

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 942**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2019** **PCT/US2019/031524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2019** **WO19217684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2019** **E 19729943 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3791183**

54 Título: **Ensayo para determinar la ocupación del receptor *in vivo***

30 Prioridad:

10.05.2018 US 201862669442 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2024

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

ZHENG, NAIYU;
CATLETT, IAN MACQUARIE y
ZENG, JIANING

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 992 942 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

Ensayo para determinar la ocupación del receptor *in vivo*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para medir directamente la ocupación del receptor *in vivo* en tiempo real mediante un compuesto unido covalentemente en el lisado de sangre. Más específicamente, la presente invención se refiere a la medición de la ocupación del receptor de BTK *in vivo* en tiempo real como biomarcador farmacodinámico para el desarrollo de fármacos clínicos.

Antecedentes de la invención

El descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso largo y de alto riesgo. Se ha estimado que el costo promedio de desarrollar un nuevo medicamento exitoso es de hasta 2.600 millones de dólares debido al fracaso de innumerables fármacos candidatos durante el proceso inicial de descubrimiento y desarrollo, y se estima que la tasa de supervivencia general del fármaco candidato que ingresa a los estudios clínicos es inferior al 12 % (Informe de PhRMA, "Biopharmaceutical Research & Development: The Process Behind New Medicines", 2015). Los principales problemas que provocaron el fracaso de estos fármacos candidatos estaban relacionados con una eficacia clínica insuficiente o nula durante la fase final del desarrollo, en particular durante los ensayos clínicos de prueba de concepto (fase II) (Kola, I., *et. al.*, J. Nature Reviews. Drug Discovery 2004, 3, 711-715; Arrowsmith, J., Nature Reviews. Drug Discovery 2011, 10, 87; Morgan, P., *et. al.*, Drug Discovery Today 2012, 17, 419-424).

Se han diseñado muchos medicamentos de moléculas pequeñas y productos biológicos en desarrollo para mediar en el sistema inmunitario. Por ello, estos fármacos candidatos a menudo requieren niveles de dosis muy bajos para desencadenar la respuesta deseada. Por lo tanto, la comprensión temprana de las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) de estos fármacos candidatos es crucial para determinar el intervalo de dosis adecuado para los ensayos clínicos (Topalian, S. L., *et. al.*, The New England Journal of Medicine 2012, 366, 2443-2454; Brahmer, J. R., *et. al.*, The New England Journal of Medicine 2012, 366, 2455-2465; Tolcher, A. W., *et. al.*, Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 2009, 27, 5800-5807; Hua, F., *et. al.*, Journal of Clinical Pharmacology 2014, 54, 14-22; Rutgeerts, P. J., *et. al.*, Gut 2013, 62, 1122-1130). Para mejorar la eficiencia clínica y reducir los costos durante la fase de desarrollo de medicamentos, la medición cuantitativa del perfil PD es tan importante como el perfil PK para el diseño racional de ensayos clínicos. Esto es especialmente cierto cuando el perfil PD cambia con múltiples dosis.

Los ensayos de ocupación del receptor (RO) miden la unión de una molécula a su proteína receptora (o diana) y proporcionan datos cuantitativos que pueden usarse para generar un perfil PD (Liang, M., *et. al.*, Cytometry B Clin Cytom 2016, 90, 117-127). La medición de RO es una determinación crítica para relacionar la eficacia con el mecanismo en modelos animales preclínicos y en estudios clínicos. En la práctica, la RO es particularmente útil para tomar decisiones sobre el aumento de dosis en el estudio primero en humanos (FIH).

La tirosina cinasa de Bruton (BTK) desempeña un papel clave en la transducción y activación de señales a través de las rutas de receptor de linfocitos B, receptor Fc y RANKL (Seiler, T., *et. al.*, Expert Opin Investig Drugs 2017, 26, 909-915; Whang, J. A., *et. al.*, Drug Discovery Today 2014, 19, 1200-1204). Para fármacos basados en anticuerpos, la RO generalmente se monitorea mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos que compiten con la molécula diana para la medición del receptor libre y anticuerpos no competitivos para la medición del receptor total (Liang, M., *et. al.*, Cytometry B Clin Cytom 2016, 90, 117-127; Woska, J. R., Jr., *et. al.*, Journal of immunological methods 2003, 277, 101-115). Sin embargo, para antagonistas de moléculas pequeñas, no existen reactivos de anticuerpos para la detección directa del receptor ocupado mediante citometría de flujo. Anteriormente, la RO de BTK de ibrutinib en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se determinó utilizando una sonda de afinidad fluorescente que se unió al sitio de ocupación activo de BTK libre (no ocupada), seguido de detección mediante SDS/PAGE y escaneo de gel fluorescente (Honigberg, L. A.; J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010, 107, 13075-13080). El ensayo basado en sonda de afinidad fluorescente solo puede determinar la cantidad de BTK libre, por consiguiente, se requiere un ensayo adicional mediante inmunotransferencia tipo Western para medir la BTK total. Debido a la gran cantidad de muestras generadas en estudios clínicos, el uso de dos plataformas de ensayo no es práctico. Además, el método carece de comparabilidad directa entre la medición no unida y la medición total, lo que da como resultado una alta variación del ensayo.

Recientemente, se ha informado y utilizado un ensayo de RO de BTK basado en ELISA que utiliza una sonda covalente biotinilada en un estudio clínico con acalabrutinib y CC-292 (Barf, T., *et. al.*, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2017; Evans, E. K., *et. al.*, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2013, 346, 219-22). En este enfoque, sólo se detecta la BTK libre mientras se elimina la BTK unida al fármaco (DB-BTK). La concentración de BTK total se determina utilizando la muestra previa a la dosis con el supuesto de que el nivel total de BTK permanece constante en todas las muestras.

Como alternativa, se puede utilizar un ensayo independiente basado en transferencia de energía por resonancia de

fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET) para BTK libre y total para estimar la ocupación de BTK en mononucleocitos de sangre periférica (PBMC) (Lutz, J. D. N., *et. al.*, Poster presentation at the 7th American Conference on Pharmacometrics (ACoP7) in Bellevue, WA. 23-26 de octubre de 2016. 2016). Sin embargo, la BTK libre y total se miden de forma independiente, en lugar de simultáneamente en la misma muestra y se encontró que los niveles de BTK total variaban significativamente entre muestras (Honigberg, L. A., *supra*). Por lo tanto, los enfoques basados en ELISA o TR-FRET están limitados por la variabilidad inherente resultante de la elección metodológica.

El documento WO 2016/100593 describe métodos y sistemas de ensayo tanto para la determinación cuantitativa de una diana tal como BTK como para la ocupación de la diana, incluida la cantidad relativa de diana disponible asociada con un inhibidor o ligando de diana, como un inhibidor irreversible de BTK.

El ensayo de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) ha demostrado potencial en la cuantificación de proteínas debido a su excelente selectividad de ensayo y capacidad de multiplexación (Neubert, H., *et. al.*, *Bioanalysis* 2014, 6, 1731-1733). En particular, el ensayo LBA-CL-EM "híbrido" que combina el enriquecimiento por inmunocaptura, seguido de la detección por CL-EM/EM se ha convertido en una poderosa plataforma tecnológica para medir biomarcadores proteicos o agentes terapéuticos con una excelente selectividad de detección (Stevenson, L., *et. al.*, *Bioanalysis* 2013, 5, 2903-2918). El principal beneficio del ensayo de CL-EM es su capacidad de cuantificar tanto DB-BTK como BTK libre simultáneamente en la misma muestra. Por lo tanto, la determinación de RO es mucho menos sensible a la variación de la muestra o del proceso.

Sin embargo, el desarrollo del ensayo de CL-EM plantea una serie de desafíos. En primer lugar, las muestras de sangre de animales o humanos a los que se les ha administrado un fármaco pueden contener una cantidad excesiva del fármaco, que reaccionará con el receptor libre *ex vivo* para formar un receptor unido al fármaco, lo que da como resultado una sobreestimación de la RO. En segundo lugar, la CL-EM/EM suele ser menos sensible que un ensayo ELISA.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere en general a ensayos para monitorear y medir la unión de un fármaco de interés a un receptor. En este ensayo, una muestra de sangre extraída de un sujeto al que se le ha administrado el compuesto de interés se incuba con una solución de lisis que contiene un desactivador. Luego, el receptor unido al fármaco y unido al desactivador se aísla de la muestra de sangre lisada. El receptor unido al fármaco y unido al desactivador aislado se digiere para generar péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador. La cantidad de péptidos sustitutos se determina. La ocupación del receptor se puede determinar comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con el péptido sustituto unido al fármaco y unido al desactivador total.

Más específicamente, la invención se refiere a un método de ensayo para determinar la ocupación del receptor de fármacos en un sujeto al que se le administra un fármaco de interés que se une covalentemente al receptor de interés, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a. recoger una muestra de sangre del sujeto tratado con el fármaco de interés
- b. añadir una solución de lisis que comprende un desactivador que se une irreversiblemente al mismo sitio de receptor que el fármaco de interés a la muestra de sangre,
- c. aislar el receptor unido al fármaco y unido al desactivador mediante inmunocaptura,
- d. digerir el receptor unido al fármaco y unido al desactivador aislado para generar péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador,
- e. medir la cantidad de péptidos sustitutos utilizando CL-EM/EM y determinar la cantidad de receptor unido al fármaco comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador.

En una realización de la invención, el desactivador compite con el compuesto de interés para unirse irreversiblemente al receptor en el mismo sitio que el compuesto de interés.

En otra realización de la invención, el desactivador se añade al tampón de lisis en niveles en exceso molar del compuesto de interés. En otra realización de la invención, el desactivador se añade al tampón de lisis en una cantidad de 105 a 1000 veces en exceso, basándose en la concentración del receptor endógeno.

En otra realización de la invención, la solución de lisis con desactivador se añade inmediatamente después de recoger la muestra de sangre. En otra realización de la invención, la solución de lisis con desactivador se añade en el intervalo de 5 minutos posteriores a la recogida de la muestra de sangre.

En otra realización de la invención, el receptor se une específicamente al agente de captura, que está inmovilizado en un soporte sólido (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas de agarosa o material de relleno de columna), y por lo tanto está separado de otras proteínas y péptidos endógenos, que no se unen muy fuertemente al anticuerpo de captura [Fung, E.N. *et. al.*, *Bioanalysis* 2016, 8, 847-856].

En otra realización de la invención, el receptor unido al fármaco y unido al desactivador se elimina del sustrato de inmunocaptura antes de la etapa de digestión.

- 5 En otra realización de la invención, el receptor unido al fármaco y unido al desactivador se digiere mientras todavía está asociado con el sustrato de inmunocaptura.

En otra realización de la invención, la proteasa utilizada durante la etapa de digestión se selecciona del grupo que consiste en serina proteasas, cisteína proteasas, treonina proteasas, ácido aspártico proteasas, ácido glutámico proteasas y metaloproteasas. Los ejemplos de proteasas incluyen tripsina, quimotripsina, Glu-C proteasa, Lys-C proteasa, Lys-N proteasa, Asp-N proteasa, Arg-C proteasa.

En otra realización de la invención, los péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador se miden simultáneamente mediante una única ejecución de CL-EM/EM.

En el ensayo de la invención, la ocupación del receptor se calcula comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptido sustituto unido al fármaco y unido al desactivador.

En una realización de la invención, la ocupación del receptor se mide 1) recogiendo sangre de un sujeto al que se le administra un compuesto de interés que se une irreversiblemente al receptor, 2) agregando inmediatamente a la sangre recogida una solución de lisis que contiene un compuesto desactivador que se une irreversiblemente al mismo sitio que el compuesto de interés, 3) aislando el receptor unido al fármaco y al desactivador de la muestra de sangre lisada y desactivada utilizando una etapa de inmunocaptura, 4) digiriendo el receptor unido al fármaco y al desactivador aislado mientras aún está unido al sustrato de inmunocaptura, 5) midiendo la cantidad de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador simultáneamente en una única ejecución de CL-EM/EM y 6) determinando la ocupación del receptor comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptido sustituto unido al fármaco y unido al desactivador.

En un aspecto preferido de las realizaciones anteriores, el receptor es BTK, el compuesto de interés se muestra en la Figura 1A y el desactivador correspondiente se muestra en la Figura 1B.

En otro aspecto preferido de las realizaciones anteriores, el sustrato de inmunocaptura son perlas de captura de estreptavidina T1.

En otro aspecto preferido de las realizaciones anteriores, el clon de Acm n.º MAB 5807 o el clon de Acm n.º MAB D3H5 es el anticuerpo anti-BTK unido al sustrato de inmunocaptura.

En otro aspecto preferido de las realizaciones anteriores, la BTK aislada unida al desactivador y unida al fármaco se digiere con tripsina mientras aún está asociada con la perla de inmunocaptura.

En otro aspecto preferido de las realizaciones anteriores, la ocupación del receptor de BTK se calcula comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con el péptido sustituto unido al fármaco y unido al desactivador total.

En una realización de la invención, la ocupación del receptor de BTK se mide 1) recogiendo sangre de un sujeto al que se le administra el compuesto mostrado en la Figura 1A, 2) agregando inmediatamente una solución de lisis que contiene el compuesto desactivador mostrado en la Figura 1B, 3) aislando la BTK unida al fármaco y al desactivador usando una etapa de inmunocaptura, 4) digiriendo la BTK unida al fármaco y al desactivador aislada con tripsina mientras aún está asociada con la perla de inmunocaptura, 5) midiendo la cantidad de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador simultáneamente en una única ejecución de CL-EM/EM y 6) determinando la ocupación del receptor de BTK comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con el péptido sustituto unido al fármaco y unido al desactivador total.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A y 1B muestra la estructura de A) Compuesto A; B) compuesto desactivador.

La Figura 2 muestra la alineación de secuencias de proteínas BTK de humanos y monos (macaco de la India/macaco cangrejero), respectivamente. Los recuadros indican los péptidos tripsínicos utilizados para el análisis. Dentro de la secuencia de aminoácidos, Cys 481 (marcada con la flecha) está unida al compuesto A (DB-BTK) o al compuesto desactivador (QB-BTK). El péptido tripsínico QRPIFIITEYMANGCLLNLYLR (SEQ ID NO: 1, como se muestra en la Tabla 1) unido al compuesto de la Figura 1A o 1B se utilizó para la cuantificación.

La Figura 3 muestra una representación esquemática del ensayo de RO de BTK mediante inmunocaptura-CL-EM/EM. Los péptidos sustitutos utilizados son el péptido unido al fármaco (DB-QRP) y el péptido unido al desactivador (QB-QRP).

La Figura 4 muestra que los anticuerpos de captura de diferentes proveedores (■ mAb-D3H5, □ mAb-MAB5807) tienen un rendimiento de inmunocaptura diferencial entre la BTK endógena en sangre humana y la BTK

recombinante (utilizada como calibradores).

La Figura 5A - 5D muestra el efecto de la concentración de tripsina, tiempo de digestión en las respuestas de CL-EM/EM de los péptidos sustitutos generados a partir de DB-BTK (5A y 5B) y QB-BTK (5C y 5D) a 50 °C (5A y 5C) o 60 °C (5B y 5D). Los péptidos sustitutos, DB-QRP o QB-QRP se midieron mediante CL-HRMS en un espectrómetro de masas Thermo's Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición.

La Figura 6 muestra una comparación de la respuesta de la señal para cada etapa de carga tanto para DB-BTK(■) como para QB-BTK(□).

La Figura 7A - 7C muestra (7A) el espectro de iones de producto de EM/EM de iones positivos por electropulverización de $[M+3H]^{3+}$ en m/z 967,4 para el péptido DB-QRP; (7B) el espectro de iones de producto de EM/EM de iones positivos por electropulverización de $[M+3H]^{3+}$ en m/z 962,5 para el péptido QB-QRP; y (7C) el espectro de iones de producto de EM/EM de iones positivos por electropulverización de $[M+3H]^{3+}$ en m/z 965,9 para el péptido SIL-QB-QRP (patrón interno) obtenido de un espectrómetro de masas Triple Quad 5500 de Sciex.

La Figura 8A - 8F muestra cromatogramas de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para DB-QRP (péptido sustituto para DB-BTK) (8A-8C) y QB-QRP (péptido sustituto para QB-BTK) (8D-8F), y sus patrones internos (IS); (8A y 8D) cromatogramas de los analitos obtenidos a partir de lisado de sangre de mono en blanco en los que las contribuciones de BTK endógena se eliminaron mediante pretratamiento con el desactivador o el fármaco individualmente; (8B y 8E) cromatogramas de los analitos obtenidos del lisado de sangre de mono que contiene el analito en LLOQ y su IS; (8C y 8F) cromatogramas del IS obtenidos a partir de lisado de sangre de mono que solo contiene el IS. (c y f) $[^{13}C_9, ^{15}N]$ -QB-QRP se usó como el IS para DB-QRP y QB-QRP.

La Figura 9A - 9D muestra los resultados de PK y PD obtenidos de los monos n.º 5149, n.º 5151 y n.º 5169 a los que se les administró el compuesto (BMS-986195) que se muestra en la Figura 1A en dos dosis diferentes 0,10 mg/kg o 0,5 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre a las 1, 3, 5, 7 y 24 h del día 1 para la evaluación PK (datos mostrados en 9A y 9B) y se recogieron antes de la dosis, 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 144 y 168 h para la evaluación PD (datos mostrados en 9C y 9D) (véase el Ejemplo 2).

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unido irreversiblemente" se refiere a un tipo de compuesto que se une permanentemente a un receptor, ya sea formando un enlace covalente con el sitio activo, o como alternativa simplemente uniéndose fuertemente de modo que la tasa de disociación sea efectivamente cero en escalas de tiempo relevantes.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "compuesto de interés" y "fármaco" se utilizan indistintamente y se refieren a la molécula que se une a la diana de interés.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "diana" y "receptor" se utilizan indistintamente cuando se hace referencia al foco del ensayo de RO.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmediatamente" cuando se refiere a cuando se añade la solución de lisis que contiene la molécula de desactivador a la muestra de sangre significa tan pronto como sea posible después de que se haya recogido la muestra de sangre. Como alternativa, la solución de lisis que contiene la molécula de desactivador se agrega en el intervalo de los primeros 5 minutos después de que se haya recogido la muestra de sangre.

Esta invención describe el desarrollo de un ensayo de ocupación del receptor *in vivo*, más específicamente, un ensayo de ocupación del receptor (RO) de tirosina cinasa de Bruton (BTK) *in vivo*. La sensibilidad del ensayo es clave para determinar la RO en niveles de ocupación muy altos o muy bajos donde la diana unida o libre podría ser inferior al 5 %.

La presente divulgación proporciona un método que comprende las etapas de a) recoger una muestra de sangre de un sujeto tratado con el compuesto de interés, b) agregar una solución de lisis que contiene un desactivador específico del receptor a la muestra de sangre, c) aislar el receptor de interés, d) digerir el receptor aislado para generar péptidos sustitutos, e) medir la cantidad de péptidos sustitutos y determinar la ocupación del receptor comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador.

Más específicamente, la invención se refiere a un método de ensayo para determinar la ocupación del receptor de fármacos en un sujeto al que se le administra un fármaco de interés que se une covalentemente al receptor de interés, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a. recoger una muestra de sangre del sujeto tratado con el fármaco de interés
- b. añadir una solución de lisis que comprende un desactivador que se une irreversiblemente al mismo sitio de

receptor que el fármaco de interés a la muestra de sangre,
 c. aislar el receptor unido al fármaco y unido al desactivador mediante inmunocaptura,
 d. digerir el receptor unido al fármaco y unido al desactivador aislado para generar péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador,
 5 e. medir la cantidad de péptidos sustitutos utilizando CL-EM/EM y determinar la cantidad de receptor unido al fármaco comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador.

10 Recogida de una muestra de sangre de un sujeto al que se le administra el compuesto de interés.

En una realización de la invención, el compuesto de interés se une irreversiblemente a al menos un aminoácido del receptor. Un ejemplo de un compuesto de interés es el compuesto mostrado en la Figura 1A, que se une irreversiblemente a BTK.

15 Se añade a la muestra de sangre una solución de lisis que contiene un desactivador específico del receptor

Hubo una serie de desafíos que impactaron en la selectividad y la sensibilidad del desarrollo del ensayo de ocupación del receptor (RO). En particular, la presencia del fármaco libre y receptor libre en la muestra de sangre podría generar un receptor unido al fármaco *ex vivo* durante la etapa de lisis, lo que llevaría a una sobreestimación de la RO. Se descubrió que la adición de un desactivador específico del receptor durante la etapa de lisis convierte rápidamente el receptor libre en un receptor unido al desactivador (QB), bloqueando de ese modo la formación de receptores unidos al fármaco *ex vivo*.

20 En una realización, el ensayo de RO comprende la lisis de la muestra de sangre en presencia de un desactivador para convertir el receptor endógeno en un receptor unido al desactivador, evitando de ese modo la formación del receptor endógeno unido al fármaco.

En una realización de la invención, el desactivador se une irreversiblemente al mismo aminoácido que el compuesto de interés. Preferiblemente, el desactivador compite con el compuesto de interés en la unión al receptor. En otra realización de la invención, el desactivador se añade a la solución de lisis en exceso molar con respecto al compuesto de interés. En otra realización de la invención, la solución de lisis que contiene el desactivador se añade inmediatamente después de recoger la muestra de sangre.

30 Un experto en la materia conocería las soluciones de lisis celular. Las soluciones de tampón de lisis celular disponibles comercialmente incluyen el tampón de lisis NP-40 (ThermoFisher Scientific), tampón de lisis RIPA (Abbeexa), tampón de lisis ACK (ThermoFisher Scientific), tampón de lisis celular (10x) (n.º de cat.: 9803, Cell Signaling Technology). El tampón de lisis se utiliza para lisar células en condiciones no desnaturalizantes.

40 Un ejemplo de un compuesto desactivador es el compuesto mostrado en la Figura 1B, que se une irreversiblemente a BTK.

Aislamiento del receptor unido al fármaco y unido al desactivador de la solución de lisado celular

45 La inmunocaptura es un método de limpieza de muestras altamente selectivo que aprovecha la inmutafinidad única de la proteína diana y el agente de captura (Stevenson, L., *et. al.*, Bioanalysis 2013, 5, 2903-2918). La selección del anticuerpo de captura adecuado con alta eficiencia de inmunocaptura para la diana endógena es clave para el éxito del ensayo. Un experto en la materia sabría cómo generar anticuerpos específicos para su proteína diana en caso de que un anticuerpo específico no estuviera disponible comercialmente.

50 Para evaluar la eficiencia de inmunocaptura, se examinan los anticuerpos utilizando dianas unidas al fármaco y unidas al desactivador. Los anticuerpos se seleccionan en función de su alta afinidad tanto con la diana unida al fármaco como con la diana unida al desactivador. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos específicos para BTK, se evaluó la capacidad de inmunocaptura del clon de Acm disponible comercialmente n.º MAB5807 y del clon de Acm n.º D3H5. Sorprendentemente, el Acm, clon n.º MAB5807 no pudo detectar BTK endógena, DB-BTK o QB-BTK con la sensibilidad necesaria aunque muestra alta afinidad por BTK recombinante, DB-BTK o QB-BTK. Tal como se muestra en la Figura 4, mientras que la respuesta de CL-EM de la BTK endógena fue demasiado baja cuando se utilizó el Acm clon n.º 5807, el otro clon, el clon de Acm n.º D3H5 dio una respuesta moderada para la BTK recombinante unida al fármaco y unida al desactivador, y una respuesta mayor para la BTK endógena unida al fármaco y unida al desactivador. Dado que el objetivo final era determinar la BTK endógena unida al fármaco y unida al desactivador en la sangre humana, se seleccionó el clon n.º D3H5 para su uso en el ensayo de RO de BTK.

Generación de péptidos sustitutos de receptor unido al fármaco y unido al desactivador

65 Los péptidos sustitutos de receptor generados para su uso en el ensayo de RO deben contener el sitio de unión del compuesto de interés. Adicionalmente, los péptidos sustitutos deben ser sensibles a la detección por CL-EM.

En una realización de la invención, el receptor unido al fármaco y unido al desactivador aislado se digiere con una o más proteasas seleccionadas del grupo que consiste en serina proteasas, cisteína proteasas, treonina proteasas, ácido aspártico proteasas, ácido glutámico proteasas y metaloproteasas. Los ejemplos de proteasas aceptables incluyen tripsina, quimotripsina, Glu-C proteasa, Lys-C proteasa, Lys-N proteasa, Asp-N proteasa, Arg-C proteasa.

La Tabla 1 describe los péptidos sustitutos generados cuando BTK se digiere con diversas proteasas.

Tabla 1. Péptidos de BTK generados cuando se tratan con diversas proteasas

| Proteasa | Péptido de BTK generado | SEQ ID NO |
|---------------|---|-----------|
| Tripsina | QRPIFIITEYMANGCLLNLYR | 1 |
| Quimotripsina | MANGCLLNLY | 2 |
| Glu-C | YMANGCLLNLYRE | 3 |
| Lys-C | QRPIFIITEYMANGCLLNLYREMRHRFQTQQLEMCCK | 4 |
| Lys-N | KQRPIFIITEYMANGCLLNLYREMRHRFQTQQLEMC | 5 |
| Asp-N | DEFIEEAKVMMNLSHEKLVQLYGVCTKQRPIFIITEYMAN GCLLNLYREMRHRFQTQQLEMCCK | 6 |
| Arg-C | GQYDVAIKMIKEGSMSEDEFIEEAKVMMNLSHEKLVQLYG VCTKQRPIFIITEYMANGCLLNLYR | 7 |

Dado que la cuantificación de la diana unida al fármaco y de la diana unida al desactivador se basa en la respuesta de EM de los péptidos sustitutos representativos, los rendimientos de la digestión de estos péptidos sustitutos podrían tener un impacto drástico en la sensibilidad de la detección.

En una realización de la invención, la etapa de digestión se realiza antes o después de la elución del receptor unido al fármaco y unido al desactivador del sustrato de inmunocaptura. Preferiblemente, la etapa de digestión se realiza mientras la diana está unida al sustrato de inmunocaptura. Por ejemplo, la BTK unida al fármaco y unida al desactivador se trató con una digestión con tripsina mientras aún estaba unida a la perla de inmunocaptura.

Medición de la cantidad de péptidos sustitutos

En una realización de la invención, la ocupación del receptor se puede determinar midiendo los péptidos sustitutos unidos al desactivador y unidos al fármaco simultáneamente en una única ejecución de CL-EM/EM.

Durante el desarrollo inicial del método, la DB-BTK y la QB-BTK generadas a partir de la reacción se analizaron utilizando una espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) Q Exactive HF. Al utilizar la masa exacta esperada de los péptidos sustitutos, se identificaron todos los péptidos sustitutos. La abundancia de señal de cada etapa de carga se muestra en la Figura 6. Los datos muestran que tanto DB-BTK como QB-BTK dieron la respuesta más alta para la etapa de tres cargas, por consiguiente, el ion $[M+3H]^{3+}$ se utilizó tanto para DB-QRP (péptido sustituto de DB-BTK) como para QB-QRP (péptido sustituto de QB-BTK) como ion original para la detección de MRM. Como se muestra en la Figura 7A-7C, se mostraron varios iones de producto en los espectros de EM/EM. El ion de producto correspondiente al ion y_2 (m/z -288) y al ion b_6 (m/z ~755 para DB-QRP y QB-QRP, m/z ~765 para IS) muestran una buena intensidad para la detección de MRM con ion y_2 mejor que ion b_6 . Punto que el ion y_2 en m/z -288 tiene un pico de interferencia que se muestra en los canales de MRM de DB-QRP y QB-QRP, ion b_6 se utilizó como ion de producto para la detección de MRM.

Los cromatogramas de MRM típicos de DB-QRP, QB-QRP e IS a partir de lisado de sangre de mono en blanco, lisado de sangre de mono en blanco enriquecido con DB-BTK y QB-BTK a la concentración del LLOQ de 0,250 nM para DB-BTK y 0,125 nM para QB-BTK se muestran en las Figuras 8a, 8b, 8d y 8e. Los cromatogramas de masas de MRM típicos de $[^{13}C_9,^{15}N]$ -QB-QRP del lisado de sangre de mono en blanco con solo IS se muestran en las figuras 8c y 8f. No se encontraron picos de interferencia significativos del lisado de mono en blanco en el tiempo de retención ni en el canal iónico de DB-QRP, QB-QRP o IS cuando se analizó el lisado de sangre de mono en blanco de control. DB-QRP, QB-QRP y sus IS se eluyeron de la columna UHPLC con una retención de 5,02, 4,87 y 4,87 min, respectivamente.

Límite inferior de cuantificación

Los límites inferiores de cuantificación (LLOQ) para DB-QRP y QB-QRP fueron 0,250 nM y 0,125 nM, que son las concentraciones más bajas para ambos analitos en las curvas estándar. Como se muestra en las Figuras 8b y 8e, la relación señal-ruido (S/N) de DB-QRP o QB-QRP en los niveles de concentración de LLOQ fue de al menos 3 o más.

Linealidad de la curva de calibración y exactitud y precisión de los controles de calidad

Para la calificación del método para cuantificar RO de BTK en lisado de sangre, todas las curvas estándar se ajustaron a un modelo de regresión cuadrática ponderada $1/x$ con curvas estándar que oscilaban entre 0,250 y 12,5 nM para DB-BTK y entre 0,125 y 12,5 nM para QB-BTK. En cada ejecución, para al menos dos tercios de los

patrones de calibración, las desviaciones de las concentraciones retrocalculadas con respecto a sus valores nominales estuvieron en el intervalo del $\pm 20,0\%$ ($\pm 25,0\%$ en el nivel de LLOQ). Como se muestra en las Tablas 2-3, las desviaciones de las concentraciones retrocalculadas con respecto a sus valores nominales estuvieron en el intervalo del $\pm 11,1\%$ para DB-BTK y en el intervalo del $\pm 19,8\%$ para QB-BTK para tres ejecuciones de exactitud y precisión. La exactitud y precisión se evaluaron utilizando las muestras de control de calidad.

Tabla 2. Resumen de datos obtenidos a partir de la precisión y exactitud de las muestras de curva estándar para el ensayo de DB-BTK

| Ejecuciones | Ejecución 1 | | Ejecución 2 | | Ejecución 3 | |
|----------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Concentración nominal (nM) | Concentración pred. | % de desviación | Concentración pred. | % de desviación | Concentración pred. | % de desviación |
| 0,250 | 0,229 | -8,4 | 0,237 | -5,2 | 0,256 | 2,4 |
| 0,500 | 0,482 | -3,6 | 0,505 | 1,0 | 0,495 | -1,0 |
| 1,000 | 1,080 | 8,0 | 1,110 | 11,0 | 0,986 | -1,4 |
| 2,000 | 2,186 | 9,3 | 1,810 | -9,5 | 2,012 | 0,6 |
| 5,000 | 4,776 | -4,5 | 5,256 | 5,1 | 4,853 | -2,9 |
| 10,000 | 9,568 | -4,3 | 9,376 | -6,2 | 11,114 | 11,1 |
| 12,500 | 12,951 | 3,6 | 13,203 | 5,6 | 11,341 | -9,3 |

Tabla 3. Resumen de datos obtenidos a partir de la precisión y exactitud de las muestras de curva estándar para el ensayo de QB-BTK

| Ejecuciones | Ejecución 1 | | Ejecución 2 | | Ejecución 3 | |
|----------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Concentración nominal (nM) | Concentración pred. | % de desviación | Concentración pred. | % de desviación | Concentración pred. | % de desviación |
| 0,125 | 0,126 | 0,8 | 0,13 | 4,0 | 0,116 | -7,2 |
| 0,250 | 0,217 | -13,2 | 0,264 | 5,6 | 0,209 | -16,4 |
| 0,500 | 0,544 | 8,8 | 0,442 | -11,6 | 0,599 | 19,8 |
| 1,000 | 0,996 | -0,4 | 0,991 | -0,9 | 1,058 | 5,8 |
| 2,000 | 2,142 | 7,1 | 2,076 | 3,8 | 2,023 | 1,2 |
| 5,000 | 4,963 | -0,7 | 4,846 | -3,1 | 4,807 | -3,9 |
| 10,000 | 9,282 | -7,2 | 10,5 | 5,0 | 9,835 | -1,7 |
| 12,500 | 13,159 | 5,3 | 12,116 | -3,1 | 12,757 | 2,1 |

Tabla 4. Calificación del ensayo: datos de control de calidad obtenidos a partir de lisado de sangre de mono que contiene el 25, 50 y 90 % de ocupación de BTK

| Nivel de control de calidad (n=6) | Ejecución 1 | | | Ejecución 2 | | | Ejecución 3 | | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|----------------|
| | DB-BTK (nM) | QB-BTK (nM) | % de RO de BTK | DB-BTK (nM) | QB-BTK (nM) | % de RO de BTK | DB-BTK (nM) | QB-BTK (nM) | % de RO de BTK |
| QC del 25 | 1,331 | 3,821 | 25,8 | 0,933 | 3,616 | 20,5 | 0,951 | 2,768 | 25,6 |
| % de RO de BTK | 1,371 | 3,918 | 25,9 | 1,102 | 3,835 | 22,3 | 0,817 | 2,743 | 22,9 |
| | 1,499 | 4,385 | 25,5 | 1,18 | 4,12 | 22,3 | 0,79 | 2,364 | 25,0 |
| | 1,408 | 3,85 | 26,8 | 0,882 | 3,727 | 19,1 | 0,804 | 2,219 | 26,6 |
| | 1,21 | 3,604 | 25,1 | 1,076 | 3,985 | 21,3 | 0,867 | 2,63 | 24,8 |
| | 1,214 | 3,653 | 24,9 | 0,933 | 3,687 | 20,2 | 0,781 | 2,353 | 24,9 |
| QC del 50 | 2,541 | 2,283 | 52,7 | 1,849 | 2,391 | 43,6 | 1,739 | 1,739 | 50,0 |
| % de RO de BTK | 2,629 | 2,454 | 51,7 | 2,105 | 2,403 | 46,7 | 1,85 | 1,648 | 52,9 |
| | 2,783 | 2,658 | 51,1 | 1,736 | 2,033 | 46,1 | 1,651 | 1,659 | 49,9 |
| | 2,479 | 2,456 | 50,2 | 2,166 | 2,52 | 46,2 | 1,553 | 1,596 | 49,3 |
| | 2,208 | 2,137 | 50,8 | 2,384 | 2,625 | 47,6 | 1,827 | 1,667 | 52,3 |
| | 2,813 | 2,424 | 53,7 | 2,301 | 2,500 | 47,9 | 1,577 | 1,485 | 51,5 |
| QC del 90 | 5,035 | 0,449 | 91,8 | 4,299 | 0,471 | 90,1 | 3,234 | 0,35 | 90,2 |
| % de RO de BTK | 4,830 | 0,384 | 92,6 | 4,600 | 0,495 | 90,3 | 2,684 | 0,237 | 91,9 |
| | 4,881 | 0,427 | 92,0 | 3,652 | 0,436 | 89,3 | 2,933 | 0,274 | 91,5 |
| | 4,080 | 0,356 | 92,0 | 4,677 | 0,495 | 90,4 | 3,139 | 0,286 | 91,6 |
| | 4,631 | 0,419 | 91,7 | 5,009 | 0,511 | 90,7 | 3,235 | 0,296 | 91,6 |
| | 4,485 | 0,420 | 91,4 | 4,710 | 0,505 | 90,3 | 2,866 | 0,279 | 91,1 |

Como se muestra en la Tabla 4, la diferencia entre el % de RO de BTK medido y el % de RO de BTK teórico estuvo en el intervalo del $\pm 5\%$ para todos los QC para las tres ejecuciones, excepto para una de cada seis muestras de QC_25 % de RO y una de cada seis muestras de QC_50 % de RO en la ejecución 2 que tuvieron una diferencia entre los valores medidos y teóricos de $> 5\%$.

El % de CV y el % de desviación estuvieron en el intervalo del 10% para todos los QC en las tres ejecuciones, excepto para un QC_25 % de RO, con un % de desviación de $-16,2\%$ (Tabla 5). Los resultados demostraron que el

método era preciso y exacto para el análisis del % de RO de BTK en lisado de sangre de mono.

Tabla 5. Resumen de datos de control de calidad obtenidos del lisado de sangre de mono que contiene el 25, 50 y 90 % de ocupación de BTK (n = 6).

| QCs de RO de BTK (valor nominal, %) | DB-BTK (nM) | QB-BTK (nM) | RO de BTK media medida (%) | % de CV | % de desviación |
|-------------------------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------|-----------------|
| Ejecución 1 | | | | | |
| QC_25 % de RO | 1,339±0,113 | 3,872 ± 0,279 | 25,7 | 2,6 | 2,7 |
| QC_50 % de RO | 2,576±0,223 | 2,402 ± 0,177 | 51,7 | 2,5 | 3,4 |
| QC_90 % de RO | 4,657±0,342 | 0,409 ± 0,033 | 91,9 | 0,4 | 2,1 |
| Ejecución 2 | | | | | |
| QC_25 % de RO | 1,018±0,118 | 3,828 ± 0,192 | 21,0 | 6,0 | -16,2 |
| QC_50 % de RO | 2,090±0,253 | 2,412 ± 0,204 | 46,4 | 3,3 | -7,3 |
| QC_90 % de RO | 4,491±0,470 | 0,486 ± 0,028 | 90,2 | 0,5 | 0,2 |
| Ejecución 3 | | | | | |
| QC_25 % de RO | 0,835 ± 0,064 | 2,513 ± 0,231 | 25,0 | 4,8 | -0,1 |
| QC_50 % de RO | 1,700 ± 0,126 | 1,632 ± 0,086 | 51,0 | 2,9 | 20 |
| QC_90 % de RO | 3,015 ± 0,224 | 0,287 ± 0,037 | 91,3 | 0,6 | 1,5 |

5

Evaluación de estabilidad

Las estabilidades establecidas para DB-BTK y QB-BTK en lisado de sangre de mono se resumen en la Tabla 6. Los resultados indicaron que la estabilidad de DB-BTK y QB-BTK no tuvo impacto o tuvo un impacto mínimo en el % de RO de BTK, ya que la diferencia entre el % de RO de BTK medido y el % de RO de BTK teórico estuvo en el intervalo del ± 5 % para todos los QC, independientemente de la concentración absoluta de DB-BTK o QB-BTK, disminuyendo después de 2 ciclos de congelación y descongelación a -80 °C o almacenados a temperatura ambiente durante 24 h o almacenados a -80 °C durante 224 días.

10

15

| Tabla 6. Evaluación de la estabilidad de las muestras de control de calidad en el % de RO de BTK del 25 % y 90 % | | | | | | |
|--|--------------------|--------------------|----------------------------|--------|----------|--|
| Evaluación de estabilidad | DB-BTK medida (nM) | QB-BTK medida (nM) | RO de BTK medida media (%) | CV (%) | Desv (%) | |
| 2 ciclos de congelación y descongelación | | | | | | |
| QC_25 % de RO | 0,968 ± 0,108 | 3,435 ± 0,307 | 22,0 | 3,0 | -12,2 | |
| QC_90 % de RO | 4,372 ± 0,157 | 0,505 ± 0,050 | 89,7 | 0,9 | -0,4 | |
| 24 horas en TA | | | | | | |
| QC_25 % de RO | 0,912 ± 0,086 | 3,099 ± 0,177 | 22,8 | 6,9 | -9 | |
| QC_90 % de RO | 3,019 ± 0,120 | 0,398 ± 0,040 | 88,4 | 1,0 | -1,8 | |
| 224 días a -80 °C | | | | | | |
| QC_25 % de RO | 0,890 ± 0,067 | 2,500 ± 0,186 | 26,3 | 4,4 | 5,1 | |
| QC_90 % de RO | 3,719 ± 0,039 | 0,367 ± 0,032 | 91,0 | 0,8 | 1,1 | |

Uso del ensayo de ocupación del receptor de CL-EM/EM de inmunocaptura

20 La medición de RO es una determinación crítica para relacionar la eficacia con el mecanismo en modelos animales preclínicos y en estudios clínicos. En la práctica, la RO es particularmente útil para tomar decisiones sobre el aumento de dosis en el estudio primero en humanos (FIH).

EJEMPLO 1

25 Preparación de muestras de control de calidad y patrones de BTK unida a fármaco (DB-BTK) y BTK unida a desactivador (QB-BTK)

Reactivos y materiales

30 Los compuestos farmacológicos y desactivadores que se muestran en las Figuras 1A y 1B, respectivamente, fueron sintetizados por Investigación y Desarrollo en Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ). El anticuerpo monoclonal de conejo anti-BTK biotinilado (lote n.º: D3H5, n.º de cat.: 12624) y tampón de lisis 10 x (n.º de cat.: 9803) se adquirieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Las perlas Dynabeads My one de estreptavidina T1 (n.º de cat.: 65602) se adquirieron de ThermoFisher Scientific (Carlsbad, CA). La proteína BTK recombinante (n.º de cat.:

PV3587) se adquirió de Life Technologies (Carlsbad, CA). El inhibidor de proteasa (n.º de cat.: 539134) se adquirió de Millipore Sigma (Billerica, MA). El patrón interno (IS) utilizado para el ensayo, [$^{13}\text{C}_9$, ^{15}E] QB-QRP que contiene aminoácidos flanqueantes tanto en el extremo N como en el C (Tabla 8), fue sintetizado por el Departamento de Síntesis Química de Bristol-Myers Squibb (BMS) (Princeton, NJ, EE.UU.). La sangre completa de mono ACD-A se adquirió de Bioreclamation Inc. (Westbury, NY). Todos los demás reactivos eran de calidad analítica. El dispositivo de separación magnética MagnaBot 96 (n.º de cat.: V8151) se adquirió de Promega Corporation (Madison, WI).

Preparación de los patrones de referencia para BTK unida al fármaco (DB-BTK)

La BTK recombinante (5,9 μM , 200 μl) se combinó con 400 μl de PBS y luego se añadió 15 μl de solución de fármaco 1,0 mg/ml (compuesto mostrado en la Figura 1A) en acetonitrilo (2701 μM de fármaco, 15 μl). La solución se incubó entonces a TA durante 1 h, dando como resultado una concentración de DB-BTK de 1919 nM. La concentración de DB-BTK se basó en la cantidad de BTK libre total utilizada para la reacción porque la conversión de BTK libre a DB-BTK fue de ~100 % en presencia de una cantidad excesiva de fármaco.

Preparación de los patrones de referencia para BTK unida al desactivador (QB-BTK)

La BTK recombinante (5,9 μM , 200 μl) se combinó con 400 μl de PBS y luego se añadió 15 μl de solución de desactivador 1,0 mg/ml (compuesto mostrado en la Figura 1B) en acetonitrilo (2806 μM de desactivador, 15 μl). La solución se incubó a TA durante 1 h, dando como resultado una concentración de QB-BTK de 1919 nM. La concentración de QB-BTK se basó en la cantidad de BTK libre total utilizada para la reacción porque la conversión de BTK libre a QB-BTK fue de ~100 % en presencia de una cantidad excesiva de desactivador.

Preparación de cóctel de tampón de lisis que contiene desactivador: Tampón de lisis 2x con inhibidor de proteasa 0,0133x y solución de desactivador 1,5 μM :

Se mezcló un vial que contenía 15 ml de tampón de lisis 10x con 1,0 ml de inhibidor de proteasa y 80 μl de solución de desactivador 0,5 mg/ml (compuesto mostrado en la Figura 1B) en DMSO. Luego, la solución se diluyó con 59 ml de agua desionizada para un volumen total de 75 ml.

Preparación de cóctel de tampón de lisis que contiene fármaco: Tampón de lisis 2x con inhibidor de proteasa 0,0133x y solución de fármaco 1,5 μM

Se mezcló un vial que contenía 15 ml de tampón de lisis 10x con 1,0 ml de inhibidor de proteasa y 83 μl de solución de fármaco 0,5 mg/ml (compuesto mostrado en la Figura 1A) en DMSO. Luego, la solución se diluyó con 59 ml de agua desionizada para un volumen total de 75 ml.

Preparación del lisado+433 (100 % de QB-BTK) de sangre de mono

La sangre completa de mono ACD-A (3,5 ml) se combinó con 7 ml del tampón de lisis que contenía 1,5 μM de desactivador (compuesto mostrado en la Figura 1B). Las muestras se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Preparación del lisado+195 (100 % de DB-BTK) de sangre de mono

La sangre completa de mono ACD-A (3,5 ml) se combinó con 7 ml del tampón de lisis que contenía 1,5 μM de fármaco (compuesto mostrado en la Figura 1A). Las muestras se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Preparación de muestras de control de calidad (QCs) utilizando lisado de sangre que contiene BTK endógena

Las QCs de RO de BTK se preparan mezclando diferentes porcentajes de Lisado+433 y Lisado+195. QC inferior (LQC), QC medio (MQC) y QC alto (HQC) con % de RO de BTK al 25 %, al 50 % y al 90 % se prepararon mezclando Lisado+433/Lisado+195 a 2250/750, 1500/1500, 300/2700 (v/v), respectivamente tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de muestras de control de calidad utilizando lisado de sangre de mono que contiene BTK endógena

| QCs de RO de BTK | Ocupación de BTK teórica (%) | Lisado+433 ^a (μl) | Lisado+195 ^b (μl) | Volumen total (μl) |
|-------------------|------------------------------|---|---|---------------------------------|
| QC del 25 % de RO | 25 | 2250 | 750 | 3000 |
| QC_50 % de RO | 50 | 1500 | 1500 | 3000 |
| QC_90 % de RO | 90 | 300 | 2700 | 3000 |

^a El lisado+433 se obtuvo mediante el pretratamiento del lisado de mono con solución de desactivador (Figura 1B).

^b El lisado+195 se obtuvo mediante el pretratamiento del lisado de mono con solución de fármaco (Figura 1A).

Preparación de la curva estándar de DB-BTK (BTK+195): Uso del Lisado+433 de sangre de mono

Se prepararon patrones de calibración (STD) a 0,250, 0,500, 1,00, 2,00, 5,00, 10,0 y 12,5 nM de DB-BTK en lisado de sangre de mono que contenía el 0 % de DB-BTK mediante dilución independiente de las soluciones madre de DB-BTK (1919 nM en tampón). Durante la preparación, se prepararon diluciones intermedias de 200 y 20 nM para DB-BTK diluyendo 1919 nM de solución madre de DB-BTK con Lisado+433 de sangre, y luego se diluyeron aún más hasta obtener las muestras finales de STD. Las concentraciones nominales se basaron en el volumen de sangre, la concentración real en el lisado sanguíneo fue 1/3 de cada uno debido al factor de dilución de 3.

Preparación de la curva de estándar de QB-BTK (BTK+433): Uso del Lisado+195 de sangre de mono

Se prepararon patrones de calibración (STD) a 0,125, 0,250, 0,500, 1,00, 2,00, 5,00, 10,0 y 12,5 nM de QB-BTK en lisado de sangre de mono que contenía el 0 % de QB-BTK mediante dilución independiente de las soluciones madre de QB-BTK (1919 nM en tampón). Durante la preparación, se prepararon diluciones intermedias de 200 y 20 nM para QB-BTK diluyendo 1919 nM de solución madre de QB-BTK con Lisado+195 de sangre, y luego se diluyeron aún más hasta obtener las muestras finales de STD. Las concentraciones nominales se basaron en el volumen de sangre, la concentración real en el lisado sanguíneo fue 1/3 de cada uno debido al factor de dilución de 3.

Preparación de perlas de captura de estreptavidina T1 con anticuerpo biotinilado anti-BTK.

La concentración de perla Dynabeads My one de estreptavidina T1 para inmunoprecipitación fue de 10 mg/ml. La capacidad de unión del Acm biotinilado fue de 20 µg de Acm/mg de perla. Se dividieron en alícuotas un total de 25 ml de perlas de estreptavidina T1 en 10 tubos de 2,5 ml cada uno. Las muestras se lavaron con 3 ml de solución PBST. Se usó un imán DynaMag™-5 para separar las perlas magnéticas de las matrices de muestra líquida. Después de descartar el último lavado, las perlas se resuspendieron en 2,5 ml de PBST en cada tubo, luego se añadieron 0,500 ml de anticuerpo anti-BTK biotinilado (1 mg/ml, n.º de lote: D3H5). Las muestras en 10 tubos (0,500 ml) se incubaron a TA durante 1 h. Las perlas se separaron de la solución y las perlas de cada tubo se lavaron con 3 ml de PBST. Las perlas en los tubos se resuspendieron en 2,5 ml de PBST. La concentración final de anticuerpo anti-BTK fue de 0,2 µg/µl de perlas. Las muestras se almacenaron a 4 °C para su uso futuro.

Inmunocaptura para el enriquecimiento de BTK unida al fármaco (DB-BTK) y BTK unida al desactivador (QB-BTK) a partir de lisado de sangre. Alícuotas de muestras de lisado de sangre de 3000 µl para el lisado de sangre de mono de control, patrones de calibración, muestras de control de calidad o muestras de estudio de monos se centrifugaron a temperatura ambiente. Se añadió anticuerpo de captura anti-BTK (60 µl a 0,2 µg de Acm/µl de perla) en perlas al sobrenadante de las muestras centrifugadas, las muestras se incubaron a TA durante 120 minutos seguido de centrifugación. Se eliminó el sobrenadante y se añadió PBST a las muestras con perlas. Las muestras se transfirieron a una placa LowBind de 96 pocillos en un manipulador de líquidos TECAN y se colocaron sobre el dispositivo de separación magnética MagnaBot 96. Las perlas se lavaron con 800 µl de PBST dos veces, seguido de 500 µl de NH₄OAc 25 mM con Tween-20 al 0,05 %. Después de retirar el tampón de lavado, las perlas en la placa de 96 pocillos LowBind se utilizaron para la digestión con tripsina como se describe a continuación.

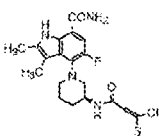
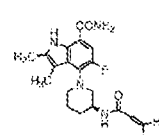
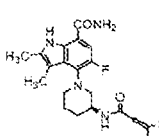
Digestión con tripsina. Después de la adición de IS (100 µl de SIL-QB-QRP 0,5 µg/ml en NH₄OAc 25 mM con Tween-20 al 0,05 %) excepto el lisado en blanco (al que se le agregaron 100 µl de NH₄OAc 25 mM con Tween-20 al 0,05 %) a las perlas en una placa de 96 pocillos, se añadieron 25 µl de NH₄OHC₃ 100 mM a cada muestra. Las muestras se digirieron mediante la adición de 25 µl de solución de tripsina recién preparada a 160 ng/µl en NH₄OHC₃ 100 mM y se incubó a 50 °C durante 30 minutos antes de extinguir con 20 µl de MeOH/ácido fórmico al 50 %/50 % (v/v). Las muestras se agitaron en vórtex brevemente y luego se colocaron en la parte superior de un dispositivo MagnaBot 96, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos, seguido de una centrifugación a 4000 rpm durante 2 minutos. Las muestras se analizaron mediante CL-EM/EM.

Análisis de UHPLC-EM/EM. Para la calificación del ensayo y el análisis de muestras, se utilizó un espectrómetro de masas AB Sciex Triple Quad 5500 de Sciex (Forster City, CA) para la adquisición de datos de CL-EM/EM.

La siguiente condición de CL-EM/EM se utilizó para la calificación del ensayo y el análisis de muestras de PD. Para cada muestra procesada, se inyectó un volumen de 50 µl del digesto en un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) (modelo LC-30AD, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD). Las condiciones de UHPLC-EM/EM descritas a continuación se utilizaron específicamente para la cuantificación de BTK ocupada y desactivada en lisado de sangre de mono. Se usó una columna Waters CORTECS™ UPLC C18+ (2,1 × 100 mm, 1,6 µm, Waters Corporation, Milford, MA) para el análisis del péptido DB-QRP y QB-QRP. La fase móvil A estaba compuesta por el 0,1 % de ácido fórmico en agua; mientras que la fase móvil B era ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. La separación por UHPLC se realizó utilizando una elución en gradiente comenzando con 15 % de B y mantener durante 0,5 min, seguido de cambiar % de B del 15 % al 30 % en 2,5 min, y luego cambiar % de B del 30 % al 45 % en 4,9 min, luego aumentar % de B del 45 % al 90 % en 0,1 min y mantener durante 1 min, luego disminuir % de B del 95 % al 15 % en 0,1 min, mantener durante 1,0 min y detener a los 10,0 min. El caudal fue de 0,600 ml/min y la temperatura de la columna fue de 60 °C. Con una configuración de válvula de conmutación, el eluyente UHPLC se introdujo con un intervalo de tiempo de 3,0-6,5 min en un espectrómetro de masas Triple Quad

5500™ equipado con una fuente de pulverización de iones turbo obtenida de AB Sciex (Forster City, CA). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de ionización por electropulverización positiva con los siguientes ajustes: gas de cortina, 30 unidades; gas CAD, 9 unidades; gas 1, 65 unidades; gas 2, 65 unidades; tensión de pulverización de iones turbo de 4000 V positivos y temperatura de la sonda turbo a 600 °C. El espectrómetro de masas se operó en modo MRM con la transición de m/z 962,493 > 755,40, 967,174 > 755,40 y 965,825 > 765,50 para QB-QRP, DB-QRP y SIL-QB-QRP (IS), respectivamente (Tabla 8). Los datos sin procesar se procesaron utilizando el software Analyst® (versión 1.6.2, AB SCIEX) para la integración de picos cromatográficos y los resultados procesados se exportaron a Watson LIMS™ (versión 7.4, ThermoFisher Scientific Inc.) para regresión de patrones de calibración y cálculos de concentración de QCs y otras muestras. Los datos estadísticos sobre el rendimiento del ensayo (ANOVA) se calcularon utilizando Watson LIMS™.

Tabla 8. Transiciones de MRM utilizadas para la detección por CL-EM/EM de péptidos sustitutos y sus patrones internos marcados con isótopos estables.

| Péptido sustituto | Secuencias de péptido sustituto | $[M+3H]^{3+}$ | Transición de MRM |
|--|--|---------------|----------------------|
| DB-QRP ^a (n.º de aa 467-487) |  QRPIITEYMANGCLLNLYR Fórmula: C ₁₃₅ H ₂₀₅ FN ₃₄ O ₃₂ S ₂ | 966,8368 | m/z 967,17 → 755,4 |
| QB-QRP ^a (n.º de aa 467-487) |  QRPIITEYMANGCLLNLYR Fórmula: C ₁₃₄ H ₂₀₃ FN ₃₄ O ₃₂ S ₂ | 962,1649 | m/z 962,50 → 755,4 |
| [¹³ C ₉ , ¹⁵ N]-QB-QRP ^b (patrón interno) |  TRQRP[F*]ITEYMANGCLLNLYREA Fórmula después de la digestión con tripsina: ¹³ C ₉ C ₁₂₅ H ₂₀₃ F ¹⁵ NN ₃₃ O ₃₂ S ₂ | 965,5073 | m/z 965,83 → 765,5 |

^a El péptido sustituto se denomina QRP basándose en los primeros tres símbolos de aminoácidos de los 21 aminoácidos del péptido tripsínico. DB-QRP = Péptido QRP unido al fármaco; QB-QRP = Péptido QRP unido al desactivador.

^b El símbolo de F* representa una [¹³C₉, ¹⁵N]-fenilalanina. El segmento peptídico subrayado fue un péptido tripsínico y se controló mediante un ensayo de CL-EM/EM.

Calificación del ensayo. La calificación del ensayo consistió en tres ejecuciones de precisión y exactitud con una evaluación adicional de la estabilidad que incluyó congelación y descongelación, TA y estabilidad a largo plazo de las QCs de RO de BTK. La linealidad del método se evaluó utilizando siete puntos de curva de calibración de DB-BTK (0,250 nM - 12,5 nM) u ocho de QB-BTK (0,125 nM - 12,5 nM) en todas las ejecuciones de calificación. Para la cuantificación se utilizó un modelo de regresión cuadrática con ponderación 1/x. Los criterios de aceptación fueron los siguientes: en cada ejecución, para al menos dos tercios de los patrones de calibración, las desviaciones de las concentraciones retrocalculadas con respecto a sus valores nominales estuvieron en el intervalo del ±20,0 % (±25,0 % en el nivel de LLOQ). Para las QCs de RO de BTK, para al menos el 50 % de las QCs en cada nivel, la diferencia entre el % de RO de BTK medido y el % de RO de BTK teórico debe estar en el intervalo de ±5 %. Por ejemplo, para QC_25 % de RO de BTK, el % de RO de BTK medido debe estar en el intervalo del 25,0 ± 5,0 %. La selectividad del ensayo se evaluó utilizando únicamente lisado de sangre en blanco, QC0 (lisado en blanco con IS únicamente).

EJEMPLO 2

Aplicación a estudios de PD de mono.

Para evaluar la utilidad y solidez del ensayo de RO de BTK por CL-EM/EM en comparación con un ensayo basado en ELISA establecido, se realizó un estudio de dosis única ascendente del compuesto mostrado en la Figura 1A. A los macacos cangrejeros se les administró el compuesto farmacológico 1A a 0,1, 0,2 y 0,5 mg/kg por vía oral. Se

recogieron muestras de sangre a las 1, 3, 5, 7 y 24 h del día 1 para la evaluación PK y se recogieron antes de la dosis, 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 144 y 168 h para la evaluación PD utilizando ensayos de RO de BTK por CL-EM/EM así como el ensayo de unión de ligando (LBA) descrito en el Ejemplo 3.

5 *Muestras de PD para el ensayo de RO de BTK por CL-EM/EM.*

Antes de la toma de muestras de PD, se preparó el siguiente cóctel de tampón de lisis que contenía tampón de lisis 2x con inhibidor de proteasa 0,0133x y solución de desactivador 1,5 μ M (compuesto mostrado en la Figura 1B): Se mezcló un vial que contenía 15 ml de tampón de lisis 10x con 1,0 ml de inhibidor de proteasa y 80 μ l de desactivador 0,5 mg/ml compuesto 1B en DMSO. Luego, la solución se diluyó con 59 ml de agua desionizada para un volumen total de 75 ml.

Como se ha mencionado anteriormente, se recogieron 2 ml de muestras de sangre en el momento establecido. Se lisaron 1,5 ml de la sangre recogida con 3 ml del cóctel de tampón de lisis que contenía el desactivador compuesto 1B. Inmediatamente después del mezclado, las muestras se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras de lisado de sangre se almacenaron a o por debajo de -70 °C inmediatamente después de la recogida. Las muestras se utilizaron para inmunocaptura con ensayo por CL-EM/EM.

20 *EJEMPLO 3*

Ensayo de RO de BTK mediante LBA

Se recogió sangre completa de mono tratada con ACD-A en puntos de tiempo establecidos después de la dosificación y se agregó a una placa de 96 pocillos, de fondo en V, de 2 ml (Costar, n.º de cat. 3960) y se lisó con tampón de lisis 2x (Cell Signaling, n.º de cat. 9803) que contiene inhibidor de proteasa (Calbiochem, n.º de cat. 539134) y sonda biotinilada (BMT-105186). El lisado se transfirió a una placa recubierta de estreptavidina (ThermoFisher Scientific, neutrAvidin® n.º de cat. 15128) y se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió el anticuerpo anti-BTK (Cell Signaling, n.º de cat. 8547, dilución 1:1000 en PBS + Tween20 al 0,05 % + BSA al 0,5 %) y se incubó mientras se agitaba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó, seguido de la adición de anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano picante de cabra anti-conejo (Invitrogen, G21234) a una dilución de 1:2500 en PBS + Tween20 al 0,05 % + BSA al 0,5 %. La prueba ELISA se desarrolló con la adición de tetrametilbencidina (TMB) (Sigma, n.º de cat. T0440) y se dejó desarrollar y se detuvo con la adición de ácido sulfúrico 2,0 N. Se leyó la absorbancia a 450 nm y se calculó el % relativo de inactivación de BTK de las muestras de estudio a partir de una curva estándar de muestras que contenían diferentes proporciones de lisados de sangre de mono normal mezclados con lisados desactivados de sangre pretratada con BMT-126867 2 μ M para permitir la inactivación completa de BTK antes de la lisis.

Análisis farmacocinético mediante CL-EM

Se recogieron 0,5 ml de sangre de mono en los puntos temporales establecidos para la evaluación PK. Cada muestra de sangre se centrifugó para separar el plasma. Se agregaron inmediatamente 10 μ l de la solución de desactivador 125 μ M (compuesto mostrado en la Figura 1B) a 200 μ l de plasma. Después de mezclar, las muestras se almacenaron a -20 °C y se utilizaron para análisis de CL-EM/EM.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo para determinar la ocupación del receptor de fármacos en un sujeto al que se le administra un fármaco de interés que se une covalentemente al receptor de interés, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a. recoger una muestra de sangre de un sujeto tratado con el fármaco de interés,
 - b. añadir una solución de lisis que comprende un desactivador que se une irreversiblemente al mismo sitio de receptor que el fármaco de interés a la muestra de sangre,
 - c. aislar el receptor unido al fármaco y unido al desactivador mediante inmunocaptura,
 - d. digerir el receptor unido al fármaco y unido al desactivador aislado para generar péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador,
 - e. medir la cantidad de péptidos sustitutos utilizando CL-EM/EM y determinar la cantidad de receptor unido al fármaco comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador.
2. El ensayo de la reivindicación 1, en donde el fármaco de interés se muestra en la Figura 1A.
3. El ensayo de la reivindicación 1, en donde el desactivador de la etapa (b) se muestra en la Figura 1B.
4. El ensayo de la reivindicación 1, en donde la etapa de digestión (d) es la digestión con tripsina.
5. Un método para determinar la ocupación del receptor de tirosina cinasa de Bruton (BTK) en un sujeto al que se le administra un fármaco mostrado en la Figura 1A, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a. recoger una muestra de sangre del sujeto al que se le administra el fármaco,
 - b. añadir a la muestra de sangre una solución de lisis que contiene el desactivador mostrado en la Figura 1B,
 - c. aislar la BTK unida al fármaco y unida al desactivador con anticuerpo biotinilado anti-BTK unido a perlas de estreptavidina T1,
 - d. digerir el complejo BTK unida al fármaco y unida al desactivador aislada-anticuerpo con tripsina para generar péptidos sustitutos,
 - e. medir la cantidad de péptidos sustitutos usando cromatografía CL-EM/EM y determinar la cantidad de BTK unida al fármaco comparando la cantidad de péptido sustituto unido al fármaco con la cantidad total de péptidos sustitutos unidos al fármaco y unidos al desactivador.

FIG. 1A

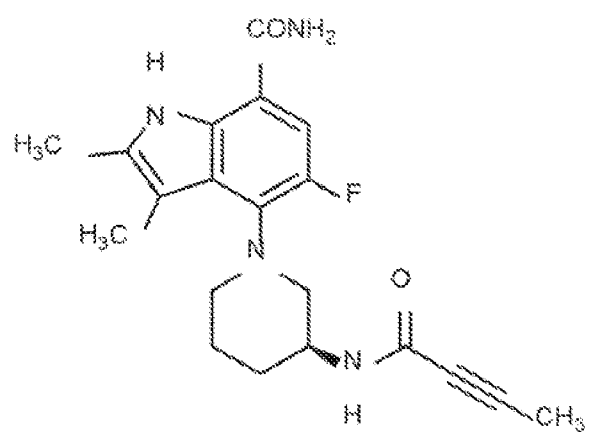


FIG. 1B

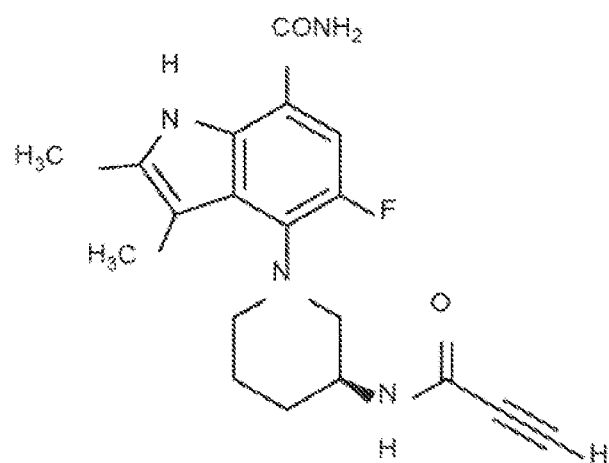


FIG. 2

```

SP|Q06187|BTK_HUMAN  MAAVILESIFLKRSSQKKKNTSPLNFKKRLFLTVMKLSYYEYDFERGARQSKKGSIDVER 60
TR|F6V016|F6V016_MACNU  MAAVILESIFLKRSSQKKKNTSPLNFKKRLFLTVMKLSYYEYDFERGARQSKKGSIDVER 60
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  ITCVETVVPKKNPPPERQIPRGGEESENEQISTIERFFYPFQVYDEGPLYVFSPTTEL 120
TR|F6V016|F6V016_MACNU  ITCVETVVPKKNPPPERQIPRGGEESENEQELIIEFFYPFQVYDEGPLYVFSPTTEL 120
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  PKRNEHQLVNVERYSOLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCCILENFMGSLKPGSS 180
TR|F6V016|F6V016_MACNU  RKRWENQLKNVERYSOLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCCILENFMGSLKPGSS 180
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  HRTKKPLPPTFEEDQILKKPLPPEPAAAPVSTSELKKVVALYDMPNNAIDLQLKGG 240
TR|F6V016|F6V016_MACNU  HRTKKPLPPTFEEDQILKKPLPPEPAAAPVSTSELKKVVALYDMPNNAIDLQLKGG 240
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  YFIEESNLPMWRARQKNGQEGYIPSNVYTEAEDSIENYENYSKHMTRSQAEQLLKQEGK 300
TR|F6V016|F6V016_MACNU  YFIEESNLPMWRARQKNGQEGYIPSNVYTEAEDSIENYENYSKHMTRSQAEQLLKQEGK 300
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  EGGFIVRDSKAGKYTVSVFAKSTGDPQGVIRHYVVCSTPQSQYYLAENHLFSTIPELIN 360
TR|F6V016|F6V016_MACNU  EGGFIVRDSKAGKYTVSVFAKSTGDPQGVIRHYVVCSTPQSQYYLAENHLFSTIPELIN 360
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  YHQHRSAGLISRLKYPVSSQNNAPSTAGLSYGSGEIDPKDLTFLKELGTGQFGVVKYCK 420
TR|F6V016|F6V016_MACNU  YHQHRSAGLISRLKYPVSSQNNAPSTAGLSYGSGEIDPKDLTFLKELGTGQFGVVKYCK 420
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  WRGQYDAIKMKEGSGDEDEFIEAKVMNLSHEKLVQLYGVCTNMPFIITEYMANG 480
TR|F6V016|F6V016_MACNU  WRGQYDAIKMKEGSGDEDEFIEAKVMNLSHEKLVQLYGVCTNMPFIITEYMANG 480
*****
↓
SP|Q06187|BTK_HUMAN  CLLNVLNEMRHAFQTQQLLENCKQVCEAMEYLESKQPLNRDLAARNCLVNDQGVVKVSDP 540
TR|F6V016|F6V016_MACNU  CLLNVLNEMRHAFQTQQLLENCKQVCEAMEYLESKQPLNRDLAARNCLVNDQGVVKVSDP 540
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  GLSRVYLDDEYTSVSGSKFPVRNSPPEVLMYSKFSKSDINAFQVLMNEIYSLGNPYER 600
TR|F6V016|F6V016_MACNU  GLSRVYLDDEYTSVSGSKFPVRNSPPEVLMYSKFSKSDINAFQVLMNEIYSLGNPYER 600
*****

SP|Q06187|BTK_HUMAN  FTNGETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVTIMYSCHHEKADERPTFKILLSNLDVNDDES 659
TR|F6V016|F6V016_MACNU  FTNGETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVTIMYSCHHEKADERPTFKILLSNLDVNDDES 659
*****

```


FIG. 3

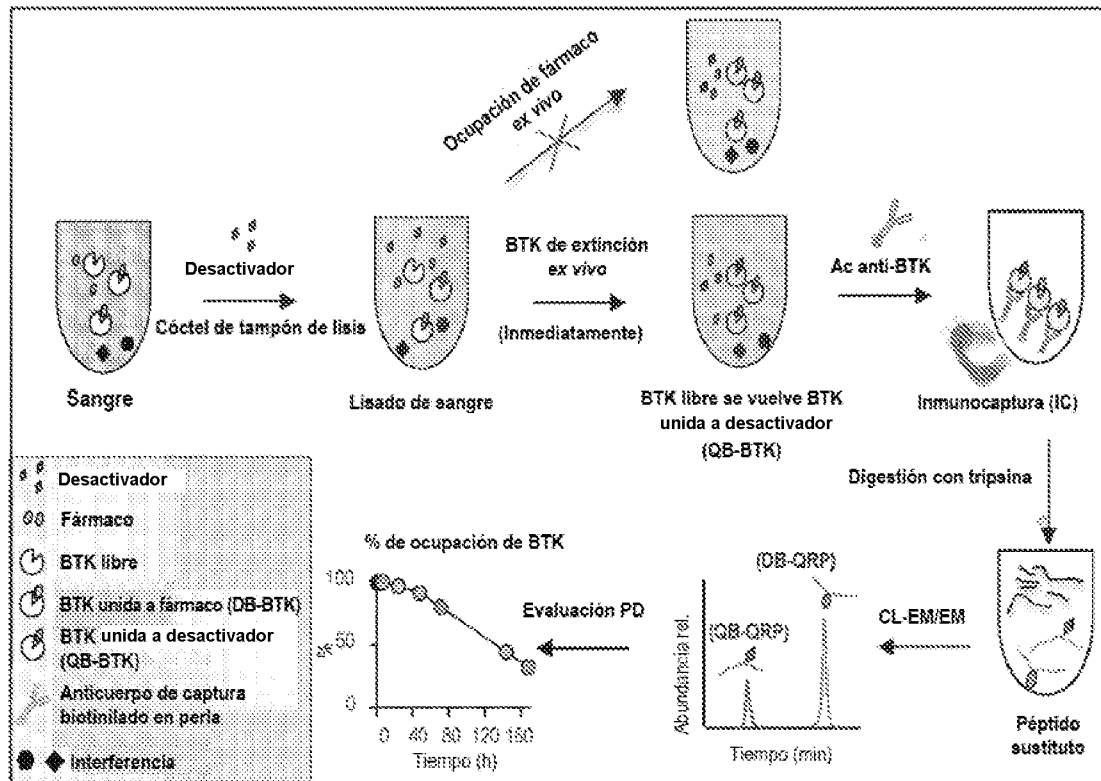


FIG. 4

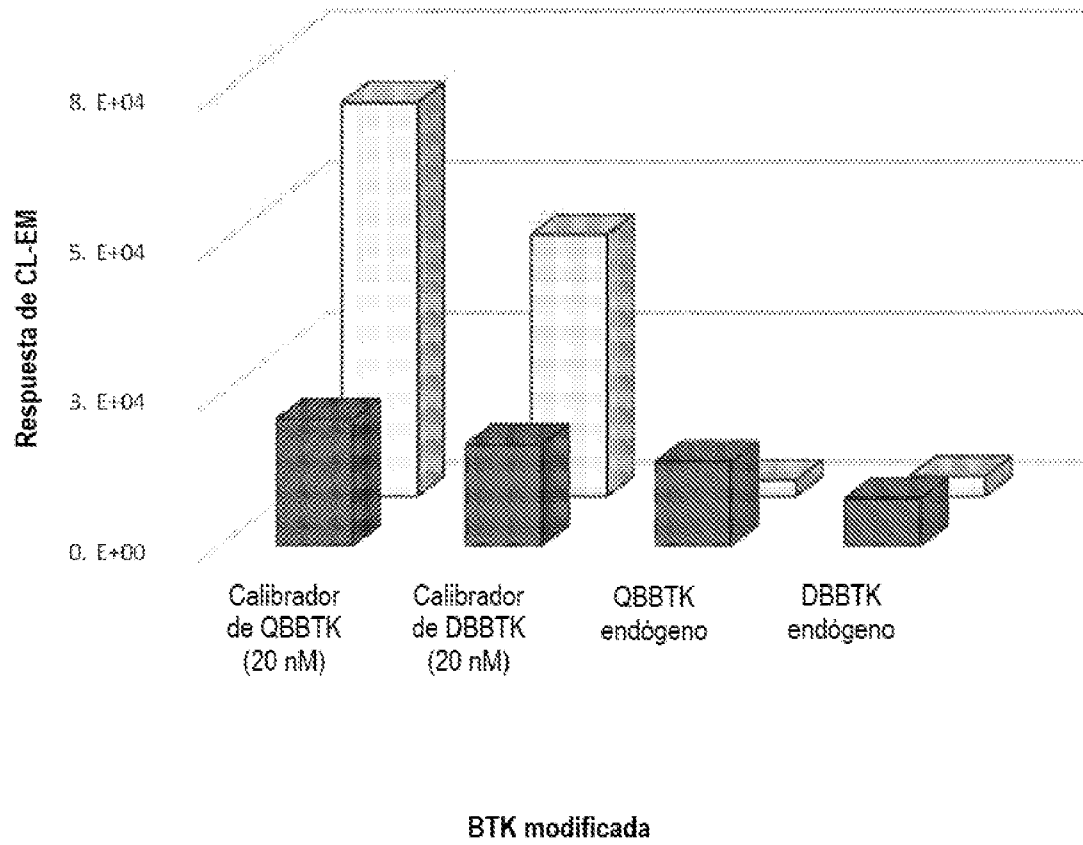


FIG. 5A

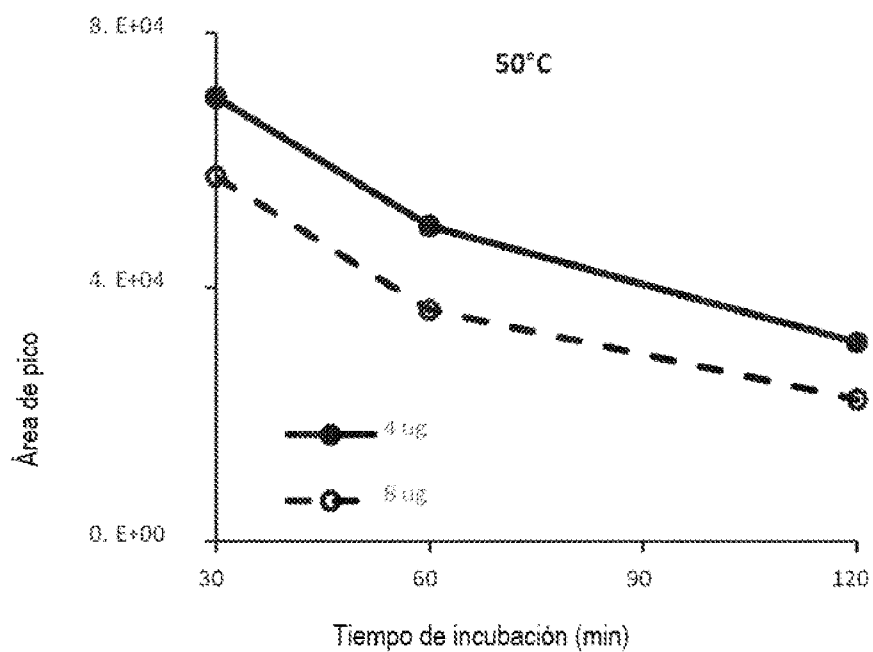


FIG. 5B

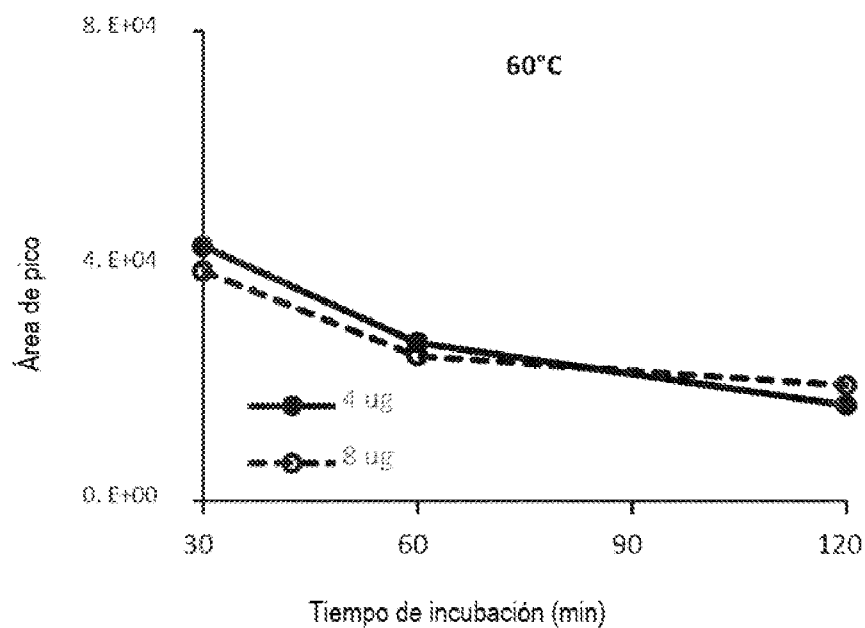


FIG. 5C

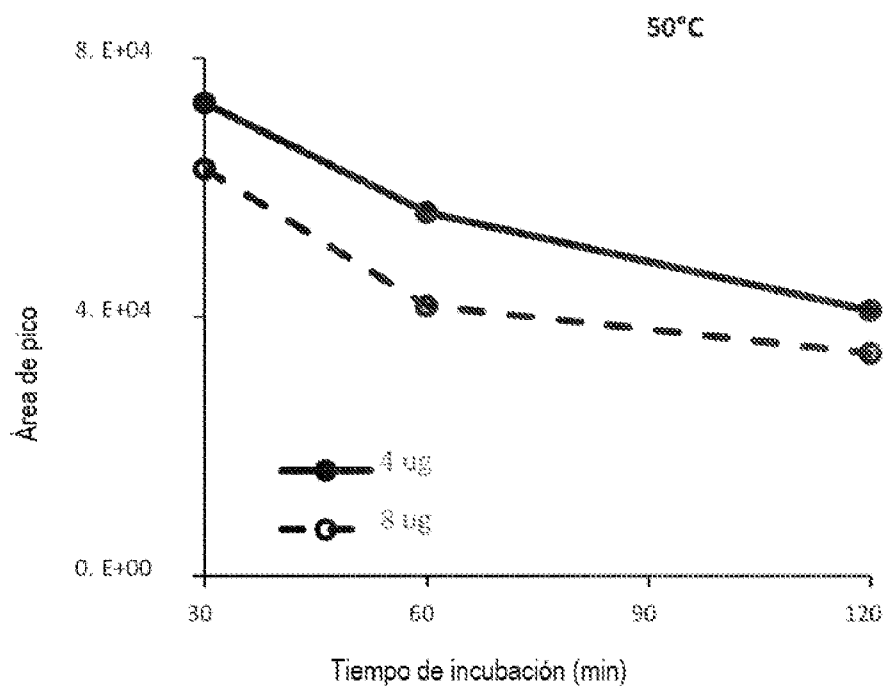


FIG. 5D

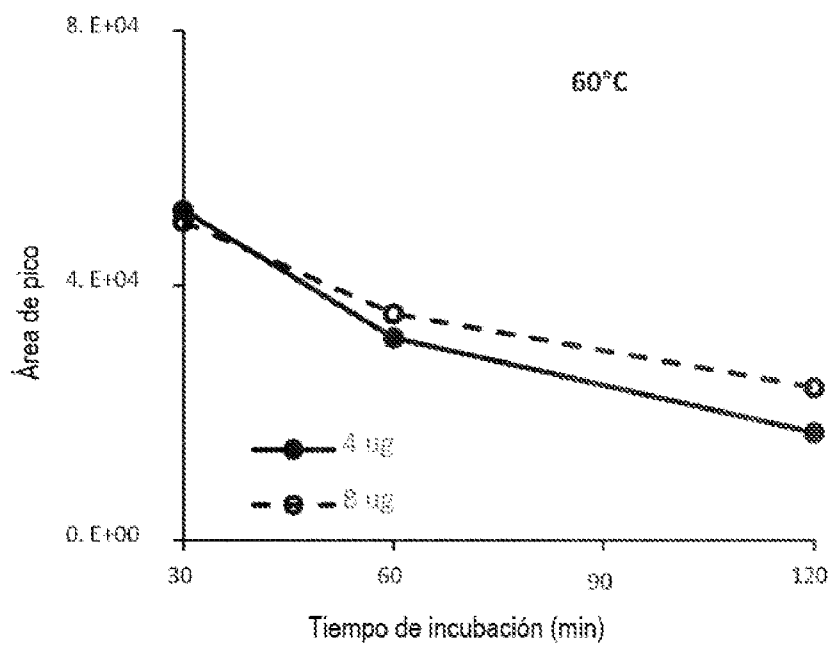


FIG. 6

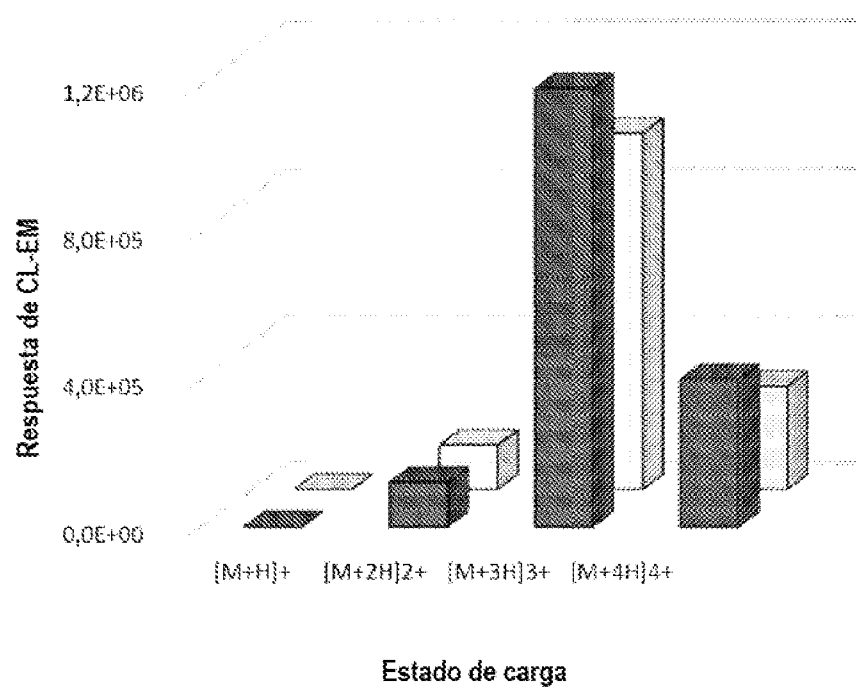


FIG. 7A

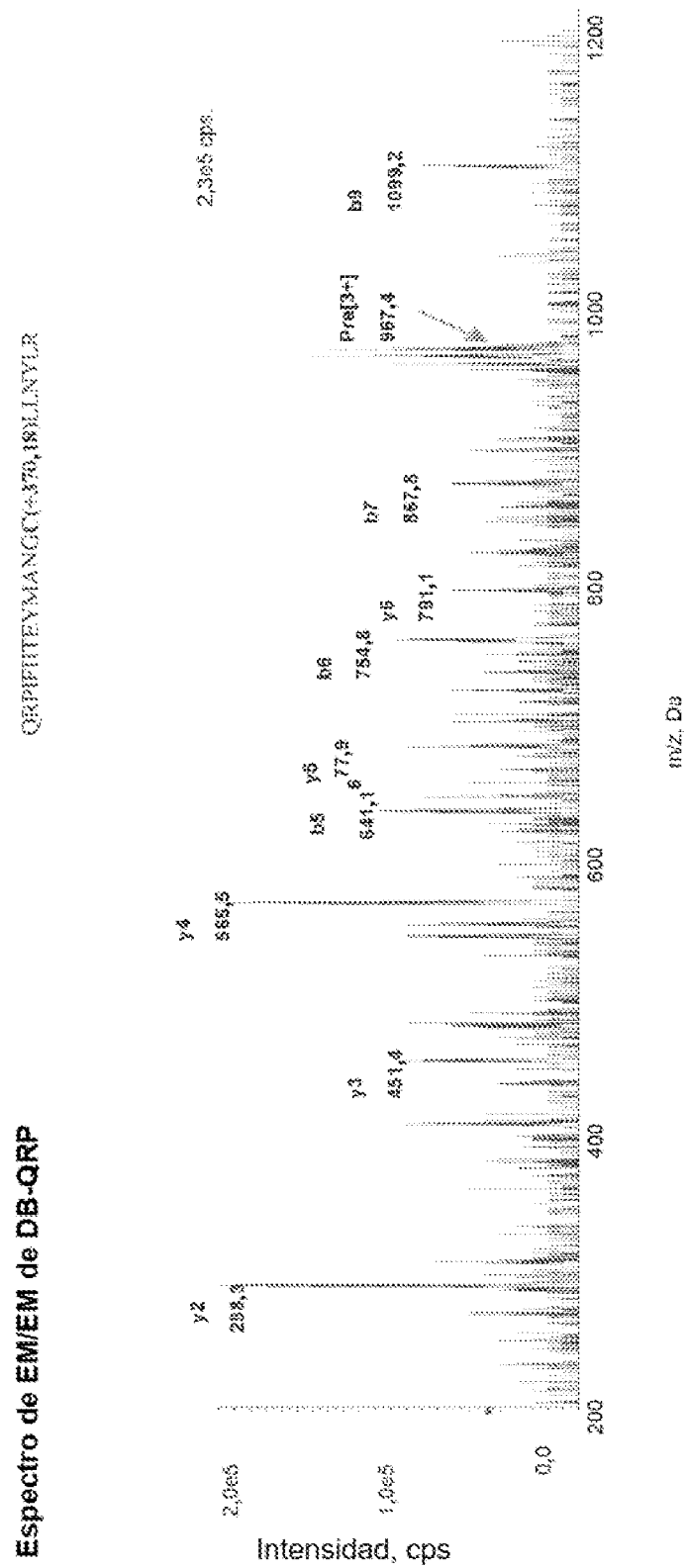


FIG. 7B

Espectro de EM/EM de QB-QRP

QRPPIIIEYMANGC(+356,16)LLNYLR

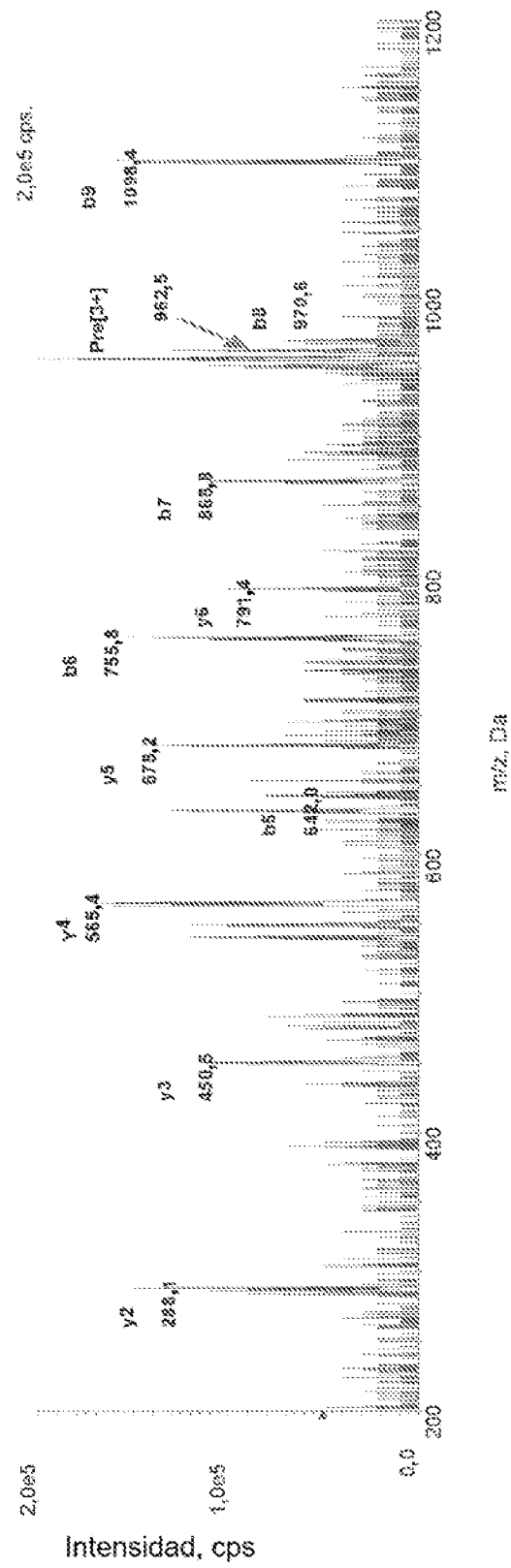


FIG. 7C

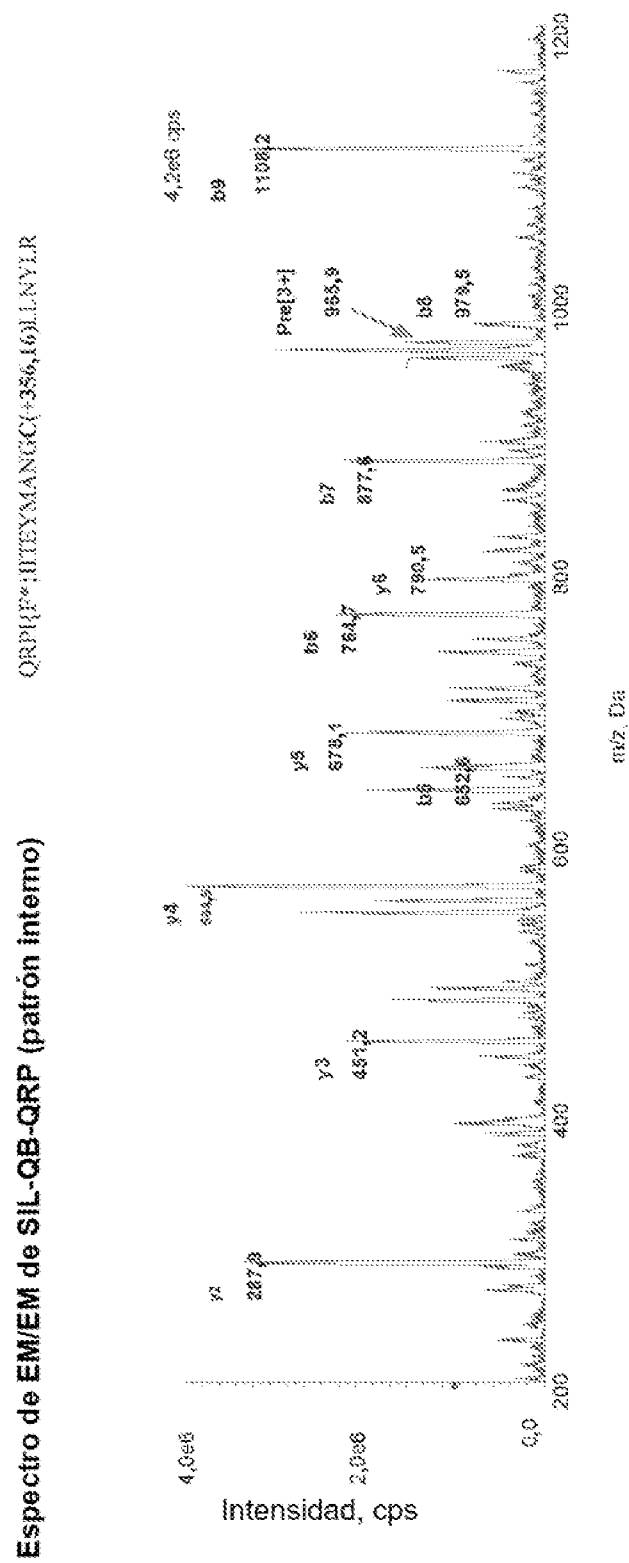


FIG. 8A

Blanco de control

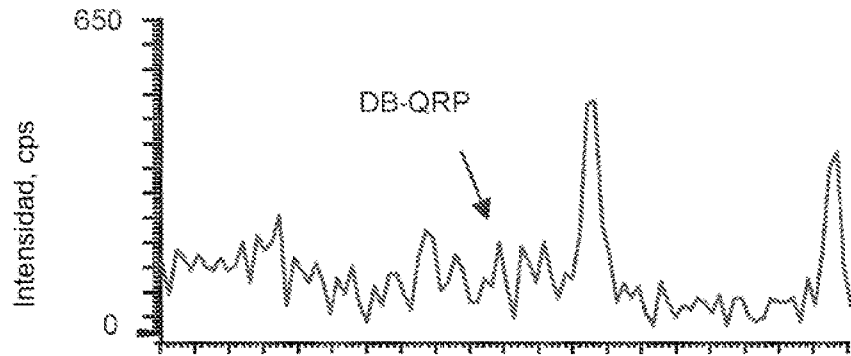


FIG. 8B

LLOQ (0,250 nM)

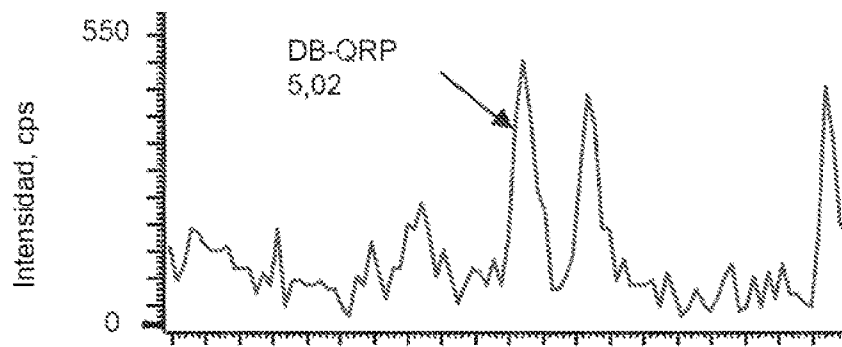


FIG. 8C

Patrón interno

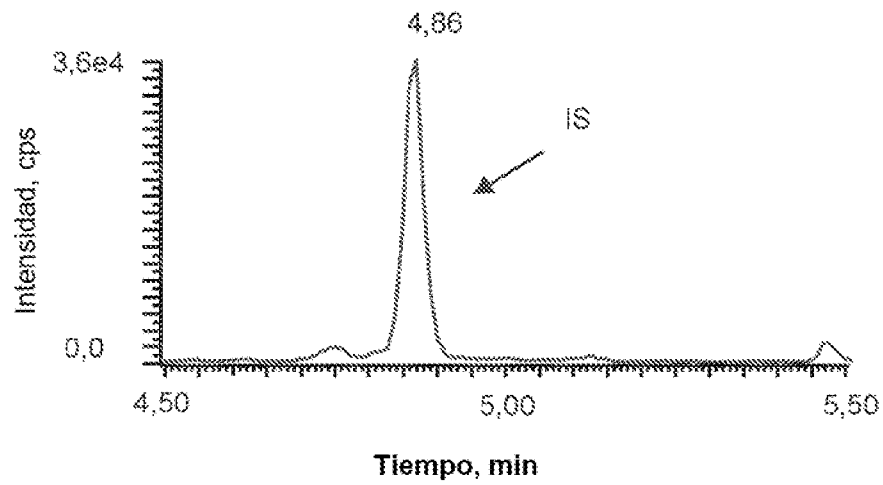


FIG. 8D

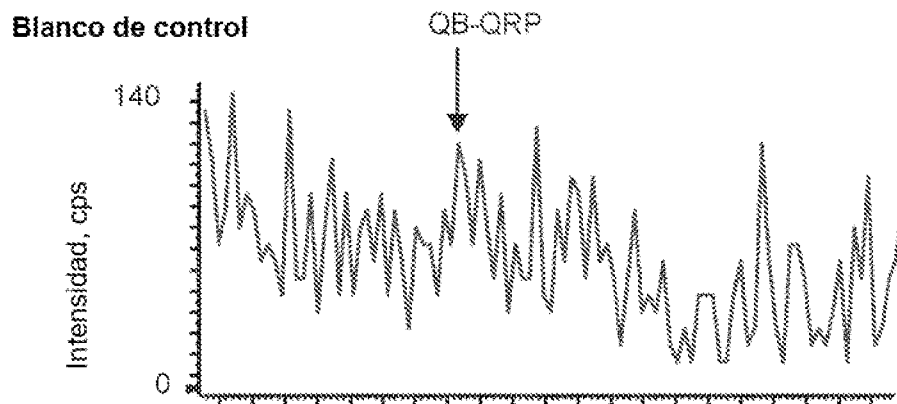


FIG. 8E

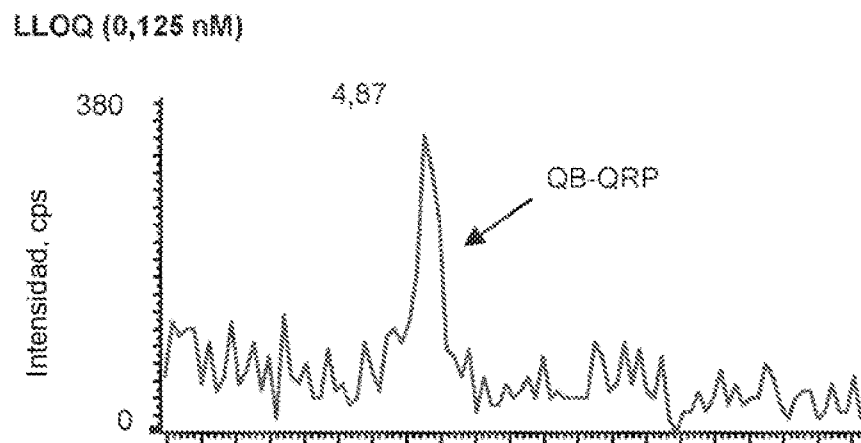


FIG. 8F

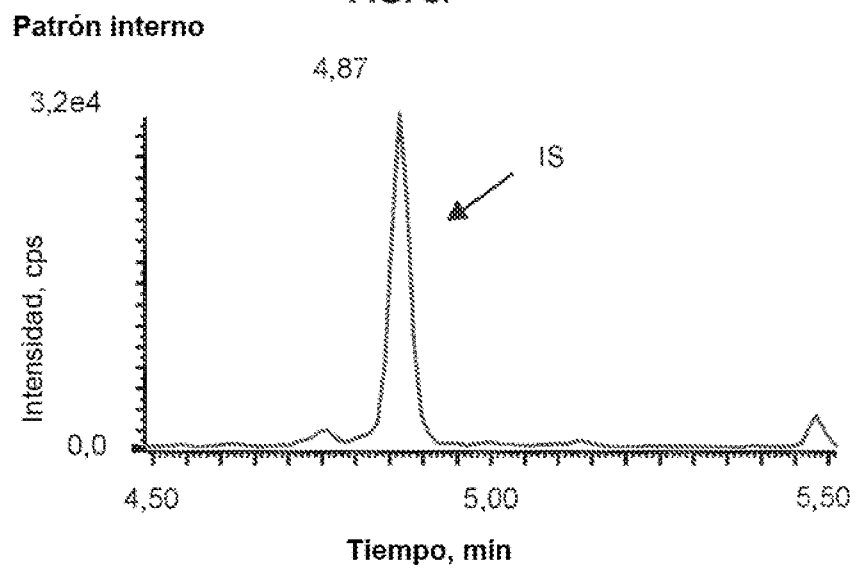


FIG. 9A

Perfil de conc. de BMS-986195 en plasma frente a tiempo

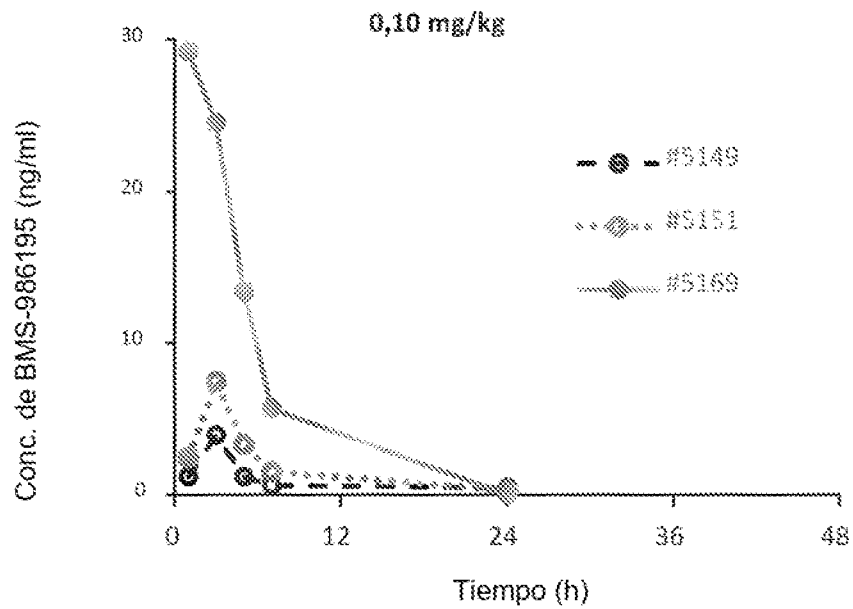


FIG. 9B

Perfil de conc. de BMS-986195 en plasma frente a tiempo

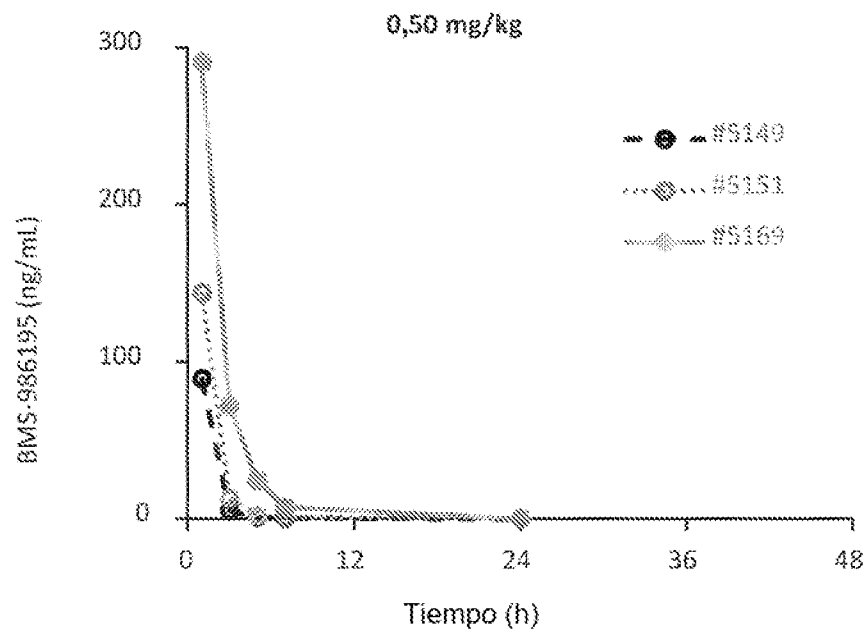


FIG. 9C

Perfil de % de ocupación de BTK frente a tiempo

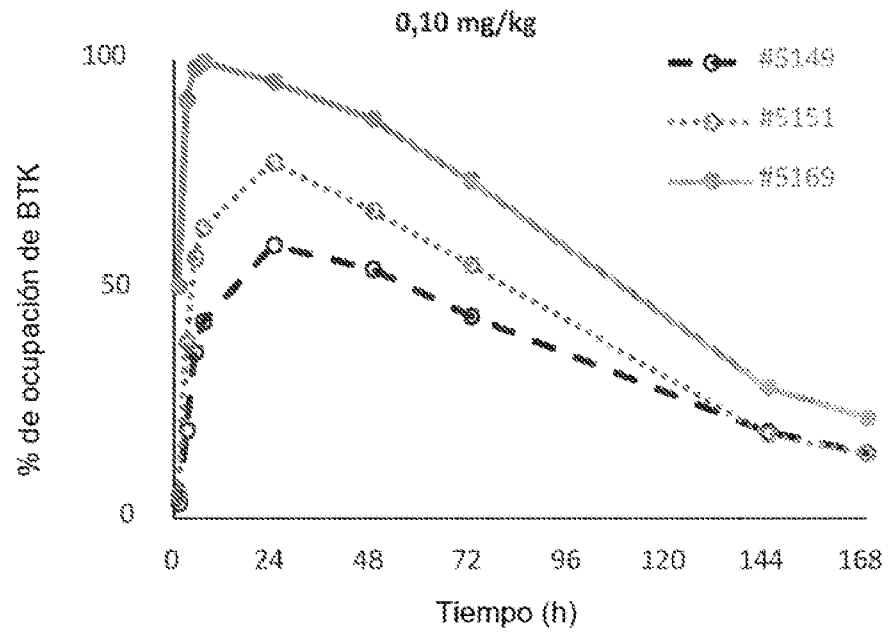


FIG. 9D

Perfil de % de ocupación de BTK frente a tiempo

