

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 597**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2020** **PCT/US2020/049992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2021** **WO21050585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2020** **E 20780825 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025** **EP 4028542**

54 Título: **Composiciones, métodos y kits para la detección de la actividad lipolítica**

30 Prioridad:

12.09.2019 US 201962899638 P

25.09.2019 US 201962905926 P

23.01.2020 US 202062964938 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2025

73 Titular/es:

LONZA LTD. (100.00%)

Lonzastrasse

3930 Visp, CH

72 Inventor/es:

MAHLER, HANNS-CHRISTIAN;

FEDOROWICZ, FILIP;

JAHN, MICHAEL;

ZERR, ANDREAS y

KOULOV, ATANAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 014 597 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones, métodos y kits para la detección de la actividad lipolítica**5 Campo de la invención**

La presente divulgación proporciona composiciones, métodos y kits para detectar y/o cuantificar la actividad lipolítica. También se proporcionan en el presente documento métodos para determinar la estabilidad de una preparación proteica. En algunas realizaciones, una composición para detectar la actividad lipolítica comprende una muestra de ensayo acuosa y un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO).

Antecedentes

Los cultivos celulares pueden utilizarse para la generación de proteínas de importancia comercial, tales como las proteínas terapéuticas. Además de la proteína diana, las células producen proteínas de la célula huésped (HCP por sus siglas en inglés), por ejemplo, lipasas, que pueden encontrarse en los pools de producción de la proteína diana, por ejemplo, el sobrenadante del cultivo celular o el lisado celular. El proceso de purificación corriente abajo, que puede incluir varios pasos de cromatografía (por ejemplo, en el caso de la producción de anticuerpos monoclonales, cromatografía de afinidad), son generalmente capaces de agotar la gran mayoría de los HCP. Sin embargo, una eliminación del 100 % de los HCP puede no ser posible debido a los principios naturales de los métodos de separación y purificación, que se basan en el equilibrio. Un límite de HCP aceptado por la industria y las autoridades sanitarias se sitúa en ~1-100 ppm, en relación con la cantidad de proteína activa. Los HCP suelen medirse y notificarse como un parámetro de suma con la ayuda de ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA por sus siglas en inglés), como se describe, por ejemplo, en USP <1132>, por lo tanto, éstos suelen incluir una gama de diferentes proteínas derivadas del huésped en diversas concentraciones. Sustancias farmacológicas con el mismo contenido total de HCP cuantificado por ELISA, podrían tener diferentes perfiles de HCP. Esto podría llevar a una situación en la que una ligera variación en el proceso provocara un aumento de una HCP específica de baja concentración, por ejemplo, una lipasa, que podría no detectarse mediante la aplicación del ensayo de HCP total. Así, un pequeño porcentaje de HCP puede estar presente en el producto proteico final y tener actividad catalítica. La actividad catalítica residual puede tener efectos perjudiciales sobre la calidad del producto, tal como la estabilidad de los excipientes, por ejemplo, tensioactivos tales como los polisorbatos, y, en última instancia, sobre la estabilidad, calidad y seguridad del producto proteico. Minimizar o eliminar estos efectos perjudiciales puede ser de suma importancia si la proteína es una proteína terapéutica, especialmente una proteína terapéutica utilizada en humanos.

La actividad residual de la lipasa en la preparación de la proteína, por ejemplo, debido a un agotamiento subóptimo durante el proceso de purificación corriente abajo de la proteína diana, puede conducir a la hidrólisis de algunos excipientes, por ejemplo, tensioactivos. Las consecuencias pueden incluir, por ejemplo, la formación de partículas subvisibles y visibles debido a la liberación de ácidos grasos de cadena larga no polares, y por lo tanto insolubles, y otros degradantes de los tensioactivos, y la pérdida de estabilización proporcionada por los tensioactivos. La degradación del tensioactivo también puede tener un impacto adverso en la calidad de la proteína, por ejemplo, produciendo peróxidos que conducen a la degradación de la proteína, o produciendo ácido láurico que induce la agregación de la proteína. La degradación de los tensioactivos también reduce su concentración en la formulación, causando potencialmente una protección insuficiente de la proteína, por ejemplo, contra el estrés interfacial (por ejemplo, agitación, congelación/descongelación y similares), y también conducen a diferencias potenciales en las consideraciones de seguridad del producto, por ejemplo, diferentes responsabilidades *in vivo* debido al tensioactivo degradado. Así, la actividad residual de la lipasa puede comprometer la calidad de la preparación proteica final debido a la hidrólisis de los excipientes. Los productos de degradación de excipientes tales como, por ejemplo, los polisorbatos, también pueden causar problemas de seguridad en los pacientes, tales como reacciones en el lugar de la inyección (véase, por ejemplo, Singh et al., J Pharm Sci 107(11):2735-2741 (2018)).

Breve descripción de la invención

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende: (a) una muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación de proteína; y (b) un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0; y donde la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99,9 % de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de la composición.

En algunas realizaciones, la preparación proteica es un sobrenadante de cultivo celular. En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica parcialmente purificada. En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica purificada.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende una proteína terapéutica.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende un tensioactivo. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un polisorbato. En algunas realizaciones, el polisorbato es polisorbato-20, polisorbato-80 o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende además proteínas adicionales de la célula huésped.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa comprende además un agente amortiguador, una sal, o ambos.

En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio, cloruro de calcio o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio y cloruro de calcio. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 400 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el cloruro de calcio es de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el cloruro de calcio es de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM en la muestra de ensayo acuosa.

En algunas realizaciones, el agente amortiguador tiene una capacidad amortiguadora a aproximadamente pH 6,0. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Tris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es BisTris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 55 mM en la muestra de ensayo acuosa.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol, un sulfóxido, un nitrilo o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO). En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende acetonitrilo.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende un alcohol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende una mezcla de acetonitrilo e iso-propanol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol C₁-C₆. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, tert-butanol, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un inhibidor de lipasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es éster (S)-1-[[[(2S,3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanil]metil]-dodecil del ácido (S)-2-formilamino-4-metil-pentanoico (orlistat).

En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa se encuentra en el disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 50 µM en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa es de aproximadamente 5 µM a aproximadamente 25 µM en la composición.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende: (a) una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación de proteína purificada; (ii) un agente amortiguador; y (iii) una sal; y (b) un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico comprende además oleato de 4-metilumbelifeilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0; y donde la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99,9 % de la composición, y donde el disolvente orgánico es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de la composición.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende: (a) aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 % (vol/vol) de una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación de proteína purificada que comprende una proteína y un lípido; (ii) un agente amortiguador; (iii) aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM de cloruro de calcio; y (iv) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y (b) aproximadamente 10 % a aproximadamente 0,1 % (vol/vol) de un disolvente orgánico seleccionado entre metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, que comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de detección de actividad lipolítica en una muestra de ensayo acuosa, comprendiendo el método (a) combinar la muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); y (b) medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona (4Mu) por fluorescencia.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de detección de actividad lipolítica en una muestra de ensayo acuosa, comprendiendo el método (a) combinar la muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica, con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO) para formar una composición de ensayo; (b) combinar una muestra de control que comprende una preparación proteica y un inhibidor de lipasa, con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO) para formar una composición de control; y (c) medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona (4Mu) por fluorescencia en la composición de ensayo y en la composición de control.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para determinar la estabilidad de una preparación proteica, que comprende (a) combinar una muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); (b) medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona (4Mu) por fluorescencia; y (c) determinar la estabilidad de la preparación proteica basándose en la fluorescencia medida.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 98:2. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 99,9:0,1.

En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide mediante excitación de fluorescencia a 330 nm y emisión de fluorescencia a 495 nm. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante un máximo de 24 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 400 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante más de aproximadamente 100 horas.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa se incuba con un inhibidor de lipasa durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora antes del paso (a). En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa se incuba con el inhibidor de lipasa durante aproximadamente 30 minutos antes del paso (a). En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es éster (S)-1-[[[(2S,3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanil]metil]-dodecil del ácido (S)-2-formilamino-4-metil-pentanoico (orlistat). En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se añade de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 50 μ M. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se añade de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 25 μ M.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un kit que comprende, en dos o más recipientes: (a) un disolvente orgánico; (b) oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); (c) un inhibidor de lipasa.

En algunas realizaciones, el kit comprende además un agente amortiguador, una sal, o ambos. En algunas realizaciones, el kit comprende además una columna de intercambio de amortiguador.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un kit que comprende: (a) un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); (b) una columna adecuada para intercambiar amortiguador de una preparación proteica; y (c) un inhibidor de lipasa.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A-1E se refieren al Ejemplo 1A. Las Figs. 1A y 1B muestran el efecto de la concentración y el pH de los amortiguadores Tris y Bis-Tris sobre la actividad de la lipasa porcina pancreática (PPL por sus siglas en inglés) y la extinción de la fluorescencia de 4-metilumbeliferona (4Mu), respectivamente. La Fig. 1C muestra el efecto de la concentración y pH del amortiguador sobre la actividad lipasa y la autohidrólisis del oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO). La Fig. 1D muestra el intervalo de pH en el que se midió la fluorescencia de 4Mu. La Fig. 1E muestra las diferentes formas de 4Mu a distintos pH.

Las Figs. 2A-2C se refieren al Ejemplo 2A. Las Figs. 2A y 2B muestran el efecto de la concentración de CaCl_2 sobre la actividad de la lipasa y la extinción de la fluorescencia de 4Mu, respectivamente. La Fig. 2C muestra el efecto de la concentración de CaCl_2 sobre la actividad de la lipasa y la autohidrólisis de 4MuO.

Las Figs. 3A-3C se refieren al Ejemplo 3A. Las Figs. 3A y 3B muestran el efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad de la lipasa y la extinción de la fluorescencia de 4Mu, respectivamente. La Fig. 3C muestra el efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad de la lipasa y la autohidrólisis de 4MuO.

Las Figs. 4A-4C se refieren al Ejemplo 4A. Las Figs. 4A y 4B muestran la influencia del disolvente orgánico sobre la actividad de la lipasa y la extinción de la fluorescencia de 4Mu, respectivamente. La Fig. 4C muestra la influencia del disolvente orgánico sobre la actividad de la lipasa y la autohidrólisis de 4MuO.

Las Figs. 5A-5C se refieren al Ejemplo 5. Las Figs. 5A y 5B muestran la influencia del tensioactivo sobre la actividad de la lipasa y la extinción de la fluorescencia de 4Mu, respectivamente. La Fig. 5C muestra la influencia del tensioactivo sobre la actividad de la lipasa y la autohidrólisis de 4MuO.

Las Figs. 6A-6B se refieren al Ejemplo 6. Las Figs. 6A y 6B muestran la influencia de un inhibidor de la lipasa, orlistat, a tres concentraciones diferentes sobre la actividad de la lipasa y la extinción de la fluorescencia de 4Mu, respectivamente.

Las Figs. 7A-7D se refieren al Ejemplo 7. Las Figs. 7A y 7C muestran la influencia de la inhibición del producto de PS20 teóricamente totalmente degradado sobre la actividad de la lipasa y la autohidrólisis de 4Mu. Las Figs. 7B y 7D muestran la influencia de la inhibición del producto de PS80 teóricamente totalmente degradado sobre la actividad de la lipasa y la

autohidrólisis de 4Mu.

La Fig. 8 se refiere al Ejemplo 8. La Fig. 8 muestra el efecto del PS80 sobre la extinción de la fluorescencia de 4Mu.

5 Las Figs. 9A-9D se refieren al Ejemplo 9. Las Figs. 9A y 9B muestran los resultados de un ensayo HPLC-FMA para probar la degradación de PS20 (Fig. 9A) y PS80 (Fig. 9B) en concentraciones variables de fluido de cosecha de cultivo celular (CCHF por sus siglas en inglés). La Fig. 9C muestra una lectura teórica de un ensayo de lipasa 4MuO. La Fig. 9D muestra la lectura real del ensayo de lipasa 4MuO probando concentraciones variables de CCHF en la degradación del polisorbato.

10 Las Figs. 10A-10H se refieren al Ejemplo 9. Las Figs. 10A-10H muestran los resultados de un ensayo de lipasa 4MuO con PS80 a diferentes concentraciones de CCHF.

La Fig. 11 se refiere al Ejemplo 1B. La Fig. 11 muestra el efecto del pH de Tris y Bis-Tris sobre la actividad lipolítica de PPL y CCHF, y la autohidrólisis (AH) de 4Mu.

15 La Fig. 12 se refiere al Ejemplo 2B. La Fig. 12 muestra los efectos de la concentración de CaCl₂ sobre la actividad lipolítica de PPL y CCHF.

20 La Fig. 13 se refiere al Ejemplo 3B. La Fig. 13 muestra los efectos de la concentración de NaCl sobre la actividad lipolítica de PPL y CCHF.

La Fig. 14 se refiere al Ejemplo 4B. La Fig. 14 muestra los efectos del disolvente orgánico sobre la actividad lipolítica de PPL y CCHF.

25 Las Figs. 15A y 15B se refieren al Ejemplo 5B. La Fig. 15A muestra los efectos de diferentes tensioactivos sobre la actividad lipolítica de PPL y CCHF. La Fig. 15B muestra la extinción de la fluorescencia de 4Mu por los diferentes tensioactivos.

30 La Fig. 16 se refiere al Ejemplo 6B. La Fig. 16 muestra el efecto sobre la actividad de la PPL de la preincubación o coincubación de una muestra con un inhibidor de la lipasa, el orlistat, a tres concentraciones diferentes.

35 Las Figs. 17A y 17B se refieren al Ejemplo 10. La Fig. 17A muestra la cinética de un ensayo de lipasa realizado con una formulación que contiene proteínas con varios controles positivos y negativos (muestra, ensayo, formulación y autohidrólisis). Las muestras analizadas se resumen en la Tabla 10. La Fig. 17B es una vista ampliada de la cinética del ensayo.

La Fig. 18 se refiere al Ejemplo 9. La Fig. 18 muestra un resumen del ensayo de lipasa realizado con concentraciones variables de CCHF.

40 Las Figs. 19A y 19B se refieren al Ejemplo 1B. Las Figs. 19A y 19B muestran una curva de calibración de 4Mu en el intervalo de concentración de 0,01 a 5 mM y los resultados numéricos de la curva de calibración de 4Mu, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

45 La presente divulgación se refiere a composiciones, métodos y kits para detectar la actividad lipolítica.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, "un" o "una" puede significar uno o más. Como se utiliza en el presente documento, cuando se utilizan junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Tal como se utiliza en el presente documento, "otro" o "uno más" puede significar al menos un segundo o más.

55 A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el método/dispositivo que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Normalmente, el término "aproximadamente" se refiere a que abarca una variabilidad aproximadamente o menor que 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % o superior, dependiendo de la situación. En algunas realizaciones, un experto en la materia entenderá el nivel de variabilidad indicado por el término "aproximadamente", debido al contexto en el que se utiliza en el presente documento. También debe entenderse que el uso del término "aproximadamente" también incluye el valor específicamente recitado.

60 El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere sólo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta una definición que se refiere sólo a alternativas e "y/o".

65 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "que comprende" (y cualquier variante o forma de comprender, tal como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier variante o forma de tener, como "tiene" y "tienen"), "que incluye" (y cualquier variante o forma de incluir, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier

variante o forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o pasos de método adicionales no mencionados. Se contempla que cualquier realización discutida en esta memoria descriptiva puede ser implementada con respecto a cualquier método, composición y/o kit de la presente divulgación. Además, las composiciones de la presente divulgación pueden utilizarse para lograr métodos y kits de la presente divulgación.

El uso del término "por ejemplo" y su correspondiente abreviatura "p.ej." (en cursiva o no) significa que los términos específicos recitados son ejemplos representativos y realizaciones de la divulgación que no pretenden limitarse a los ejemplos específicos referenciados o citados a menos que se indique explícitamente lo contrario.

Tal como se utiliza en el presente documento, "entre" es un intervalo que incluye los extremos del intervalo. Por ejemplo, un número entre x e y incluye explícitamente los números x e y, y cualquier número que se encuentre entre x e y.

Como se usa en el presente documento, "proteína", "péptido" o "polipéptido" se refieren a una forma polimérica de aminoácidos, que puede ser de cualquier longitud. Las proteínas pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos, proteínas estructurales, enzimas, proteínas de membrana, asociadas a membrana y/o transmembrana, transportadores, receptores, proteínas de señalización y similares. Las proteínas y/o péptidos de la presente divulgación también abarcan proteínas modificadas, por ejemplo, conjugadas con una o más sustancias no peptídicas tales como, por ejemplo, un fármaco, una fracción dirigida, una etiqueta tal como una etiqueta de visualización, y similares. Una proteína de la presente divulgación puede ser una proteína terapéutica, por ejemplo, utilizada en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, un polisorbato descrito en el presente documento puede mejorar la estabilidad de la proteína en una formulación farmacéutica. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un anticuerpo. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un conjugado anticuerpo-fármaco. En algunas realizaciones, una preparación proteica descrita en el presente documento incluye una proteína, por ejemplo, una proteína terapéutica.

Tal como se utiliza en el presente documento, en el contexto de las preparaciones proteicas, "purificación" se refiere a un proceso en el que una o más sustancias, por ejemplo, proteínas, se aíslan de una mezcla compleja, típicamente células, tejidos u organismos. Una muestra de proteína "purificada" o una preparación proteica puede referirse a una muestra en la que uno o más componentes no solubles en agua de una célula, tejido u organismo (tales como, por ejemplo, membranas celulares, lípidos, proteínas agregadas o ácidos nucleicos y otras sustancias hidrofóbicas) se han reducido o eliminado y se han dejado sólo los componentes solubles (tales como, por ejemplo, proteínas solubles). Tal como se utiliza en el presente documento, "soluble" puede referirse a la capacidad de una sustancia para disolverse en un determinado disolvente, por ejemplo, un medio de cultivo celular, un amortiguador, agua o un disolvente orgánico. En el contexto de las proteínas, "soluble" también puede referirse a proteínas que no precipitan y/o no se agregan en un determinado disolvente, por ejemplo, un medio de cultivo celular, un amortiguador, agua o un disolvente orgánico.

Un proceso de purificación ejemplar puede incluir: hacer crecer un cultivo celular que contenga la proteína de interés, por ejemplo, una proteína terapéutica; separar las células del medio de cultivo; lisar las células y separar las células lisadas para generar un sobrenadante de cultivo celular que contenga los componentes solubles y un gránulo que contenga los componentes insolubles descritos en el presente documento; y someter el sobrenadante de cultivo celular a intercambio de amortiguador, ajuste de pH, centrifugación, filtración (incluyendo, por ejemplo, ultrafiltración y/o diafiltración), cromatografía, o cualquier combinación de los mismos para generar una preparación proteica purificada. En algunas realizaciones, una preparación proteica purificada de la presente divulgación se purifica mediante el proceso descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, una preparación proteica parcialmente purificada de la presente divulgación se ha sometido a parte del proceso de purificación descrito en el presente documento. Por ejemplo, una preparación proteica parcialmente purificada puede no haber sido sometida a todos los pasos de intercambio de amortiguador, ajuste de pH, centrifugación, filtración y/o cromatografía utilizados para generar la preparación proteica purificada. En algunas realizaciones, un sobrenadante de cultivo celular descrito en el presente documento incluye una proteína terapéutica de la presente divulgación. En algunas realizaciones, una preparación proteica parcialmente purificada descrita en el presente documento incluye una proteína terapéutica de la presente divulgación. En algunas realizaciones, una preparación proteica purificada descrita en el presente documento incluye una proteína terapéutica de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para la detección de la actividad lipolítica. La actividad lipolítica, es decir, la lipólisis, se refiere generalmente a la hidrólisis de los lípidos. La reacción de lipólisis puede ser catalizada por las enzimas lipasas, que son una subclase de las enzimas esterasas. Así, "lipasa" se refiere a una enzima que hidroliza los enlaces éster de un lípido, por ejemplo, un triglicérido, un fosfolípido, un éster de colesterol, y similares. Las lipasas incluyen, por ejemplo, la lipasa de triglicéridos, la lipasa de lipoproteína, la lipasa pancreática, la lipasa hepática, la lipasa gástrica, la lipasa lingual, la lipasa endotelial y la fosfatidilserina fosfolipasa. Las lipasas se producen de forma natural, por ejemplo, producidas por el páncreas, el hígado, las glándulas linguales, el estómago, las tiroides y/o la mucosa de los mamíferos, secretadas por ciertas bacterias y hongos y/o se encuentran en el lisosoma. En algunas realizaciones, la lipasa es endógena a la célula de la que se derivó la proteína en la purificación de la proteína. En algunas realizaciones, la lipasa es endógena a otro componente biológico en la preparación proteica, por ejemplo, un componente biológico que comprende una proteína estabilizadora añadida a la preparación proteica.

En algunas realizaciones, las lipasas son producidas por células en un cultivo celular. En algunas realizaciones, las lipasas

son producidas por células en un cultivo celular para la producción de una proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células adecuadas para la producción de una proteína de interés incluyen células bacterianas, de insectos, de levaduras, de mamíferos y/o transgénicas. Ejemplos no limitantes de líneas celulares incluyen CHO, HEK 293, HT-1080, PER.C6, CAP, VERO, BHK, HeLa, CV1, Cos, MDCK, 3T3, NS0, NS1, PC12, W138, Sp2/0, HKB-11, TM4, MMT 060562, TR1, MRC 5, FS4, líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y líneas celulares de hepatoma. En algunas realizaciones, la línea celular para producir la proteína de interés es una línea celular estable, por ejemplo, donde el gen de la proteína de interés está integrado de forma estable en el genoma de la célula. En algunas realizaciones, la línea celular para producir la proteína de interés es una línea celular transitoria, por ejemplo, donde las células expresan, pero no integran el gen en el genoma.

En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, la proteína de interés se purifica a partir del cultivo celular para generar una preparación proteica purificada. En algunas realizaciones, las lipasas del cultivo celular no se eliminan completamente de la preparación proteica durante el proceso de purificación. Así, en algunas realizaciones, una lipasa está presente en una preparación proteica purificada.

Tal como se menciona en el presente documento, las lipasas "activas" son lipasas capaces de realizar lipólisis (también referidas en el presente documento como que tienen "actividad lipolítica"). Las lipasas activas presentes en una preparación proteica pueden interferir con los procesos corriente abajo que involucran la proteína de interés, por ejemplo, la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, una preparación proteica que comprende una proteína de interés, por ejemplo, una proteína terapéutica, y una lipasa se incluye en una formulación farmacéutica. En algunas realizaciones, el excipiente se añade al preparación proteica. En algunas realizaciones, el excipiente estabiliza la preparación proteica, por ejemplo, minimizando la tensión interfacial, reduciendo la agregación proteica y/o mejorando la solubilidad de la proteína. En algunas realizaciones, el excipiente es un tensioactivo. En algunas realizaciones, el excipiente comprende un ácido graso, un éster o ambos. En algunas realizaciones, el excipiente es propenso a la hidrólisis por una lipasa activa. En algunas realizaciones, la presencia de una lipasa activa en una preparación proteica que comprende la proteína de interés y el excipiente reduce la estabilidad de la preparación. Por lo tanto, es ventajoso detectar de forma fiable la actividad lipolítica en una preparación proteica, con el fin de minimizar los impactos negativos, tales como el aumento de partículas, los problemas de seguridad (debido a, por ejemplo, el aumento de las reacciones en el lugar de inyección) y la disminución de la calidad, causados por la hidrólisis lipasa de los excipientes.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones en las que puede detectarse la actividad lipolítica en una preparación proteica.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende (a) una muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica; y (b) un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0; y donde la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 98 % de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % de la composición.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende (a) una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación proteica purificada, (ii) un agente amortiguador, y (iii) una sal; y (b) un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0; y en donde la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 98 % (v/v) de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % (v/v) de la composición.

En aún otras realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende (a) aproximadamente 90 % a aproximadamente 98 % (v/v) de una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación proteica purificada, (ii) un agente amortiguador, (iii) aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 20 mM de cloruro de calcio, y (iv) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y b) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % (v/v) de un disolvente orgánico seleccionado entre metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, isobutanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, que comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.

Tal como se utiliza en el presente documento, "acuoso" (por ejemplo, muestra de ensayo acuosa) se refiere a una solución o muestra en la que el agua es el disolvente. Así, las muestras de ensayo acuosas de la presente divulgación pueden incluir, por ejemplo, medios de cultivo celular, soluciones amortiguadoras, muestras de proteínas y similares. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa de la presente divulgación comprende una preparación proteica.

En algunas realizaciones, la preparación proteica es un sobrenadante de cultivo celular. En el presente documento se describen sobrenadantes de cultivos celulares que pueden obtenerse, por ejemplo, de un cultivo celular para producir una proteína de interés. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, se produce un sobrenadante de cultivo celular después de lisar las células cultivadas y separar los componentes solubles e insolubles, por ejemplo, por centrifugación. En el presente documento se proporcionan ejemplos de células y líneas celulares adecuadas para el cultivo y la producción de proteínas. En algunas realizaciones, el sobrenadante del cultivo celular comprende una proteína de interés, por ejemplo, una proteína terapéutica, y componentes adicionales de la célula

huésped. En algunas realizaciones, los componentes adicionales de la célula huésped comprenden proteínas adicionales de la célula huésped. En algunas realizaciones, las proteínas adicionales de la célula huésped comprenden una lipasa. En algunas realizaciones, la lipasa tiene actividad lipolítica.

5 En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica parcialmente purificada. En el presente documento se describen preparaciones de proteínas parcialmente purificadas que pueden obtenerse, por ejemplo, después de someterse a un procedimiento de purificación parcial (por ejemplo, un proceso de purificación descrito en el presente documento) de una proteína de interés a partir de un cultivo celular. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, una preparación proteica parcialmente purificada ha sido sometida a pasos
10 de purificación adicionales en comparación con un sobrenadante de cultivo celular. En algunas realizaciones, una preparación proteica parcialmente purificada comprende una proteína terapéutica y componentes adicionales de la célula huésped. En algunas realizaciones, los componentes de la célula huésped comprenden proteínas de la célula huésped. En algunas realizaciones, las proteínas de la célula huésped comprenden una lipasa. En algunas realizaciones, la lipasa tiene actividad lipolítica. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es del 20 % al 95 % (p/p), 30 % al 90 % (p/p) o
15 40 % al 80 % (p/p) de todas las proteínas de la preparación proteica parcialmente purificada.

En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica purificada. Las preparaciones proteicas purificadas se describen en el presente documento y pueden obtenerse, por ejemplo, después de someterse a un procedimiento de purificación (por ejemplo, un proceso de purificación descrito en el presente documento) de una proteína de interés a partir de un cultivo celular. En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, una preparación proteica purificada una proteína terapéutica y componentes adicionales de la célula huésped. En algunas realizaciones, los componentes de la célula huésped comprenden proteínas de la célula huésped. En algunas realizaciones, las proteínas de la célula huésped comprenden una lipasa. En algunas realizaciones, la lipasa tiene actividad lipolítica. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es superior al 70 % (p/p), superior al
20 80 % (p/p), superior al 85 % (p/p), superior al 90 % (p/p), superior al 95 % (p/p) o superior al 99 % (p/p) de todas las proteínas en la preparación proteica purificada.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende una proteína terapéutica. Ejemplos no limitativos de proteínas terapéuticas incluyen anticuerpos (tales como anticuerpos monoclonales o policlonales) y fragmentos de anticuerpos; vacunas basadas en proteínas (tales como, por ejemplo, antígeno de superficie de la hepatitis B); factores sanguíneos (tales como, por ejemplo, Factor VIII y Factor IX); agentes trombolíticos (tales como, por ejemplo, activador tisular del plasminógeno); hormonas (tales como, por ejemplo, insulina, glucagón, hormona del crecimiento y gonadotropina); factores de crecimiento hematopoyético (tales como la eritropoyetina y los factores estimulantes de colonias); interferones (tales como el interferón- α , el interferón- β y el interferón- γ); proteínas basadas en interleucinas (tales como la interleucina-12); y otras proteínas tales como el factor de necrosis tumoral y las enzimas terapéuticas. Otros ejemplos de terapias basadas en proteínas incluyen belimumab, ipilimumab, belatacept, brentuximab vedotin, aflibercept, asparaginasa erwinia chrysanthemi, glucaripidasa, obinutuzumab, pembrolizumab, blinatumomab, nivolumab, idarucizumab, asofatasa alfa, daratumumab, elotuzumab, sebelipasa alfa, atezolizumab, taliglucerasa alfa, raxibacumab, elosulfasa alfa, metreleptina, ramucirumab, siltuximab, pembrolizumab, dinutuximab, evolocumab, necitumumab, obiltoximab, abatacept, adalimumab, alefacept, etanercept, infliximab, trastuzumab, ustekinumab, denileukin diftitox y golimumab. Otros ejemplos de terapias proteicas se describen en, por ejemplo, Dimitrov, *Methods Mol Biol* 899: 1-26 (2012), Lagassé et al., *F1000Res* 6: 113 (2017), y *Protein Therapeutics*, Eds: Vaughan et al., 2017: Wiley-VCH Verlag. Las proteínas terapéuticas pueden incluir proteínas recombinantes, proteínas modificadas y proteínas de fusión, tales como, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco, fusiones anticuerpo-citoquina, fusiones Fc, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, fusiones afibody, proteínas y péptidos glicosilados y antagonistas de receptores diseñados. En algunas realizaciones, la preparación proteica que comprende la proteína terapéutica se utiliza en una formulación farmacéutica.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende una proteína comercialmente importante, por ejemplo, una enzima industrial. Las proteínas de importancia comercial pueden utilizarse en diversas industrias, tales como la farmacéutica, la de producción química, la de biocombustibles, la de alimentos y bebidas y la de productos de consumo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la preparación proteica es una enzima utilizada dentro de un proceso para generar un producto deseado o puede ser el producto de interés. En algunas realizaciones, la proteína de importancia comercial se utiliza en las industrias alimentaria, de síntesis farmacéutica, de biocombustibles, química o manufacturera. En algunas realizaciones, la enzima industrial incluye, pero no se limita a, la lipozima palatasa, el lipopan, la xilosa isomerasa, la bromelina y la noopazima (utilizadas en la industria alimentaria), la celulasa y la amilasa (utilizadas en la industria de los biocombustibles), la resinasas (utilizada en la industria de transformación del papel), la amidasa (utilizada en la industria química), la novozima-435 (utilizada en la producción cosmética de miristato de isopropilo) o la subtilisina (utilizada en detergentes).

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende un excipiente farmacéutico. Los excipientes farmacéuticos se incluyen, por ejemplo, para ayudar en el procesamiento del sistema de administración del fármaco antes, durante o después de la fabricación; para proteger, apoyar o mejorar la estabilidad, biodisponibilidad o aceptabilidad del paciente; para ayudar en la identificación del producto y mejorar la seguridad general; para ayudar en la eficacia y/o administración del fármaco en uso; y/o para ayudar a mantener la integridad del fármaco durante el almacenamiento. Ejemplos no limitativos de excipientes farmacéuticos incluyen tensioactivos, cargas, diluyentes, aglutinantes, agentes de suspensión,

agentes de viscosidad, recubrimientos, agentes aromatizantes, desintegrantes, colorantes, lubricantes, deslizantes, conservantes, edulcorantes y similares. En algunas realizaciones, el excipiente farmacéutico se añade a la preparación proteica. En algunas realizaciones, el excipiente farmacéutico se añade a la preparación proteica antes, después o durante la purificación.

En algunas realizaciones, el excipiente farmacéutico es un tensioactivo. Tal como se utiliza en el presente documento, "tensioactivo" se refiere a un agente que disminuye la tensión superficial o la tensión interfacial entre dos líquidos. En algunas realizaciones, los tensioactivos pueden estabilizar una composición, p. ej., una preparación proteica descrita en el presente documento, minimizando la agregación y/o precipitación y/o mejorando la solubilidad (p. ej., reduciendo la tensión superficial e inhibiendo la adsorción superficial de proteínas; véase, p. ej., Agarkhed et al., AAPS PharmSciTech 14:1-9 (2013)) de uno o más componentes de la composición. Los tensioactivos en composiciones farmacéuticas también pueden modular la biodisponibilidad de un ingrediente activo farmacéutico (API por sus siglas en inglés); ayudar al API a mantener una forma polimórfica preferida; prevenir la agregación o disociación; y/o modular las respuestas inmunogénicas de los principios activos. Los tensioactivos pueden ser catiónicos, aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos, anfóteros y/o anfófilos. Ejemplos no limitativos de tensioactivos incluyen polisorbatos (p. ej., tensioactivos TWEEN tales como TWEEN 20 y TWEEN 80, que también se conocen como polisorbato 20, polisorbato 80, respectivamente) derivados de sorbitanos etoxilados esterificados con ácidos grasos (p. ej., ácido láurico en polisorbato 20 y ácido oleico en polisorbato 80); tiloxapoles; poloxámeros (p. ej., PLURONIC F68LF, PLURONIC L-G2LF, PLURONIC L62D, LUTROL F68 y KOLLIPHOR P188); aceite de ricino polioxi-etilenado (por ejemplo, KOLLIPHOR EL) y derivados de los mismos; ésteres de sorbitán, también conocidos como Spans; estearatos de polioxilo; lecitinas; fosfolípidos; tensioactivos de polioxi-etileno tales como, por ejemplo, TRITON (p. ej., TRITON X-100) y BRIJ (p. ej., BRIJ 35); y ácidos grasos polietoxilados tales como, p. ej., MYRJ S40, MYRJ S100 y MYRJ 52.

En algunas realizaciones, el tensioactivo comprende un ácido graso. En algunas realizaciones, el tensioactivo comprende un éster. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un polisorbato. Los polisorbatos son una clase de compuestos derivados de sorbitanos etoxilados esterificados con ácidos grasos e incluyen, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, polisorbato 21, polisorbato 61, polisorbato 65 y polisorbato 81. En algunas realizaciones, la preparación proteica proporcionada en el presente documento incluye un polisorbato. En algunas realizaciones, el polisorbato de la preparación proteica es polisorbato 20, polisorbato 80 o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,001 % p/v a aproximadamente 2 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,005 % p/v a aproximadamente 2 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,01 % p/v a aproximadamente 2 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 1,5 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 1,0 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 0,8 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,6 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 0,4 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 0,2 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 0,15 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 0,10 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,04 % p/v de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un polisorbato. En algunas realizaciones, el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80 o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende además una o más proteínas adicionales de la célula huésped. Como se describe en el presente documento, la preparación proteica se prepara a partir de un cultivo celular, es decir, que comprende células huésped de la proteína de interés, por ejemplo, una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, la preparación proteica incluye una o más proteínas adicionales de la célula huésped. En algunas realizaciones, las proteínas adicionales de la célula huésped son solubles sustancialmente las mismas condiciones que la proteína de interés, por ejemplo, la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, las proteínas adicionales de la célula huésped no son fácilmente separables de la proteína de interés, por ejemplo, la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, las proteínas adicionales de la célula huésped comprenden una lipasa. En algunas realizaciones, una o más de las proteínas adicionales de la célula huésped tienen actividad lipolítica.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa que comprende la preparación proteica comprende además un agente amortiguador, una sal, o ambos. En general, una sal de la presente divulgación se refiere a un compuesto iónico cuyo anión no es OH^- y O^{2-} . En algunas realizaciones, la sal reduce y/o previene la degradación de uno o más componentes de la composición. Las sales adecuadas que pueden incluirse en las muestras de ensayo acuosas pueden ser seleccionadas por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de amonio y similares. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), carbonato de sodio (Na_2CO_3), sulfato de sodio (Na_2SO_4), cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de amonio (NH_4Cl), acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), o combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la sal es NaCl, CaCl_2 , o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la sal es tanto NaCl como CaCl_2 .

- En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en la muestra de ensayo acuosa facilita la detección precisa y/o eficaz de la actividad lipolítica en la muestra. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 400 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, o 200 mM en el amortiguador de ensayo acuoso.
- En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM en la composición final (muestra de ensayo acuosa y disolvente orgánico). En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 400 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 140 mM, por ejemplo, 120 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el NaCl es aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, o 200 mM en la composición final.
- En algunas realizaciones, la concentración de CaCl_2 en la muestra de ensayo acuosa facilita la detección precisa y/o eficiente de la actividad lipolítica en la muestra. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5,0 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 3,0 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 0,6 mM, aproximadamente 0,7 mM, aproximadamente 0,8 mM, aproximadamente 0,9 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 1,1 mM, aproximadamente 1,2 mM, aproximadamente 1,3 mM, aproximadamente 1,5 mM, aproximadamente 1,6 mM, aproximadamente 1,7 mM, aproximadamente 1,8 mM, aproximadamente 1,9 mM, aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 3,5 mM, aproximadamente 4,0 mM, aproximadamente 4,5 mM, o aproximadamente 5,0 mM en la muestra de ensayo acuosa.
- En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM en la composición final (muestra de ensayo acuosa y disolvente orgánico). En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5,0 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 3,0 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 0,6 mM, aproximadamente 0,7 mM, aproximadamente 0,8 mM, aproximadamente 0,9 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 1,1 mM, aproximadamente 1,2 mM, aproximadamente 1,3 mM, aproximadamente 1,5 mM, aproximadamente 1,6 mM, aproximadamente 1,7 mM, aproximadamente 1,8 mM, aproximadamente 1,9 mM, aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 3,5 mM, aproximadamente 4,0 mM, aproximadamente 4,5 mM, o aproximadamente 5,0 mM en la composición final.
- En algunas realizaciones, el NaCl y el CaCl_2 reducen y/o previenen la degradación de uno o más componentes en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl y el CaCl_2 reducen y/o previenen la agregación y/o precipitación de la proteína, por ejemplo, la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, el NaCl y el CaCl_2 reducen y/o previenen la degradación de uno o más componentes de la composición que no se encuentra en la muestra de ensayo acuosa, por ejemplo, en el disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el NaCl y el CaCl_2 reducen y/o previenen la autohidrólisis del oleato de 4-metilumbelifeilo (4MuO). En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, y el CaCl_2 es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 400 mM, y el CaCl_2 es de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, y el CaCl_2 es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5,0 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250 mM, y el CaCl_2 es de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 3,0 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, y el CaCl_2 es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 150 mM y el CaCl_2 es de aproximadamente 0,3 mM

en la muestra de ensayo acuosa.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "agente amortiguador" se refiere a una sustancia utilizada en una solución para mantener el pH de la solución. Los agentes amortiguadores pueden mantener una solución en un determinado intervalo de pH (es decir, la capacidad amortiguadora en un intervalo dado) y prevenir un cambio rápido del pH cuando se añaden componentes adicionales a la solución. En general, un agente amortiguador puede ser un ácido débil o una base débil. En algunas realizaciones, el agente amortiguador tiene una capacidad amortiguadora a aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 7,0. Los agentes amortiguadores con capacidad amortiguadora de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0 incluyen, por ejemplo, citrato, acetato, fosfato, MES, Bis-Tris, ADA, ACES, PIPES, MOPSO, Bis-Tris propano, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, MOBS, TAPSO y Tris. La capacidad amortiguadora de un agente amortiguador puede ser determinada por el experto en la materia. En algunas realizaciones, el agente amortiguador en la muestra de ensayo acuosa facilita la detección precisa y/o eficiente de la actividad lipolítica en la muestra. En algunas realizaciones, el agente amortiguador reduce y/o previene la degradación de uno o más componentes de la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador reduce y/o previene la agregación de la proteína, por ejemplo, la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, el agente amortiguador reduce y/o previene la degradación de uno o más componentes en la composición que no se encuentra en la muestra de ensayo acuosa, por ejemplo, en el disolvente orgánico de la composición. En algunas realizaciones, el agente amortiguador reduce y/o previene la autohidrólisis del oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO). En algunas realizaciones, el agente amortiguador se proporciona en la muestra de ensayo acuosa como una solución amortiguadora acuosa.

En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 38 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 42 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 48 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 52 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 58 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 62 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 68 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 72 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 78 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 82 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 88 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 92 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 98 mM, o aproximadamente 100 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Bis-Tris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Tris.

En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM en la composición final (muestra de ensayo acuosa y disolvente orgánico). En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM en la composición final (muestra de ensayo acuosa y disolvente orgánico). En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM en la composición final. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 38 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 42 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 48 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 52 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 58 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 62 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 68 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 72 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 78 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 82 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 88 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 92 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 98 mM, o aproximadamente 100 mM en la composición final.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa comprende NaCl, CaCl₂ y un agente amortiguador. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, el CaCl₂ es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, y el agente amortiguador es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 400 mM, el CaCl₂ es de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM, y el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, el CaCl₂ es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5,0 mM, y el agente amortiguador es de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 8 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 250

mM, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 3,0 mM, y el agente amortiguador es de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, el CaCl_2 es de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM, y el agente amortiguador es de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el NaCl es de aproximadamente 150 mM, el CaCl_2 es de aproximadamente 0,3 mM y el agente amortiguador es de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 55 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Bis-Tris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Tris. Un experto en la materia reconocerá que las sales y los amortiguadores se encuentran comúnmente en una preparación proteica y por lo tanto los porcentajes anteriores se proporcionan sólo a modo de ejemplo.

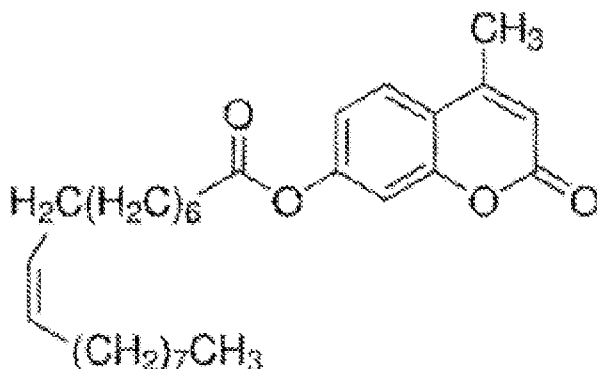
En algunas realizaciones, el pH de la muestra de ensayo acuosa se ajusta para maximizar la intensidad de fluorescencia del 4Mu. En algunas realizaciones, el pH de la muestra de ensayo acuosa se ajusta para estabilizar uno o más componentes de la muestra de ensayo acuosa y/o del disolvente orgánico. En algunas realizaciones, un pH de ligeramente ácido a neutro (por ejemplo, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0) minimiza la degradación de los componentes en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, un pH de ligeramente ácido a neutro (por ejemplo, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0) minimiza la agregación de la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, un pH de ligeramente ácido a neutro (por ejemplo, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0) minimiza la autohidrólisis del oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO).

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa tiene un pH ácido. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, o aproximadamente 7,0.

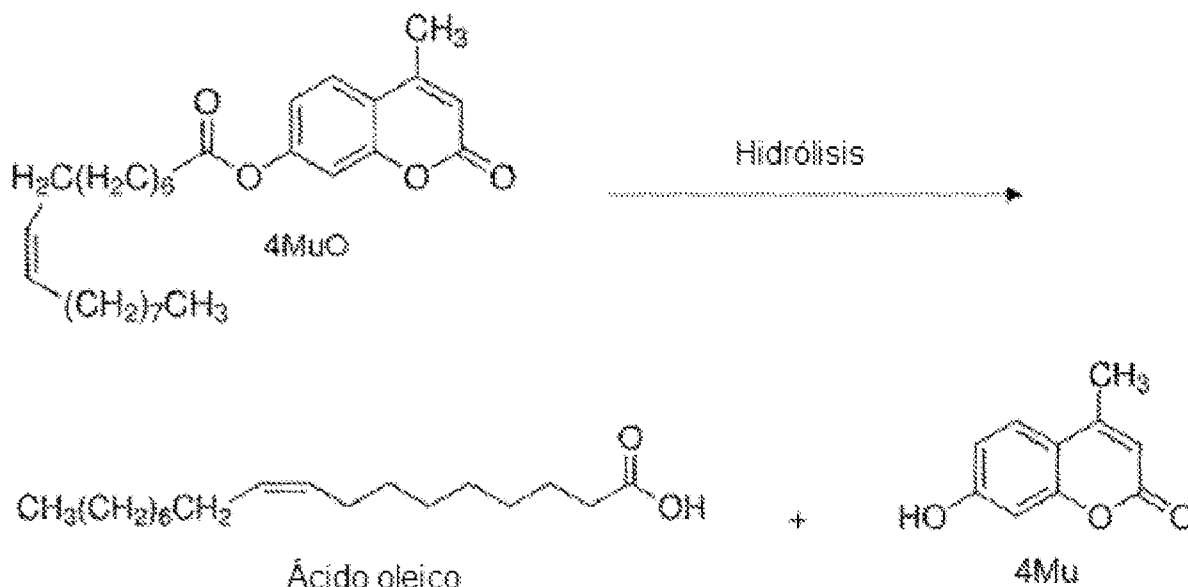
En algunas realizaciones, la composición de la presente divulgación comprende una muestra de ensayo acuosa como se describe en el presente documento, y un disolvente orgánico. Tal y como se utiliza en el presente documento, "disolvente orgánico" se refiere a una sustancia a base de carbono que puede utilizarse para disolver uno o más solutos. Ejemplos de disolventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos que incluyen, por ejemplo, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos cíclicos, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos halogenados; cetonas; aminas; ésteres; alcoholes; aldehídos; éteres; nitrilos; sulfóxidos; y similares. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es capaz de solubilizar el oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO).

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende un alcohol, un sulfóxido, un nitrilo o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO). En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende acetonitrilo (ACN). En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende un alcohol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol $\text{C}_1\text{-C}_6$. En algunas realizaciones, el alcohol $\text{C}_1\text{-C}_6$ es metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, ter-butanol, pentanol o hexanol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, ter-butanol, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende una mezcla de acetonitrilo y un alcohol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende una mezcla de acetonitrilo e isopropanol. En algunas realizaciones, el acetonitrilo y el iso-propanol se mezclan en una proporción de aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones, el oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO) está presente en el disolvente orgánico. 4MuO tiene la estructura:



En algunas realizaciones, 4MuO se hidroliza para formar ácido oleico y 4-metilumbeliferona (4Mu) (Esquema I):



5 Esquema I

En algunas realizaciones, 4MuO no es fluorescente. En algunas realizaciones, el 4Mu es fluorescente. En algunas realizaciones, la fluorescencia de 4Mu se utiliza para detectar la hidrólisis de 4MuO por una lipasa, y por lo tanto es un indicador de la actividad lipolítica. El experto entenderá que la hidrólisis de 4MuO (medida por la fluorescencia de 4Mu) probablemente indicará que se ha producido actividad lipolítica en la preparación proteica, es decir, que los tensioactivos pueden haberse hidrolizado, lo que posiblemente haría inestable la preparación proteica. En algunas realizaciones, la fluorescencia del 4Mu puede medirse a una longitud de onda de excitación de aproximadamente 330 nm y a una longitud de onda de emisión de aproximadamente 495 nm. En algunas realizaciones, la fluorescencia del 4Mu puede medirse a una longitud de onda de excitación de aproximadamente 327 nm y a una longitud de onda de emisión de aproximadamente 449 nm. En algunas realizaciones, la fluorescencia del 4Mu puede medirse a una longitud de onda de excitación de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 350 nm y a una longitud de onda de emisión de aproximadamente 420 nm a aproximadamente 500 nm. En algunas realizaciones, los parámetros de medida de fluorescencia del 4Mu (por ejemplo, las longitudes de onda de excitación y emisión) varían cuando se modifica el pH. En algunas realizaciones, los parámetros de medida de fluorescencia de 4Mu varían cuando se cambia la concentración de sal y/o de agente amortiguador. En algunas realizaciones, el 4MuO es un sustrato para una lipasa. En algunas realizaciones, el 4MuO es hidrolizado por una lipasa en la preparación proteica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la formación de 4Mu se mide por fluorescencia. En algunas realizaciones, la actividad lipolítica de una muestra de ensayo que comprende una preparación proteica descrita en el presente documento se mide por la fluorescencia de 4Mu.

Se pueden utilizar varias concentraciones de 4MuO en las composiciones y métodos descritos en el presente documento. En general, la cantidad de 4MuO debe reducirse al mínimo para minimizar el efecto de la autohidrólisis. En algunas realizaciones, el 4MuO en el disolvente orgánico es de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 500 μ M, o de aproximadamente 20 μ M a aproximadamente 200 μ M, o de aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 150 μ M, o de aproximadamente 75 μ M a aproximadamente 125 μ M, o de aproximadamente 100 μ M.

En algunas realizaciones, la composición comprende la muestra de ensayo acuosa que comprende la preparación proteica como se describe en el presente documento; y el disolvente orgánico comprende 4MuO como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición no comprende un volumen igual de la muestra de ensayo acuosa y del disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la cantidad de disolvente orgánico en la composición es menor que la cantidad de amortiguador de ensayo acuoso en la composición, con el fin de minimizar los efectos potencialmente adversos del disolvente orgánico en la preparación proteica, en particular la proteína terapéutica. Por ejemplo, si la cantidad de disolvente orgánico es demasiado alta, la proteína terapéutica puede agregarse. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99,9 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 30 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99,5 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 30 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 75 % a

- aproximadamente 99 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 80 % a aproximadamente 98 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 90 % a aproximadamente 98 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 95 % a aproximadamente 98 % en volumen de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 % en volumen de la composición.
- En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es de aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 99,1 %, aproximadamente 99,2 %, aproximadamente 99,3 %, aproximadamente 99,4 %, aproximadamente 99,5 %, aproximadamente 99,6 %, aproximadamente 99,7 %, aproximadamente 99,8 % o aproximadamente 99,9 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, la preparación proteica es de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 %, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 %, o de aproximadamente 80 % a aproximadamente 85 % en volumen de la composición, y los componentes de la preparación no proteica de la muestra de ensayo acuosa, por ejemplo, el agente amortiguador y/o la sal, comprenden de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 % en volumen de la composición. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, o aproximadamente 50 % en volumen de la composición. Un experto en la materia reconocerá que las sales y los amortiguadores se encuentran comúnmente en una preparación proteica, por lo que los porcentajes anteriores se utilizan sólo a modo de ejemplo.
- En algunas realizaciones, la composición comprende además un inhibidor de lipasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa reduce o suprime la actividad lipolítica en la composición mediante la inactivación de una lipasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se incluye en la composición para proporcionar un control negativo para la detección de la actividad lipolítica, es decir, no se espera que una composición que comprende un inhibidor de la lipasa tenga actividad lipolítica. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se añade a la composición después de detectar la actividad lipolítica, por ejemplo, midiendo la fluorescencia de 4Mu. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se encuentra en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es soluble en agua. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se encuentra en el disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa no es soluble en agua.
- En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa está a una concentración suficiente para reducir o abolir la actividad lipolítica en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa se encuentra a una concentración suficiente para reducir la actividad lipolítica en la composición en aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 %. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 50 μ M en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 40 μ M en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 3 μ M a aproximadamente 35 μ M en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 4 μ M a aproximadamente 30 μ M en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 25 μ M en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 2 μ M, aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 4 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 6 μ M, aproximadamente 7 μ M, aproximadamente 8 μ M, aproximadamente 9 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 11 μ M, aproximadamente 12 μ M, aproximadamente 13 μ M, aproximadamente 14 μ M, aproximadamente 15 μ M, aproximadamente 16 μ M, aproximadamente 17 μ M, aproximadamente 18 μ M, aproximadamente 19 μ M, aproximadamente 20 μ M, aproximadamente 21 μ M, aproximadamente 22 μ M, aproximadamente 23 μ M, aproximadamente 24 μ M, aproximadamente 25 μ M, aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 35 μ M, aproximadamente 40 μ M, aproximadamente 45 μ M, o aproximadamente 50 μ M en la composición.
- En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es el éster (S)-1-[(2S,3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanyl]metil]-dodecil del ácido (S)-2-formilamino-4-metil-pentanoico (orlistat). En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es un alcaloide, por ejemplo, cafeína, teofilina y teobromina. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es un carotenoide tal como,

- por ejemplo, la fucoxantina. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es un glucósido, por ejemplo, acteósido, kaempferol-3-O-rutinósido, rutina, kaempferol, quercetina y luteolina. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es un polifenol, por ejemplo, galangina, hesperidina, licohalcona A, CT-II, 7-floroeckol e isoliquiritigenina. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es una saponina, por ejemplo, sessilósida y chiianosida. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es un terpeno, por ejemplo, crocina y crocetina. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa se deriva de bacterias, por ejemplo, lipstatin, valilactone, percyquinnin, panclicin, ebelactone, vibrallactone, y esterastin. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es un inhibidor sintético de la lipasa, por ejemplo, análogos sintéticos de grasas naturales. Los inhibidores de la lipasa se revisan en Lunagariya yet al., EXCLI J 13: 897-921 (2014).
- En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende: (a) de aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 % (vol/vol) de una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación de proteína purificada que comprende una proteína y un lípido; (ii) un agente amortiguador; (iii) de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM de cloruro de calcio; y (iv) de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y (b) de aproximadamente 10 % a aproximadamente 0,1 % (vol/vol) de un disolvente orgánico seleccionado de metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, comprendiendo además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.
- En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende: (a) de aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 % (vol/vol) de una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación de proteína purificada que comprende una proteína y un tensioactivo de polisorbato; (ii) un agente amortiguador; (iii) de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM de cloruro de calcio; y (iv) de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y (b) de aproximadamente 10 % a aproximadamente 0,1 % (vol/vol) de un disolvente orgánico seleccionado de metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, comprendiendo además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.
- En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende: (a) aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 % (vol/vol) de una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) una preparación de proteína parcialmente purificada que comprende una proteína y un lípido; (ii) un agente amortiguador; (iii) aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM de cloruro de calcio; y (iv) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y (b) aproximadamente 10 % a aproximadamente 0,1 % (vol/vol) de un disolvente orgánico seleccionado entre metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, que comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.
- En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende: (a) aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 % (vol/vol) de una muestra de ensayo acuosa que comprende (i) un sobrenadante de cultivo celular que comprende una proteína y un lípido; (ii) un agente amortiguador; (iii) aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM de cloruro de calcio; y (iv) aproximadamente 101 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y (b) aproximadamente 10 % a aproximadamente 0,1 % (vol/vol) de un disolvente orgánico seleccionado entre metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, que comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.
- En realizaciones adicionales, las composiciones proporcionadas en el presente documento son adecuadas para ser utilizadas en un método para detectar la actividad lipolítica en una preparación proteica. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona además métodos para detectar la actividad lipolítica en una muestra de ensayo acuosa.
- En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de detección de la actividad lipolítica en una muestra de ensayo acuosa, comprendiendo el método (a) combinar la muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); y (b) medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona (4Mu) por fluorescencia.
- En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa es una muestra de ensayo acuosa descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.
- En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa comprende además un agente amortiguador, una sal, o ambos, como se describe en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento ejemplos de agentes amortiguadores y sales y concentraciones de los mismos adecuados para los presentes métodos. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂), o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio y cloruro de calcio. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 400 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el cloruro de calcio es de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el cloruro de calcio es de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0

mM en la muestra de ensayo acuosa.

En algunas realizaciones, el agente amortiguador tiene una capacidad amortiguadora a aproximadamente pH 6,0. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Tris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Bis-Tris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM en la muestra de ensayo acuosa. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 55 mM en la muestra de ensayo acuosa.

En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la preparación proteica es un sobrenadante de cultivo celular. En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica parcialmente purificada. En algunas realizaciones, la preparación proteica es una preparación proteica purificada. En el presente documento se describen preparaciones proteicas purificadas en diversos grados, por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular, preparación proteica parcialmente purificada y preparación proteica purificada. En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende una proteína terapéutica, por ejemplo, una proteína terapéutica descrita en el presente documento. Los métodos de la presente divulgación permiten ventajosamente una determinación sencilla y eficaz de la actividad lipolítica en una preparación proteica a lo largo de todo el proceso de purificación de la misma. Por ejemplo, la actividad lipolítica de un sobrenadante de cultivo celular (o producto de un proceso de purificación posterior) puede medirse utilizando los presentes métodos para determinar si es necesario eliminar las lipasas durante los pasos de purificación posteriores. Ventajosamente, los presentes métodos pueden utilizarse en los productos a lo largo del proceso de purificación con el fin de determinar si la actividad lipolítica de la preparación proteica se ha suprimido correctamente.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende proteínas adicionales de la célula huésped. En algunas realizaciones, las proteínas adicionales de la célula huésped comprenden una lipasa. Las lipasas se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la preparación proteica comprende un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un polisorbato. En algunas realizaciones, el polisorbato es polisorbato 20, polisorbato 80 o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un disolvente orgánico descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol, un sulfóxido, un nitrilo o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO). En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende acetonitrilo. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende un alcohol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol C₁-C₆. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, ter-butanol, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende una mezcla de acetonitrilo e isopropanol. En algunas realizaciones, el acetonitrilo y el isopropanol se mezclan en una proporción de aproximadamente 3:1.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO). En el presente documento se proporciona la estructura de 4MuO. En algunas realizaciones, 4MuO se hidroliza para formar ácido oleico y 4-metilumbeliferona (4Mu), como se describe, por ejemplo, en el Esquema I. La estructura de 4Mu se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, el 4Mu es fluorescente. En algunas realizaciones, la fluorescencia de 4Mu se mide a aproximadamente 330 nm de excitación y 495 nm de emisión.

En algunas realizaciones, el método comprende medir la fluorescencia durante un máximo de 24 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 400 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante más de aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante más de aproximadamente 100 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide durante más de aproximadamente 300 horas. Debe entenderse que la medición de la fluorescencia no es necesariamente una medición continua, y que la fluorescencia puede medirse en puntos temporales predeterminados. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide en puntos temporales seleccionados entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 400 horas. En algunas realizaciones, la fluorescencia se mide en un punto de tiempo de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 120 horas, aproximadamente 144 horas, aproximadamente 168 horas, aproximadamente 192 horas, aproximadamente 216 horas, aproximadamente 240 horas, aproximadamente 264 horas, aproximadamente 288 horas, aproximadamente 312 horas, aproximadamente 336 horas, aproximadamente 360 horas, aproximadamente 384 horas, o aproximadamente 400 horas. El período de tiempo durante el que se mide la fluorescencia puede elegirse en función del nivel de actividad de la lipasa en la preparación proteica. Por ejemplo, los niveles bajos de actividad lipolítica pueden requerir un período de detección más largo debido a la hidrólisis más lenta del 4MuO.

En algunas realizaciones, una preparación proteica que comprende una proteína terapéutica se purifica, luego se almacena durante un período de tiempo (p. ej., durante menos de 4 horas, menos de 8 horas, menos de 1 día, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente

5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana, más de 1 semana, aproximadamente 2 semanas, más de 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, más de 3 semanas, aproximadamente 1 mes, más de 1 mes, aproximadamente 2 meses, más de 2 meses, aproximadamente 3 meses o más de 3 meses). A continuación, la preparación proteica se somete al presente método para detectar la actividad lipolítica.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 99:1. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 99:1. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 98:2. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 85:15 a aproximadamente 98:2. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 98:2. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y el disolvente orgánico se combinan en una proporción de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 98:2.

En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa se incuba con un inhibidor de lipasa durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora antes del paso (a), combinando la muestra de ensayo acuosa que comprende la preparación proteica y el disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa se incuba con un inhibidor de lipasa durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos, durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, o durante aproximadamente 30 minutos antes del paso (a). En algunas realizaciones, la incubación de la muestra de ensayo acuosa con un inhibidor de lipasa reduce o suprime la actividad lipolítica. En algunas realizaciones, la incubación de la muestra de ensayo acuosa con un inhibidor de lipasa proporciona un control negativo para la detección de la actividad lipolítica. En las realizaciones donde la muestra de ensayo acuosa se incuba con un inhibidor de lipasa antes del paso (a), se espera que la fluorescencia medida sea baja, es decir, que indique una actividad lipolítica baja o nula. En el presente documento se describen los inhibidores de la lipasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es éster (S)-1-[(2S,3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanil]metil]-dodecil del ácido (S)-2-formilamino-4-metil-pentanoico (orlistat). En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 50 μ M en la composición. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 25 μ M en la composición.

En algunas realizaciones, una muestra de control se mide en paralelo con una muestra de ensayo acuosa para la actividad lipolítica. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para detectar la actividad lipolítica en una muestra de ensayo acuosa, el método comprende (a) combinar la muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica, con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO) para formar una composición de ensayo; (b) combinar una muestra de control que comprende una preparación proteica y un inhibidor de lipasa, con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO) para formar una composición de control; y (c) medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona (4Mu) por fluorescencia en la composición de ensayo y en la composición de control. En algunas realizaciones, la preparación proteica de (a) y la preparación proteica de (b) se obtienen de la misma preparación proteica. Por ejemplo, se obtiene una preparación proteica de un cultivo celular del que pueden extraerse dos alícuotas. Una alícuota puede ser la preparación proteica de la muestra de ensayo acuosa, y la otra alícuota puede ser la preparación proteica de la muestra de control. En algunas realizaciones, la preparación proteica de (a) y la preparación proteica de (b) comprenden sustancialmente los mismos componentes. En algunas realizaciones, se espera que la preparación proteica de (a) y la preparación proteica de (b) tengan el mismo nivel de actividad lipolítica. En algunas realizaciones, la muestra de ensayo acuosa y la muestra de control tienen sustancialmente los mismos componentes, excepto por el inhibidor de lipasa en la muestra de control. En algunas realizaciones, la muestra de control que comprende el inhibidor de lipasa es una muestra de control negativo, es decir, no se espera detectar fluorescencia. En algunas realizaciones, el método utiliza además una muestra de control positivo, es decir, donde se espera fluorescencia. En algunas realizaciones, una muestra de control positivo comprende una cantidad conocida de 4Mu. En algunas realizaciones, una muestra de control positivo comprende una cantidad conocida de 4MuO y una cantidad conocida de una lipasa activa.

Como se discute en el presente documento, una lipasa que tiene actividad lipolítica puede interferir con los componentes de una preparación proteica. En algunas realizaciones, una lipasa que tiene actividad lipolítica hidroliza ácidos grasos y/o ésteres presentes en una preparación proteica. En algunas realizaciones, una lipasa que tiene actividad lipolítica hidroliza un tensioactivo presente en una preparación proteica. En algunas realizaciones, la hidrólisis del tensioactivo reduce la estabilidad del preparado proteico. Al medir la cantidad de actividad lipolítica utilizando los métodos proporcionados en el presente documento, se puede determinar el nivel de hidrólisis que se ha producido en la preparación proteica basándose en la cantidad medida de actividad lipolítica, determinando así la estabilidad de la preparación proteica. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para determinar la estabilidad de una preparación proteica, que comprende (a) combinar una muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); (b) medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona (4Mu) por fluorescencia; y (c) determinar la estabilidad de la preparación proteica basándose en la fluorescencia medida. Por ejemplo, el aumento de la fluorescencia, en relación con un control, indicaría la presencia de lipasas, lo que indicaría que los excipientes, por ejemplo, los tensioactivos tales como el polisorbato, se han hidrolizado, formando así ácidos grasos de cadena larga no polares y, por lo tanto, insolubles, que pueden desestabilizar la proteína en la preparación proteica. En algunas realizaciones, el método se utiliza para determinar la estabilidad de una preparación proteica para

una formulación farmacéutica.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona kits adecuados para proporcionar las composiciones de la presente invención. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un kit que puede utilizarse para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona además un kit que comprende, en dos o más recipientes: (a) un disolvente orgánico; (b) oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); y (c) un inhibidor de lipasa.

En los kits descritos en el presente documento puede utilizarse cualquier recipiente adecuado. En algunas realizaciones, el recipiente es un vial. En algunas realizaciones, el recipiente es una botella. En algunas realizaciones, cada recipiente es un compartimento de un recipiente multicompartimento. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico y el 4MuO están en un primer recipiente, y el inhibidor de lipasa está en un segundo recipiente. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico y el inhibidor de lipasa están en un primer recipiente, y el 4MuO está en un segundo recipiente. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa y el 4MuO están en un primer recipiente, y el disolvente orgánico está en un segundo recipiente. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa y el disolvente orgánico están en un primer recipiente, y el 4MuO y el disolvente orgánico están en un segundo recipiente. En algunas realizaciones, el 4MuO se proporciona como un sólido, por ejemplo, un polvo. En algunas realizaciones, el 4MuO se proporciona en solución, por ejemplo, en el disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa se proporciona como un sólido, por ejemplo, un polvo tal como un polvo liofilizado. En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa se proporciona en solución, por ejemplo, en el disolvente orgánico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el (a) un disolvente orgánico; (b) oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); y/o (c) un inhibidor de lipasa pueden incluirse en sus respectivos recipientes para recibir una cantidad específica predeterminada de preparación proteica, donde la cantidad de cada componente es suficiente para practicar el método de determinación de la actividad lipolítica descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para utilizar el kit para determinar la actividad lipolítica como en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el kit comprende además un agente amortiguador, una sal, o ambos. En el presente documento se describen agentes amortiguadores y sales adecuados. En algunas realizaciones, un usuario del kit proporciona una preparación proteica para usarse con el kit. En algunas realizaciones, la preparación proteica del usuario se encuentra en un amortiguador inadecuado para usarse con el kit, por ejemplo, un amortiguador que promueve la autohidrólisis del 4MuO y/o la degradación del inhibidor de lipasa. En algunas realizaciones, el kit proporciona una columna de intercambio de amortiguador. En algunas realizaciones, la columna de intercambio de amortiguador intercambia el amortiguador de la preparación proteica del usuario en un amortiguador adecuado para usarse con los kits proporcionados en el presente documento. Algunos ejemplos de columnas de intercambio de amortiguador son, pero no se limitan a, las columnas ZEBRA de THERMO FISHER, las columnas PD-10, SEPHADEX, HIPREP y HITRAP de GE HEALTHCARE, los concentradores VIVAFLOW y VIVASPIN de SARTORIUS, las columnas BIO-SPIN y ECONO de BIORAD y las columnas SPINOUT de G-BIOSCIENCES.

La columna del kit descrito en el presente documento puede utilizarse para intercambiar el sistema amortiguador. Las columnas utilizadas para este propósito son conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, la columna podría utilizarse para intercambiar el amortiguador en una preparación proteica por un amortiguador más adecuado para practicar los métodos de determinación de la actividad lipolítica descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un kit que comprende: (a) un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO); (b) una columna adecuada para intercambiar amortiguador de una preparación proteica; y (c) un inhibidor de lipasa.

Los disolventes orgánicos adecuados para los kits de la presente divulgación incluyen los disolventes orgánicos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol, un sulfóxido, un nitrilo o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es dimetilsulfóxido (DMSO). En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende acetonitrilo. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende un alcohol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol C₁-C₆. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, secbutanol, iso-butanol, ter-butanol, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico comprende una mezcla de acetonitrilo y alcohol isopropílico.

Los inhibidores de lipasa adecuados para los kits de la presente divulgación incluyen los inhibidores de lipasa descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el inhibidor de la lipasa es el éster (S)-1-[[[(2S,3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanyl]metil]-dodecil del ácido (S)-2-formilamino-4-metil-pentanoico (orlistat). En algunas realizaciones, el inhibidor de lipasa se utiliza como control al practicar el método de determinación de la actividad lipolítica descrito en el presente documento.

Las sales adecuadas para los kits de la presente divulgación incluyen las sales descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio, cloruro de calcio o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio y cloruro de calcio.

Los agentes amortiguadores adecuados para los kits de la presente divulgación incluyen los agentes amortiguadores

descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Tris. En algunas realizaciones, el agente amortiguador es Bis-Tris.

En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para realizar un ensayo para determinar la actividad lipolítica. En algunas realizaciones, el ensayo comprende un método descrito en el presente documento.

Todas las referencias citadas en el presente documento, incluidas patentes, solicitudes de patentes, documentos, libros de texto y similares, y las referencias citadas en los mismos, en la medida en que no lo estén, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Los productos químicos y reactivos para los experimentos descritos en el presente documento son los siguientes:

2-propanol (IPA, 99,9 %), acetonitrilo (ACN, HPLC Plus, $\geq 99,9$ %), cloruro de calcio (≥ 97 %), Triton X-100 (grado laboratorio), fosfato de sodio monobásico monohidratado (reactivo ACS, ≥ 95 %), dimetilsulfóxido (DMSO, Reagent Plus, $\geq 99,5$ %), se obtuvieron de Sigma- Aldrich (ahora Merck KGaA). 4-metilumbeliferona (4Mu, ≥ 98 %) y la N-fenil-L-naftilamina (NPN, grado reactivo, 98 %) se obtuvieron de Aldrich. Cloruro de sodio (biorreactivo, ≥ 99 %), clorhidrato de TRIZMA® (grado reactivo, 99,0 %), TRIZMA® base (patrón primario y amortiguador, $\geq 99,9$ %), lipasa de páncreas porcino (PPL, tipo II, 100-500 U/mg), clorhidrato de BIS-TRIS ($\geq 99,0$ % (valoración)), oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO, adecuado para fluorescencia, ≥ 95 % (HPCE)) y KOLLIPHOR® P 188 (adecuado para cultivo celular) se obtuvo de Sigma. El acetonitrilo (grado LC-MS) se obtuvo de Thermo Fisher. El etanol (EtOH, grado gradiente para cromatografía líquida) y el ácido clorhídrico 25 % v/v se obtuvieron de Merck. La sacarosa (USP/NF, EP, JP, alta pureza) se obtuvo de Pfanstiehl. La solución de hidróxido de sodio 1M se obtuvo de Honeywell FlukaTM. El cloruro de sodio (USP, multi compendio), la L-histidina (USP, multi compendio), el monohidrócloruro de L-histidina (FCC, multi compendio), el PS20 (NF) y el PS80 (NF) se obtuvieron de J.T. Baker. El agua altamente purificada, en lo sucesivo denominada "agua", se preparó utilizando un sistema de purificación de agua (BarnsteadTM GenPureTM Pro, Thermo Fisher). El pH se midió utilizando un pH-metro (780 pH Meter, Metrohm) y un electrodo de pH de Pt (Unitrode Pt1000, Metrohm). El fluido de cosecha de cultivo celular (CCHF por sus siglas en inglés) que contiene una mezcla de lipasas como parte de las HCP, producidas a partir de una línea celular CHO propietaria que expresa un anticuerpo monoclonal no terapéutico (mAb 1), así como el mAb 1, se obtuvieron de Lonza Biologies, Slough, Reino Unido.

Ejemplo 1A, Desarrollo del ensayo de lipasa I: pH

Se desarrolló un ensayo de lipasa basado en un método descrito en Kurihara et al., Biol Pharm Bull 26: 383-385 (2003), utilizando oleato de 4-metilumbeliferilo (4MuO) como sustrato para la enzima lipasa.

En el desarrollo del ensayo se utilizó lipasa de páncreas porcino (PPL). En este experimento, 500 nM de PPL y 4MuO se incubaron durante 22 horas en uno de cuatro sistemas amortiguadores diferentes y se ensayó la extinción de la fluorescencia y la autohidrólisis del 4MuO: (a) 10,4 mM Tris pH 8,1, (b) 10,4 mM Bis-Tris pH 6, (c) 41,6 mM Bis-Tris pH 6, (d) 104 mM Bis-Tris pH 6.

Los resultados de las Figs. 1A-1B y la Tabla 1 muestran que la autohidrólisis de 4MuO se redujo a pH 6 en comparación con pH 8. La Fig. 1C muestra que la tasa de autohidrólisis a pH 8 era casi el doble que a pH 6. La lipasa era ligeramente (<20 %) más activa en pH 8 en comparación con pH 6. La concentración de amortiguador no pareció tener una gran influencia sobre la autohidrólisis y la actividad de la lipasa. La actividad lipolítica parece ser la más elevada en el amortiguador Bis-Tris 41,6 mM. La extinción de la fluorescencia se observó en amortiguador Bis-Tris 104 mM.

Tabla 1

Condiciones (Conc. final)	Autohidrólisis (AH) (μ M)	Hidrólisis total (AH+EH) (μ M)	Hidrólisis enzimática (EH-AH) (μ M)
10,4 mM TRIS pH 8,1	0,22	1,51	1,29
10,4 mM BIS-TRIS pH 6	0,13	1,22	1,09
41,6 mM BIS-TRIS pH 6	0,11	1,26	1,14
104 mM BIS-TRIS pH 6	0,16	1,23	1,07

Se investigó más a fondo la autohidrólisis de 4MuO. El pK_a del 4Mu es aproximadamente 7,7. La Fig. 1D muestra el intervalo de pH en el que se midió 4Mu (gráfico reproducido de Zhi et al., J Spectrosc 1 (2013) doi:10.1155/2013/147128). La Fig. 1E muestra las cuatro formas de 4Mu en varios intervalos de pH (reproducido de Zhi et al., 2013). La Forma II es

prevalente y muestra su excitación y emisión a λ_{ex} de 320 nm y λ_{em} de 445 nm.

Ejemplo 1B. Desarrollo del ensayo de lipasa I: pH

5 Se realizó otro estudio para evaluar varios agentes amortiguadores y el pH de un amortiguador de ensayo de lipasa. Se aplicaron las siguientes proporciones de volumen (todas v/v): muestra (75 %), amortiguador de matriz de alta concentración (HCMB por sus siglas en inglés) (20 %), disolvente orgánico (5 %). Las mezclas se incubaron en plazos de aproximadamente 24 a aproximadamente 300 horas. Los componentes del ensayo se transfirieron a placas de 96 pocillos y se analizó su intensidad fluorescente. Para las curvas de calibración de 4Mu, el patrón de referencia 4Mu se preparó en concentraciones de 0 μM , 0,2 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM y 100 μM en el disolvente orgánico y se añadió al 5 % (v/v) a las concentraciones finales de 0 μM , 0,1 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM y 5 μM a los demás componentes del ensayo. Se observó que la pendiente de la curva de calibración se desplazaba ligeramente del intervalo de calibración bajo (0,01- 0,5 μM) al intervalo de calibración alto hasta 5 μM . Por lo tanto, los resultados cuantitativos de 4Mu en un intervalo de concentración de hasta 0,5 μM se calcularon con una curva de calibración reducida de 0,01-0,5 μM . En las FIGS. 19A y 19B se muestra una curva de calibración de 4Mu.

En este estudio, la "muestra" fue un amortiguador de formulación placebo que incluía 20 mM de L-histidina, pH 6 (el ajuste del pH se realizó añadiendo 25 % (p/v) de HCl o NaOH 1 M), 250 mM de sacarosa, 0,5 % de fluido de cosecha de cultivo celular (CCHF) o aproximadamente 0,0025 mg/mL de lipasa pancreática porcina (PPL). El HCMB incluía TRIS (208 mM) a pH 7 y 8 o BIS-TRIS (208 mM) a pH 6 (el ajuste del pH se realizó añadiendo 25 % (p/v) de HCl o NaOH 1 M), NaCl (200 mM, 600 mM o 1800 mM), CaCl_2 (0,52 mM, 5,2 mM o 52 mM). El disolvente orgánico fue ya sea metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO) o isopropanol (IPA), conteniendo 4MuO a 100 μM , y se añadió 5 % (v/v) de disolvente orgánico / sustrato. Los componentes del ensayo se transfirieron a placas de 96 pocillos y se analizó su intensidad fluorescente.

25 Para el análisis fluorescente, las muestras se transfirieron a microplacas de 96 pocillos (placas de poliestireno negro Thermo Scientific™ Nunc™ F96 MicroWell™). La medición de la fluorescencia se realizó con el lector de microplacas Molecular Devices SpectraMax iD3 y el software SMP 7.1. Las longitudes de onda máximas de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) fueron a 330 nm y 495 nm, respectivamente, después de la optimización utilizando el modo de optimización de longitud de onda SoftMax Pro 7.1 (SMP 7.1) para una concentración intermedia de 4Mu. La señal de fluorescencia se leyó entre aproximadamente 24 h y aproximadamente 300 h de tiempo de incubación, y se prepararon nuevas microplacas de 96 pocillos para cada lectura transfiriendo 200 μL de líquido (incluyendo muestra, HCMB y disolvente orgánico) a cada pocillo. Las mediciones de fluorescencia se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados de la evaluación de los dos amortiguadores diferentes (TRIS o BIS-TRIS) a pH 6, pH 7 o pH 8 se muestran en la FIG. 11. La conversión de 4MuO en 4Mu se midió controlando la intensidad de fluorescencia del 4Mu. Se evaluaron muestras que contenían PPL o CCHF y autohidrólisis de 4MuO. El impacto más significativo de la modificación del pH se observó en la autohidrólisis (AH), que disminuyó en un factor de ~5 al reducir el pH de 8 a 6. La concentración de 4Mu en las muestras de pH diferente se midió con respecto a curvas de calibración de 4Mu en muestras de referencia al mismo pH, es decir, la tendencia observada no se debe a una respuesta diferente de la fluorescencia de 4Mu a pH diferentes, sino que se debe a velocidades de reacción diferentes. La actividad PPL se aumentó casi por un factor de 2 al disminuir el pH de 8 a 6, mientras que la actividad lipolítica CCHF no se vio afectada. La dependencia del pH de la PPL se describió anteriormente en Li et al., "Adsorption and catalytic activity of Porcine pancreatic lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material", *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2009; 341:79-85. Sin embargo, esta dependencia del pH puede no ser idéntica para otro tipo de lipasa posiblemente presente en HCP contenidos en los pools de DS. El pH 6 se consideró el más adecuado también desde la perspectiva de que muchas formulaciones de proteínas terapéuticas, en las que se observó y notificó la degradación del polisorbato, se mantienen normalmente a un pH ligeramente ácido y, por lo tanto, se supone que la adaptación del pH del ensayo a ~6 cubre a los culpables (por ejemplo, las lipasas) responsables de causar la degradación hidrolítica del polisorbato mediada por lipasas. Por lo tanto, se seleccionó BIS-TRIS a una concentración de 200 mM para ser añadido en el HCMB para obtener una concentración final de ensayo de 40 mM a pH 6.

Ejemplo 2A. Desarrollo del ensayo de lipasa II: CaCl_2

Se investigó la concentración de cloruro de calcio en el amortiguador de ensayo de la lipasa. Se realizó un ensayo de lipasa utilizando 500 nM de PPL y 4MuO a 3 concentraciones diferentes de CaCl_2 para investigar la extinción de la fluorescencia del 4MuO y la autohidrólisis: (a) CaCl_2 0,104 mM; (b) CaCl_2 1,04 mM; y (c) CaCl_2 10,4 mM.

Los resultados de las Figs. 2A-2C y la Tabla 2 muestran que no se produjo autohidrólisis de 4MuO, y no se observó extinción de fluorescencia por el anión cloruro. La actividad de lipasa fue máxima en CaCl_2 1,3 mM.

Tabla 2

Condiciones final)	(Conc.)	Autohidrólisis (AH) (μM)	Hidrólisis total (AH+EH) (μM)	Hidrólisis enzimática (EH-AH) (μM)
--------------------	---------	---------------------------------------	--	---

CaCl ₂ 0,104 mM	0,15	0,81	0,66
CaCl ₂ 1,04 mM	0,16	0,90	0,73
CaCl ₂ 10,4 mM	0,16	0,85	0,69

Ejemplo 2B. Desarrollo del ensayo de lipasa II: CaCl₂

En otro experimento se investigó la concentración de cloruro de calcio en el amortiguador de ensayo de lipasa. La muestra, la composición HCBM y los procedimientos experimentales fueron como los descritos en el Ejemplo 1B, con CaCl₂ incluido en el HCMB a 0,52 mM, 5,2 mM o 52 mM, tal como se describe en el Ejemplo 1B.

Los resultados de la evaluación de diferentes concentraciones de CaCl₂ en HCMB con muestras que contienen ya sea PPL o CCHF se muestran en la FIG. 12. Se observó que a la mayor concentración de CaCl₂, la actividad de PPL disminuía ligeramente. Teniendo en cuenta los requisitos para que el HCMB establezca condiciones de ensayo similares para diversas matrices de sustancias farmacológicas/productos farmacológicos, se seleccionó añadir CaCl₂ 5 mM al HCMB para obtener una concentración de ensayo final de CaCl₂ 1 mM.

Ejemplo 3 A. Desarrollo del ensayo de lipasa III: NaCl

Se investigó la concentración de cloruro de sodio en el amortiguador de ensayo de lipasa. Se realizó un ensayo de lipasa utilizando 500 nM de PPL y 4MuO a 3 concentraciones diferentes de NaCl para investigar la extinción de la fluorescencia del 4MuO y la autohidrólisis: (a) NaCl 40 mM; (b) NaCl 120 mM; y (c) NaCl 360 mM.

Los resultados de las Figs. 3A-3C y la Tabla 3 muestran que no se produjo autohidrólisis de 4MuO, y no se observó extinción de fluorescencia por el anión cloruro. La actividad de la lipasa fue máxima en NaCl 120 mM.

Tabla 3

Condiciones final)	(Conc. Autohidrólisis (AH) (μM)	Hidrólisis (AH+EH) (μM)	totalHidrólisis enzimática (EH-AH) (μM)
NaCl 40mM	0,25	0,82	0,57
NaCl 120 mM	0,29	0,91	0,62
NaCl 360 mM	0,28	0,86	0,59

Ejemplo 3B. Desarrollo del ensayo de lipasa III: NaCl

En otro experimento se investigó la concentración de cloruro de sodio en el amortiguador de ensayo de lipasa. La muestra, la composición HCBM y los procedimientos experimentales fueron como se describió en el Ejemplo 1B. Se incluyó NaCl en el HCMB a 200 mM, 600 mM o 1800 mM como se describe en el Ejemplo 1B.

Los resultados de la evaluación de diferentes concentraciones de NaCl en HCMB con muestras que contienen ya sea PPL o CCHF se muestran en la FIG. 13. Se observó que, a la mayor concentración de NaCl, la actividad PPL disminuía ligeramente. Teniendo en cuenta los requisitos para que el HCMB establezca condiciones de ensayo similares para diversas matrices de sustancias farmacológicas/productos farmacológicos, se seleccionó añadir 600 mM de NaCl al HCMB para obtener una concentración de ensayo final de 120 mM de NaCl.

Ejemplo 4A. Desarrollo del ensayo de lipasa IV: Disolvente orgánico

Se investigó el disolvente orgánico en el amortiguador de ensayo de lipasa. Se realizó un ensayo de lipasa utilizando 500 nM de PPL y 4MuO utilizando 3 disolventes orgánicos diferentes para investigar la extinción de la fluorescencia y la autohidrólisis del 4MuO: (a) DMSO; (b) isopropanol (IPA); y (c) metanol (MeOH).

Los resultados de las Figs. 4A-4C y la Tabla 4 muestran que, de los tres disolventes, la menor autohidrólisis, pero una ligera extinción de la fluorescente se observó con isopropanol. Sin embargo, el metanol obtuvo resultados comparables. Además, Glogauer et al., Microb Cell Fact 10: 54 (2011) indican que el metanol puede tener capacidades potenciadoras de la actividad.

Tabla 4

Condiciones final.)	(Conc. final.)	Autohidrólisis (AH) (μM)	Hidrólisis (AH+EH) (μM)	total	Hidrólisis enzimática (EH-AH) (μM)
DMSO		0,14	0,89		0,75
IPA		0,09	3,41		3,31
MeOH		0,13	3,24		3,11

Ejemplo 4B, Desarrollo del ensayo de lipasa IV: Disolvente orgánico

5 En otro experimento se investigó el disolvente orgánico en el amortiguador de ensayo de lipasa. La muestra, la composición HCBM y los procedimientos experimentales fueron como se describió en el Ejemplo 1B. Los disolventes orgánicos metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO) o isopropanol (IPA) que contenían 4MuO 100 μM se incluyeron en la reacción de ensayo como se describe en el Ejemplo 1B.

10 Los resultados de la evaluación de diferentes disolventes orgánicos con muestras que contienen PPL o CCHF se muestran en la FIG. 14. A diferencia de los resultados anteriores reportados en Glogauer et al., "Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach," *Microb Cell Fact* 2011 10:54, que reportaron una fuerte influencia de diferentes disolventes en la lipasa LipC12 aislada mediante un enfoque metagenómico a partir de E. coli. En Glogauer et al., el MeOH -y, en menor grado, IPA- mostraron un efecto activador, aumentando la actividad de la lipasa LipC12 en un factor de >10. Sin embargo, es probable que la enzima bacteriana estudiada tenga propiedades muy diferentes, por ejemplo, como lo demuestra un pH óptimo diferente para la actividad en comparación con los resultados del Ejemplo 1B. Con base en los resultados de la FIG. 14, se optó por añadir MeOH al HCMB.

Ejemplo 5A, Desarrollo del ensayo de lipasa V: Tensioactivo

20 Se investigó el rendimiento del amortiguador de ensayo de lipasa en presencia de tensioactivos. Se realizó un ensayo con lipasas utilizando 500 nM de PPL y 4MuO utilizando 2 tensioactivos a 2 concentraciones diferentes para investigar la extinción de la fluorescencia y la autohidrólisis del 4MuO: (a) TRITON X-100 0,012 % p/v, (b) TRITON X-100 0,06 % p/v, (c) KOLLIPHOR P188 0,032 % p/v, y (d) KOLLIPHOR P188 0,16 % p/v. También se ensayó un control que no contenía tensioactivos.

25 Los resultados de las Figs. 5A-5C y la Tabla 5 muestran que las muestras con tensioactivo presentaron la menor autohidrólisis, pero se observó una extinción de la fluorescencia. La actividad lipolítica también parecía disminuir con el tensioactivo.

30 **Tabla 5**

Condiciones (Conc. final.)	Autohidrólisis (AH) (μM)	Hidrólisis (AH+EH) (μM)	total	Hidrólisis enzimática (EH-AH) (μM)
Control	0,14	3,67		3,53
Triton X-100 0,012 % p/v	0,04	1,00		0,96
Triton X-100 0,06 % p/v	0,03	1,01		0,98
Kolliphor P188 0,032 % p/v	0,07	2,23		2,16
Kolliphor P188 0,16 % p/v	0,06	2,15		2,09

Ejemplo 5B, Desarrollo del ensayo de lipasa V: Tensioactivo

35 Se realizó otro estudio para evaluar el efecto de un tensioactivo sobre la actividad lipolítica de PPL y CCHF. Se evaluaron los tensioactivos polisorbato-20 (PS20) y polisorbato-80 (PS80), que pueden encontrarse en formulaciones de productos farmacológicos biofarmacéuticos. También se probó un poloxámero, ya que trabajos anteriores (Gupta et al., "Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases," *Anal Biochem* 2002;311: 98-99) sugerían que los tensioactivos solubilizan tensioactivos poco solubles como el para-nitrofenil palmitato.

40 Las muestras contenían 20 mM de L-histidina a pH 6, 250 mM de sacarosa, un tensioactivo (ya sea polisorbato-20 (PS20), polisorbato-80 (PS80) o poloxámero al 0,02 % o 0,06 % (todos p/v), o como control no contenían tensioactivo), 0,5 % de CCHF o 0,0025 mg/mL de PPL. El HCMB contenía 208 mM de BIS-TRIS a pH 6, NaCl 600 mM, CaCl₂ 5,2 mM. Se añadió

al ensayo un 5 % (v/v) del disolvente orgánico MeOH que contenía 100 μ M 4MeO. Los componentes del ensayo se transfirieron a placas de 96 pocillos y se analizó su intensidad fluorescente como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 1B.

- 5 Los resultados del efecto de los tensioactivos sobre la actividad lipolítica se muestran en la FIG. 15. La presencia de los tensioactivos tuvo un impacto notable en la actividad lipolítica. Los polisorbatos disminuyeron drásticamente la formación de 4Mu en >90 % para PPL y en ~80 % para CCHF, y PS80 disminuyó la formación de 4Mu de forma ligeramente más pronunciada en comparación con PS20.
- 10 Hay varias razones posibles para estas observaciones: (1) los polisorbatos, que consisten en ésteres de ácidos grasos, fueron un tensioactivo / inhibidor competitivo para las lipasas, y/o (2) el tensioactivo no polar 4MuO se incorporaba a la estructura micelar del polisorbato, reduciéndose así su concentración en el medio acuoso y, por lo tanto, afectando negativamente a las constantes de velocidad enzimática, que se correlacionan con la concentración de tensioactivo (de acuerdo con, por ejemplo, el concepto de cinética de Michaelis-Menten), y/o (3) las enzimas lipasa se veían afectadas estructuralmente, resultando potencialmente en un desdoblamiento y, por lo tanto, a una disminución de la actividad.
- 15

Curiosamente, la concentración de polisorbato parece haber tenido un efecto sobre la actividad lipolítica del CCHF, con una mayor concentración de polisorbato produciendo una menor actividad, mientras que la PPL fue similarmente activa en las dos diferentes concentraciones elegidas de ambos polisorbatos. El poloxámero, por otra parte, influyó en la actividad lipolítica de la PPL y la CCHF de forma muy diferente. La actividad de la PPL se redujo a ~50 % en comparación con el control, y -como ya se vio con los polisorbatos- las concentraciones elegidas del tensioactivo no mostraron una variabilidad distinta en la actividad enzimática. La actividad lipolítica del CCHF se vio influenciada positivamente por el poloxámero, al menos a una concentración de tensioactivo del 0,02 %, y aparentemente no se vio afectada a una concentración del 0,06 %. Sin ceñirnos a ninguna teoría en particular, una de las razones del comportamiento enzimático en presencia de los tensioactivos, así como de la dependencia de la concentración, puede ser la combinación de más de una causa. Por ejemplo, la cinética de las lipasas y las investigaciones mecanísticas son difíciles, debido al hecho de que las enzimas catalizan reacciones en tensioactivos poco solubles en agua, por ejemplo, los triglicéridos y otras grasas. En la interfaz agua / grasa, las enzimas se activan por el movimiento de un dominio de tapa, que en la forma cerrada protege el sitio activo, mientras que en la forma abierta permite el acceso del sustrato al sitio activo. Véase, por ejemplo, Lowe, "The triglyceride lipases of the pancreas", *J Lipid Res* 2002;43(12): 2007-2016.

20

25

30

Notablemente, los polisorbatos tienen un impacto negativo en la actividad lipolítica para la lipasa modelo PPL y para la CCHF. La intensidad de la fluorescencia del producto de hidrólisis 4Mu también fue influenciada (se redujo en ~20 %) en presencia de los tensioactivos (véase la Fig. 15B), lo que también contribuye a la disminución de la intensidad de la señal del producto 4Mu, como se observa en la Fig. 15 A.

35

Ejemplo 6A, Desarrollo del ensayo de lipasa VI: Inhibidor de lipasa

Se eligió el inhibidor de lipasa orlistat para los experimentos de control del ensayo de lipasa, y así se evaluó el rendimiento del ensayo con diferentes concentraciones del inhibidor. El orlistat se desarrolló como un inhibidor basado en un mecanismo para unirse covalentemente a la serina del sitio activo de las lipasas pancreáticas, inhibiendo así las enzimas. Este modo de acción lo convirtió en un medicamento de administración oral para tratar la obesidad y los síntomas relacionados que se basan en la hidrólisis de la grasa gastrointestinal. No se ha publicado ningún estudio que investigue sistemáticamente qué clases de lipasa pueden ser inhibidas por el orlistat. Sin embargo, se reportó anteriormente que, aparte de las lipasas de mamíferos, también las lipasas bacterianas, por ejemplo, la de *Streptomyces rimosus*, podían inhibirse a una concentración milimolar de orlistat, y que la inhibición se producía por modificación covalente de la serina del sitio activo. Véase, por ejemplo, Hadváry et al., "The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase," *J Biol Chem* 1991; 266(4):2021-2027; Heck et al., "Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity," *Pharmacotherapy* 2000; 20(3):270-279; Asler et al., "Mass spectrometric evidence of covalently-bound tetrahydrolipstatin at the catalytic serine of *Streptomyces rimosus* lipase," *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770:163-170. En dichos estudios previos, fue necesaria una gran relación de volumen del 50 % (v/v) de disolvente orgánico en el ensayo final para introducir el inhibidor hidrófobo a esta alta concentración. Como tal, en el ensayo actual de la lipasa no se preveía una concentración tan alta de disolvente orgánico debido a la posible alteración de los demás componentes del ensayo, por ejemplo, la precipitación de la proteína farmacéuticamente activa, se optó por utilizar concentraciones más bajas de disolvente -y también de inhibidor-. Esto no debería tener necesariamente un impacto negativo en la lectura del ensayo, ya que se descubrió que las lipasas de mamíferos se inhiben a concentraciones de orlistat mucho más bajas, es decir, nanomolares. Véase, por ejemplo, Lewis et al., "Direct measurement of lipase inhibition by Orlistat using a dissolution linked in vitro assay", *Clin Pharmacol Biopharm* 2012;1(3): 1-3.

40

45

50

55

Se ensayó la actividad de la lipasa después del co- y pre-tratamiento de una muestra que contenía PPL 500 nM con orlistat (inhibidor de la lipasa) a 3 concentraciones para investigar la extinción de la fluorescencia 4MuO y la autohidrólisis: (a) co-tratamiento 25 μ M orlistat, (b) co-tratamiento 15 μ M orlistat, (c) co-tratamiento 5 μ M orlistat, (d) pre-tratamiento 25 μ M orlistat, (e) pre-tratamiento 15 μ M orlistat, y (f) pre-tratamiento 5 μ M orlistat. También se ensayó una muestra de control sin orlistat.

60

65

Los resultados de las Figs. 6A-6B y la Tabla 6 muestran que el pretratamiento (30 minutos) con orlistat a 25 μ M abolió

completamente la actividad lipolítica. Se observó actividad residual con las concentraciones más bajas de orlistat. No se observó ninguna extinción de la fluorescencia.

Tabla 6

Condiciones (Conc. final.)	Autohidrólisis (AH) (μM)	Hidrólisis (AH+EH) (μM)	total	Hidrólisis enzimática (EH-AH) (μM)
Control	0,09	4,40		4,31
Co-tratamiento 25 μM	/	0,14		0,05
Co-tratamiento 15 μM	/	0,14		0,06
Co-tratamiento 5 μM	/	0,21		0,12
Pre-tratamiento 25 μM	/	0,07		0
Pre-tratamiento 15 μM	/	0,10		0,01
Pre-tratamiento 5 μM	/	0,13		0,04

Ejemplo 6B. Desarrollo del ensayo de lipasa VI: Inhibidor de lipasa

En otro experimento se evaluó la concentración del inhibidor de la lipasa orlistat. Las muestras, la composición HCMB y los procedimientos experimentales se realizaron como en el Ejemplo 1B. El inhibidor se preparó en MeOH a concentraciones de 200, 600 y 1000 μM . Para los experimentos de preincubación, las soluciones de inhibidor se añadieron al 2,5 % (v/v) al ensayo y se realizó una pre-incubación durante 30 min. A continuación, se añadió al ensayo MeOH que contenía 4MuO a 200 μM al 2,5 % (v/v). Para los experimentos de co-incubación, se añadió MeOH que contenía 4MuO 100 μM y Orlistat (100 μM , 300 μM y 500 μM) al 5 % (v/v). Se utilizó una concentración elevada de PPL de 0,0335 mg/mL.

Se ensayaron tres concentraciones de orlistat, es decir, 5 μM , 15 μM y 25 μM (en relación con el volumen final del ensayo), con un "peor caso", es decir, una concentración de lipasa muy alta de 0,0335 mg/mL PPL. A estas concentraciones, las soluciones de ensayo finales eran claras y no mostraban turbidez debido a la posible insolubilidad del inhibidor. Además, se estudió el efecto sobre la actividad de la lipasa cuando el orlistat se sometía directamente al ensayo con el tensioactivo en MeOH al 5 % (v/v), frente a la preadición de orlistat a la muestra que contenía la enzima en 2,5 % (v/v) de MeOH y la incubación durante 30 min antes de añadir el sustrato en otra fracción de volumen de MeOH al 2,5 % (v/v).

Los resultados de la evaluación del inhibidor de lipasa se muestran en la FIG. 16. Debido a la alta concentración de PPL descrita anteriormente, 4MuO se hidrolizó casi por completo en 24 horas en ausencia de orlistat. También puede observarse que el orlistat inhibió la PPL, y el efecto inhibitorio se correlacionó con la concentración de orlistat, es decir, el mayor efecto inhibitorio se observó con 25 μM de orlistat. La pre-incubación de la enzima con el inhibidor tuvo un efecto beneficioso, es decir, la actividad enzimática a la concentración más alta de orlistat ensayada de 25 μM se redujo en ~50 % en la muestra pre-tratada en comparación con la muestra en la que el tensioactivo y el inhibidor se añadieron al mismo tiempo. Por lo tanto, se optó por añadir orlistat a los controles negativos a alta concentración, es decir, a 25 μM , y los controles negativos se pre-incubarían durante ~30 min con el inhibidor antes de añadir el tensioactivo.

Ejemplo 7. Desarrollo del ensayos de la lipasa VII: Inhibición de productos de ácidos grasos

La inhibición del producto de ácido graso se probó en el ensayo de lipasa utilizando ácido oleico y ácido láurico, a 2 concentraciones de PS20 y PS80 teóricamente degradadas: (a) 0,1 % y (b) 0,001 %. En este experimento, la concentración de PPL fue de 800 nM.

Los resultados de las Figs. 7A-7D y la Tabla 7 muestran que el ácido láurico por encima de 8,5 μM inhibe la actividad de la lipasa sin grandes diferencias entre 8,5 μM y 850 μM . Para el ácido oleico, se observó una inhibición significativa del producto a 780 μM .

Tabla 7

Condiciones (Conc. final.)	Autohidrólisis (AH) (μM)	Hidrólisis (AH+EH) (μM)	total	Hidrólisis enzimática (EH-AH) (μM)
Control	0,09	3,94		3,85

PS20 0,001% (8,5 μ M Ácido láurico)	0,15	3,49	3,34
PS20 0,1 % (850 μ M Ácido láurico)	0,08	3,31	3,23
PS80 0,001 % (7,8 μ M Ácido oleico)	0,11	3,77	3,66
PS80 0,1 % (780 μ M Ácido oleico)	0,06	2,27	2,21

Ejemplo 8. Desarrollo del ensayo de la lipasa VIII: Efectos de Extinción

- 5 Se investigó el efecto amortiguador del polisorbato 80. Se ensayó una muestra que contenía 800 nM de PPL y PS80 fresco frente a un control con 800 nM de PPL y sin PS80. Resultados en la FIG. 8 muestran que el PS80 disminuye los valores de RFU de cada estándar, lo que sugiere un efecto de extinción leve.

Ejemplo 9. Evaluación del ensayo de lipasa: CCHF

- 10 Para evaluar la aplicación de los ensayos desarrollados en los Ejemplos 1-8 para estudiar la actividad lipolítica en sustancias farmacológicas/productos farmacológicos, el ensayo se evaluó a concentraciones de lipasa que podrían conducir a la degradación del polisorbato dentro de un marco de tiempo en el que se observaría dicha degradación en el producto farmacológico, por ejemplo, dentro de 1 mes.

- 15 Las muestras para este estudio contenían 20 mM de L-histidina a pH 6, 250 mM de sacarosa, los tensioactivos PS20 o PS80 al 0,02 % (p/v), y varias concentraciones de CCHF (0 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, todos v/v). Las muestras se almacenaron durante 1 mes a temperatura ambiente y a 2-8 °C. Las muestras se analizaron por HPLC-FMA como se describe a continuación y el ensayo de lipasa en el presente documento. Para los controles positivos del ensayo, las muestras se suplementaron con 0,055 mg/mL de PPL. El HCMB contenía 208 mM de BIS-TRIS a pH 6, NaCl 600 mM, CaCl₂ 5,2 mM. Se añadió al ensayo un 5 % (v/v) del disolvente orgánico MeOH que contenía 100 μ M 4MuO. Para los controles negativos que contenían orlistat se preparó el inhibidor en MeOH a 1000 μ M, y se añadieron al ensayo 2,5 % (v/v) y se realizó una pre-incubación durante 30 min. A continuación, se añadió al ensayo MeOH que contenía 4MuO a 200 μ M al 2,5 % (v/v). Los componentes del ensayo se transfirieron a placas de 96 pocillos y se analizó su intensidad fluorescente como se describe en el Ejemplo 1B.

- 25 El análisis cuantitativo de PS20 y PS80 intactos se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Waters Alliance e2695) equipado con una bomba isocrática, un muestreador automático, una bobina de reactor tejida (1 mL; Supelco #57410-U) y un detector de fluorescencia (Waters 2475 FLR Detector). Las muestras se inyectaron en una fase móvil que contenía N-fenil-1-naftilamina (NPN) 5 μ M, 15 ppm (p/v) Brij® 35 disuelto en una solución de NaCl 150 mM, TRIS 50 mM, 5 % (v/v) ACN a pH 8. La fluorescencia se midió a λ_{ex} = 350 nm y λ_{em} = 420 nm. Para la integración y el análisis de los picos se utilizó el sistema de datos cromatográficos (CDS por sus siglas en inglés) Empower 3.

- 30 La Tabla 9 resume las muestras probadas:

35

Tabla 9

Muestra	HCMB (84 μ L)	Matriz (315 μ L)	MeOH (21 μ L)	Comentario
Control positivo del ensayo	HCMB que contenía PPL 4 μ M	Muestra auténtica	MeOH 21 μ L que contiene 4MuO 100 μ M	
Control negativo del ensayo	HCMB que contenía PPL 4 μ M	Muestra auténtica	MeOH 10,5 μ L que contenía Orlistat 1 mM	Pre-incubar con Orlistat durante 30 min, después añadir 4MuO
			MeOH 10,5 μ L que contenía 4MuO 200 μ M	
Muestra	HCMB	Muestra auténtica	MeOH 21 μ L que contiene 4MuO 100 μ M	
Muestra de control negativo	HCMB	Muestra auténtica	MeOH 10,5 μ L que contenía Orlistat 1 mM	Pre-incubar con Orlistat durante 30

			MeOH 10,5 µL que contenía 4MuO 200 µM	min, después añadir 4MuO
Autohidrólisis	HCMB	Placebo	MeOH 10,5 µL que contenía Orlistat 1 mM	
			MeOH 10,5 µL que contenía 4MuO 200 µM	
Estándar de referencia	HCMB	Placebo	MeOH 21 µL que contenía 0,2-100 µM 4MU	

HCMB = amortiguador de matriz de alta concentración: Bis-Tris 208 mM pH 6, NaCl 600 mM, CaCl₂ 5,2 mM

Los resultados de HPLC-FMA se muestran en las Figs. 9A y 9B e indican que la degradación del polisorbato se observó a concentraciones de CCHF mayores o iguales al 0,10 %. Las muestras PS20 son más propensas a la degradación, con un efecto observado a CCHF ~0,10 %. Las concentraciones más elevadas mostraron una disminución de las concentraciones aparentes de polisorbato. La tendencia fue más pronunciada a 25 °C que a 2-8 °C. Las muestras que contenían PS20 eran aparentemente más propensas a la degradación que las que contenían PS80, en las que la disminución de la intensidad de la señal sólo podía detectarse al 0,5 % de CCHF. En los experimentos descritos anteriormente sobre la evaluación de tensioactivos se observó que el PS80 tenía un efecto negativo ligeramente mejorado sobre la actividad lipolítica en las muestras que contenían CCHF en comparación con PS20, y, por lo tanto, en el peor de los casos, las muestras que contenían PS80 del ensayo HPLC-FMA se sometieron al ensayo de la lipasa.

La lectura teórica del ensayo de lipasa desarrollado en el presente documento se muestra en la Fig. 9C, con los resultados reales mostrados en la Fig. 9D. Los resultados reales son comparables a los previstos. Las muestras con CCHF a diferentes concentraciones mostraron una formación de 4Mu correlacionada con la concentración de CCHF. Esta actividad enzimática era superior a la de los tres controles negativos, es decir, la autohidrólisis y las dos muestras de CCHF enriquecidas con orlistat. El ensayo fue lo suficientemente sensible como para detectar la actividad de la lipasa a concentraciones en las que el método HPLC-FMA aún no detectaba la degradación del polisorbato, es decir, a concentraciones de CCHF de <0,1 %.

En las Figs. 10A-10H se muestran mediciones adicionales de ensayos de lipasa con PS80 en diferentes concentraciones de CCHF que varían de 0,001 % a 2 %. Las concentraciones indicadas de CCHF y polisorbato fueron previas a la adición de 4MuO y amortiguador.

Los resultados del ensayo de lipasa se resumen en la FIG. 18. La muestra de CCHF al 1 % enriquecida con PPL (control positivo del ensayo) mostró una actividad mayor que la de la misma concentración de CCHF no enriquecida con PPL. La formación de 4Mu se correlacionó con la concentración de CCHF, y esta actividad lipolítica fue mayor que la de la autohidrólisis y otros controles negativos enriquecidos con orlistat. En particular, el ensayo fue lo suficientemente sensible como para diferenciar la actividad de la lipasa de la autohidrólisis y de los controles negativos en concentraciones de <0,1 % de CCHF, en las que el método HPLC-FMA aún no detectaba la degradación del polisorbato, es decir, la actividad lipolítica podía detectarse en concentraciones de 0,01 % y 0,05 % de CCHF con el ensayo de la lipasa.

Ejemplo 10. Evaluación del ensayo de lipasa: Formulación que contiene proteínas

Las formulaciones de productos farmacológicos biofarmacéuticos que pueden verse afectadas negativamente por la actividad lipolítica contienen una proteína bioterapéutica. El ensayo de la lipasa desarrollado en los Ejemplos 1-8 se probó con una formulación que contenía proteínas.

La muestra contenía L-histidina 20 mM a pH 6, sacarosa 250 mM, 0,02 % de PS80, 10 mg/mL de mAb1 (una IgG 1 propietaria), 0,5 % de CCHF o 0,025 mg/mL de PPL. El HCMB consistió en BIS-TRIS 208 mM a pH 6, NaCl 600 mM, CaCl₂ 5,2 mM. Se añadió al ensayo un 5 % (v/v) del disolvente orgánico MeOH que contenía 100 µM 4MuO. Para los controles negativos que contenían Orlistat, el inhibidor se preparó en MeOH a 1000 µM, y se añadieron al ensayo 2,5 % (v/v) y se realizó una pre-incubación durante 30 min. A continuación, se añadió al ensayo MeOH que contenía 4-MuO a 200 µM al 2,5 % (v/v). Los componentes del ensayo se transfirieron a placas de 96 pocillos y se analizó su intensidad fluorescente como se describe en el Ejemplo 1B. La Tabla 10 resume las muestras ensayadas:

Tabla 10

Etiqueta de muestra / control	Matriz muestra / control; relación de volumen 75 % (v/v)	HCMB; relación de volumen 20 % (v/v)	MeOH; relación de volumen 5 % (v/v)
-------------------------------	--	--------------------------------------	-------------------------------------

Muestra	mAb 1 10 mg/mL, L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6, CCHF 0,5 %	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	100µM 4MuO
Muestra negativa	mAb 1 10 mg/mL, L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6, CCHF 0,5 %	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	4MuO 200 µM, Orlistat 1000 µM
Ensayo positivo	mAb 1 10 mg/mL, L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6, CCHF 0,5 %, PPL 0,025 mg/mL	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	4MuO 100 µM
Ensayo negativo	mAb 1 10 mg/mL, L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6, CCHF 0,5 %, PPL 0,025 mg/mL	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	4MuO 200 µM, Orlistat 1000 µM
Formulación positiva	L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6, PPL 0,025 mg/mL	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	4MuO 100 µM
Formulación negativa	L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6, PPL 0,025 mg/mL	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	4MuO 200 µM, Orlistat 1000 µM
Autohidrólisis	L-histidina 20 mM, sacarosa 250 mM, PS80 0,02 % a pH 6	BIS-TRIS 200 mM, NaCl 600 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6	4MuO 100 µM

Los resultados del ensayo en diferentes puntos de tiempo (1 h, 24 h, 72 h, 168 h y 336 h) se muestran en la FIG. 17A. Como era de esperar, el control positivo del ensayo, que contenía tanto CCHF como PPL, mostró la mayor liberación de 4Mu. El control negativo del ensayo exhibió una actividad fuertemente disminuida, lo que indica que tanto la PPL como las lipasas CCHF fueron inhibidas por el Orlistat. La misma tendencia puede observarse en los controles positivos de la muestra y de la formulación (alta actividad), mientras que el control negativo de la muestra y el control negativo de la formulación fueron inhibidos por el Orlistat (baja actividad). El control de autohidrólisis y el control negativo de la formulación muestran en todos los puntos de tiempo lecturas similares, que no pueden diferenciarse en la FIG. 17A. La FIG. 17B, que muestra una vista ampliada de los controles negativos, ilustra que la actividad en ambos controles negativos es similar.

Puede observarse una desviación en la actividad aparente de los controles negativos de ensayo / muestra en comparación con el control negativo de autohidrólisis / formulación. El mismo desplazamiento se observó en una muestra en blanco que no contenía tensioactivo (datos no mostrados), lo que indica que la muestra que contiene proteínas ya tiene una respuesta de fluorescencia independiente de 4Mu. Durante el periodo de tiempo en el que se estudió la actividad lipolítica, es decir, en 336 h, el desplazamiento aumentó, lo que indica que las lipasas inicialmente inhibidas en CCHF y PPL se reactivaron lentamente, aunque aparentemente no en la formulación negativa.

Lookene et al. reportó anteriormente que el orlistat no es sólo un inhibidor basado en un mecanismo, sino más bien un verdadero tensioactivo para la lipoproteína lipasa, con una inhibición rápida, es decir, la formación del complejo covalente enzima-orlistat en la serina del sitio activo, y una hidrólisis lenta de este complejo (véase, por ejemplo, Lookene et al., "Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat)R," *Eur J Biochem.* 1994; 222:395-403). Para el presente ensayo y su aplicación para la evaluación de la actividad lipolítica en sustancias/productos farmacológicos, esto es relevante: si los culpables (por ejemplo, las enzimas lipolíticas) que forman parte de la fracción residual de HCP en sustancias/productos farmacológicos, y que son responsables de la degradación del polisorbato, pueden ser inhibidos por el orlistat, podrían ser reactivados. Si no es posible diferenciar la actividad lipolítica entre la muestra y el control negativo de la muestra, esto podría ser indicativo de ya sea una baja actividad lipolítica en la muestra o de la presencia de enzimas lipolíticas que no pueden ser inhibidas por el orlistat. En el primer caso, si la formación de 4Mu no aumenta mucho en comparación con el control de autohidrólisis, esto indica una baja actividad lipolítica y un bajo riesgo de degradación del polisorbato en la sustancia farmacológica/producto farmacológico. Si se observa una formación elevada de 4Mu en la muestra, en comparación con la autohidrólisis, esto indica que las enzimas lipolíticas están presentes, pero no pueden ser inhibidas por el orlistat.

Todas las referencias citadas en el presente documento, incluidas patentes, solicitudes de patentes, documentos, libros de texto y similares, y las referencias citadas en los mismos, en la medida en que no lo estén, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 a. una muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica, donde la preparación proteica comprende una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados anticuerpo-fármaco, fusiones anticuerpo-citoquina, fusiones Fc, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos y fusiones afibody; y
- 10 b. un disolvente orgánico, donde el disolvente orgánico comprende además oleato de 4-metilumbeliferilo, donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0; y donde la muestra de ensayo acuosa representa de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99,9 % de la composición, y el disolvente orgánico es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de la composición.
- 15 2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, donde la preparación proteica es un sobrenadante de cultivo celular, una preparación proteica parcialmente purificada o una preparación proteica purificada.
- 20 3. La composición de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la preparación proteica comprende un tensioactivo.
- 25 4. La composición de conformidad con la reivindicación 3, donde el tensioactivo es un polisorbato, preferentemente polisorbato-20, polisorbato-80 o combinaciones de los mismos.
- 30 5. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la preparación proteica comprende además proteínas adicionales de la célula huésped.
- 35 6. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la muestra de ensayo acuosa comprende además un agente amortiguador, una sal, o ambos.
- 40 7. La composición de conformidad con la reivindicación 6, donde la sal es cloruro de sodio, cloruro de calcio o combinaciones de los mismos.
- 45 8. La composición de conformidad con la reivindicación 7, donde el cloruro de sodio es de 50 mM a 400 mM en la muestra de ensayo acuosa.
- 50 9. La composición de conformidad con las reivindicaciones 7 u 8, donde el cloruro de calcio es de 0,2 mM a 10 mM en la muestra de ensayo acuosa.
- 55 10. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el agente amortiguador es Tris o Bis-Tris.
- 60 11. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el agente amortiguador es de 2 mM a 200 mM en la muestra de ensayo acuosa.
- 65 12. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el disolvente orgánico es un alcohol, un sulfóxido, un nitrilo o una combinación de los mismos.
13. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la composición comprende además un inhibidor de lipasa.
14. La composición de la reivindicación 13, donde el inhibidor de la lipasa es el éster (S)-1-[(2S,3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanyl]metil]-dodecil del ácido (S)-2-formilamino-4-metil-pentanoico.
15. La composición de conformidad con la reivindicación 13 o 14, donde el inhibidor de la lipasa se encuentra en el disolvente orgánico.
16. La composición de conformidad con la reivindicación 1 que comprende:
 - a. de aproximadamente 90 % a aproximadamente 99,9 % (v/v) de una muestra de ensayo acuosa que comprende
 - i. una preparación proteica purificada que comprende la proteína terapéutica y un lípido;
 - ii. un agente amortiguador;
 - iii. de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM de cloruro de calcio; y
 - iv. de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio; y
 - b. de aproximadamente 10 % a aproximadamente 0,1 % (v/v) de un disolvente orgánico seleccionado entre metanol,

etanol, propanol, iso-propanol, butanol, sec-butanol, iso-butanol, ter-butanol, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, o combinaciones de los mismos, comprendiendo además oleato de 4-metilumbeliferilo;

donde la muestra de ensayo acuosa tiene un pH de 5,0 a 7,0.

5

17. Un método de detección de la actividad lipolítica en una muestra de ensayo acuosa, el método comprende

10

- a. combinar la muestra de ensayo acuosa que comprende una preparación proteica, donde la preparación proteica comprende una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados anticuerpo-fármaco, fusiones anticuerpo-citoquina, fusiones Fc, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos y fusiones afibody, con un disolvente orgánico que comprende oleato de 4-metilumbeliferilo; y
- b. medir la formación de oleato y 4-metilumbeliferona por fluorescencia.

15

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, que comprende además

- c. determinar la estabilidad de la preparación proteica basándose en la fluorescencia medida.

20

19. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o el método de conformidad con las reivindicaciones 17 o 18, donde la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en belimumab, ipilimumab, belatacept, brentuximab vedotin, aflibercept, obinutuzumab, pembrolizumab, blinatumomab, nivolumab, idarucizumab, asofatasa-alfa, daratumumab, elotuzumab, atezolizumab, raxibacumab, ramucirumab, siltuximab, pembrolizumab, dinutuximab, evolocumab, necitumumab, obiltoxaximab, abatacept, adalimumab, alefacept, etanercept, infliximab, trastuzumab, ustekinumab y golimumab.

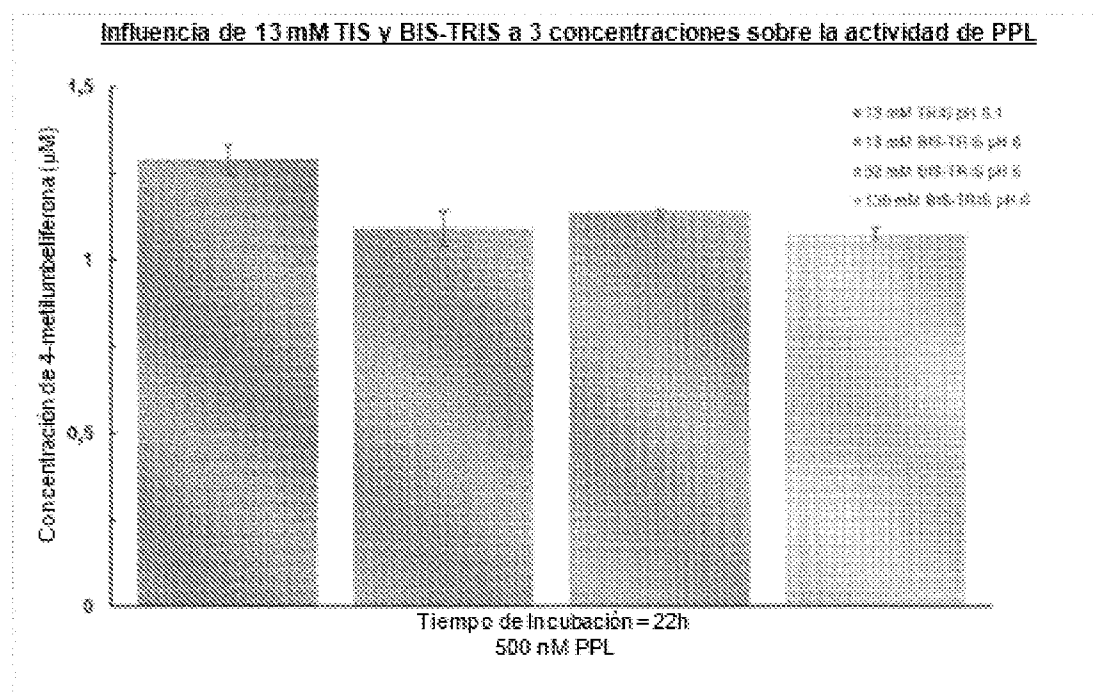


FIG. 1A

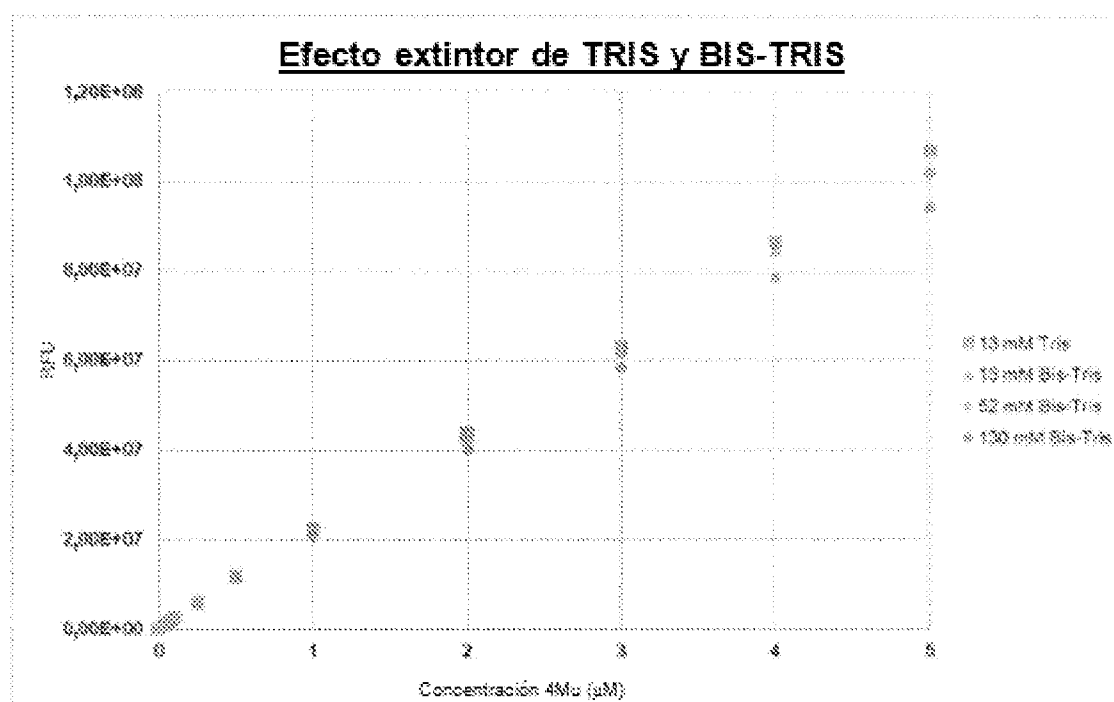


FIG. 1B

Influencia de la sal amortiguadora y del pH en la autohidrólisis y en la actividad de

PPL

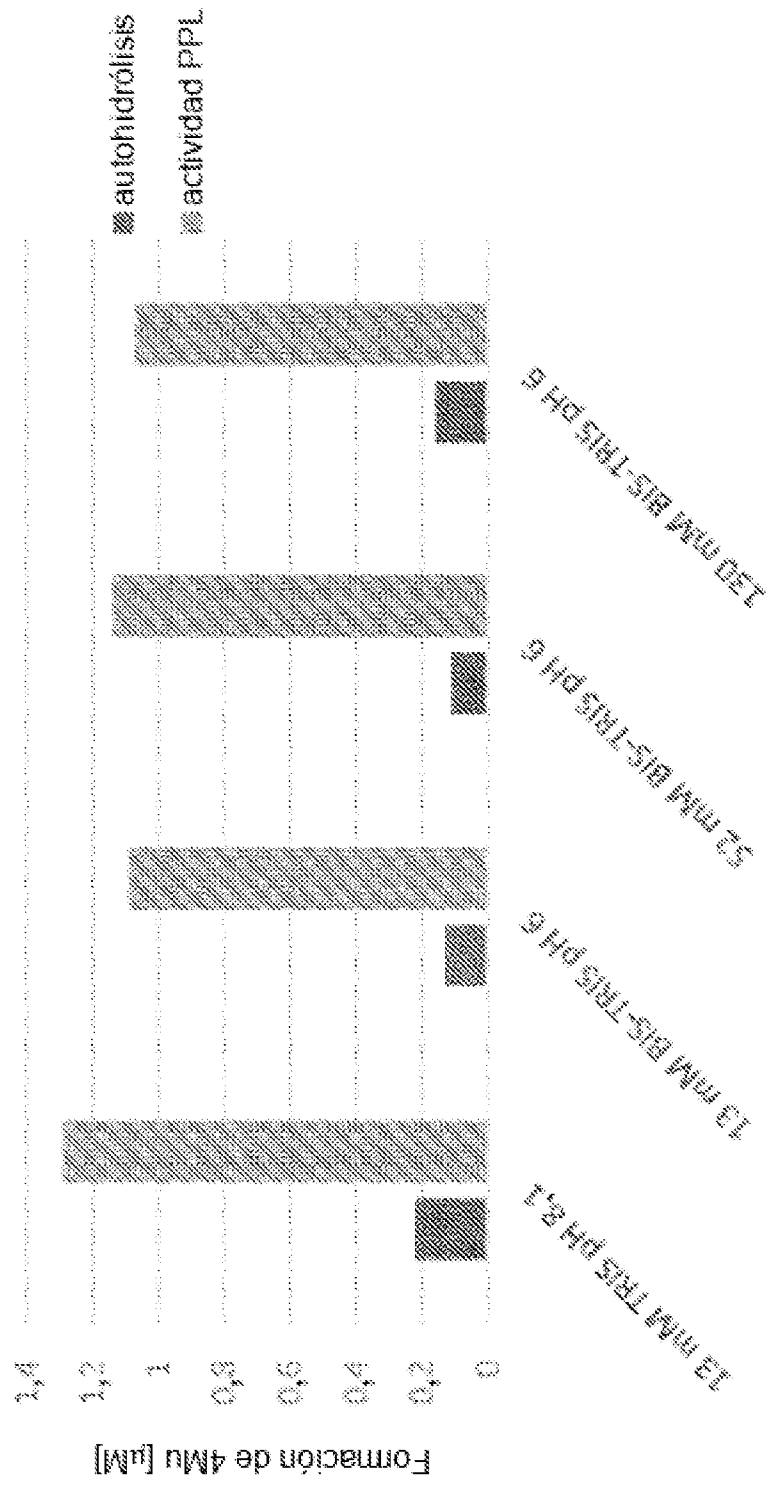


FIG. 1C

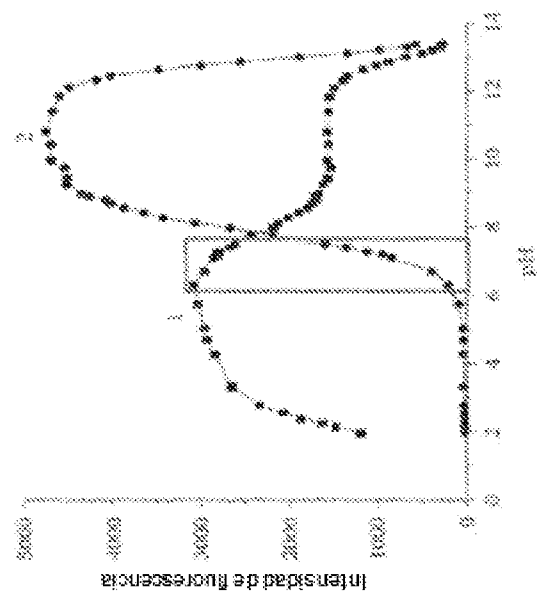


FIG. 1D

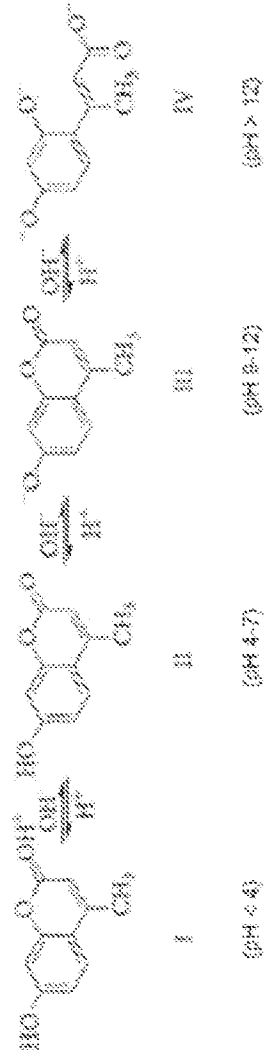


FIG. 1E

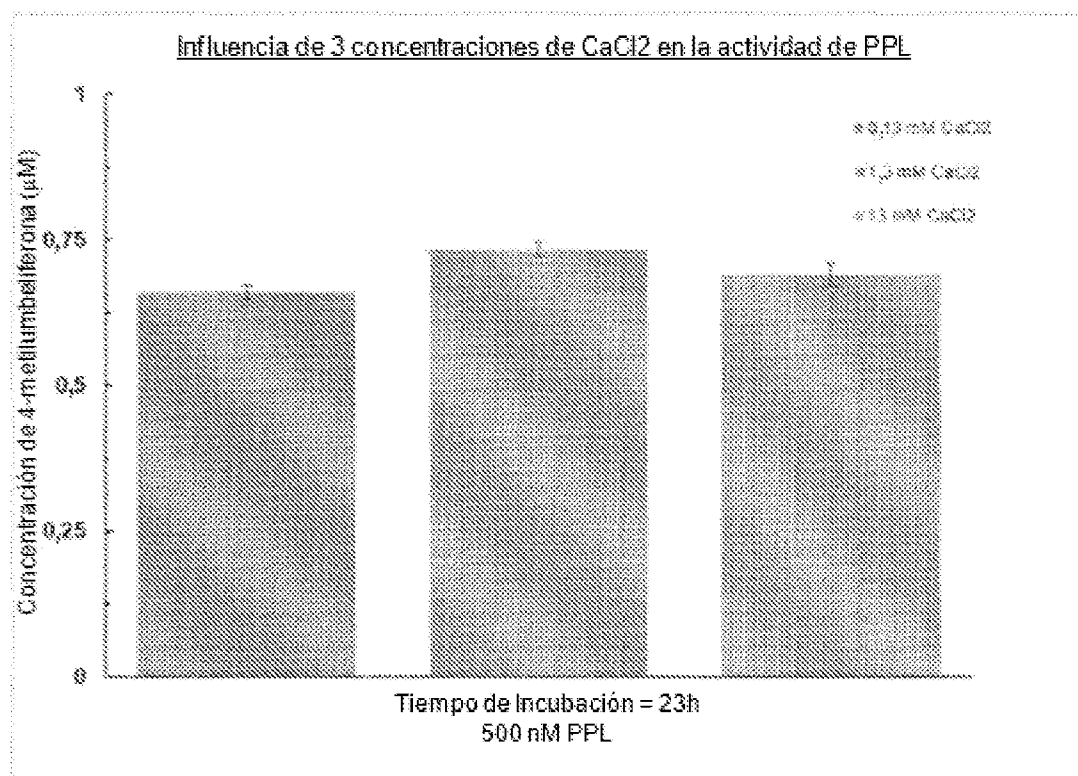


FIG. 2A

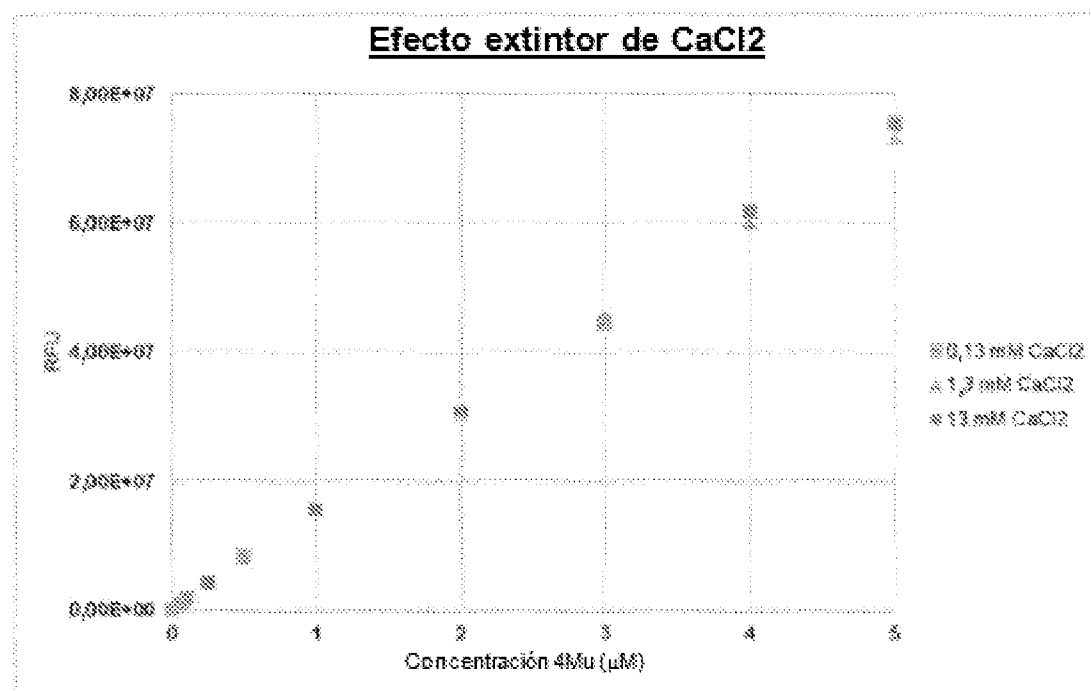


FIG. 2B

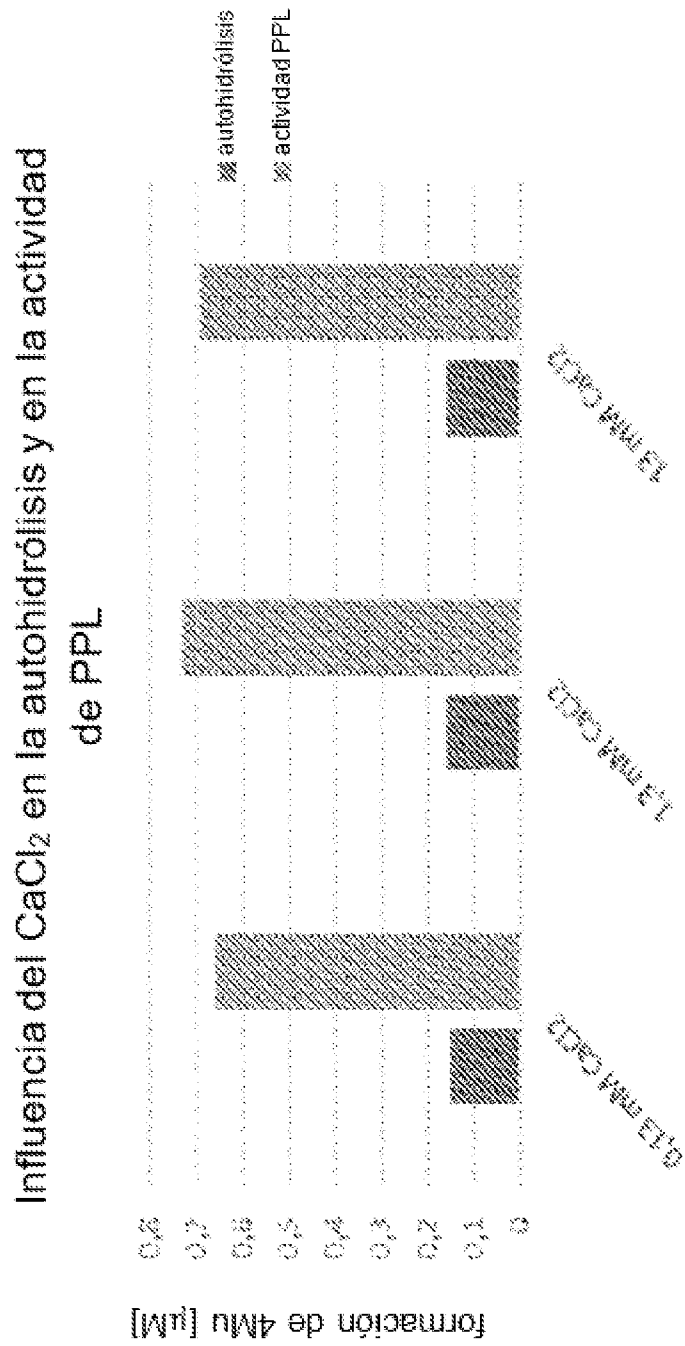


FIG. 2C

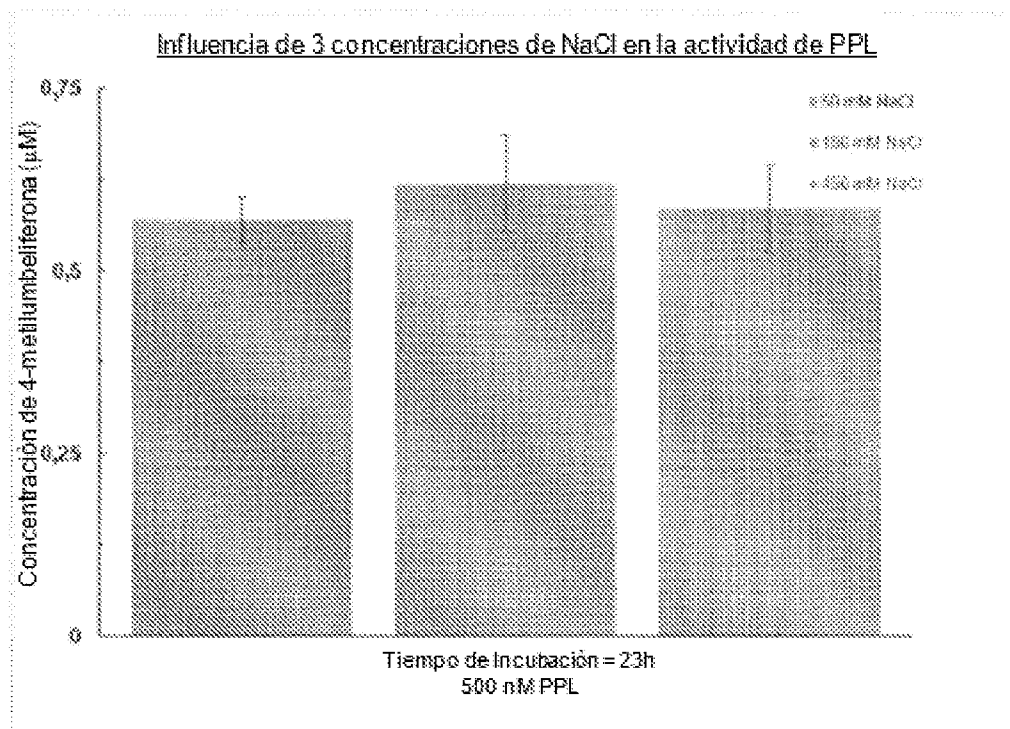


FIG. 3A

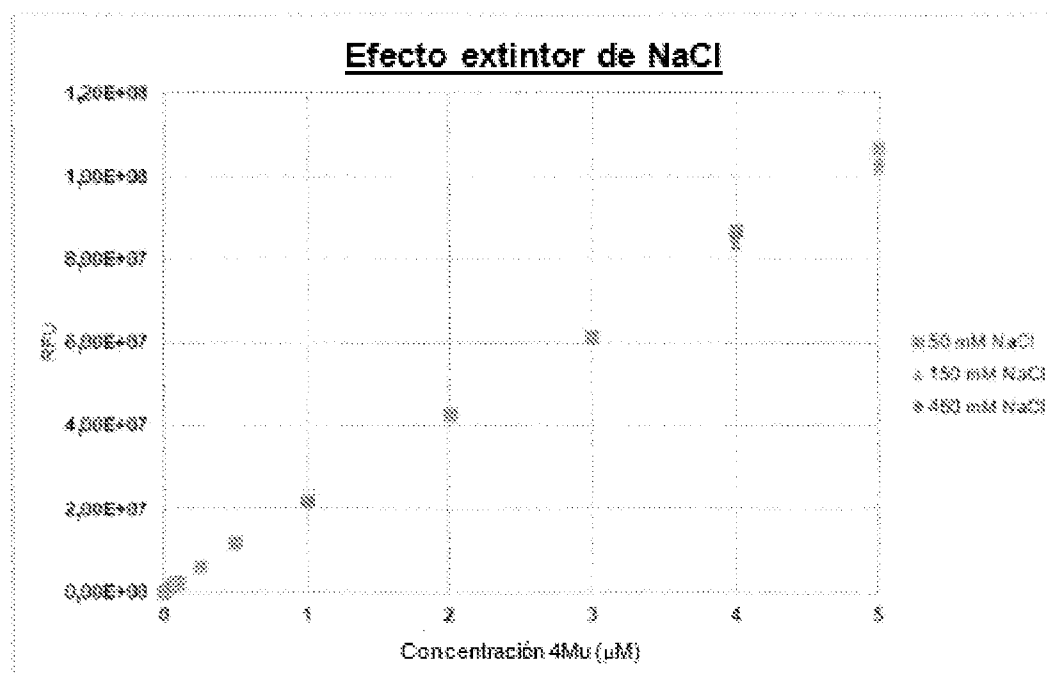


FIG. 3B

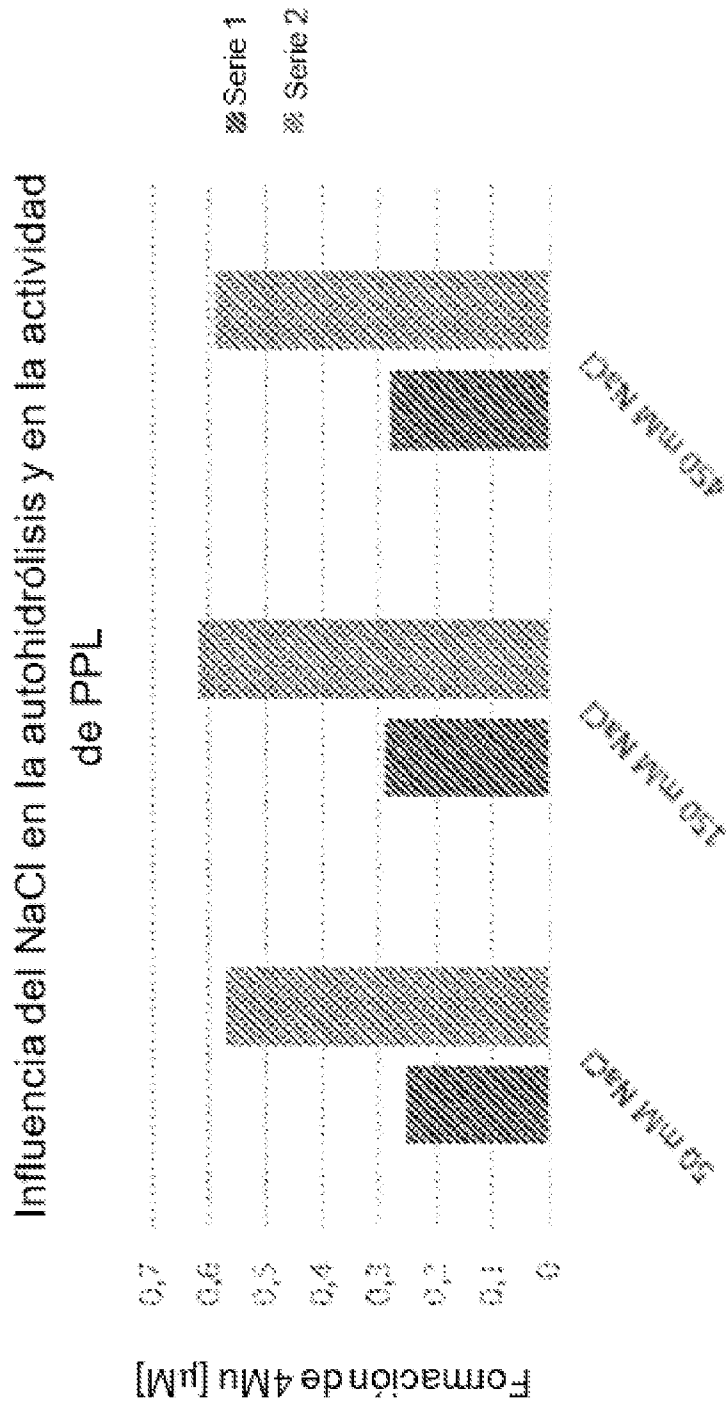


FIG. 3C

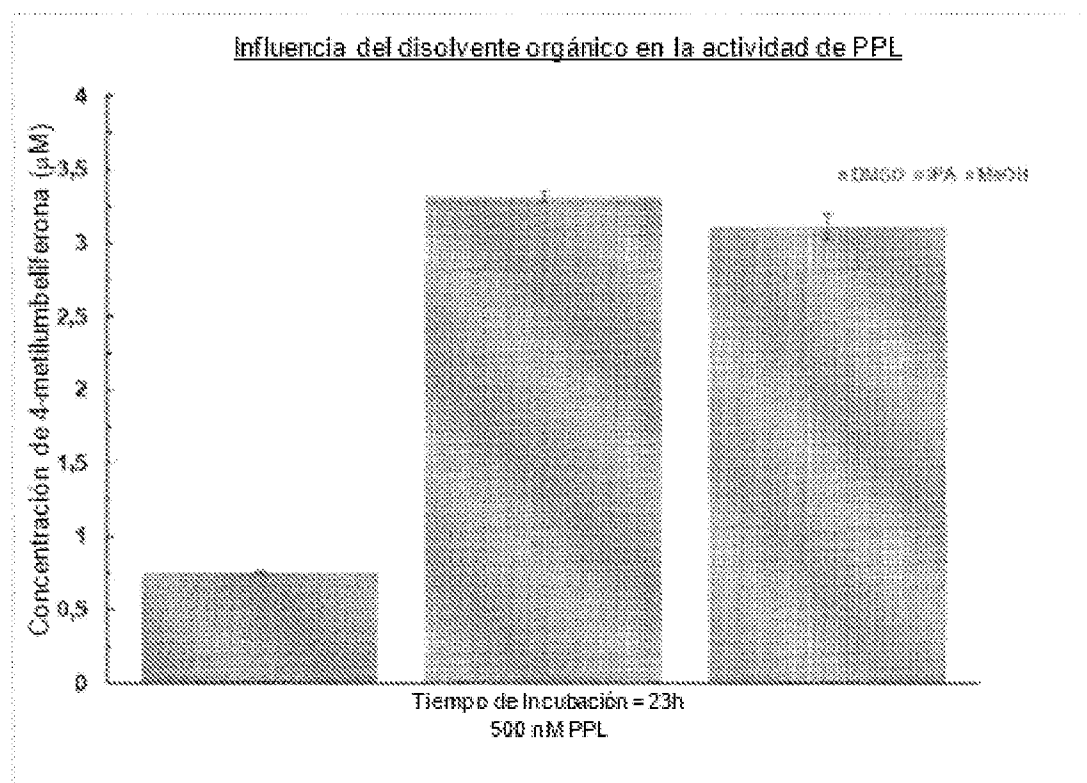


FIG. 4A

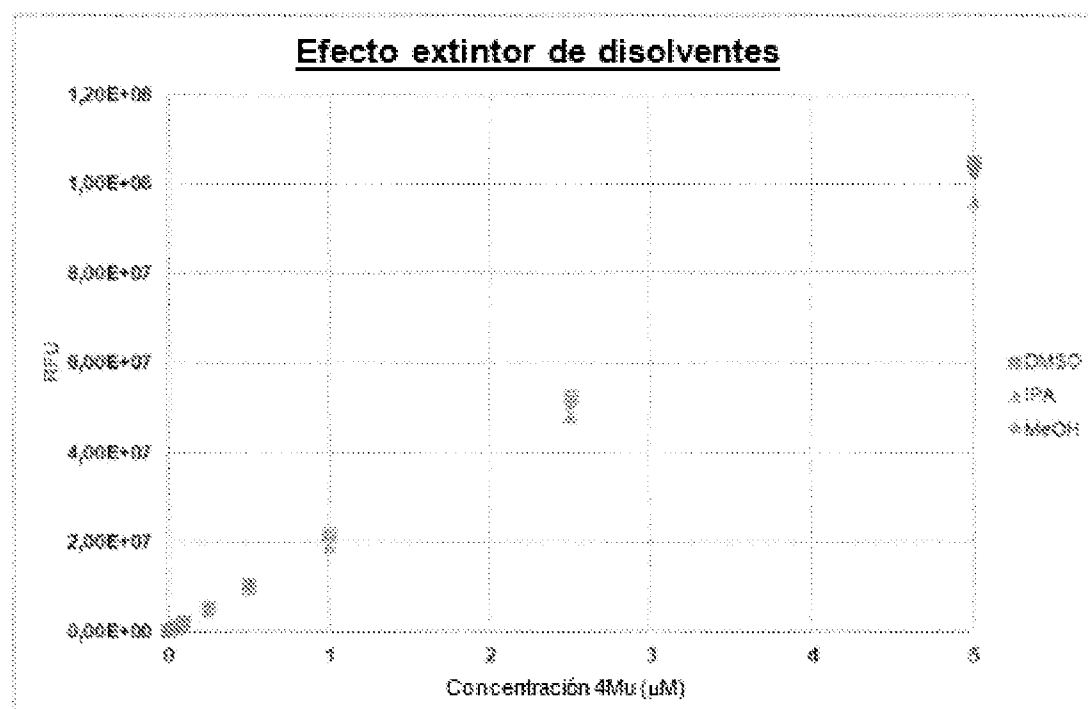


FIG. 4B

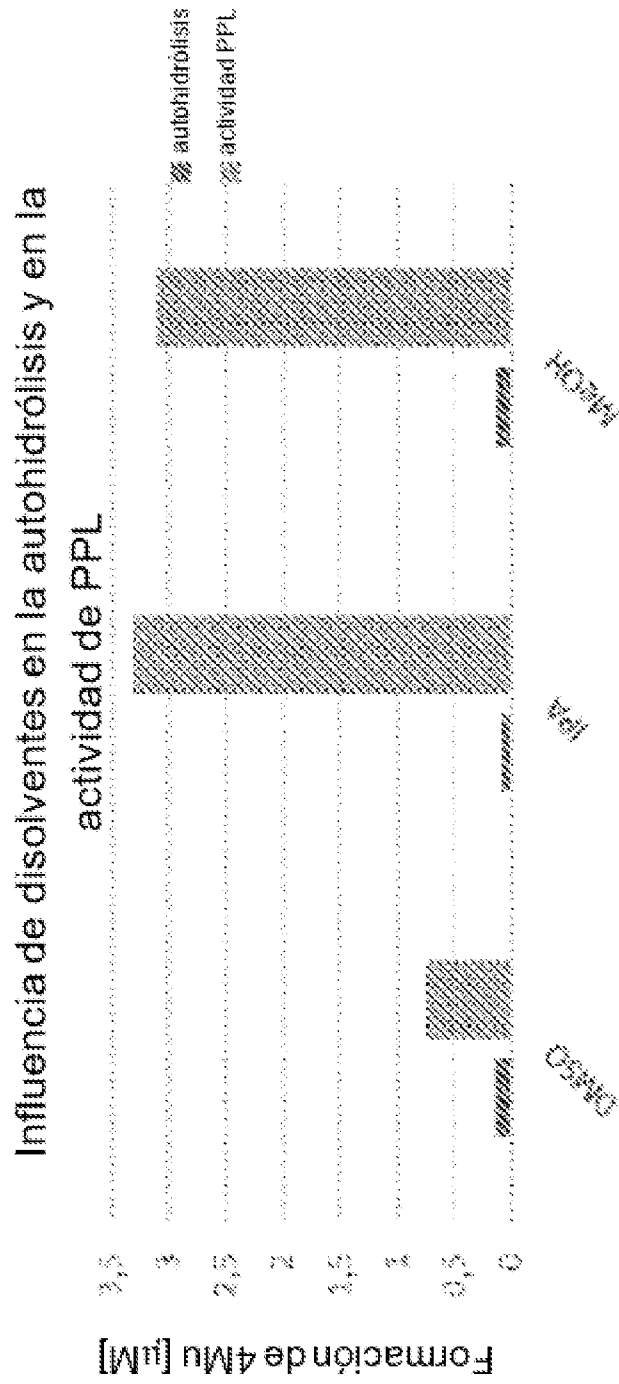


FIG. 4C

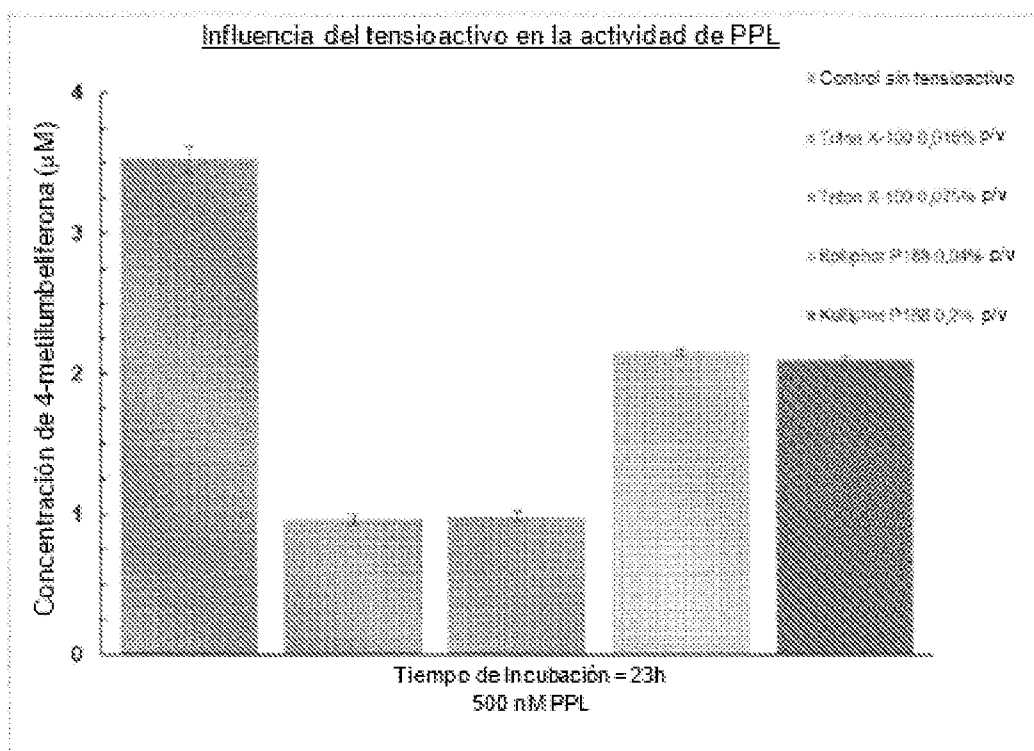


FIG. 5A

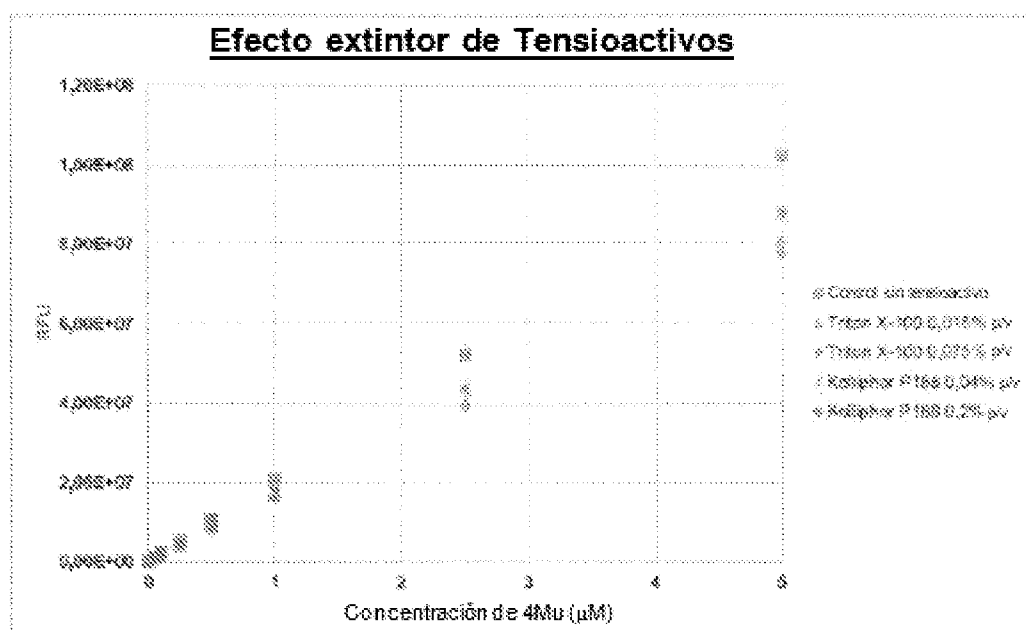


FIG. 5B

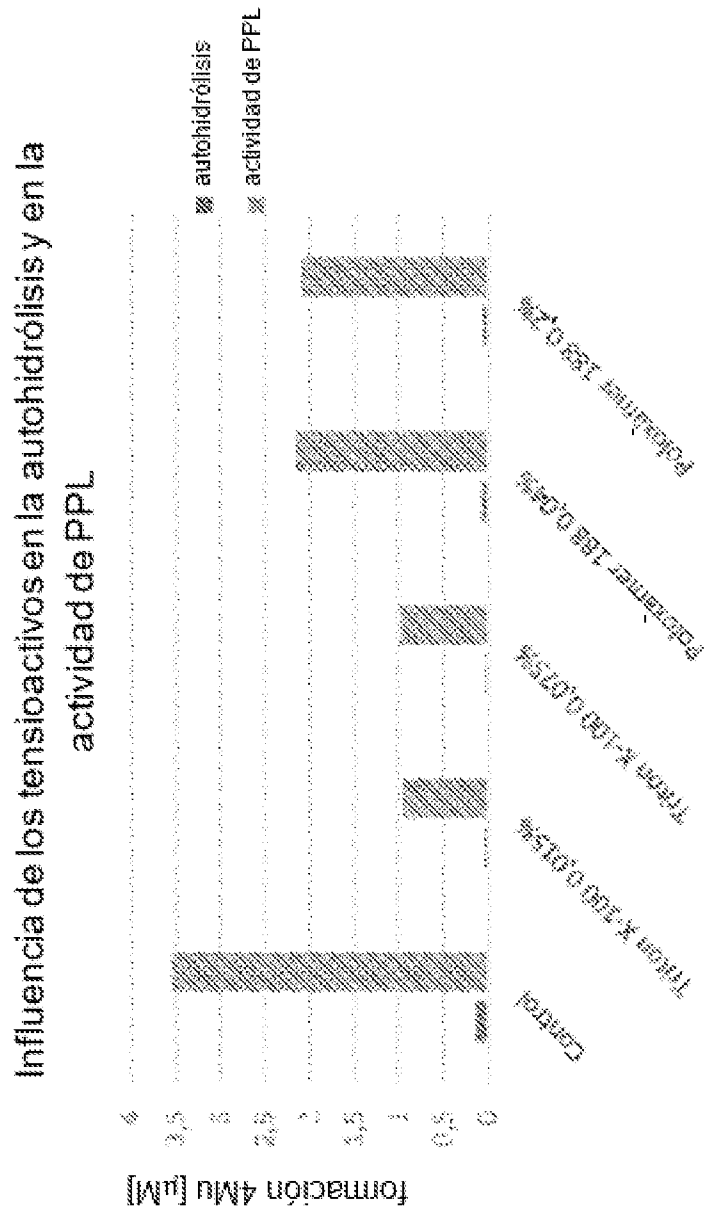


FIG. 5C

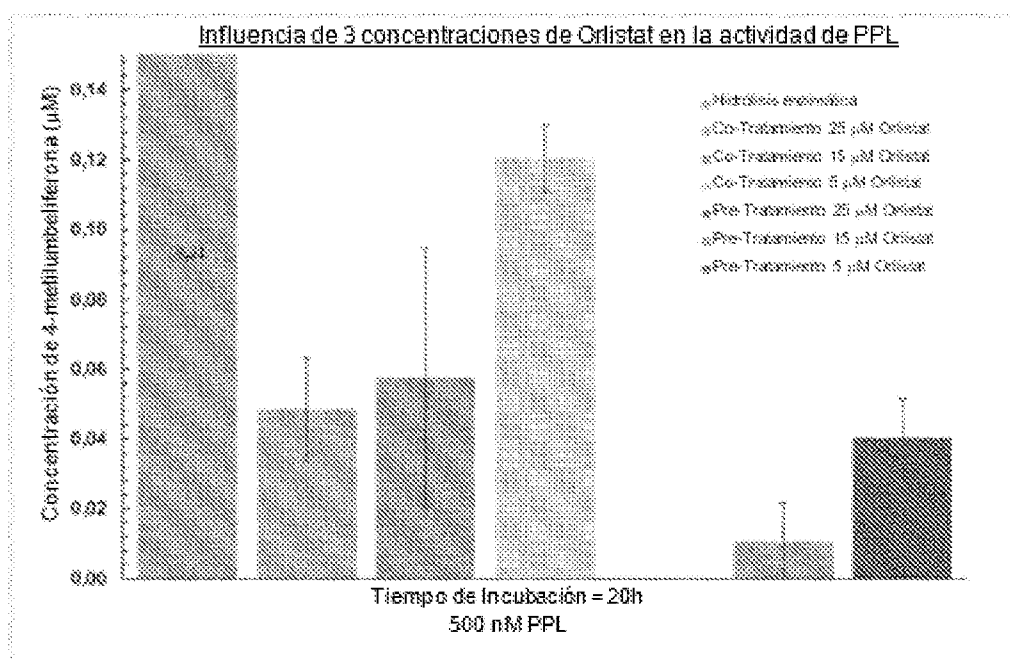


FIG. 6A

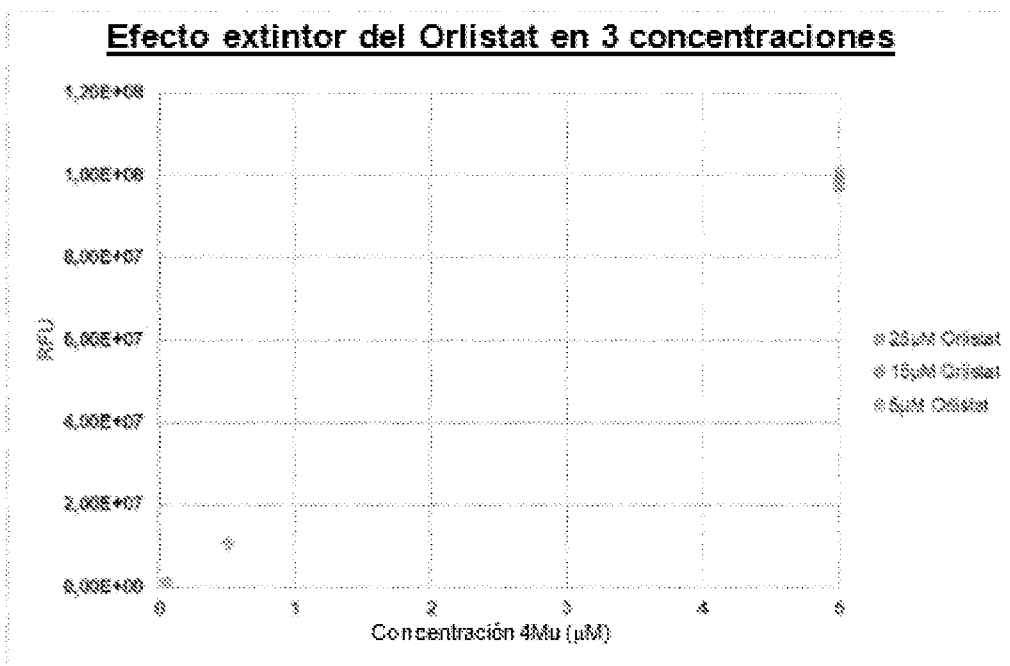


FIG. 6B

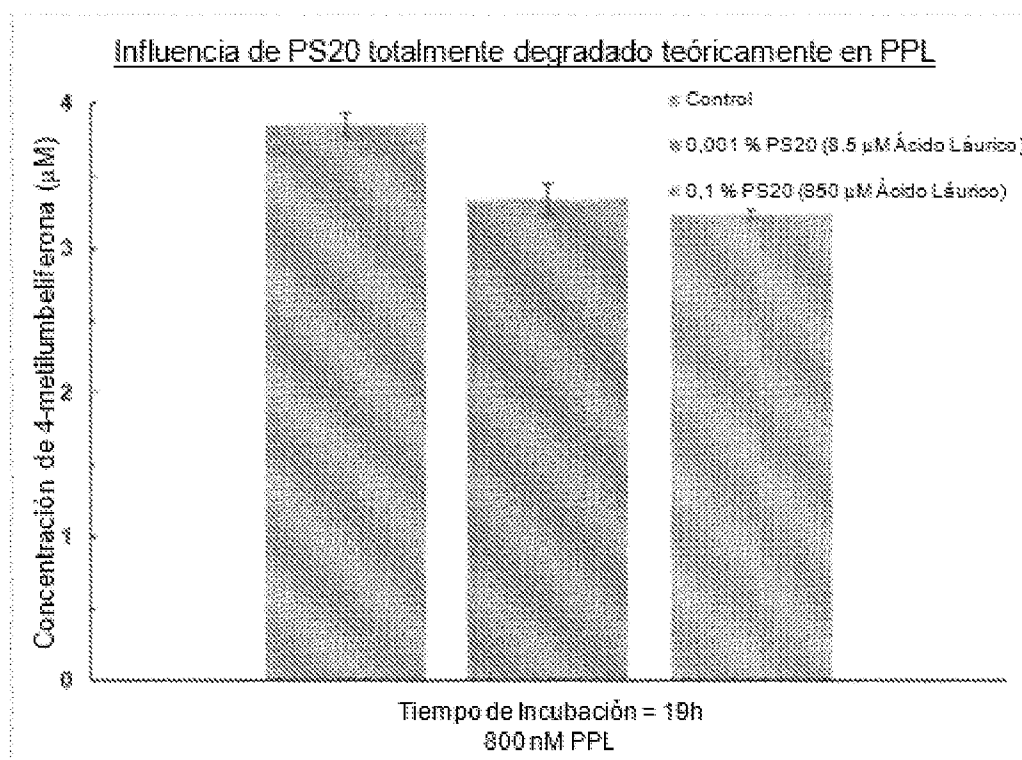


FIG. 7A

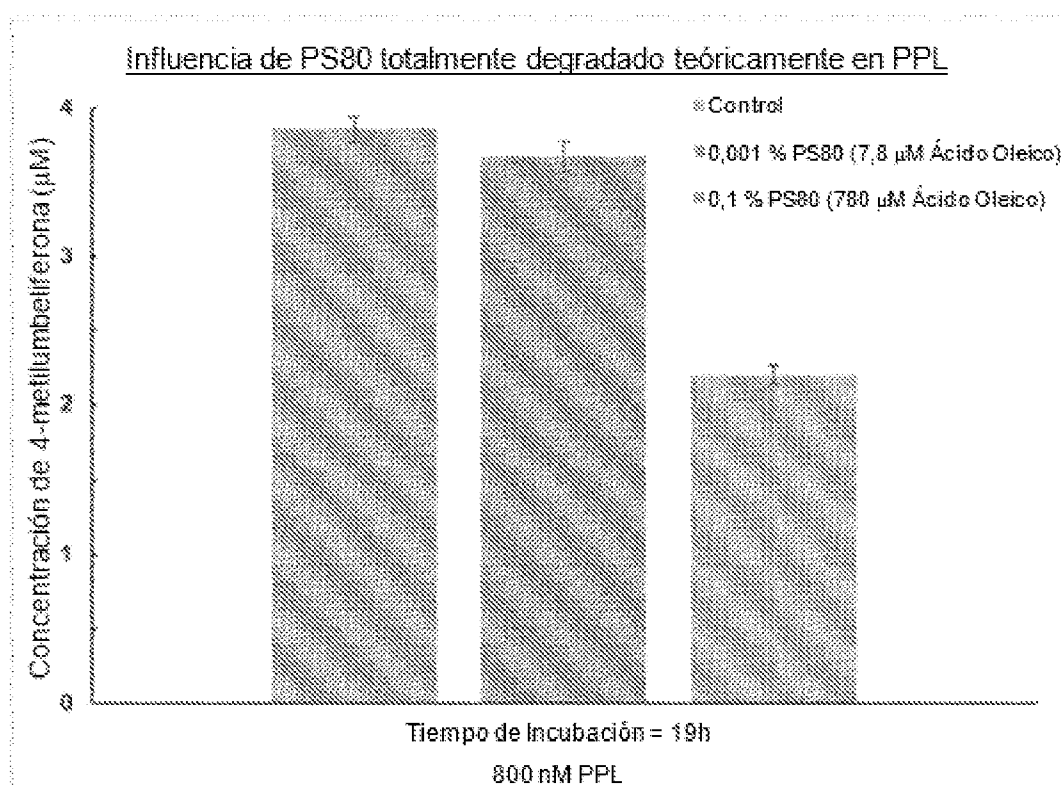


FIG. 7B

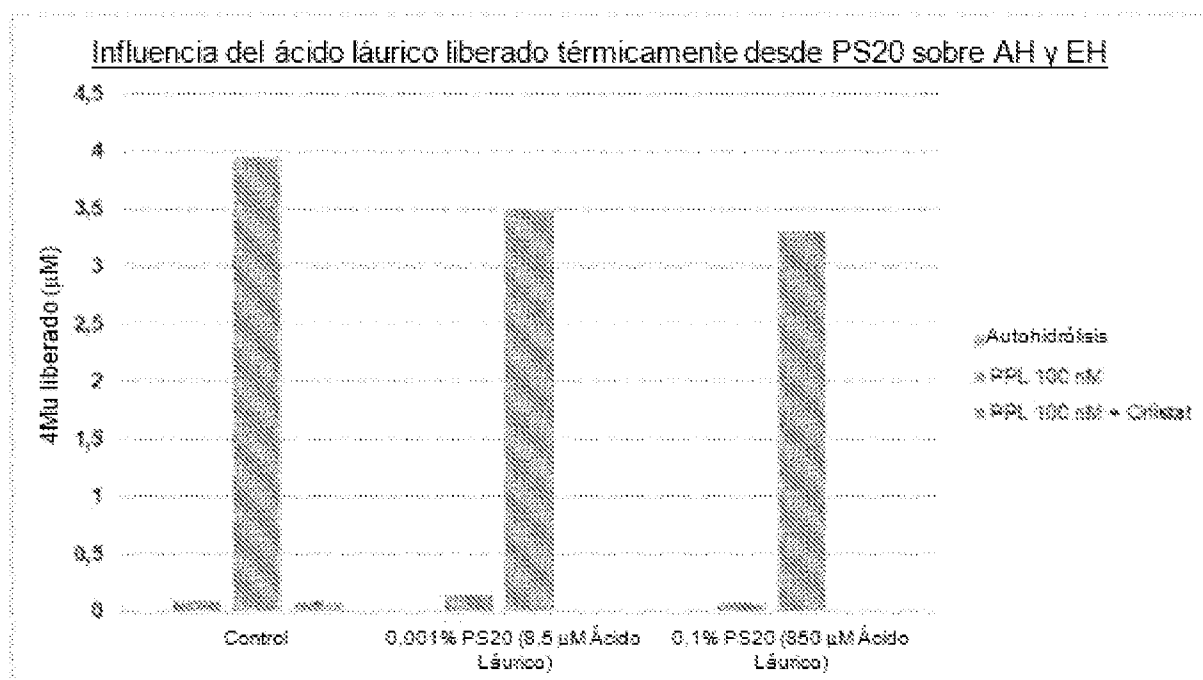


FIG. 7C

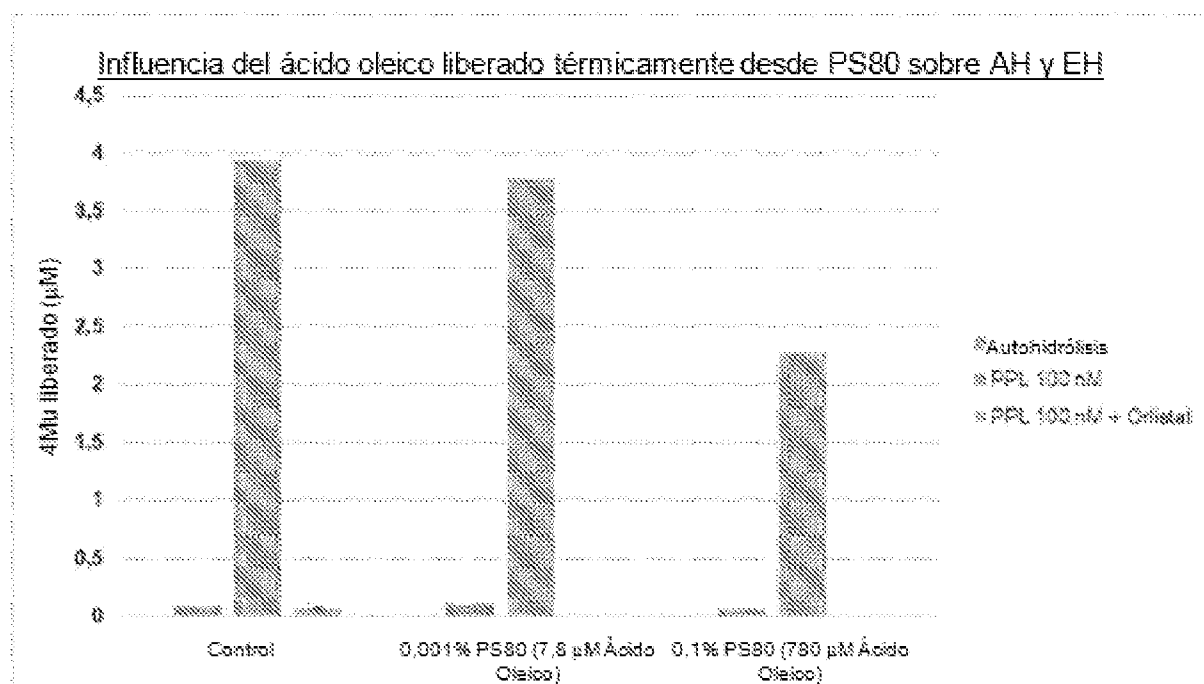


FIG. 7D

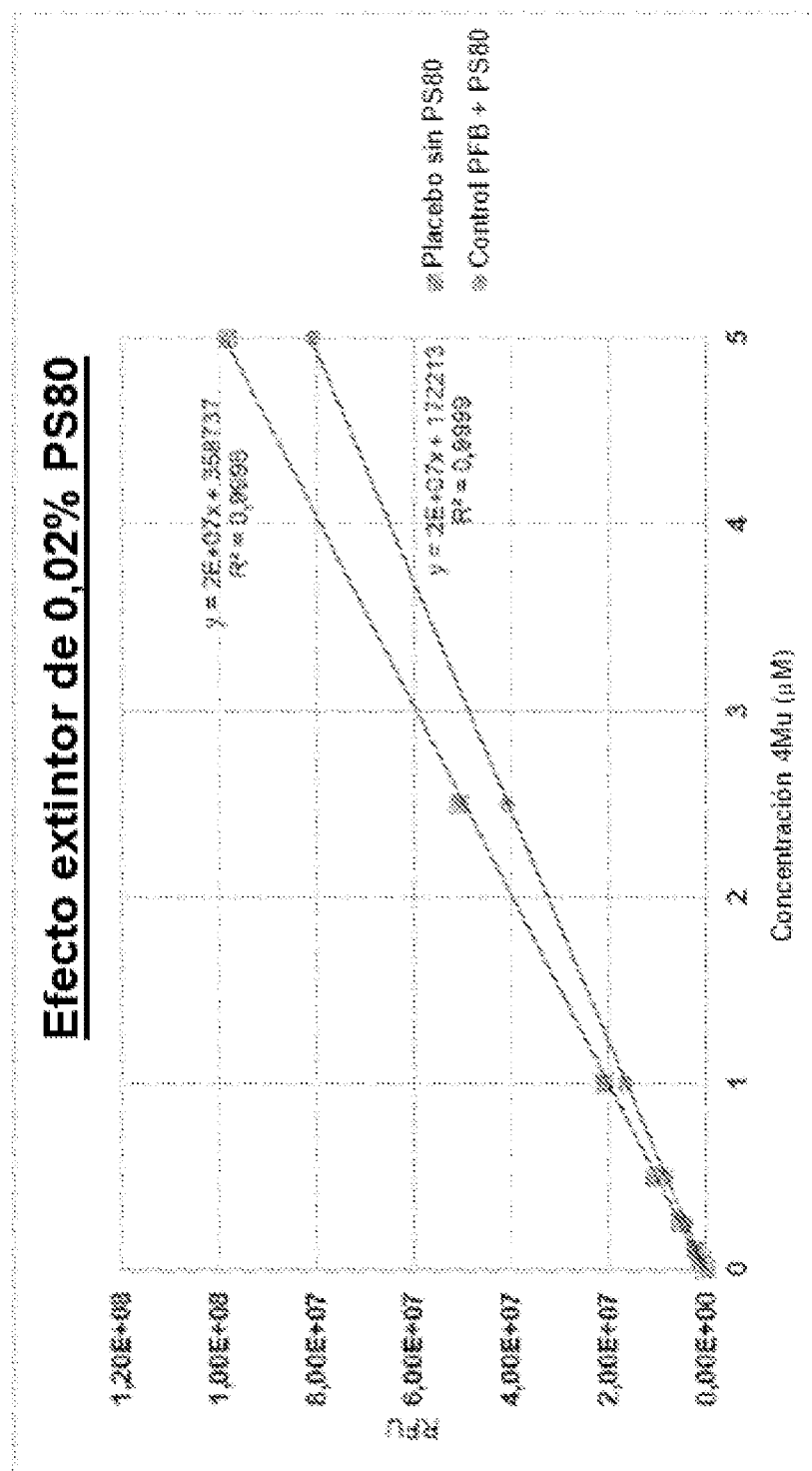
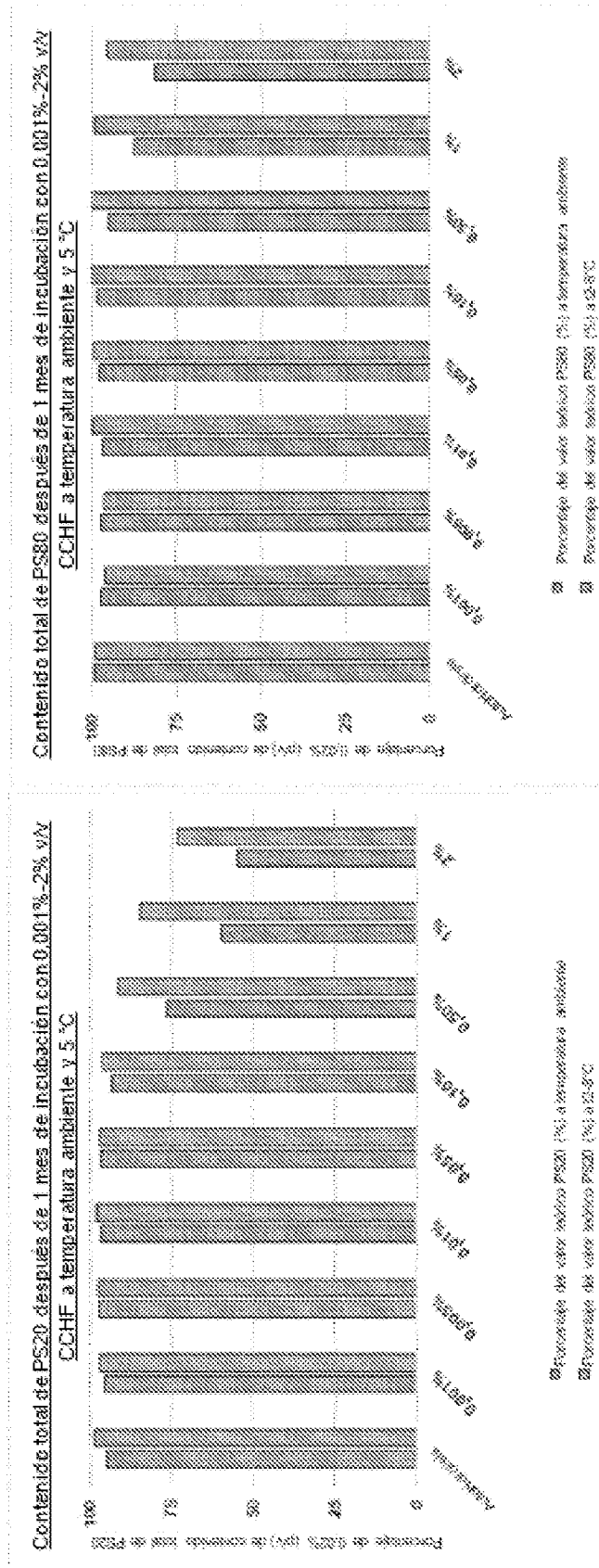


FIG. 8



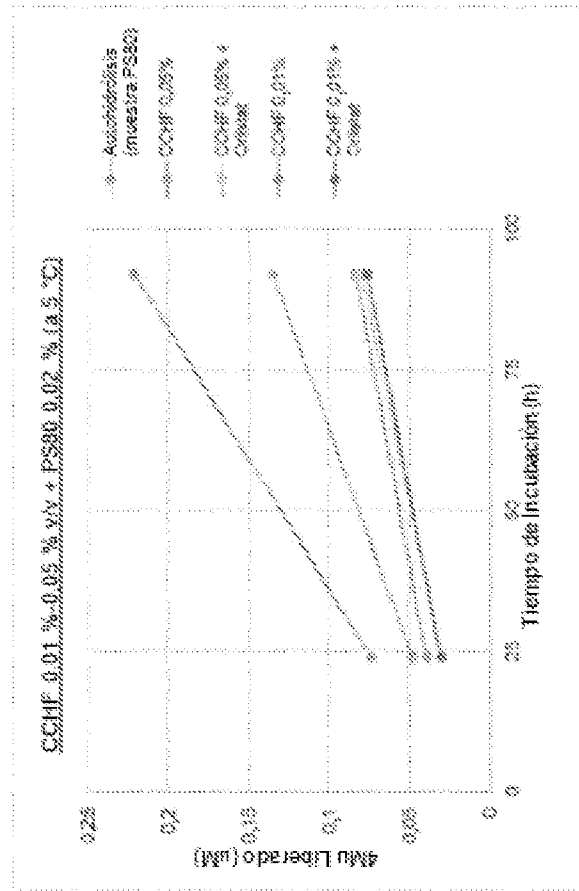


FIG. 9D

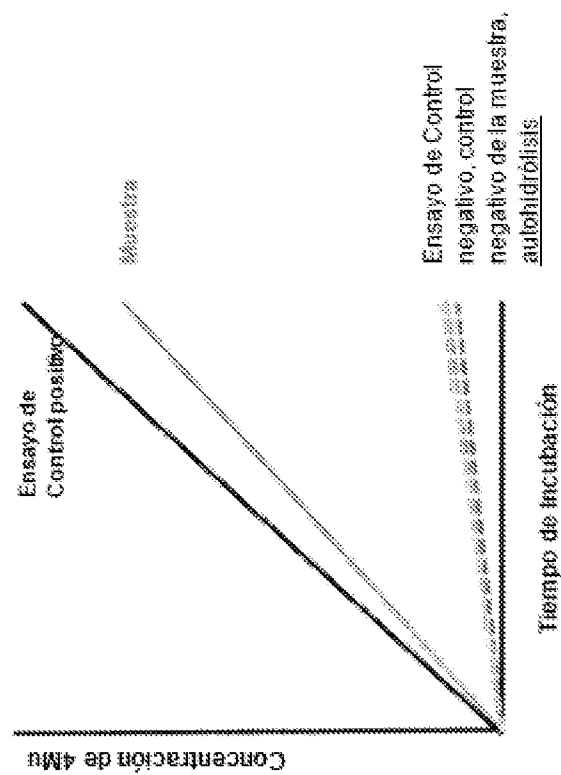


FIG. 9C

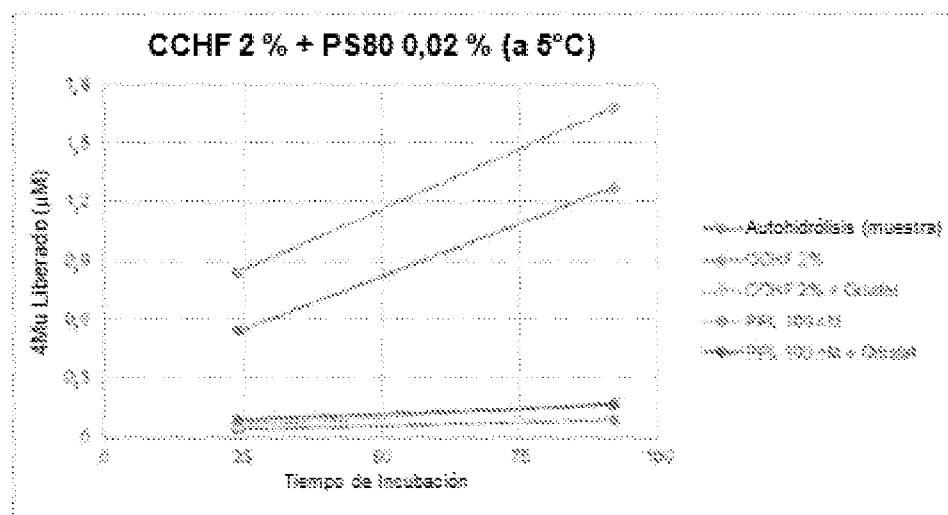


FIG. 10A

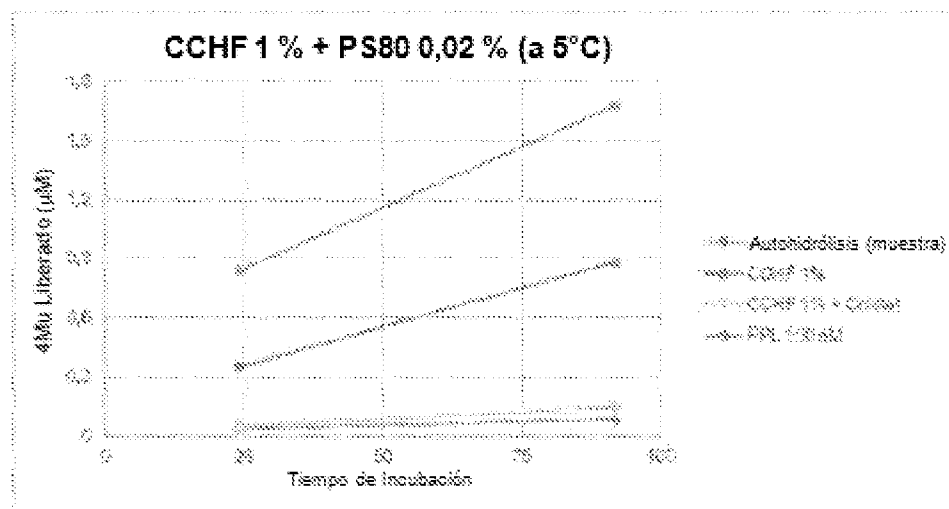


FIG. 10B

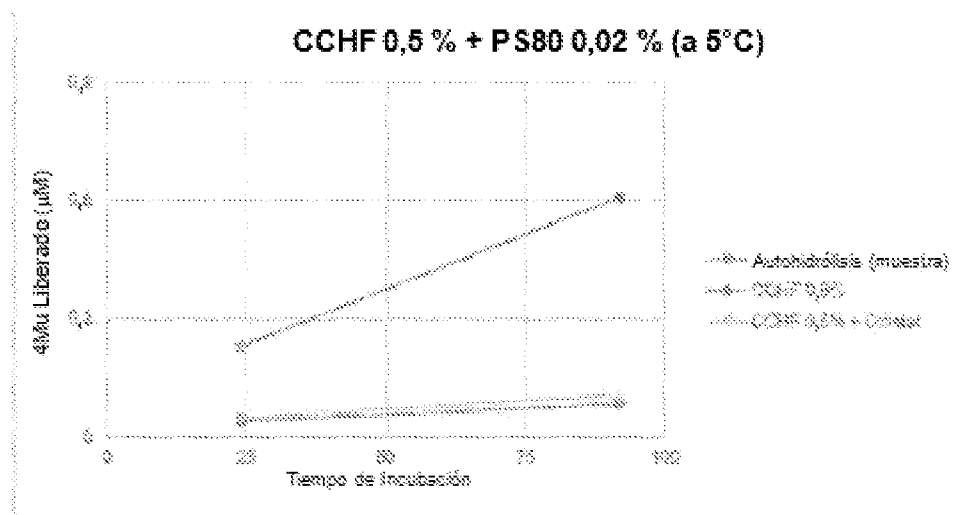


FIG. 10C

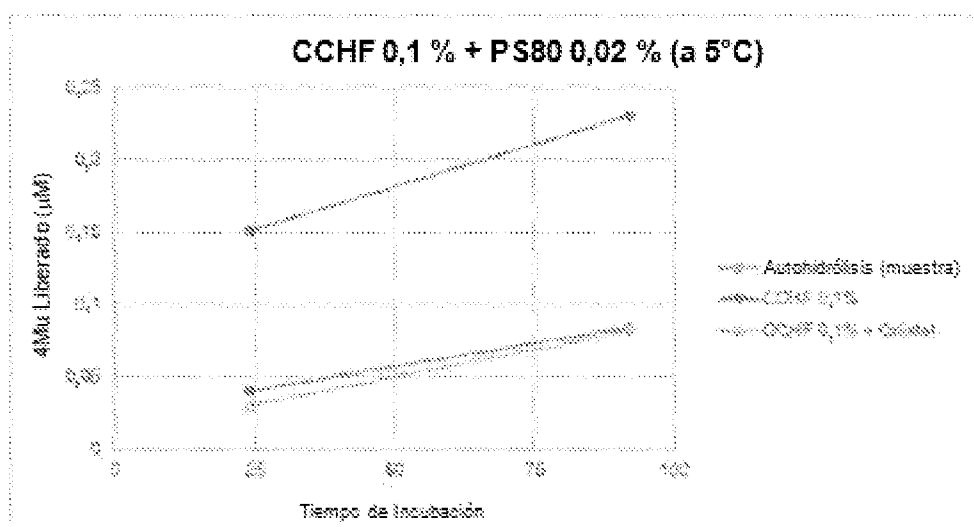


FIG. 10D

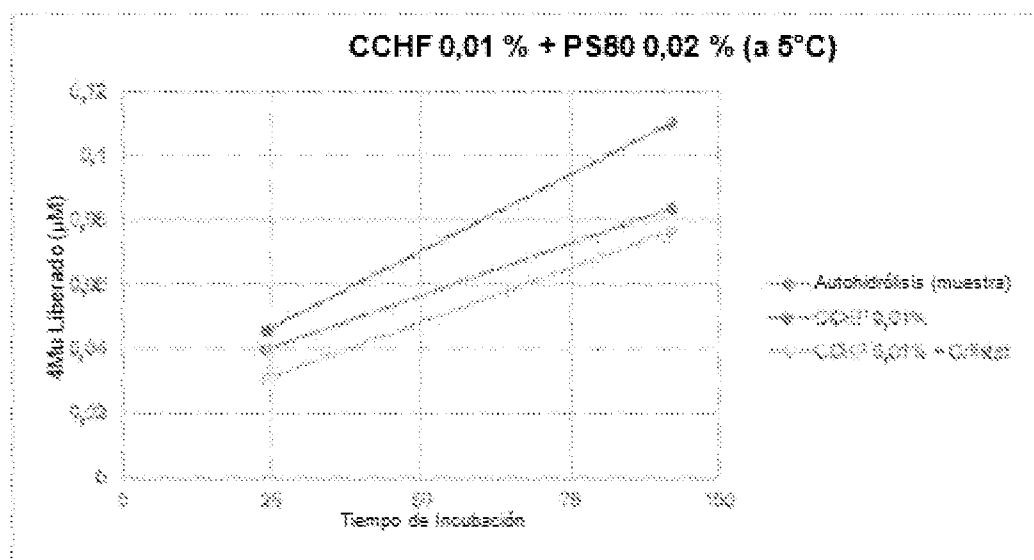


FIG. 10E

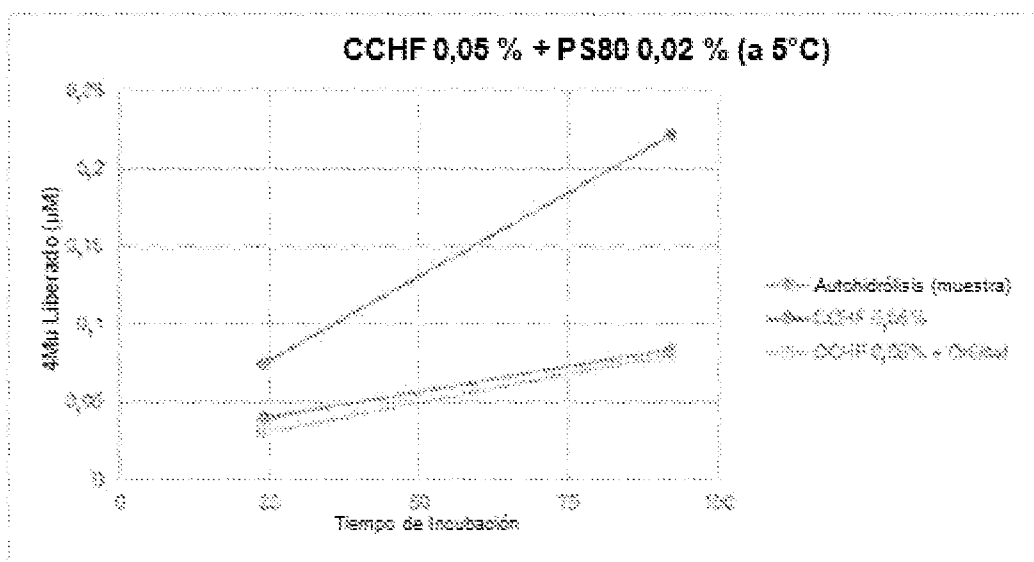


FIG. 10F

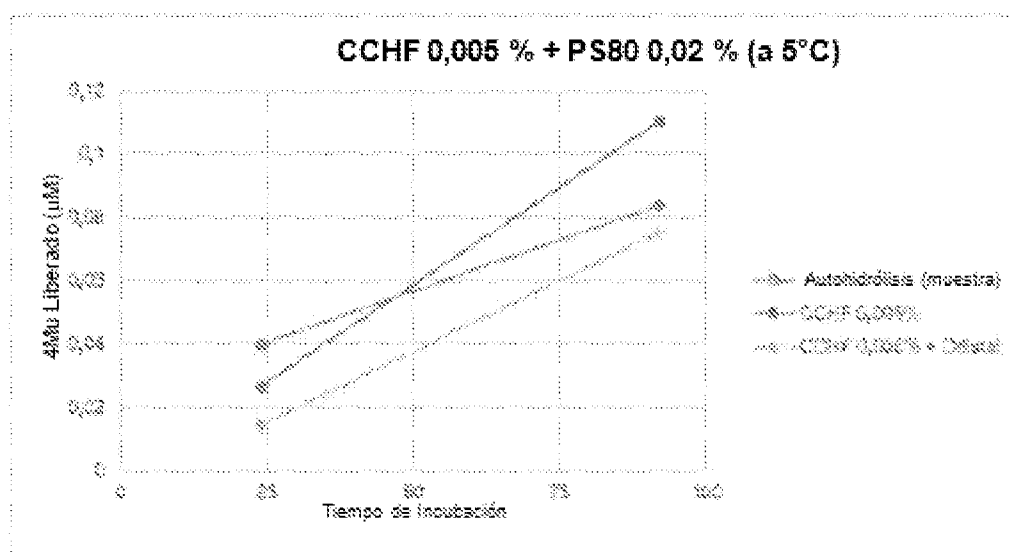


FIG. 10G

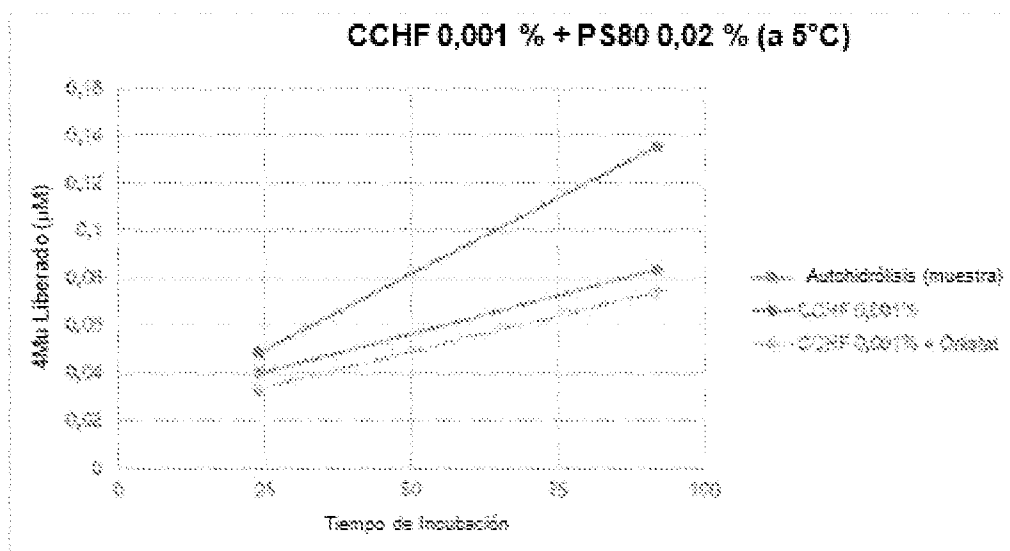


FIG. 10H

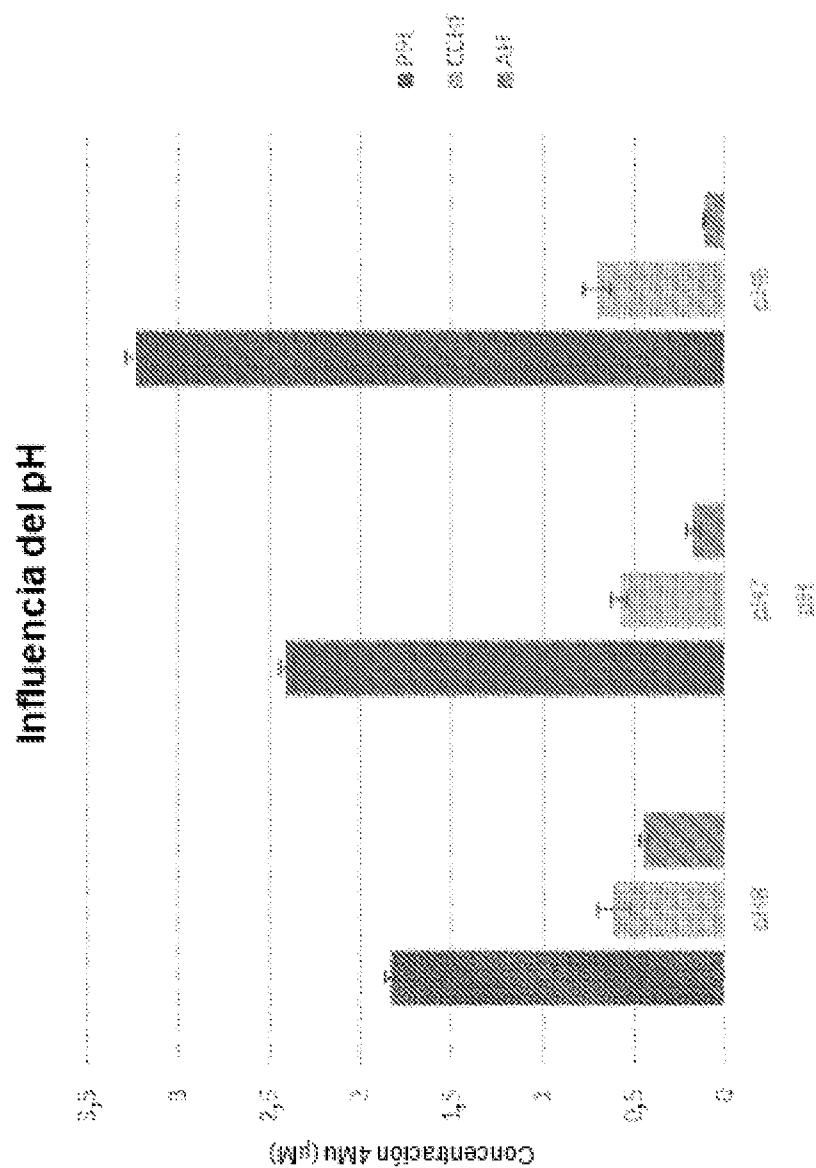


FIG. 11

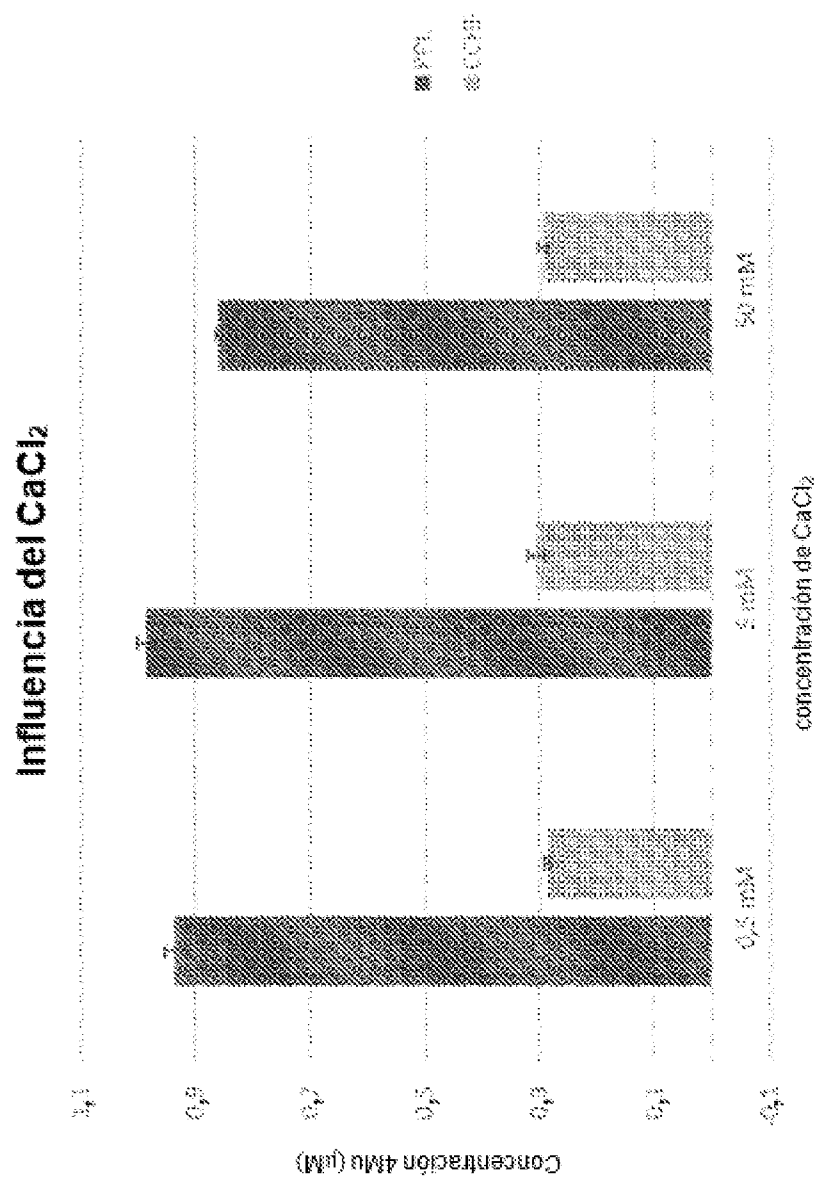


FIG. 12

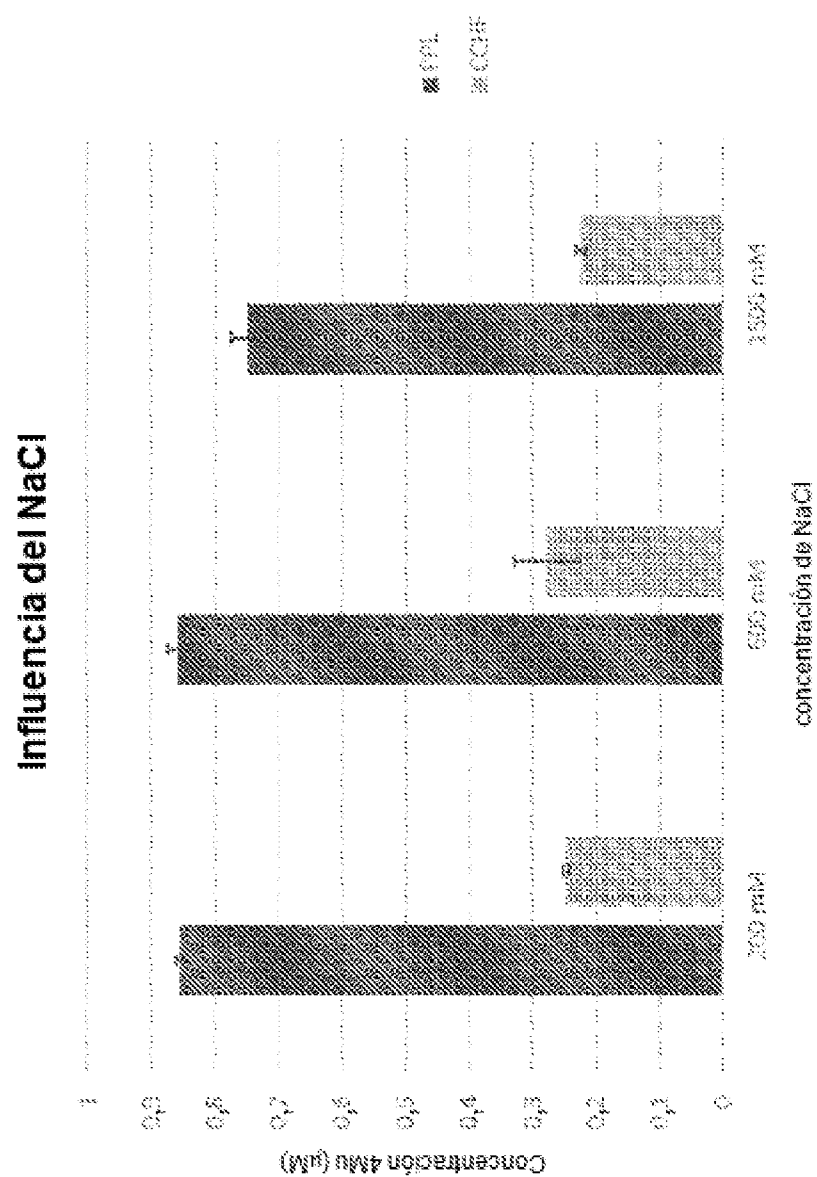


FIG. 13

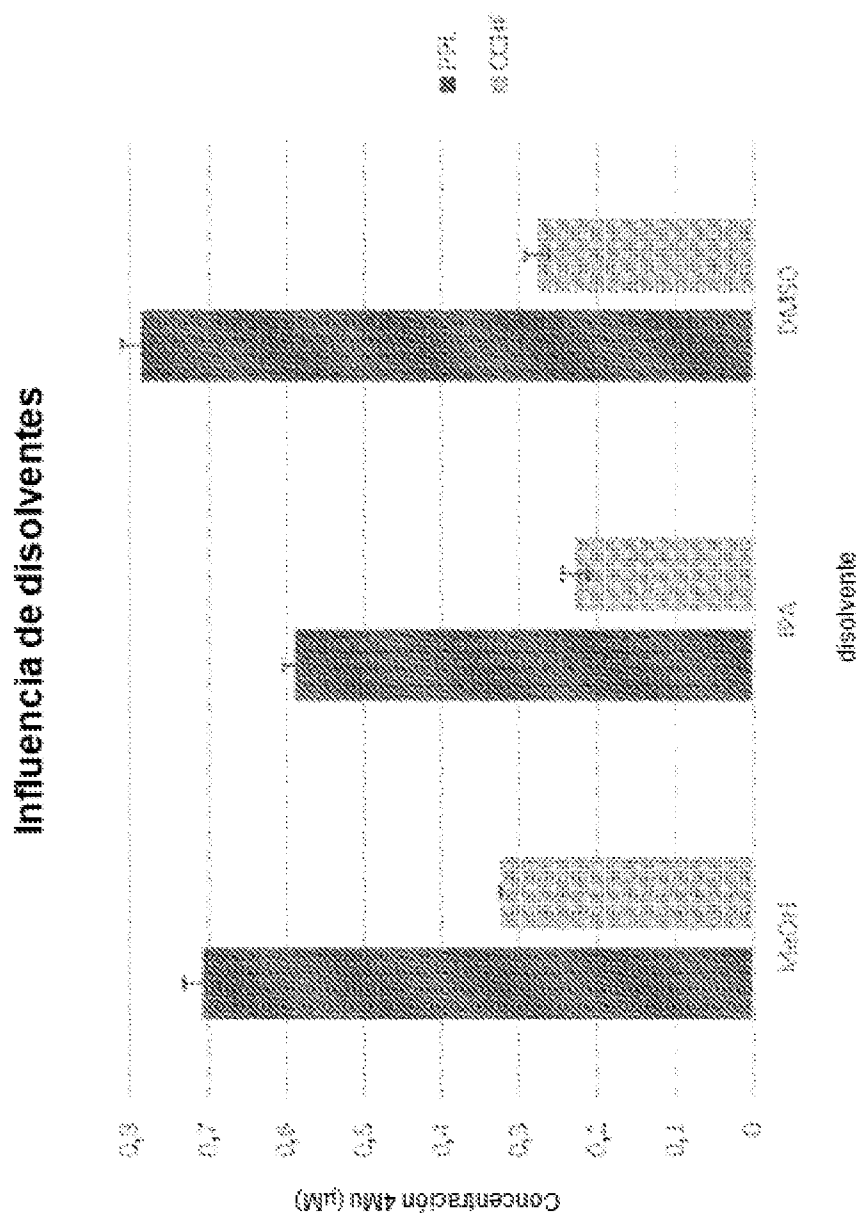


FIG. 14

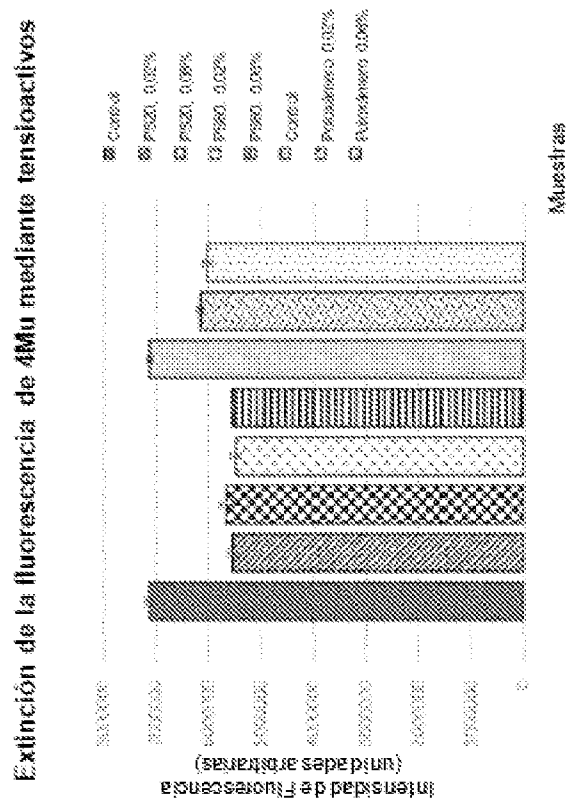


FIG. 15B

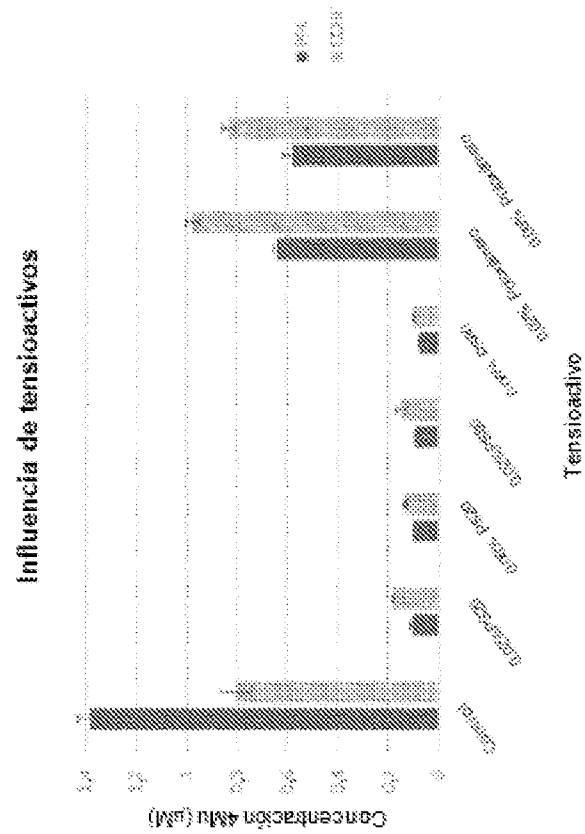


FIG. 15A

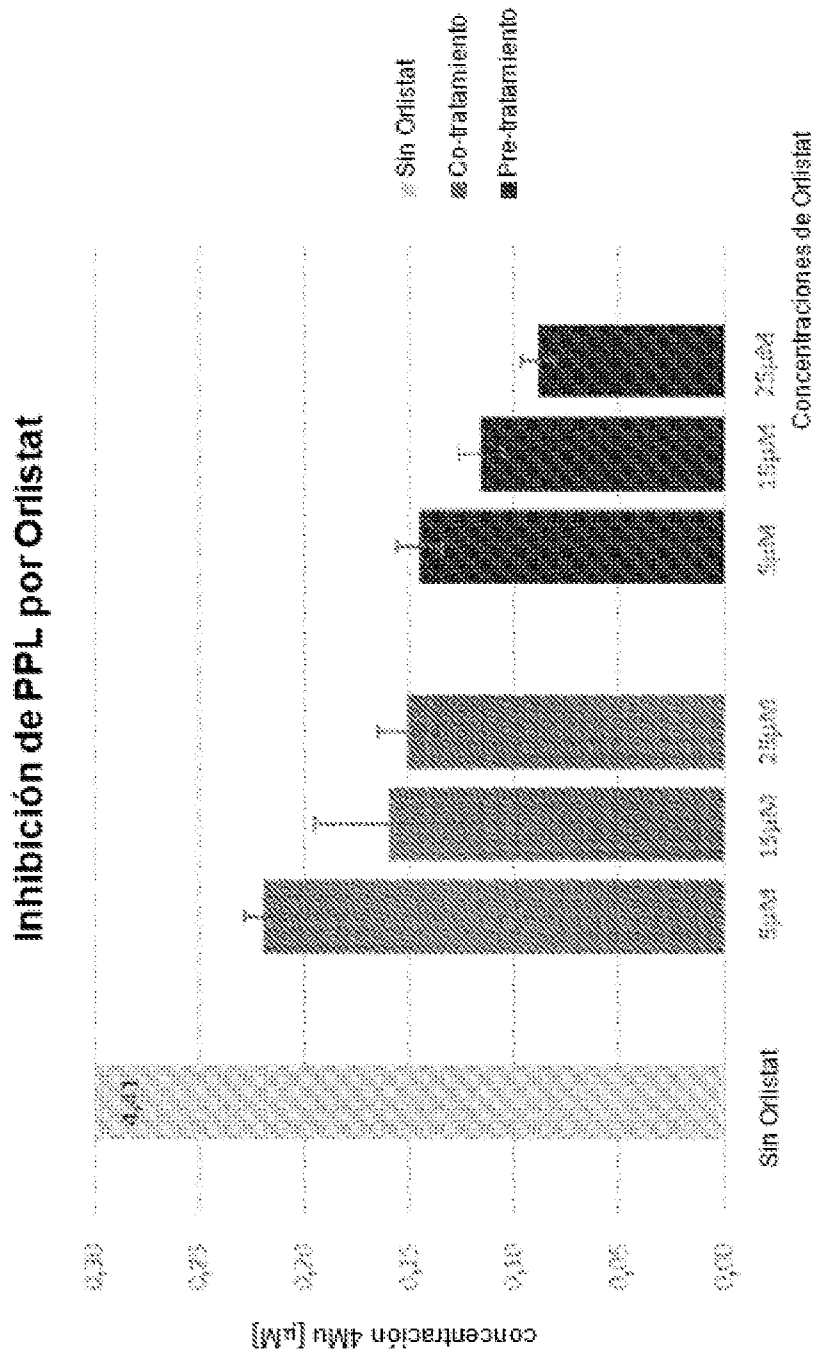


FIG. 16

Cinética del ensayo de lipasa

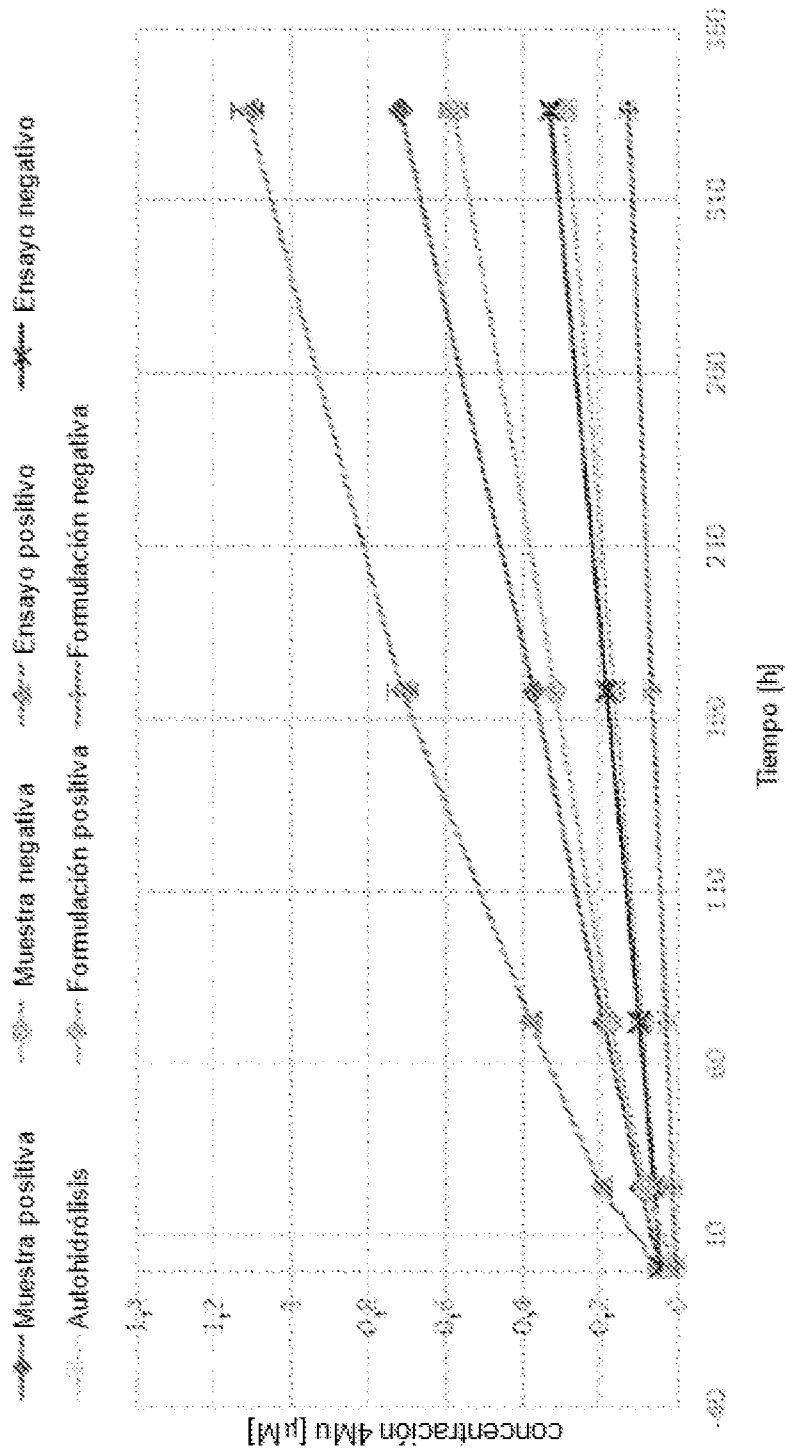


FIG. 17A

Cinética del ensayo de lipasa

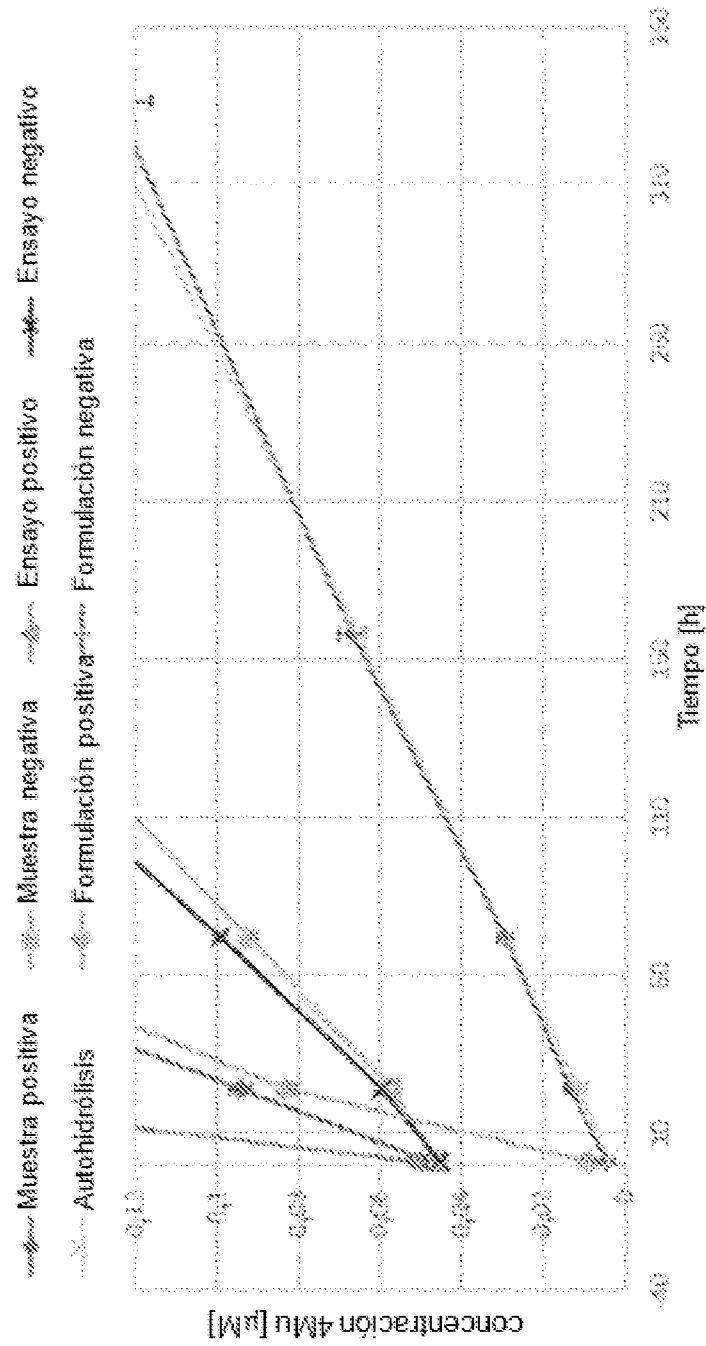


FIG. 17B

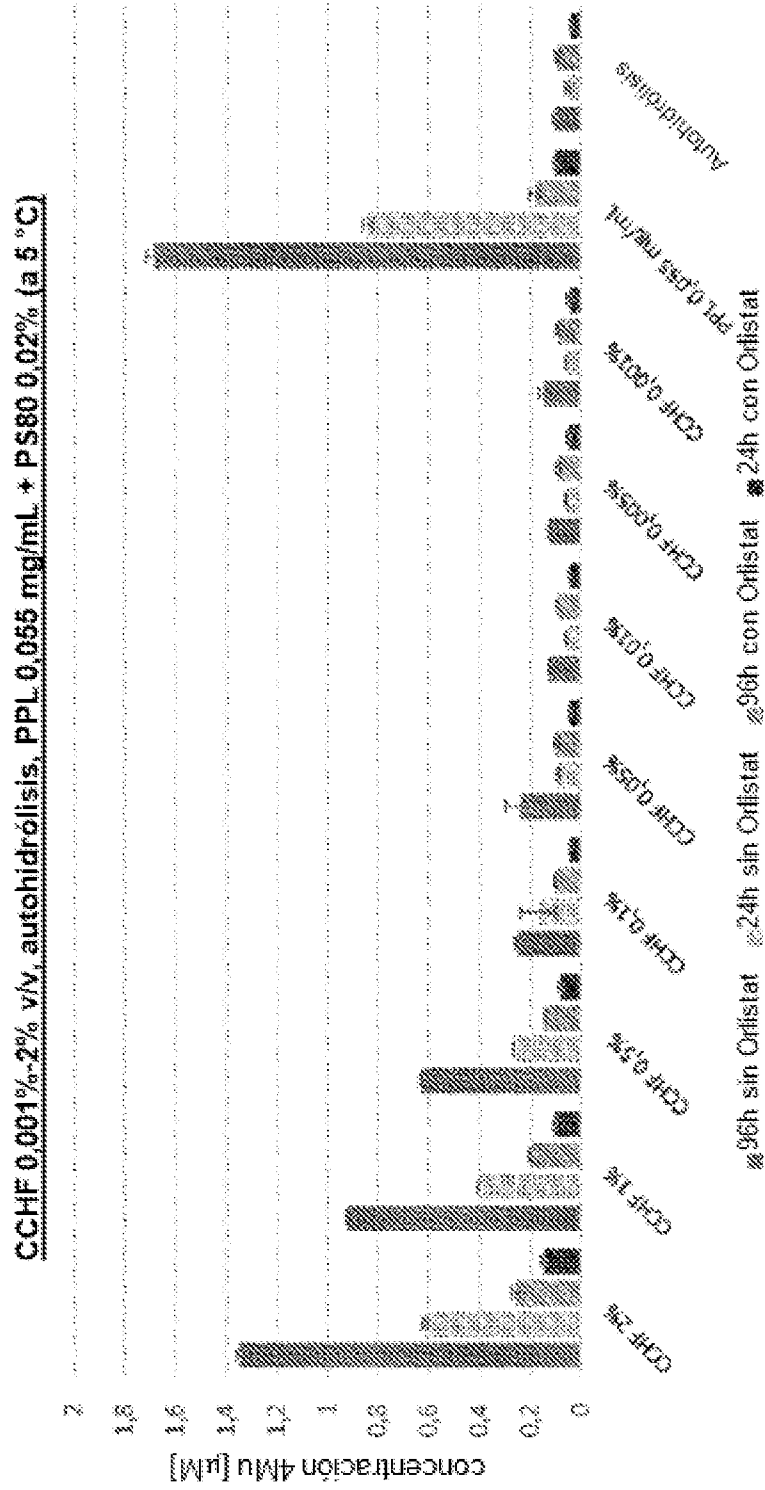
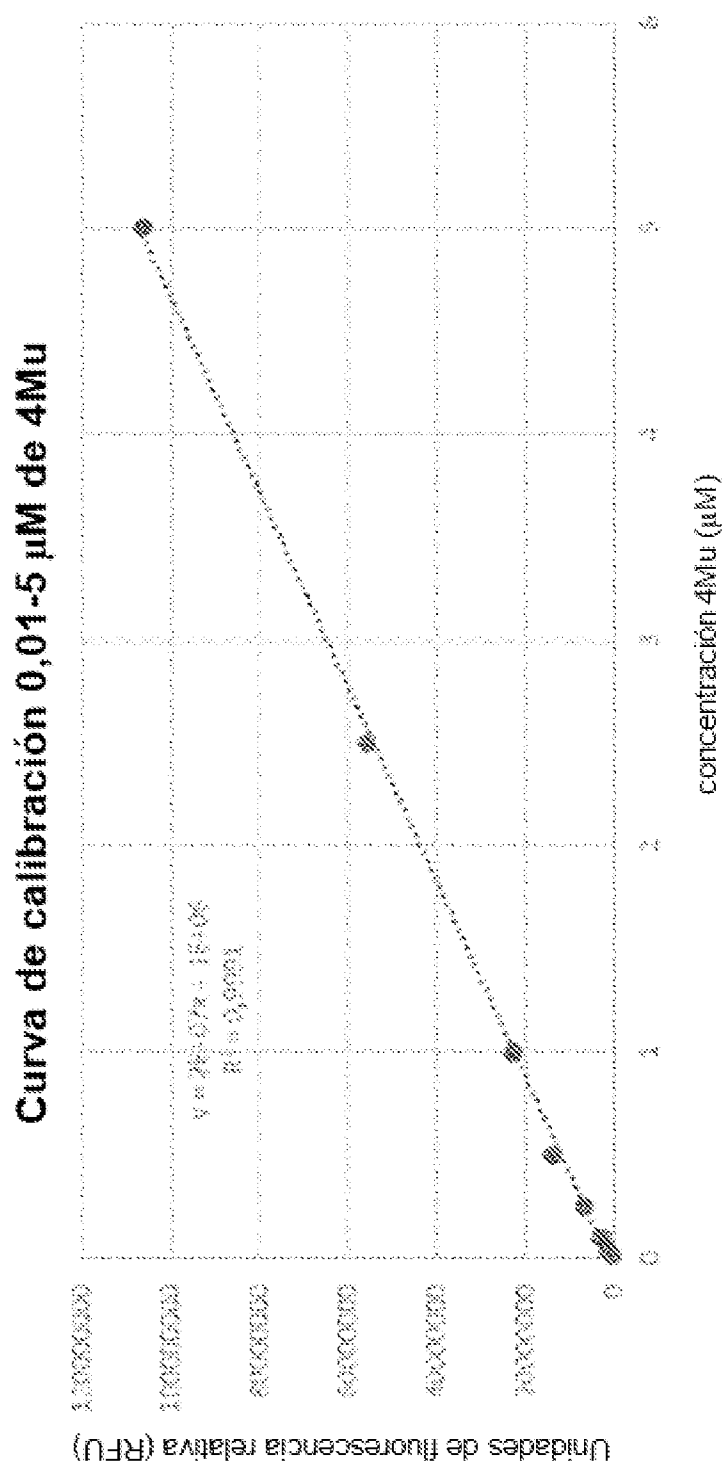


FIG. 18

**FIG. 19A**

Concentración especificada de 4Mu [μ M]	Unidades de fluorescencia relativa (RFU)	Concentración calculada de 4Mu [μ M]	Recuperación [%]
0,00	83135	No aplicable	No aplicable
0,01	376178	0,01	124
0,05	1511383	0,05	108
0,10	2738342	0,10	99
0,25	6534340	0,24	96
0,50	13763493	0,55	109
1,00	22688574	0,97	97
2,50	55708864	2,58	102
5,00	106213696	4,98	100

FIG. 19B