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

20 La composición de ensayo 183 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que se utilizó glicerol en lugar de NaCl y 1,8 mL de solución de glicerol al 10 %, 10,7 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

25 La composición de ensayo 184 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que se utilizó D-manitol en lugar de NaCl y 3,75 mL de solución de D-manitol al 10 %, 8,75 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

30 La composición de ensayo 185 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que se utilizó lactitol en lugar de NaCl y 7,05 mL de solución de lactitol al 10 %, 5,45 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

La composición de ensayo 186 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que se utilizó D-sorbitol en lugar de NaCl y 3,75 mL de solución de D-sorbitol al 10 %, 8,75 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

35 La composición de ensayo 187 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que se utilizó sacarosa en lugar de NaCl y 7 mL de solución de sacarosa al 10 %, 5,5 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

40 La composición de ensayo 188 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que 12,5 mL de agua para inyección y 1,5 mL de tampón citrato 0,5 M (pH 6,0) se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

La composición de ensayo 189 se preparó mediante un método similar al utilizado para la preparación de la composición de ensayo 181, excepto que 12,65 mL de agua para inyección y 1,35 mL de solución de NaCl al 10% se añadieron a y se mezclaron con 1 mL de la solución madre.

45 Composición de ensayo 181: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/NaCl (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 182: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/KCl (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

50 Composición de ensayo 183: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/glicerol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 184: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/D-manitol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 185: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/lactitol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 186: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/D-sorbitol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

5 Composición de ensayo 187: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/sacarosa (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 188: PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (0,1 mg/mL)

Composición de ensayo 189: PK-0051 (NaCl (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)

## 2. Método de evaluación

10 Las composiciones de ensayo 181 - 189 se colocaron respectivamente en catorce viales de vidrio de 5 mL, conteniendo cada uno 1 mL de las mismas y se almacenaron en cámaras de ensayo de la estabilidad a 25 °C/60 % HR, 40 °C/75 % HR y 60 °C. Una y dos semanas después, cada una de las composiciones de ensayo (30 µL) se midió mediante HPLC de fase inversa y HPLC de intercambio iónico.

15 Las composiciones de ensayo 181 -189 se sometieron a un ensayo de aceleración bajo condiciones (105 °C y 121 °C durante 5 min y 15 min) correspondientes al almacenamiento a 60 °C durante 4 semanas. Las composiciones de ensayo 181 – 189 se sometieron respectivamente a un tratamiento en autoclave bajo cuatro condiciones de 105 °C durante 5 min, 105 °C durante 15 min, 121 °C durante 5 min y 121 °C durante 15 min y 30 µL se midieron mediante HPLC de fase inversa y HPLC de intercambio iónico.

20 Después de la medición mediante HPLC, se calculó el contenido de PK-0051 y la estabilidad se evaluó en base a una disminución en la proporción de contenido (%) con relación al contenido en el momento de inicio del almacenamiento. El método de cálculo del contenido y método de medición se muestran más adelante.

25 Las soluciones (90 %, 80 %, 70 % y 60 %) obtenidas al mezclar la composición de ensayo 188 (100 %) y agua para inyección a 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4, respectivamente, se utilizaron como muestras de curva de calibración, 30 µL de cada una de las muestras de curva de calibración se aplicaron a HPLC para medir las áreas pico, los valores medidos de muestras de curva de calibración respectivas se representaron en una gráfica con el contenido teórico (%) en el eje horizontal (X) y el área pico en el eje vertical (Y), una línea de regresión ( $Y = aX+b$ ) (curva de calibración) se obtuvo mediante el método de mínimos cuadrados y aplicando el área pico de la composición de ensayo medida mediante HPLC bajo las mismas condiciones a la curva de calibración, con lo que se obtuvo el contenido teórico (%).

### Método de medición

30 Las muestras de curva de calibración (60 % - 100 %) y composiciones de ensayo se midieron bajo las siguientes condiciones de medición. La medición mediante HPLC de intercambio iónico se realizó mediante un método de medición similar al del Ejemplo 7. La medición mediante HPLC de fase inversa se realizó mediante un método de medición similar al del Ejemplo 8, excepto que se utilizó TEAA 50 mM (pH 7,3) como fase móvil A y la longitud de onda de medición fue 254 nm.

## 35 3. Resultados

Los resultados se muestran en las Tablas 10 – 18. Las composiciones de ensayo 181 – 188 no mostraron una disminución definida en el contenido de PK-0051 después de almacenamiento a 25 °C, 40 °C o 60 °C durante 2 semanas. Las composiciones de ensayo 181 – 188 mostraron una disminución dentro de aproximadamente el 15 % en el contenido de PK-0051 mediante un tratamiento en autoclave (105 °C y 121 °C durante 5 min y 15 min), exhibiendo así una alta estabilidad. Por otra parte, la composición de ensayo 189 no mostró disminución definida en el contenido de PK-0051 después de almacenamiento a 25 °C, 40 °C o 60 °C durante 2 semanas; sin embargo, se encontró de manera notable una disminución en el contenido de PK-0051 debido a un tratamiento en autoclave (121 °C durante 5 min y 15 min) (aproximadamente 24 % de disminución mediante 121°C durante 5 min, aproximadamente 41 % de disminución mediante 121 °C durante 15 min). También se aclaró que la estabilidad disminuye debido a una influencia de NaCl en ausencia de tampón citrato 0,05 M (pH 6,0). Los resultados anteriores han aclarado que un agente de isotonicidad no disminuye la estabilidad de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0).

[Tabla 10]

Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/NaCl (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
Composición de ensayo 181  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/NaCl (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,70	103,70
		1 semana	102,08	101,15
		2 semanas	102,73	101,45
	40 °C	en momento de inicio	101,70	103,70
		1 semana	102,37	101,19
		2 semanas	101,32	101,02
	60 °C	en momento de inicio	101,70	103,70
		1 semana	102,36	100,99
		2 semanas	101,39	98,83
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,70	103,70
		5 min	99,43	101,67
		15 min	98,06	97,32
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,70	103,70
		5 min	95,16	96,58
		15 min	90,00	86,90

[Tabla 11]

5 Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/KCl (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
Composición de ensayo 182  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/KCl (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,05	102,22
		1 semana	101,41	98,79
		2 semanas	102,24	100,44
	40 °C	en momento de inicio	101,05	102,22
		1 semana	101,70	100,47
		2 semanas	102,07	99,52
	60 °C	en momento de inicio	101,05	102,22
		1 semana	101,46	100,02
		2 semanas	100,94	98,44
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,05	102,22
		5 min	99,65	99,94
		15 min	97,27	96,70
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,05	102,22
		5 min	95,44	95,16
		15 min	88,63	85,79

[Tabla 12]

Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/glicerol (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 183  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/glicerol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,27	102,24
		1 semana	101,73	101,23
		2 semanas	102,55	97,82
	40 °C	en momento de inicio	101,27	102,24
		1 semana	101,52	101,35
		2 semanas	102,98	102,18
	60 °C	en momento de inicio	101,27	102,24
		1 semana	102,09	99,25
		2 semanas	100,87	99,72
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,27	102,24
		5 min	100,22	100,87
		15 min	98,78	97,78
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,27	102,24
		5 min	95,17	95,77
		15 min	91,04	86,41

[Tabla 13]

5 Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón de citrato 0.05 M (pH 6.0)/D-manitol (proporción de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 184  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/D-manitol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,86	102,32
		1 semana	102,42	101,18
		2 semanas	102,59	98,52
	40 °C	en momento de inicio	101,86	102,32
		1 semana	102,40	101,57
		2 semanas	102,85	100,76
	60 °C	en momento de inicio	101,86	102,32
		1 semana	102,00	101,13
		2 semanas	101,20	100,12
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,86	102,32
		5 min	100,35	100,79
		15 min	98,86	97,25
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,86	102,32
		5 min	95,58	95,85
		15 min	90,14	86,95

[Tabla 14]

Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/lactitol (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 185  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/lactitol (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	102,18	102,70
		1 semana	102,37	101,06
		2 semanas	101,12	102,50
	40 °C	en momento de inicio	102,18	102,70
		1 semana	103,15	101,60
		2 semanas	101,84	101,04
	60 °C	en momento de inicio	102,18	102,70
		1 semana	102,63	101,45
		2 semanas	101,62	100,04
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	102,18	102,70
		5 min	100,15	100,79
		15 min	99,01	98,17
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	102,18	102,70
		5 min	95,54	96,00
		15 min	90,80	87,74

5 [Tabla 15]

Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/D-sorbitol (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 186  PK-0051 (tampón de citrato 0.05 M (pH 6.0)/D-sorbitol (proporción de presión osmótica de 1)), (0.1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,42	102,53
		1 semana	101,93	100,91
		2 semanas	102,21	99,73
	40 °C	en momento de inicio	101,42	102,53
		1 semana	102,16	101,24
		2 semanas	101,99	102,88
	60 °C	en momento de inicio	101,42	102,53
		1 semana	102,01	100,98
		2 semanas	100,04	99,18
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,42	102,53
		5 min	99,66	100,91
		15 min	98,05	96,94
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,42	102,53
		5 min	95,35	94,84
		15 min	90,10	85,32

[Tabla 16]

Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/sacarosa (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 187  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)/sacarosa (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25°C	en momento de inicio	102,10	103,37
		1 semana	102,49	101,67
		2 semanas	101,15	102,00
	40°C	en momento de inicio	102,10	103,37
		1 semana	102,60	99,59
		2 semanas	102,90	101,39
	60°C	en momento de inicio	102,10	103,37
		1 semana	102,56	103,63
		2 semanas	101,52	101,59
	autoclave 105°C	en momento de inicio	102,10	103,37
		5 min	100,44	101,87
		15 min	99,24	96,84
	autoclave 121°C	en momento de inicio	102,10	103,37
		5 min	95,52	95,98
		15 min	90,15	87,35

[Tabla 17]

5 Estabilidad térmica de PK-0051 en tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) of PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 188  PK-0051 (tampón citrato 0,05 M (pH 6,0)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,72	100,97
		1 semana	102,32	101,09
		2 semanas	102,98	103,16
	40 °C	en momento de inicio	101,72	103,27
		1 semana	102,37	101,54
		2 semanas	102,67	101,55
	60 °C	en momento de inicio	101,72	103,27
		1 semana	102,45	103,33
		2 semanas	102,07	101,72
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,72	103,27
		5 min	100,51	100,92
		15 min	99,04	97,67
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,72	103,27
		5 min	95,83	98,21
		15 min	89,65	87,45

[Tabla 18]

Estabilidad térmica de PK-0051 en NaCl (relación de presión osmótica de 1)

Nombre de la muestra	Temperatura de almacenamiento o temperatura de tratamiento en autoclave	Periodo de almacenamiento	Contenido (%) de PK-0051	
			HPLC de fase inversa	HPLC de intercambio iónico
composición de ensayo 189  PK-0051(NaCl (relación de presión osmótica de 1)), (0,1 mg/mL)	25 °C	en momento de inicio	101,19	102,38
		1 semana	101,13	100,86
		2 semanas	101,98	101,07
	40 °C	en momento de inicio	101,19	102,38
		1 semana	101,71	101,30
		2 semanas	101,89	100,17
	60 °C	en momento de inicio	101,19	102,38
		1 semana	99,57	100,41
		2 semanas	95,09	91,67
	autoclave 105 °C	en momento de inicio	101,19	102,38
		5 min	95,59	96,12
		15 min	93,82	94,94
	autoclave 121 °C	en momento de inicio	101,19	102,38
		5 min	78,25	75,92
		15 min	62,71	58,85

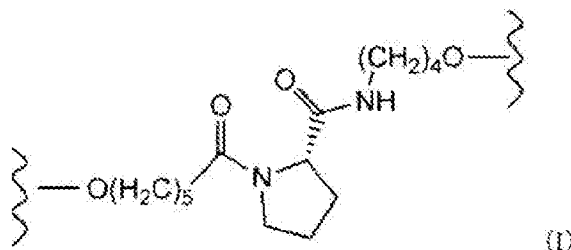
## [Aplicabilidad industrial]

- 5 De acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla PK-0051 capaz de inhibir la expresión de TGF- $\beta$ 1 puede almacenarse de manera estable en un estado de solución a temperatura ambiente durante un largo plazo. Por lo tanto, la presente invención es extremadamente útil, ya que puede proporcionar un producto farmacéutico de ácido nucleico que puede almacenarse y transportarse de manera conveniente, no requiere preparación mediante redisolución cuando está en uso y es superior en manipulación.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada por 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3'

5 (en la secuencia, P es un enlazador derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I))



y un tampón y que tiene las siguientes características:

(a) está en la forma de una solución a temperatura ambiente; y

10 (b) un contenido de la molécula de ácido nucleico después de almacenamiento a 25 °C, humedad relativa de 60 % durante 4 semanas, de no menos de 80 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento, en donde el tampón ajusta el pH de la composición a no menos de 4,6 y a no más de 7,0.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tampón ajusta el pH de la composición a no menos de 5,5 y a no más de 6,5.

15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el contenido de la molécula de ácido nucleico después del almacenamiento a 40 °C, humedad relativa de 75 % durante 4 semanas no es menor que 80 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento.

4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el contenido de la molécula de ácido nucleico después del almacenamiento a 60 °C durante 4 semanas no es menor que 60 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento.

20 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el contenido de la molécula de ácido nucleico expuesta a la exposición a luz total de 1.2 millones de Lux•h no es menor que 80 % en relación con el contenido en el momento de comenzar el almacenamiento.

25 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el tampón comprende uno o más agentes tampón seleccionados de hidrógeno-fosfato sódico, dihidrógeno-fosfato sódico, hidrógeno-fosfato disódico, cloruro sódico, clorhidrato de arginina, citrato de sodio, citrato trisódico dihidrato, L-glutamato monosódico, acetato de sodio, carbonato de sodio, hidrógeno-carbonato de sodio, lactato de sodio, fosfato monopotásico, hidróxido de sodio, meglumina, glicina, ácido cítrico y ácido acético.

7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tampón comprende ácido cítrico y/o ácido fosfórico.

30 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un agente de isotonicidad.

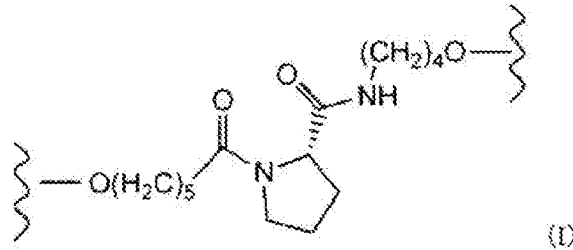
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el agente de isotonicidad es uno o más seleccionados de D-sorbitol, cloruro sódico, glicerol, D-manitol, cloruro de potasio, lactitol y sacarosa.

35 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en la profilaxis o el tratamiento de fibrosis pulmonar o lesión pulmonar aguda.

11. Un método para producir la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, que comprende disolver una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada por 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3'

(en la secuencia, P es un enlazador derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I))



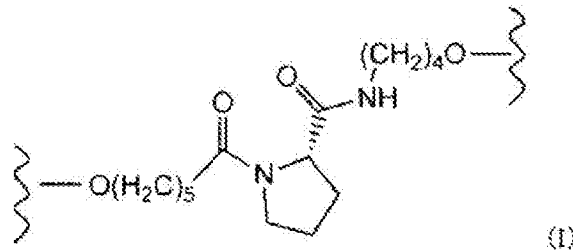


en un tampón, ajustar un pH de la composición a no menos de 5,5 y a no más de 6,5 y almacenar la solución a temperatura ambiente.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el tampón comprende ácido cítrico y/o ácido fosfórico.

- 5 13. Un método para estabilizar una molécula de ácido nucleico en una composición, que comprende disolver una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada por 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3'

(en la secuencia, P es un enlazador derivado de prolina representado por la siguiente fórmula (I))



- 10 en un tampón, ajustar un pH de la composición a no menos de 5,5 y a no más de 6,5 y almacenar la solución a temperatura ambiente.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el tampón comprende ácido cítrico y/o ácido fosfórico.

FIG. 1

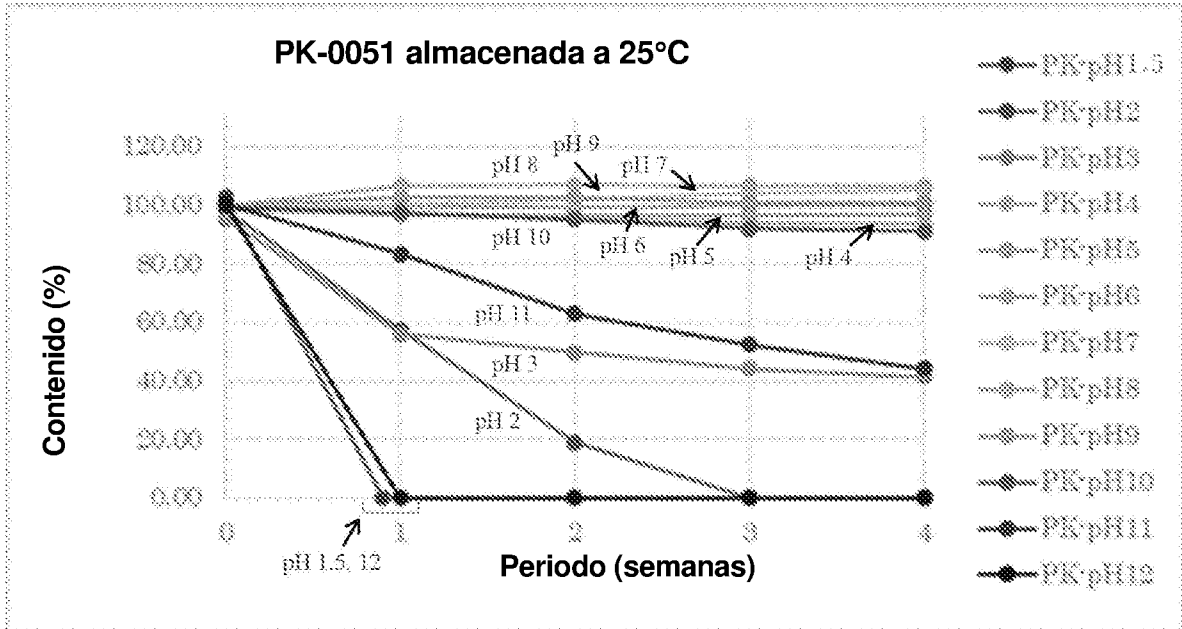


FIG. 2

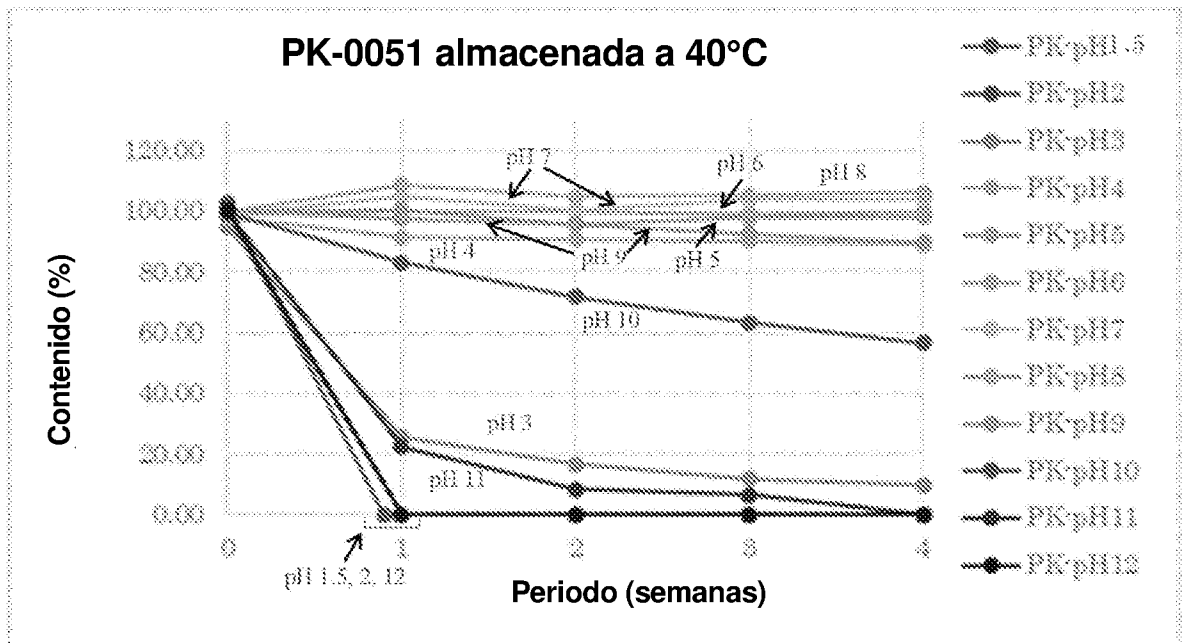


FIG. 3

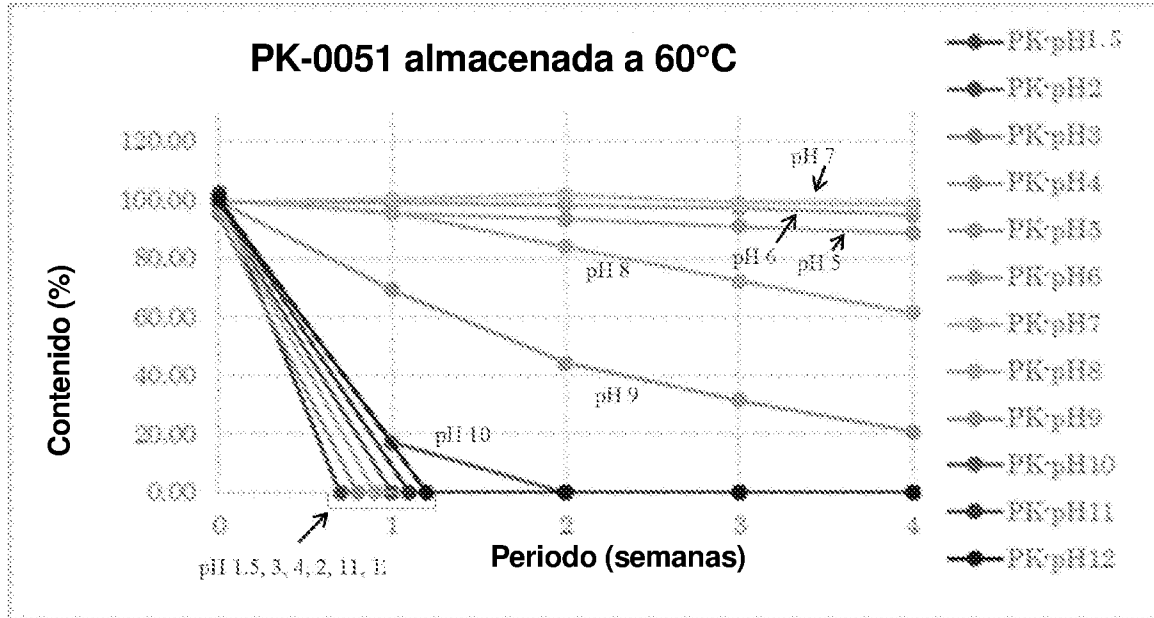


FIG. 4

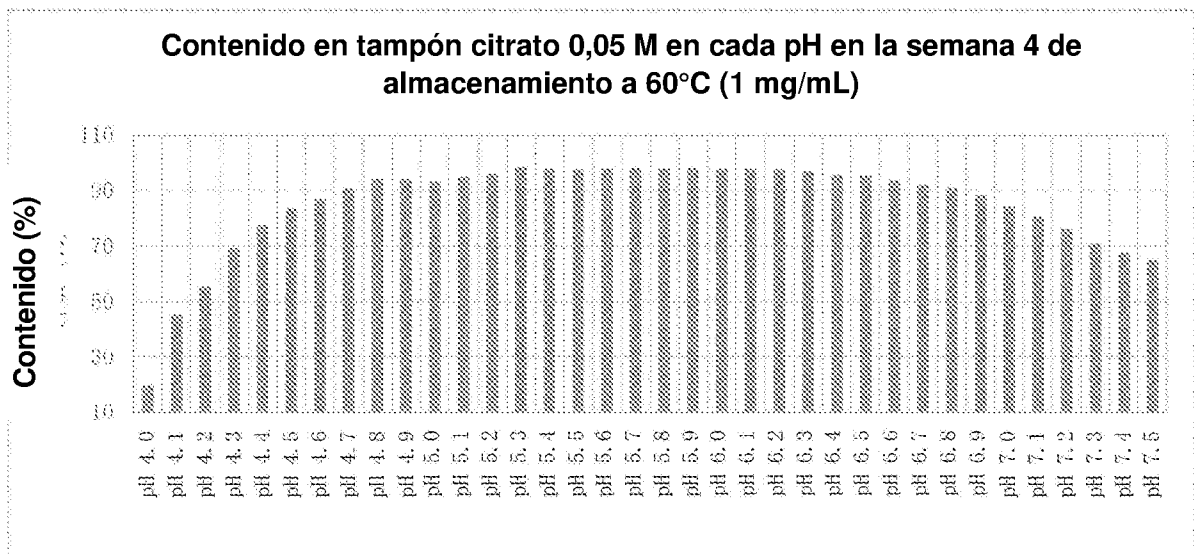


FIG. 5

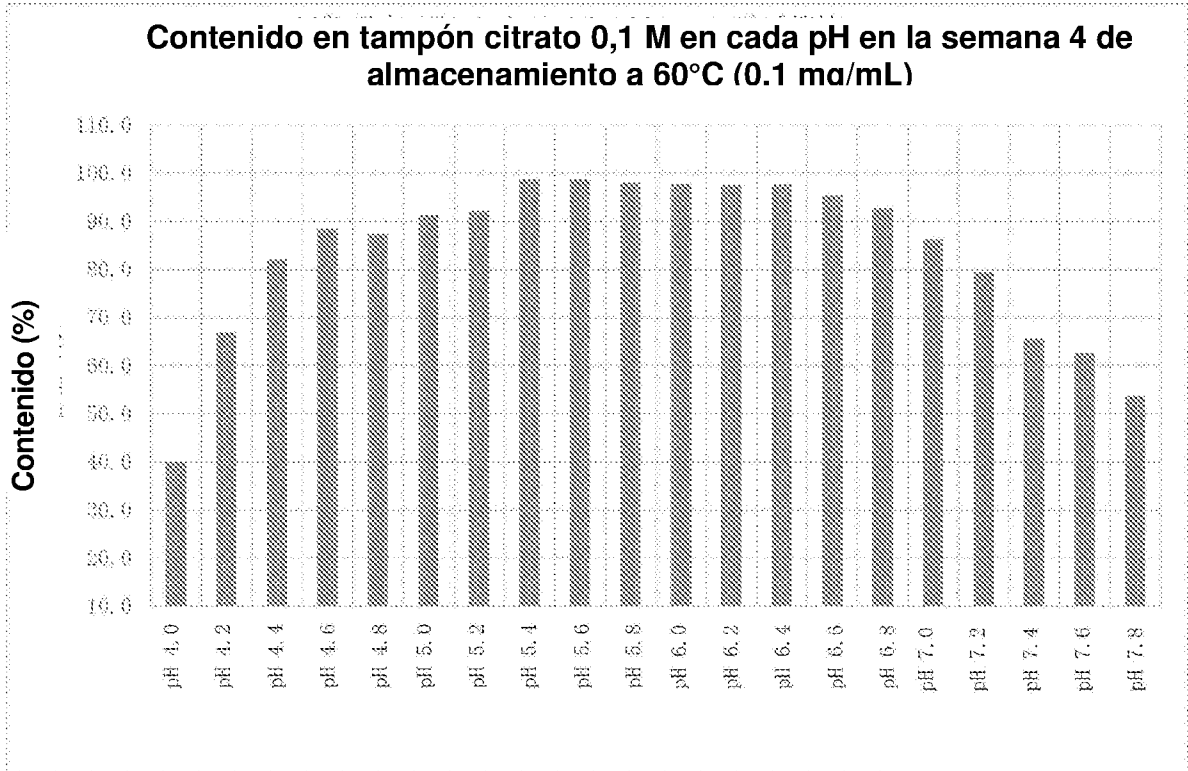


FIG. 6

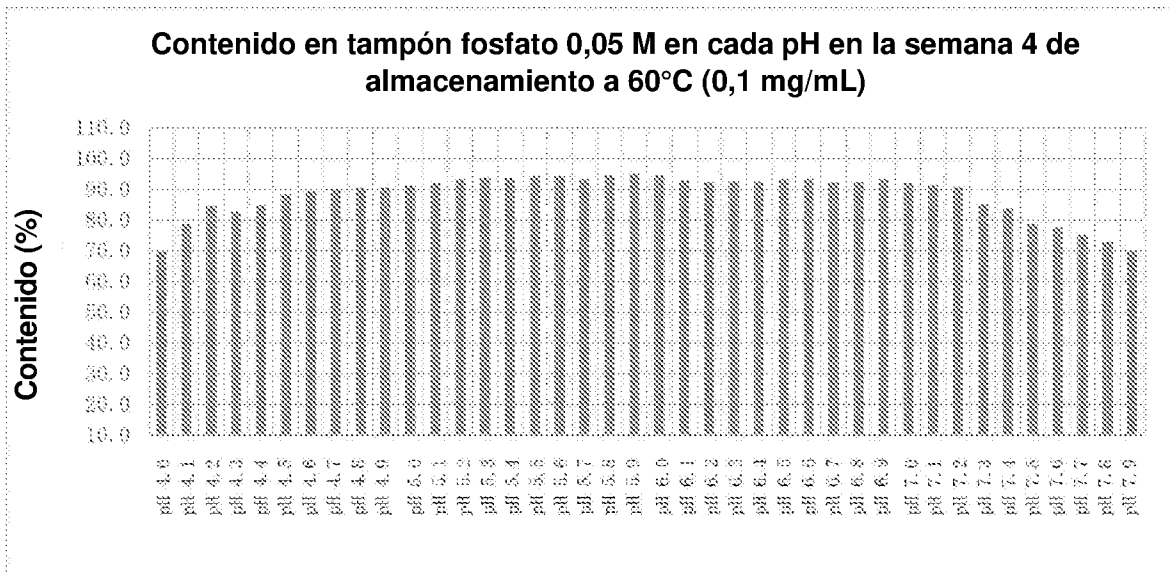


FIG. 7

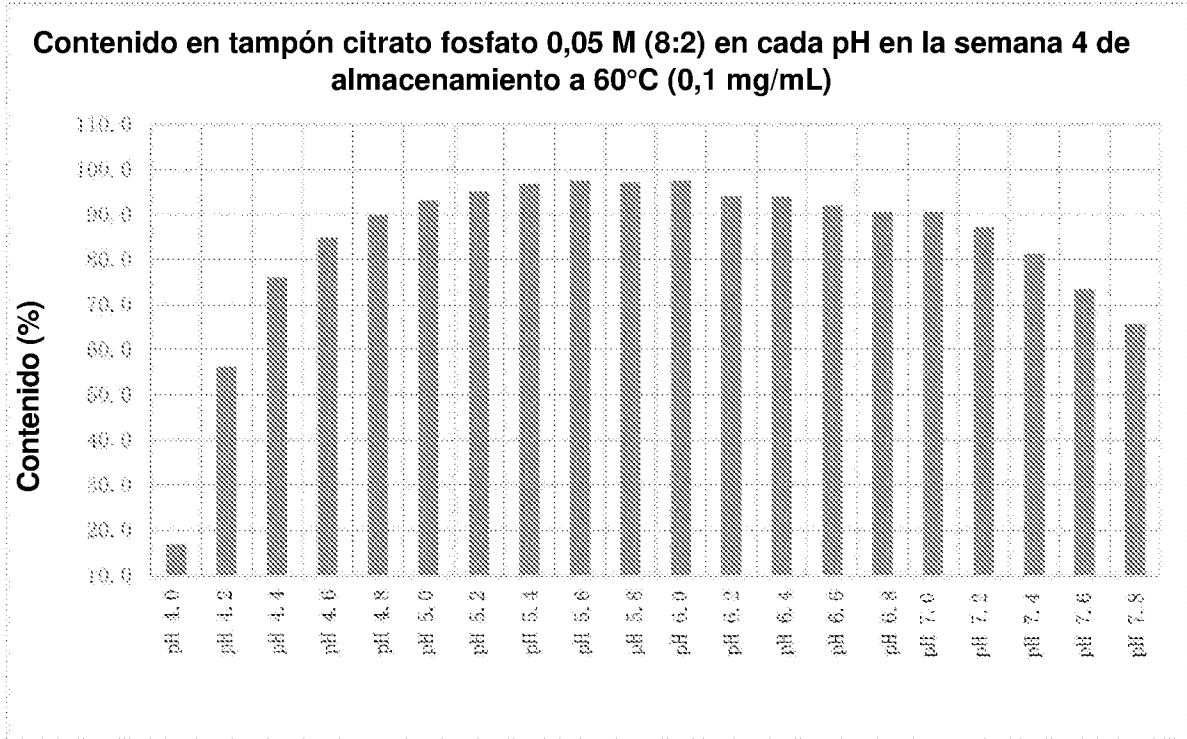


FIG. 8

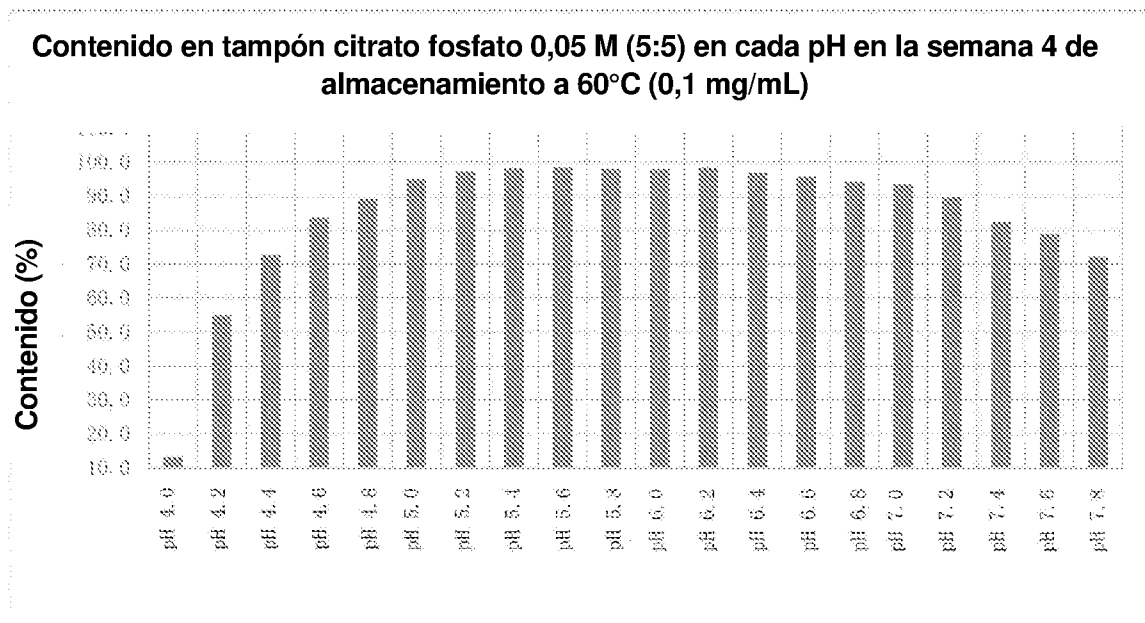


FIG. 9

Contenido en tampón citrato fosfato 0,05 M (2:8) en cada pH en la semana 4 de almacenamiento a 60°C (0,1 mg/mL)

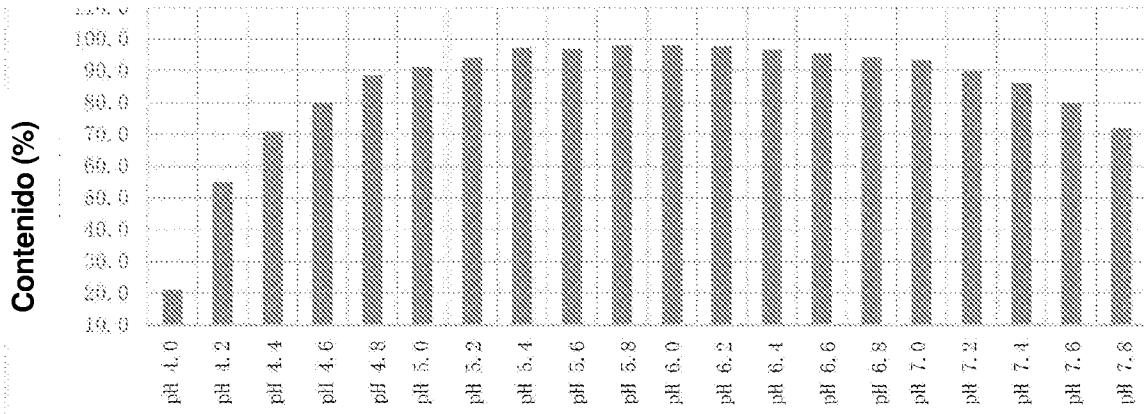


FIG. 10

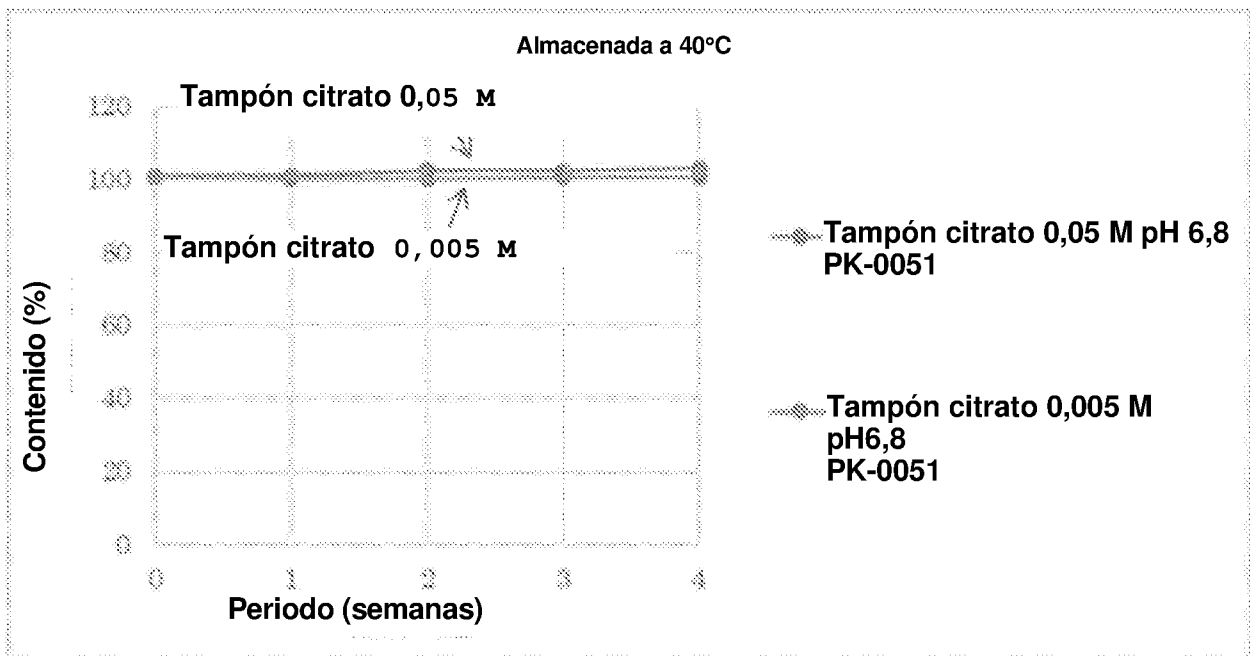


FIG. 11

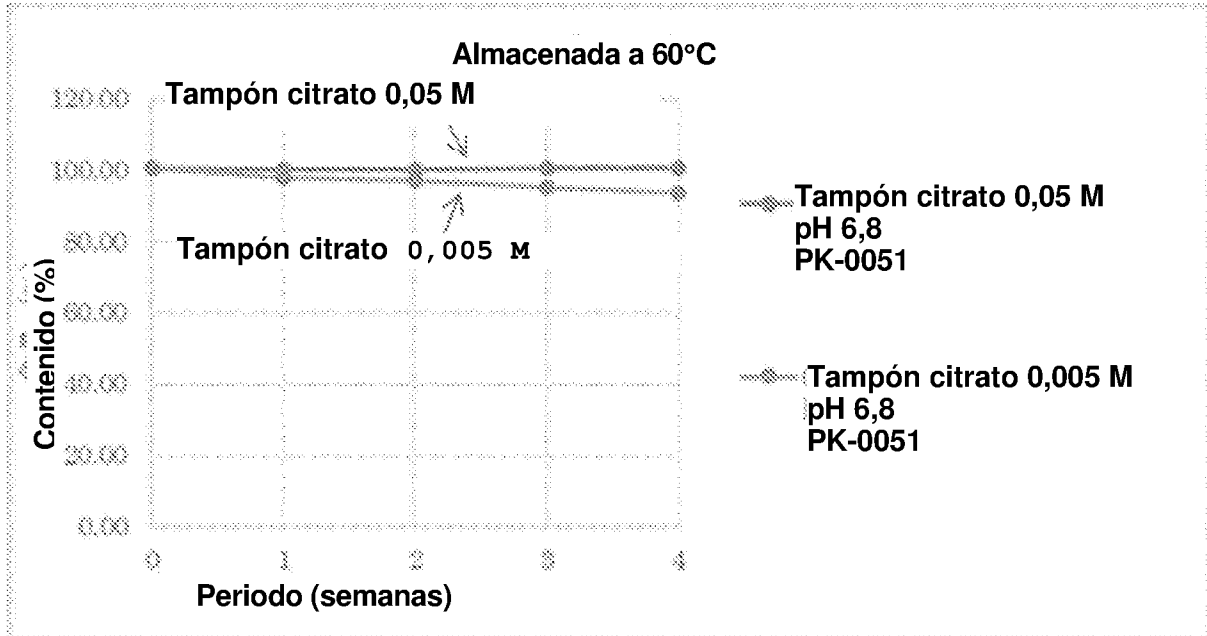


FIG. 12

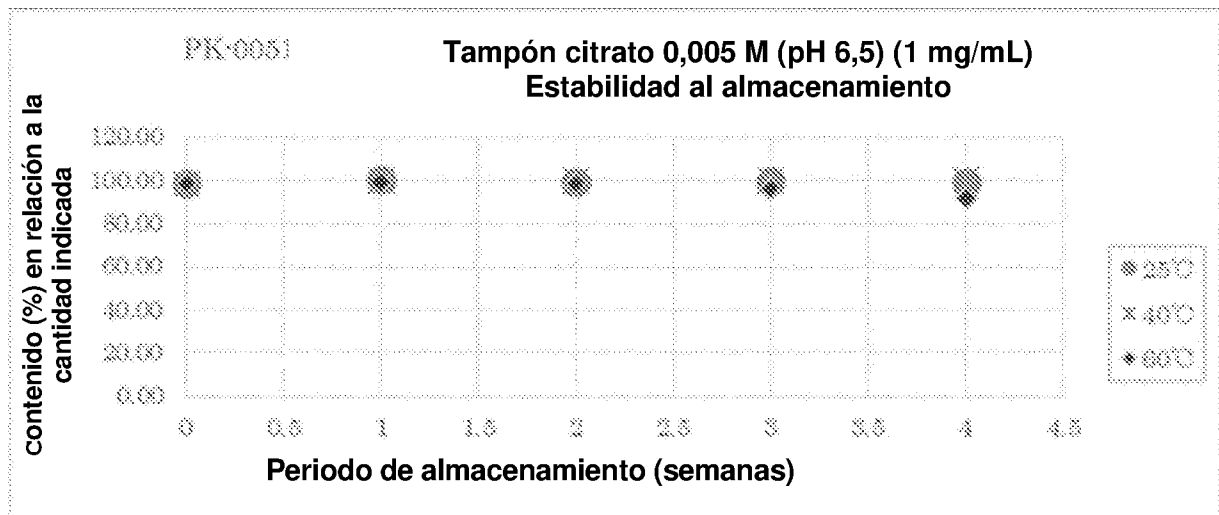


FIG. 13

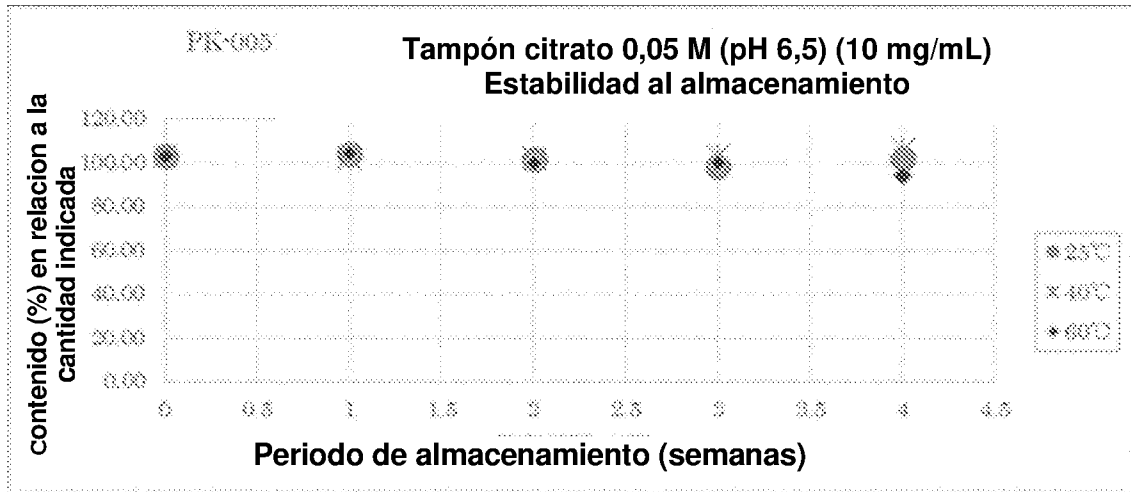


FIG. 14

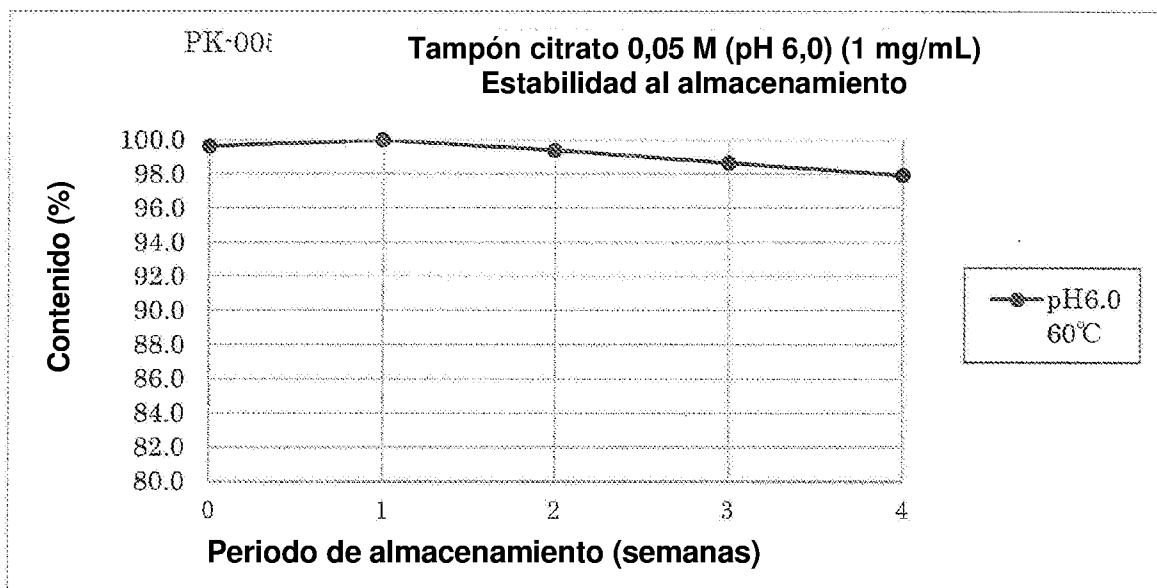




FIG. 15

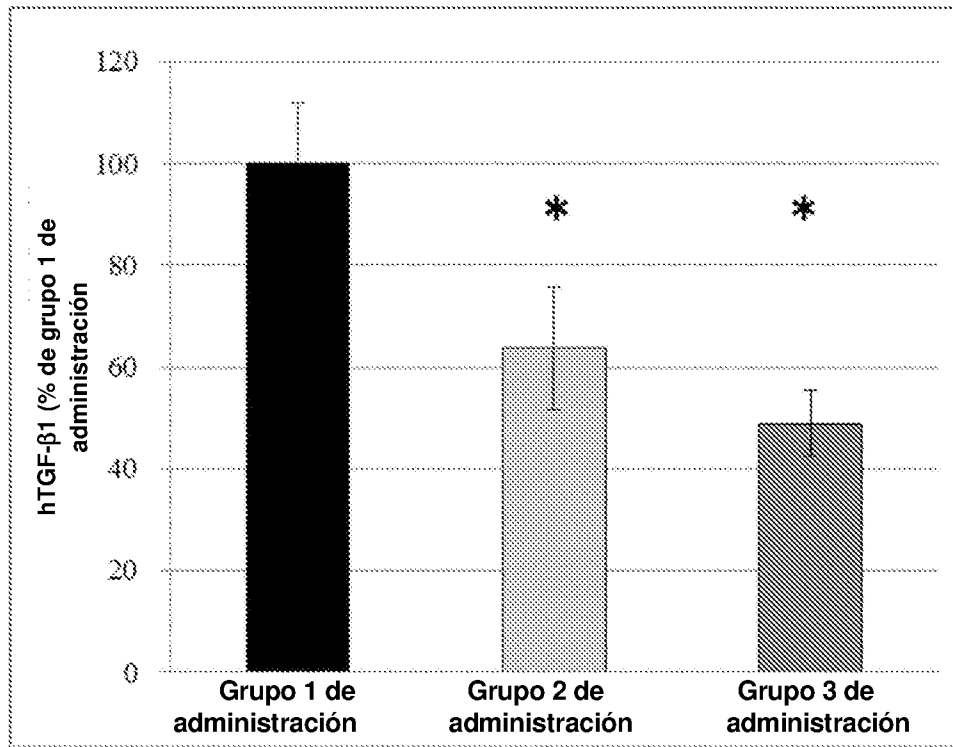


FIG. 16

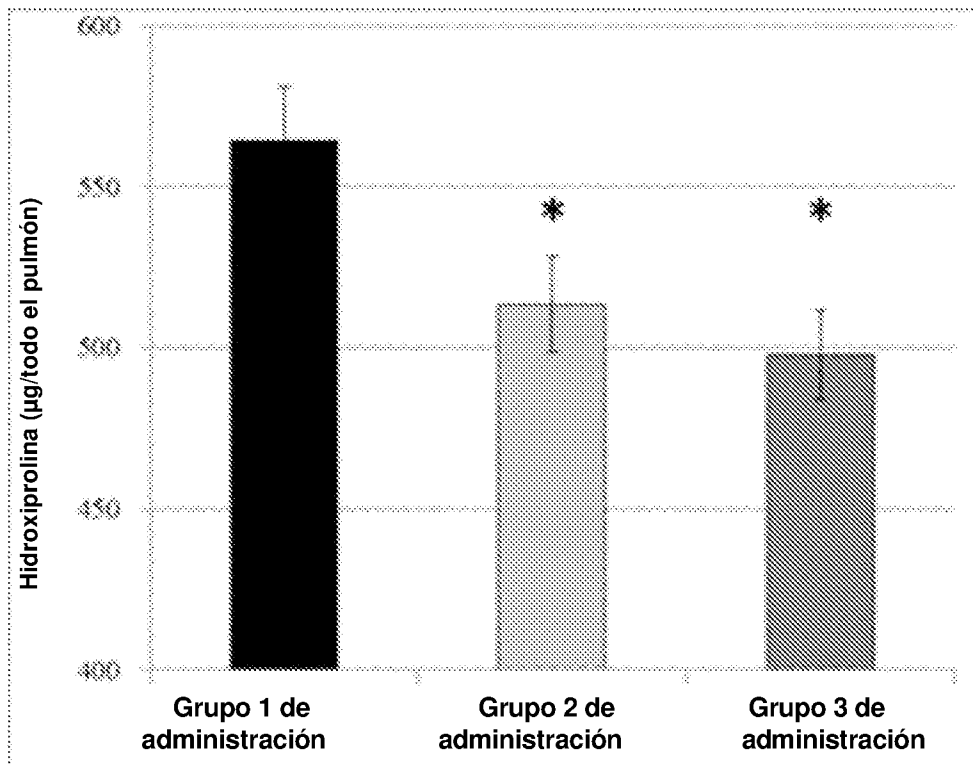


FIG. 17

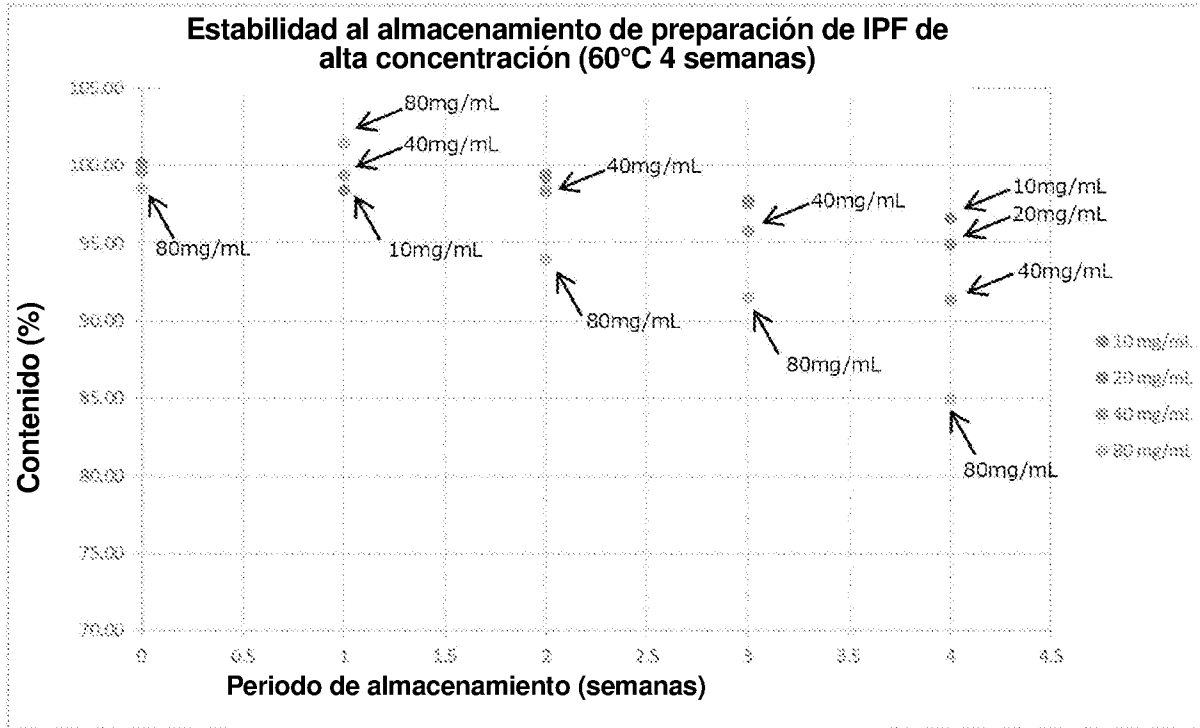
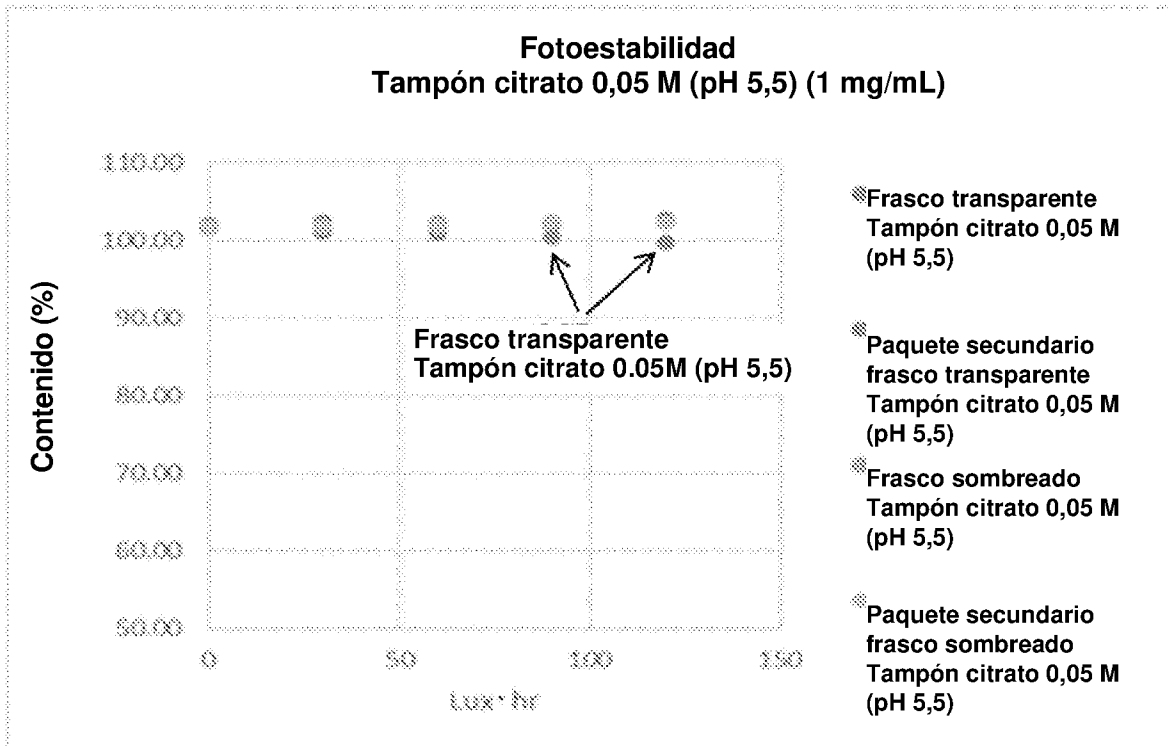
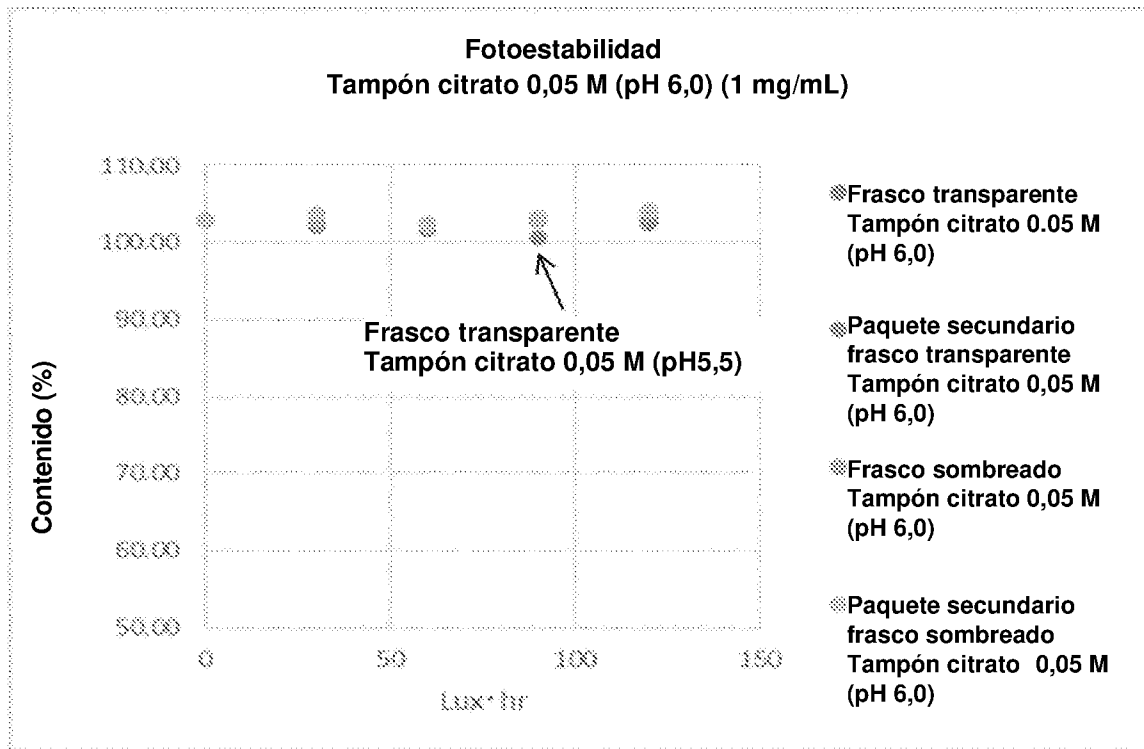


FIG. 18



**FIG. 19**



**FIG. 20**

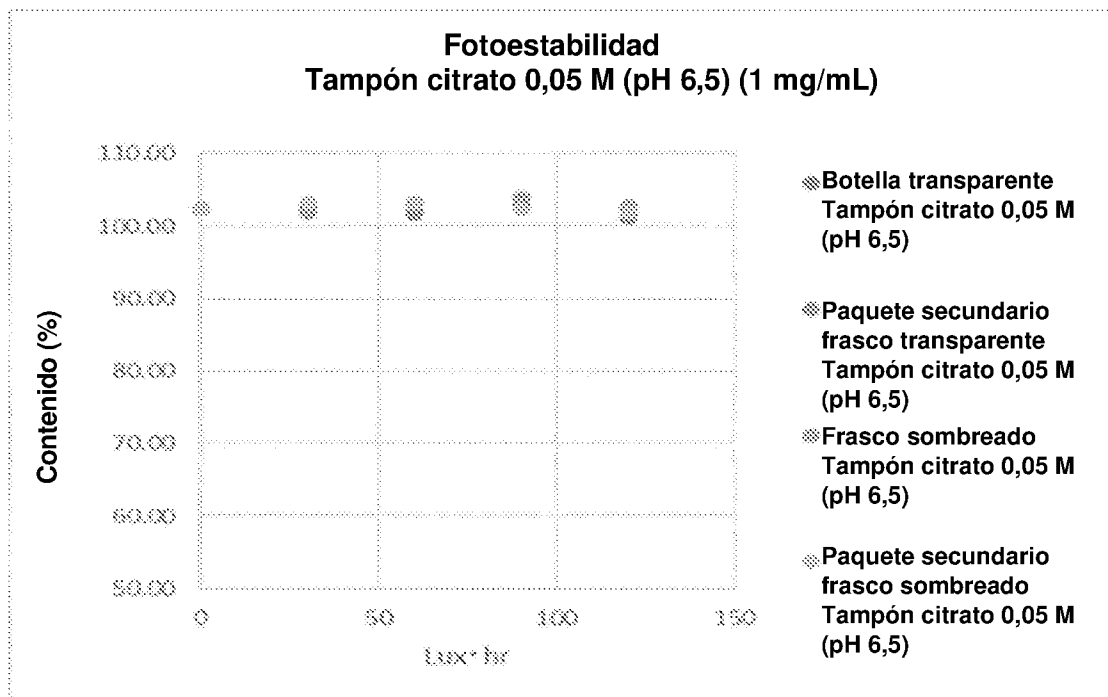


FIG. 21

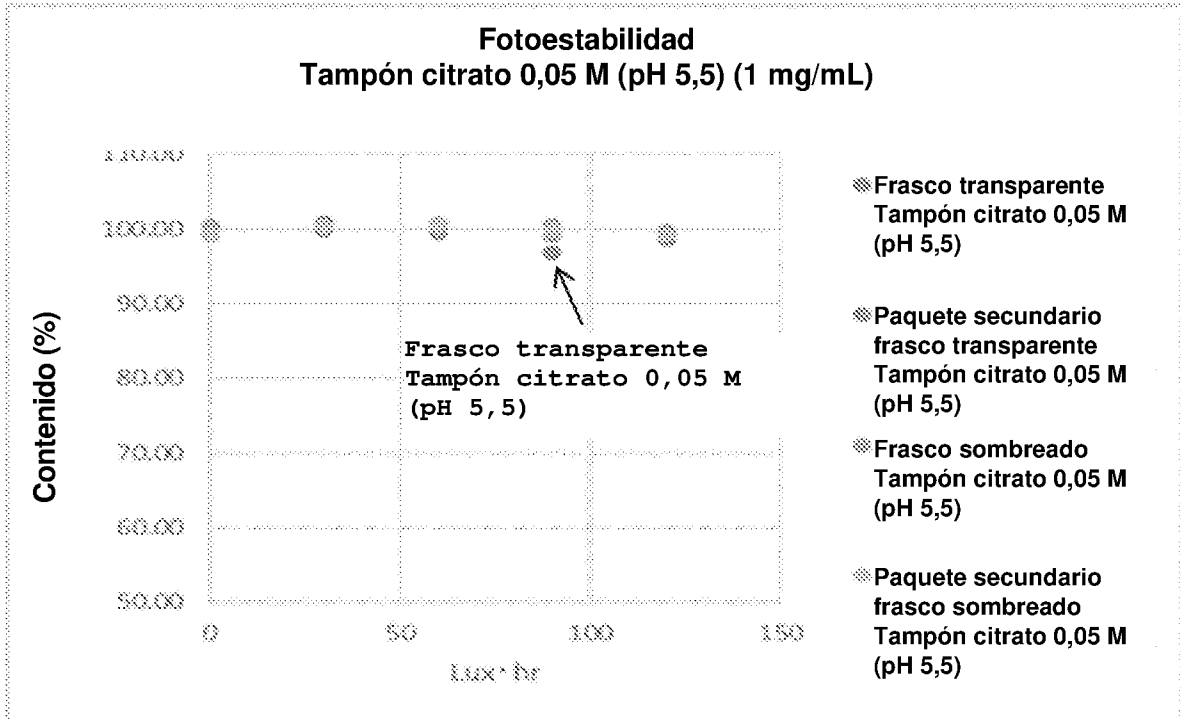
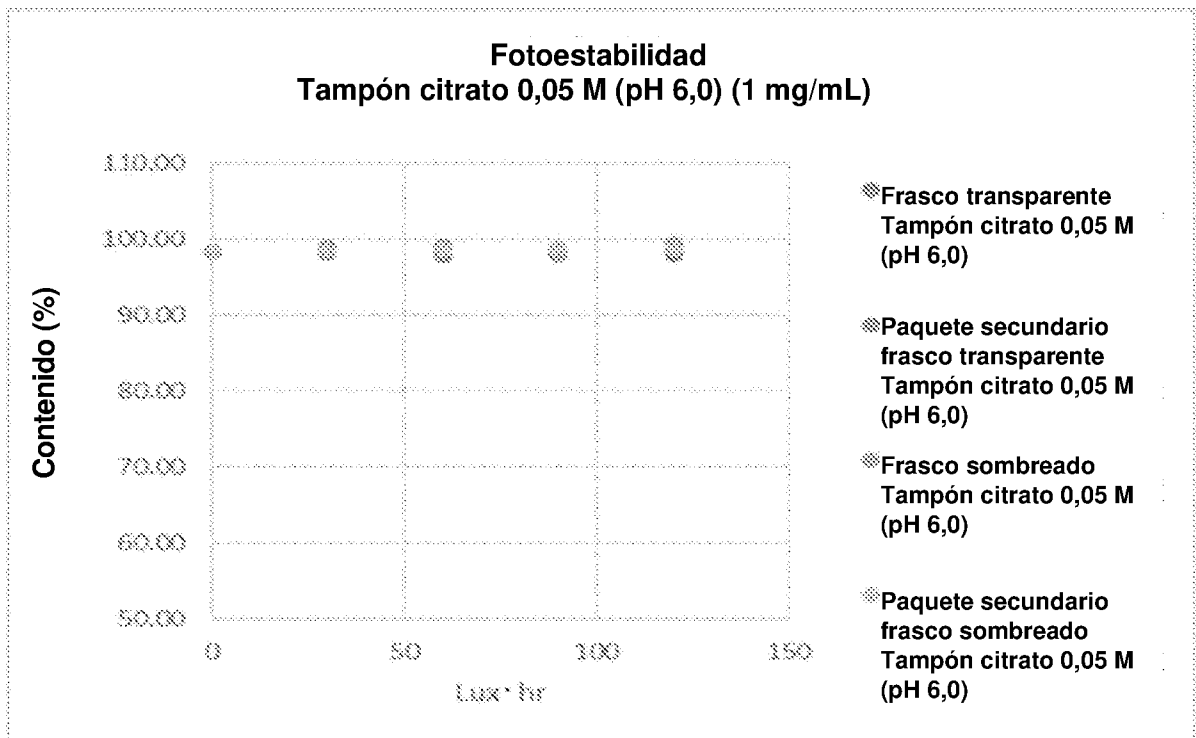


FIG. 22



**FIG. 23**

