



공개특허 10-2025-0021652



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0021652  
(43) 공개일자 2025년02월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 33/68* (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)  
*G01N 33/543* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*G01N 33/6848* (2013.01)  
*G01N 30/7233* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7003448(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년05월09일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2020-7035120  
원출원일자(국제) 2019년05월09일  
심사청구일자 2022년04월26일
- (85) 번역문제출일자 2025년02월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/031524
- (87) 국제공개번호 WO 2019/217684  
국제공개일자 2019년11월14일
- (30) 우선권주장  
62/669,442 2018년05월10일 미국(US)

- (71) 출원인  
브리스톨-마이어스 스클럽 컴퍼니  
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
- (72) 발명자  
정, 나이유  
미국 08543 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스클럽 컴퍼니 내  
캐틀렛, 이안 맥쿼리  
미국 08543 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스클럽 컴퍼니 내  
정, 지아닝  
미국 08543 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스클럽 컴퍼니 내
- (74) 대리인  
양영준, 이귀동

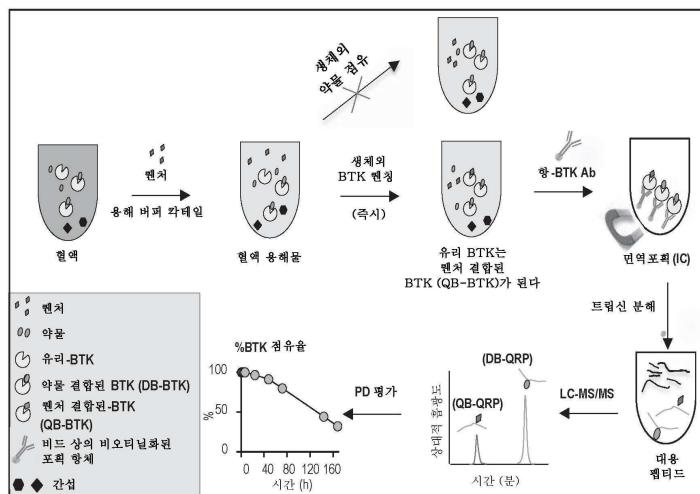
전체 청구항 수 : 총 1 항

- (54) 발명의 명칭 생체내 수용체 점유율을 결정하기 위한 검정

### (57) 요약

본 발명은 수용체에 대한 관심 약물의 결합을 모니터링 및 측정하기 위한 검정에 관한 것이다. 이 검정에서, 관심 화합물이 투여된 대상체로부터 수집된 혈액 샘플은 웬처를 함유하는 용해 용액과 함께 인큐베이션된다. 이어서, 약물 결합된 및 웬처 결합된 수용체는 용해된 혈액 샘플로부터 단리된다. 단리된 약물 결합된 및 웬처 결합된 수용체는 분해되어 대용 약물 결합된 및 웬처 결합된 펩티드를 생성한다. 대용 펩티드의 양이 결정된다. 수용체 점유율은 약물 결합된 대용 펩티드의 양을 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 펩티드의 총량과 비교함으로써 결정될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류

*G01N 33/54393* (2013.01)

*G01N 2333/912* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

용도.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 5월 10일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/669,442의 우선권을 주장하며, 이는 전체가 본 원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 혈액 용해물에서 공유적으로 결합된 화합물에 의해 실시간 생체내 수용체 점유율을 직접적으로 측정하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 임상 약물 개발을 위한 약력학 바이오마커로서의 실시간 생체내 BTK 수용체 점유율 측정에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 약물 발견 및 개발은 길고 위험성이 높은 과정이다. 성공적인 신약 개발에 드는 평균 비용은 초기 발견 및 개발 과정 동안 수많은 약물 후보의 실패로 인해 많게는 26억 달러로 추정되었으며, 임상 연구에 진입한 약물 후보의 전체 잔존율은 12% 미만으로 추정된다 (PhRMA Report, "Biopharmaceutical Research & Development: The Process Behind New Medicines", 2015). 이를 약물 후보의 실패를 유발하는 주요 문제는 후기 개발 단계 동안, 특히 개념 증명 (II상) 임상 시험 동안 임상 효능이 불충분하거나 결여되는 것과 관련되었다 (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).

[0006] 개발 중인 많은 소분자 약물 및 생물제제가 면역계를 매개하도록 설계되었다. 이에 따라, 이들 약물 후보는 원하는 반응을 유발하기 위해 종종 매우 낮은 용량 수준을 요구한다. 따라서, 이들 약물 후보의 약동학 (PK) 및 약력학 (PD) 특성에 대한 조기 이해는 임상 시험을 위한 적절한 용량 범위를 결정하는데 중요하다 (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). 약물 개발 단계 동안 임상 효율을 개선하고 비용을 줄이기 위해, PD 프로파일의 정량적 측정은 임상 시험의 합리적인 설계를 위해 PK 프로파일만큼 중요하다. 이것은 PD 프로파일이 다중 투여로 변화하는 경우 특히 그러하다.

[0007] 수용체 점유율 (RO) 검정은 분자의 수용체 단백질 (또는 표적)에 대한 결합을 측정하고 PD 프로파일을 생성하는데 사용될 수 있는 정량적 데이터를 제공한다 (Liang, M., et. al., Cytometry B Clin Cytom 2016, 90, 117-127). RO의 측정은 전임상 동물 모델 및 임상 연구에서 효능과 메커니즘을 결부시키는 중요한 결정이다. 실제로, RO는 인간에서의 최초 (FIH) 연구에서 증량 결정을 내리는데 특히 유용하다.

[0008] 브루톤 (Bruton)의 티로신 키나제 (BTK)는 B-세포 수용체, Fc 수용체- 및 RANKL 경로를 통한 신호 전달 및 활성화에 중요한 역할을 한다 (Seiler, T., et. al., Expert Opin Investig Drugs 2017, 26, 909-915; Whang, J. A., et. al., Drug Discovery Today 2014, 19, 1200-1204). 항체-기반 약물의 경우, RO는 일반적으로 유리 수용체 측정을 위해 표적 분자와 경쟁하는 항체를 사용하고 총 수용체 측정을 위해 비-경쟁 항체를 사용하여 유동 세포측정으로 모니터링된다 (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). 그러나, 소분자 길항제의 경우, 유동

세포측정에 의해 점유된 수용체를 직접 검출하기 위한 항체 시약이 존재하지 않는다. 이전에는, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서 이브루티닙의 BTK RO를 유리 (비점유된) BTK의 활성 점유 부위에 결합된 형광 친화성 프로브를 사용하여 결정한 다음 SDS/PAGE 및 형광 겔 스캐닝을 사용하여 검출하였다 (Honigberg, L. A.; J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010, 107, 13075-13080). 형광 친화성 프로브-기반 검정은 유리 BTK의 양만 결정할 수 있으므로, 총 BTK를 측정하려면 웨스턴 블로트를 사용하는 추가 검정이 필요하다. 임상 연구에서 생성된 많은 수의 샘플로 인해, 2개의 검정 플랫폼을 사용하는 것은 실용적이지 않다. 또한, 이 방법은 비결합된 측정과 총 측정 사이에 직접적인 비교가능성이 없기 때문에 검정 편차가 높다.

[0009] 최근에, 비오티닐화된 공유 프로브를 사용하는 ELISA 기반 BTK RO 검정이 보고되어 아칼라브루티닙 및 CC-292 임상 연구에 활용되었다 (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). 이 접근법에서는 약물 결합된 BTK (DB-BTK)를 씻어내면서 유리 BTK만을 검출한다. 총 BTK 농도는 총 BTK 수준이 샘플 간에 일관되게 유지된다는 가정 하에 투여 전 샘플을 사용하여 결정된다.

[0010] 대안적으로, 유리 및 총 BTK에 대한 별도의 시간-분해된 형광 공명 에너지 전달 (TR-FRET)-기반 검정을 사용하여 말초 혈액 단핵구 (PBMC)에서 BTK 점유율을 추정할 수 있다 (Lutz, J. D. N., et.al., *Poster presentation at the 7th American Conference on Pharmacometrics (ACoP7) in Bellevue, WA. October 23-26, 2016.* 2016). 그러나, 유리 및 총 BTK는 동일한 샘플에서 동시에 측정되는 것이 아니라 독립적으로 측정되며, 총 BTK 수준은 샘플에 따라 크게 다른 것으로 밝혀졌다 (Honigberg, L. A., 상기 참조). 따라서, ELISA 또는 TR-FRET-기반 접근법은 방법론적 선택으로 인한 고유한 가변성에 의해 제한된다.

[0011] 액체 크로마토그래피 - 텐덤 질량 분광측정 (LC-MS/MS) 검정은 그의 탁월한 검정 선택성 및 변화 능력으로 인해 단백질 정량화의 잠재력을 입증하였다 (Neubert, H., et. al., *Bioanalysis* 2014, 6, 1731-1733). 특히, 면역 포획 농축에 이어 LC-MS/MS 검출을 조합한 "하이브리드" LBA-LC-MS 검정은 탁월한 검출 선택성으로 단백질 바이오마커 또는 치료제를 측정하는 강력한 기술 플랫폼이 되었다 (Stevenson, L., et. al., *Bioanalysis* 2013, 5, 2903-2918). LC-MS 검정의 주요 이점은 동일한 샘플에서 DB-BTK 및 유리 BTK 둘 다를 동시에 정량화하는 능력이다. 따라서, RO 결정은 샘플 또는 실행 변화에 훨씬 덜 민감하다.

[0012] 그러나, LC-MS 검정 개발에는 다수의 문제가 있다. 첫째, 약물이 투여된 동물 또는 인간으로부터의 혈액 샘플에는 과량의 약물이 함유될 수 있으며, 이는 생체외에서 유리 수용체와 반응하여 약물 결합된 수용체를 형성함으로써 RO의 과대평가를 초래한다. 둘째, LC-MS/MS는 일반적으로 ELISA 검정보다 덜 민감하다.

## 발명의 내용

[0013] 본 발명은 수용체에 대한 관심 약물의 결합을 모니터링하고 측정하기 위한 검정에 관한 것이다. 이 검정에서, 관심 화합물이 투여된 대상체로부터 수집된 혈액 샘플은 퀘처를 함유하는 용해 용액과 함께 인큐베이션된다. 이어서, 약물 결합된 및 퀘처 결합된 수용체는 용해된 혈액 샘플로부터 단리된다. 단리된 약물 결합된 및 퀘처 결합된 수용체는 분해되어 대용 약물 결합된 및 퀘처 결합된 웨프티드를 생성한다. 대용 웨프티드의 양이 결정된다. 수용체 점유율은 약물 결합된 대용 웨프티드의 양을 약물 결합된 및 퀘처 결합된 대용 웨프티드의 총량과 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0014] 본 발명의 한 실시양태에서, 관심 화합물은 수용체에 공유적으로 결합된다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀘처는 관심 화합물과 동일한 부위에서 수용체에 비가역적으로 결합하기 위해 관심 화합물과 경쟁한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀘처는 관심 화합물의 몰 과량의 수준으로 용해 버퍼에 첨가된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀘처는 내인성 수용체 농도를 기준으로 105 내지 1000 배 과량의 양으로 용해 버퍼에 첨가된다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀘처를 갖는 용해 용액은 혈액 샘플이 수집된 직후에 첨가된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀘처를 갖는 용해 용액은 혈액 샘플 수집 후 5분 이내에 첨가된다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 약물 결합된 및 퀘처 결합된 수용체는 면역포획 단계를 사용하여 단리된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 수용체는 고체 지지체 (예컨대, 자기 비드, 아가로스 비드 또는 컬럼 패킹 물질) 상에 고정된 포획제에 특이적으로 결합하므로, 포획 항체에 매우 단단히 결합하지 않는 다른 내인성 단백질

및 웨티드로부터 분리된다 [Fung, E.N. et. al., *Bioanalysis* 2016, 8, 847-856].

[0019] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 약물 결합된 및 웬처 결합된 수용체는 분해 단계 전에 면역포획 기재로부터 제거된다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 약물 결합된 및 웬처 결합된 수용체는 여전히 면역포획 기재와 회합된 상태로 분해된다.

[0021] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 분해 단계 동안 사용되는 프로테아제는 세린 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 아스파르트산 프로테아제, 글루탐산 프로테아제 및 메탈로프로테아제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 프로테아제의 예에는 트립신, 키모트립신, Glu-C 프로테아제, Lys-C 프로테아제, Lys-N 프로테아제, Asp-N 프로테아제, Arg-C 프로테아제가 포함된다.

[0022] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드는 단일 LC-MS/MS 실행에 의해 동시에 측정된다.

[0023] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 수용체 점유율은 약물 결합된 대용 웨티드의 양을 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드의 총량과 비교함으로써 계산된다.

[0024] 본 발명의 한 실시양태에서, 수용체 점유율은 1) 수용체에 비가역적으로 결합하는 관심 화합물이 투여된 대상체로부터 혈액을 수집하고, 2) 관심 화합물과 동일한 부위에 비가역적으로 결합하는 웬처 화합물을 함유하는 용해 용액을 수집된 혈액에 즉시 첨가하고, 3) 용해되고 웬칭된 혈액 샘플로부터 약물 및 웬처 결합된 수용체를 면역포획 단계를 사용하여 단리하고, 4) 단리된 약물 및 웬처 결합된 수용체를 여전히 면역포획 기재에 결합된 상태로 분해하고, 5) 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드의 양을 단일 LC-MS/MS 실행으로 동시에 측정하고, 6) 약물 결합된 대용 웨티드의 양을 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드의 총량과 비교하여 수용체 점유율을 결정함으로써 측정된다.

[0025] 상기 실시양태의 하나의 바람직한 측면에서, 수용체는 BTK이고, 관심 화합물은 도 1a에 나타나 있으며, 상응하는 웬처는 도 1b에 나타나 있다.

상기 실시양태의 또 다른 바람직한 측면에서, 면역포획 기재는 스트렙타비딘 T1 포획 비드이다.

[0027] 상기 실시양태의 또 다른 바람직한 측면에서, mAb 클론 # MAB 5807 또는 mAb 클론 # MAB D3H5는 면역포획 기재에 부착된 항-BTK 항체이다.

[0028] 상기 실시양태의 또 다른 바람직한 측면에서, 단리된 웬처 결합된 및 약물 결합된 BTK는 여전히 면역포획 비드와 회합된 상태로 트립신으로 분해된다.

[0029] 상기 실시양태의 또 다른 바람직한 측면에서, BTK 수용체 점유율은 약물 결합된 대용 웨티드의 양을 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드의 총량과 비교함으로써 계산된다.

[0030] 본 발명의 한 실시양태에서, BTK 수용체 점유율은 1) 도 1a에 나타낸 화합물이 투여된 대상체로부터 혈액을 수집하고, 2) 도 1b에 나타낸 웬처 화합물을 함유하는 용해 용액을 즉시 첨가하고, 3) 약물 및 웬처 결합된 BTK를 면역포획 단계를 사용하여 단리하고, 4) 단리된 약물 및 웬처 결합된 BTK를 여전히 면역포획 비드와 회합된 상태로 트립신으로 분해하고, 5) 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드의 양을 단일 LC-MS/MS 실행으로 동시에 측정하고, 6) 약물 결합된 대용 웨티드의 양을 약물 결합된 및 웬처 결합된 대용 웨티드의 총량과 비교함으로써 BTK 수용체 점유율을 결정함으로써 측정된다.

### 도면의 간단한 설명

[0031] 도 1a 및 1b는 a) 화합물 A; b) 웬처 화합물의 구조를 도시한다.

도 2는 각각 인간 및 원숭이 (레서스/시노)로부터의 BTK 단백질의 서열 정렬을 도시한다. 박스는 분석에 사용되는 트립신분해 웨티드를 나타낸다. 아미노산 서열 내에서 Cys 481 (화살표로 표시됨)은 화합물 A (DB-BTK) 또는 웬처 화합물 (QB-BTK)에 결합된다. 정량화를 위해 도 1a 또는 1b의 화합물에 결합되는 트립신분해 웨티드 QRPIFIITEYMANGLNNYLR (표 1에 나타낸 바와 같은 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1)을 사용하였다.

도 3은 면역포획-LC-MS/MS에 의한 BTK RO 측정의 개략도를 도시한다. 사용되는 대용 웨티드는 약물 결합된 웨티드 (DB-QRP) 및 웬처 결합된 웨티드 (QB-QRP)이다.

**도 4**는 상이한 공급업체로부터의 포획 항체 (■ mAb-D3H5, □ mAb-MAB5807)가 인간 혈액의 내인성 BTK와 재조합 BTK (캘리브레이터로 사용됨) 간에 차별적인 면역포획 성능을 갖는다는 것을 도시한다.

**도 5a - 5d**는 50°C (5a 및 5c) 또는 60°C (5b 및 5d)에서 DB-BTK (5a 및 5b) 및 QB-BTK (5c 및 5d)로부터 생성되는 대용 웨პ티드의 LC-MS/MS 반응에 대한 트립신 농도, 분해 시간의 영향을 도시한다. 대용 웨პ티드인 DB-QRP 또는 QB-QRP는 씨모 (Thermo)의 큐 에그잭티브(Q Exactive)™ 하이브리드 콰드루폴-오비트랩(Hybrid Quadrupole-Orbitrap)™ 질량 분광기에서 LC-HRMS로 측정되었다. 실험은 각각의 조건에 대해 삼중으로 수행되었다.

**도 6**은 DB-BTK (■) 및 QB-BTK (□) 둘 다의 각각의 하전 단계에 대한 신호 반응의 비교를 도시한다.

**도 7a - 7c**는 사이엑스의 트리플 콰드 5500 (Sciex's Triple Quad 5500) 질량 분광기로부터 수득되는 (7a) DB-QRP 웨პ티드에 대한  $m/z$  967.4에서의  $[M+3H]^{3+}$ 의 전기분무 양이온 MS/MS 생성물 이온 스펙트럼; (7b) QB-QRP 웨პ티드에 대한  $m/z$  962.5에서의  $[M+3H]^{3+}$ 의 전기분무 양이온 MS/MS 생성물 이온 스펙트럼; 및 (7c) SIL-QB-QRP 웨პ티드 (내부 표준)에 대한  $m/z$  965.9에서의  $[M+3H]^{3+}$ 의 전기분무 양이온 MS/MS 생성물 이온 스펙트럼을 도시한다.

**도 8a - 8f**는 DB-QRP (DB-BTK에 대한 대용 웨პ티드) (8a-8c) 및 QB-QRP (QB-BTK에 대한 대용 웨პ티드) (8d-8f), 그들의 내부 표준 (IS)에 대한 다중 반응 모니터링 (MRM) 크로마토그램; (8a 및 8d) 내인성 BTK의 기여가 웬처 또는 약물로 개별적으로 사전-처리하여 제거된 블랭크 원숭이 혈액 용해물로부터 수득되는 분석물의 크로마토그램; (8b 및 8e) LLOQ로 분석물 및 그의 IS를 함유하는 원숭이 혈액 용해물로부터 수득되는 분석물의 크로마토그램; (8c 및 8f) IS만을 함유하는 원숭이 혈액 용해물로부터 수득되는 IS의 크로마토그램을 도시한다. (c 및 f)  $[^{13}\text{C}_9, ^{15}\text{N}]$ -QB-QRP는 DB-QRP 및 QB-QRP에 대한 IS로 사용되었다.

**도 9a - 9d**는 2개의 상이한 용량 0.10 mg/kg 또는 0.5 mg/kg으로 도 1a에 나타낸 화합물 (BMS-986195)이 투여된 원숭이 #5149, #5151 및 #5169로부터 수득되는 PK 및 PD 결과를 도시한다. 혈액 샘플은 PK 평가를 위해 제1 일 1, 3, 5, 7 및 24시간에 수집되었고 (데이터는 9a 및 9b에 도시됨), PD 평가를 위해 투여 전, 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 144 및 168시간에 수집되었다 (데이터는 9c 및 9d에 도시됨) (실시예 2 참조).

EFS-WEB를 통해 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

출원서와 함께 출원된 ASCII 텍스트 파일 12728WOPCT\_ST25.txt (크기: 16 kb, 2019년 4월 8일 생성됨)의 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용은 전체가 참조로 본원에 포함된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 본 발명의 바람직한 실시양태에 대한 하기 상세한 설명 및 본원에 포함된 실시예를 참조하여 보다 용이하게 이해될 수 있다.
- [0033] 본원에 사용된 용어 "비가역적으로 결합된"은 활성 부위에 공유 결합을 형성함으로써 또는 대안적으로 해리 속도가 관련 시간 척도에서 사실상 0이 되도록 매우 단단하게 결합함으로써 수용체에 영구적으로 결합하는 화합물 유형을 지칭한다.
- [0034] 본원에 사용된 용어 "관심 화합물" 및 "약물"은 상호교환적으로 사용되며 관심 표적에 결합하는 분자를 지칭한다.
- [0035] 본원에 사용된 용어 "표적" 및 "수용체"는 RO 검정을 중심으로 언급할 때 상호교환적으로 사용된다.
- [0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, 웬처 분자를 함유하는 용해 용액이 혈액 샘플에 첨가되는 경우를 지칭할 때 용어 "즉시"는 혈액 샘플이 수집된 후 가능한 한 빨리를 의미한다. 대안적으로, 웬처 분자를 함유하는 용해 용액은 혈액 샘플이 수집된 후 처음 5분 이내에 첨가된다.
- [0037] 본 발명은 생체내 수용체 점유율 검정, 보다 구체적으로 생체내 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 수용체 점유율 (RO) 검정의 개발을 기재한다. 검정 민감성은 결합된 또는 유리 표적이 5% 미만일 수 있는 매우 높거나 매우 낮은 점유율 수준에서 RO를 결정하는데 중요하다.
- [0038] 본 발명은 a) 관심 화합물로 치료된 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 단계, b) 수용체 특이적 웬처를 함유하

는 용해 용액을 혈액 샘플에 첨가하는 단계, c) 관심 수용체를 단리하는 단계, d) 단리된 수용체를 분해하여 대용 펩티드를 생성하는 단계, e) 대용 펩티드의 양을 측정하고, 약물 결합된 대용 펩티드의 양을 약물 결합된 및 퀸처 결합된 대용 펩티드의 총량과 비교함으로써 수용체 점유율을 결정하는 단계를 포함하는 방법이다.

**[0039] 관심 화합물이 투여된 대상체로부터 혈액 샘플 수집.**

본 발명의 한 실시양태에서, 관심 화합물은 수용체의 적어도 하나의 아미노산에 비가역적으로 결합한다. 관심 화합물의 예는 BTK에 비가역적으로 결합하는 도 1a에 나타낸 화합물이다.

**[0041] 수용체 특이적 퀸처를 함유하는 용해 용액이 혈액 샘플에 첨가된다.**

수용체 점유율 (RO) 검정 개발의 선택성 및 민감성에 영향을 미치는 많은 문제가 있었다. 특히, 혈액 샘플에서 유리 약물 및 유리 수용체의 존재는 용해 단계 동안 생체외에서 약물 결합된 수용체를 생성할 수 있으며, 이는 RO의 과대평가로 이어질 수 있다. 용해 단계 동안 수용체 특이적 퀸처의 첨가는 유리 수용체를 퀸처 결합된 (QB) 수용체로 빠르게 전환시켜 생체외에서 약물 결합된 수용체 형성을 차단하는 것으로 밝혀졌다.

한 실시양태에서, RO 검정은 내인성 수용체를 퀸처 결합된 수용체로 전환시킴으로써 내인성 약물 결합된 수용체의 형성을 방지하기 위해 퀸처의 존재 하에 혈액 샘플을 용해하는 것을 포함한다.

본 발명의 한 실시양태에서, 퀸처는 관심 화합물과 동일한 아미노산에 비가역적으로 결합한다. 바람직하게는, 퀸처는 수용체에 대한 결합에서 관심 화합물과 경쟁한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀸처는 관심 화합물에 대해 몰 과량으로 용해 용액에 첨가된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 퀸처를 함유하는 용해 용액은 혈액 샘플을 수집한 직후에 첨가된다.

관련 기술분야의 통상의 기술자는 세포 용해 용액을 알고 있을 것이다. 상업적으로 이용가능한 세포 용해 버퍼 용액에는 NP-40 용해 버퍼 (써모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific)), RIPA 용해 버퍼 (아벳사 (Abbexa)), ACK 용해 버퍼 (써모피셔 사이언티픽), 세포 용해 버퍼 (10x) (카탈로그 번호: 9803, 셀 시그널링 테크놀로지 (Cell Signaling Technology))가 포함된다. 용해 버퍼는 비변성 조건 하에서 세포를 용해하는데 사용된다.

퀸처 화합물의 예는 BTK에 비가역적으로 결합하는 도 1b에 나타낸 화합물이다.

**[0047] 세포 용해를 용액으로부터 약물 결합된 및 퀸처 결합된 수용체 단리**

면역포획은 표적 단백질 및 포획체의 고유한 면역친화성의 이점을 취하는 고도로 선택적인 샘플 클린업 방법이다 (Stevenson, L., et. al., *Bioanalysis* 2013, 5, 2903-2918). 내인성 표적에 대해 높은 면역포획 효율을 갖는 올바른 포획 항체를 선택하는 것이 검정 성공의 핵심이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 특정 항체가 상업적으로 이용가능하지 않은 경우 그들의 표적 단백질에 특이적인 항체를 생성하는 방법을 알고 있을 것이다.

면역포획 효율을 평가하기 위해 항체는 약물 결합된 및 퀸처 결합된 표적을 사용하여 스크리닝된다. 항체는 약물 결합된 및 퀸처 결합된 표적 모두에 대한 높은 친화성을 기반으로 선택된다. 예컨대, BTK에 특이적인 항체를 선택하기 위해 상업적으로 이용가능한 mAb 클론 # MAB5807 및 mAb 클론 # D3H5의 면역포획 능력을 평가하였다. 놀랍게도, mAb 클론 # MAB5807은 재조합 BTK, DB-BTK 또는 QB-BTK에 대해 높은 친화성을 나타내지만 내인성 BTK, DB-BTK 또는 QB-BTK를 필요한 민감도로 검출할 수 없었다. 도 4에 도시된 바와 같이, 내인성 BTK로부터의 LC-MS 반응은 mAb 클론 # 5807을 사용할 때는 매우 낮았지만, 다른 클론인 mAb 클론 # D3H5는 약물 결합된 및 퀸처 결합된 재조합 BTK에 대해 중간 정도의 반응을 제공하고, 약물 결합된 및 퀸처 결합된 내인성 BTK 모두에 대해 큰 반응을 제공하였다. 궁극적인 목표는 인간 혈액에서 약물 결합된 및 퀸처 결합된 내인성 BTK를 결정하는 것이었기 때문에, BTK RO 검정에 사용하기 위해 클론 # D3H5를 선택하였다.

**[0050] 약물 결합된 및 퀸처 결합된 수용체 대용 펩티드 생성**

RO 검정에 사용하기 위해 생성된 수용체 대용 펩티드는 관심 화합물의 결합 부위를 함유하여야 한다. 또한, 대용 펩티드는 LC-MS 검출에 민감해야 한다.

본 발명의 한 실시양태에서, 단리된 약물 결합된 및 퀸처 결합된 수용체는 세린 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 아스파르트산 프로테아제, 글루탐산 프로테아제 및 메탈로프로테아제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로테아제로 분해된다. 허용되는 프로테아제의 예에는 트립신, 키모트립신, Glu-C 프로테아제, Lys-C 프로테아제, Lys-N 프로테아제, Asp-N 프로테아제, Arg-C 프로테아제가 포함된다.

[0053] 표 1은 BTK가 다양한 프로테아제로 분해될 때 생성되는 대용 펩티드를 기재한다.

[0054] <표 1>

#### 다양한 프로테아제로 처리될 때 생성되는 BTK 펩티드

프로테아제	생성되는 BTK 펩티드	SEQ ID NO
트립신	QRPIIITEYMAN <u>G</u> CLLNLYR	1
키모트립신	MANG <u>G</u> LLNY	2
Glu-C	YMANG <u>G</u> LLNYLRE	3
Lys-C	QRPIIITEYMAN <u>G</u> LLNLREMRHRFQTQQLEMCK	4
Lys-N	KQRPIIITEYMAN <u>G</u> LLNLREMRHRFQTQQLEM	5
Asp-N	DEFIEEAKVMMNLSHEKLVQLYGVCTKQRPIIITEYMAN <u>G</u> LLNLREMRHRFQTQQLEMCK	6
Arg-C	GQYDVAIKMIKEGSMSEDEFIEEAKVMMNLSHEKLVQLYG VCTKQRPIIITEYMAN <u>G</u> LLNYLRE	7

[0055]

[0056] 약물 결합된 표적 및 펜처 결합된 표적의 정량화는 대표적인 대용 펩티드의 MS 반응을 기반으로 하기 때문에, 이를 대용 펩티드의 분해 수율은 검출 민감도에 극적인 영향을 미칠 수 있다.

[0057] 본 발명의 한 실시양태에서, 분해 단계는 면역포획 기재로부터 약물 결합된 및 펜처 결합된 수용체의 용출 전 또는 후에 수행된다. 바람직하게는, 분해 단계는 표적이 면역포획 기재에 결합된 상태에서 수행된다. 예컨대, 약물 결합된 및 펜처 결합된 BTK는 여전히 면역포획 비드에 의해 결합된 상태에서 트립신 분해로 처리되었다.

#### 대용 펩티드의 양 측정

[0059] 본 발명의 한 실시양태에서, 수용체 점유율은 펜처 결합된 및 약물 결합된 대용 펩티드를 단일 LC-MS/MS 실행으로 동시에 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0060] 초기 방법 개발 동안, 반응으로부터 생성되는 DB-BTK 및 QB-BTK는 큐 에그잭티브 HF 고분해능 질량 분광측정 (HRMS)을 사용하여 분석되었다. 대용 펩티드로부터 예상되는 정확한 질량을 사용하여 모든 대용 펩티드를 확인하였다. 각각의 하전 단계의 신호 풍부도는 도 6에 도시된다. 데이터는 DB-BTK 및 QB-BTK가 모두 3개의 하전 단계에 대해 가장 높은 반응을 제공하였으므로  $[M+3H]^{3+}$  이온이 MRM 검출을 위한 모 이온으로서 DB-QRP (DB-BTK의 대용 펩티드) 및 QB-QRP (QB-BTK의 대용 펩티드) 둘 다에 대해 사용되었다는 것을 보여준다. 도 7a-7c에 도시된 바와 같이, MS/MS 스펙트럼에서 여러 생성물 이온이 나타났다.  $y_2$  이온 ( $m/z \sim 288$ ) 및  $b_6$  이온 (DB-QRP 및 QB-QRP의 경우  $m/z \sim 755$ , IS의 경우  $m/z \sim 765$ )에 상응하는 생성물 이온은  $b_6$  이온보다  $y_2$  이온으로 MRM 검출에 대해 우수한 강도를 나타낸다.  $m/z \sim 288$ 의  $y_2$  이온은 DB-QRP 및 QB-QRP의 MRM 채널에 나타난 간접 피크를 가지므로,  $b_6$  이온이 MRM 검출을 위한 생성물 이온으로 사용되었다.

[0061] 블랭크 원숭이 혈액 용해물, DB-BTK의 경우 0.250 nM, QB-BTK의 경우 0.125 nM의 LLOQ의 농도로 DB-BTK 및 QB-BTK로 스파이킹된 블랭크 원숭이 혈액 용해물의 DB-QRP, QB-QRP 및 IS에 대한 전형적인 MRM 크로마토그램이 도 8a, 8b, 8d 및 8e에 도시된다. IS만 갖는 블랭크 원숭이 혈액 용해물로부터의 [ $^{13}\text{C}_9, ^{15}\text{N}$ ]-QB-QRP의 전형적인 MRM 질량 크로마토그램은 도 8c 및 8f에 도시된다. 대조군 블랭크 원숭이 혈액 용해물이 분석되었을 때, DB-QRP, QB-QRP 또는 IS의 정체 시간 또는 이온 채널에서 블랭크 원숭이 용해물로부터 어떠한 유의한 간접 피크도 발견되지 않았다. DB-QRP, QB-QRP 및 그들의 IS는 각각 5.02, 4.87 및 4.87분의 정체로 UHPLC 컬럼으로부터 용출되었다.

#### 정량화 하한

[0063] DB-QRP 및 QB-QRP에 대한 정량화 하한 (LLOQ)은 0.250 nM 및 0.125 nM이며, 이는 표준 곡선에서 두 분석물에 대한 최저 농도이다. 도 8b 및 8e에 도시된 바와 같이, LLOQ 농도 수준에서 DB-QRP 또는 QB-QRP의 신호 대 잡음 (S/N)은 적어도 3 이상이었다.

#### QC의 캘리브레이션 곡선 선형성 및 정확도 및 정밀도

[0065] 혈액 용해물에서 BTK RO를 정량화하기 위한 방법 검증을 위해, 모든 표준 곡선은 DB-BTK의 경우 0.250 내지

12.5 nM, QB-BTK의 경우 0.125 내지 12.5 nM 범위의 표준 곡선으로 1/x 가중치 이차 회귀 모델에 피팅하였다. 각각의 실행에서, 캘리브레이션 표준의 최소 2/3에 대해, 공정 값으로부터 역-계산된 농도의 편차는 ±20.0% (LLOQ 수준에서 ±25.0%) 이내였다. 표 2-3에 나타난 바와 같이, 공정 값으로부터 역-계산된 농도의 편차는 3 번의 정확도 및 정밀도 실행에 대해 DB-BTK의 경우 ±11.1% 이내였고 QB-BTK의 경우 ±19.8% 이내였다. 정확도 및 정밀도는 품질 관리 샘플을 사용하여 평가되었다.

[0066]

&lt;표 2&gt;

**DB-BTK 검정에 대한 표준 곡선 샘플의 정밀도 및 정확도로부터 수득된  
데이터 요약**

실행 공정 Conc (nM)	실행 1		실행 2		실행 3	
	Pred Conc	Dev%	Pred Conc	Dev%	Pred Conc	Dev%
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

[0067]

[0068]

&lt;표 3&gt;

**QB-BTK 검정에 대한 표준 곡선 샘플의 정밀도 및 정확도로부터 수득된  
데이터 요약**

실행 공정 Conc (nM)	실행 1		실행 2		실행 3	
	Pred Conc	Dev%	Pred Conc	Pred Conc	Pred Conc	Dev%
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

[0069]

[0070]

&lt;표 4&gt;

검정 검증: 25, 50 및 90% BTK-점유율을 함유하는 원숭이 혈액 용해물로부터 수득된 품질 관리 데이터

QC 수준 (n=6)	실행 1			실행 2			실행 3		
	DB-BTK (nM)	QB-BTK (nM)	BTK RO%	DB-BTK (nM)	QB-BTK (nM)	BTK RO%	DB-BTK (nM)	QB-BTK (nM)	BTK RO%
QC 25% BTK RO	1.331	3.821	25.8	0.933	3.616	20.5	0.951	2.768	25.6
	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 50% BTK RO	2.541	2.283	52.7	1.849	2.391	43.6	1.739	1.739	50.0
	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 90% BTK RO	5.035	0.449	91.8	4.299	0.471	90.1	3.234	0.35	90.2
	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

[0071]

[0072]

표 4에 나타난 바와 같이, 측정된 BTK RO%와 이론적 BTK RO% 사이의 차이는 측정값과 이론값 사이에  $> 5\%$  차이가 있는 실행 2에서 6개의 QC\_25% RO 샘플 중 1개 및 6개의 QC\_50% RO 샘플 중 1개를 제외하고는 모든 3개의 실행에 대한 모든 QC에 대해  $\pm 5\%$  이내였다.

[0073]

CV% 및 Dev%는  $-16.2\%$ 의 Dev%를 갖는 하나의 QC\_25% RO를 제외하고는 3개의 실행 모두에서 모든 QC에 대해 10% 이내였다 (표 5). 이 결과는 이 방법이 원숭이 혈액 용해물에서 BTK RO%의 분석에 대해 정확하고 정밀하다는 것을 입증하였다.

[0074]

&lt;표 5&gt;

25, 50 및 90% BTK-점유율을 함유하는 원숭이 혈액 용해물로부터 수득된 품질 관리 데이터 요약 (n=6).

BTK RO QC (공정 값, %)	DB-BTK (nM)	QB-BTK (nM)	측정된 평균 BTK RO (%)	CV%	Dev%
<b>실행 1</b>					
QC_25% RO	1.339 $\pm$ 0.113	3.872 $\pm$ 0.279	25.7	2.6	2.7
QC_50% RO	2.576 $\pm$ 0.223	2.402 $\pm$ 0.177	51.7	2.5	3.4
QC_90% RO	4.657 $\pm$ 0.342	0.409 $\pm$ 0.033	91.9	0.4	2.1
<b>실행 2</b>					
QC_25% RO	1.018 $\pm$ 0.118	3.828 $\pm$ 0.192	21.0	6.0	-16.2
QC_50% RO	2.090 $\pm$ 0.253	2.412 $\pm$ 0.204	46.4	3.3	-7.3
QC_90% RO	4.491 $\pm$ 0.470	0.486 $\pm$ 0.028	90.2	0.5	0.2
<b>실행 3</b>					
QC_25% RO	0.835 $\pm$ 0.064	2.513 $\pm$ 0.231	25.0	4.8	-0.1
QC_50% RO	1.700 $\pm$ 0.126	1.632 $\pm$ 0.086	51.0	2.9	2.0
QC_90% RO	3.015 $\pm$ 0.224	0.287 $\pm$ 0.037	91.3	0.6	1.5

[0075]

안정성 평가

[0076]

원숭이 혈액 용해물에서 DB-BTK 및 QB-BTK에 대해 확립된 안정성은 표 6에 요약되어 있다. 이 결과는, 측정된 BTK RO%와 이론적 BTK RO% 사이의 차이가  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 2회의 동결-해동 사이클 또는 24시간 동안 RT에서 저장 또

는 224일 동안 -80°C에서 저장 후 감소하는 DB-BTK 또는 QB-BTK의 절대 농도에 관계 없이 모든 QC에 대해 ±5% 이내였으므로, DB-BTK 및 QB-BTK의 안정성이 BTK RO%에 영향을 미치지 않거나 최소한의 영향을 미쳤음을 나타내었다.

[0078] <표 6>

#### 25% 및 90%의 BTK RO%에서 품질 관리 샘플의 안정성 평가

안정성 평가	측정된 DB-BTK (nM)	측정된 QB-BTK (nM)	측정된 평균 BTK RO (%)	CV (%)	Dev (%)
<b>2회의 동결-해동 사이클</b>					
QC_25% RO	0.968 ± 0.108	3.435 ± 0.307	22.0	3.0	-12.2
QC_90% RO	4.372 ± 0.157	0.505 ± 0.050	89.7	0.9	-0.4
<b>RT에서 24h</b>					
QC_25% RO	0.912 ± 0.086	3.099 ± 0.177	22.8	6.9	-9
QC_90% RO	3.019 ± 0.120	0.398 ± 0.040	88.4	1.0	-1.8
<b>-80°C에서 224일</b>					
QC_25% RO	0.890 ± 0.067	2.500 ± 0.186	26.3	4.4	5.1
QC_90% RO	3.719 ± 0.039	0.367 ± 0.032	91.0	0.8	1.1

[0079]

#### 면역포획 LC-MS/MS 수용체 점유율 검정의 사용

[0080]

RO의 측정은 전임상 동물 모델 및 임상 연구에서 효능과 메커니즘을 결부시키는 중요한 결정이다. 실제로, RO는 인간에서의 최초 (FIH) 연구에서 중량 결정을 내리는데 특히 유용하다.

[0081]

#### 실시예 1

[0082]

#### 약물 결합된 BTK (DB-BTK) 및 퀸처 결합된 BTK (QB-BTK) 표준 및 품질 관리 샘플의 제조

[0083]

#### 시약 및 재료

[0084]

도 1a 및 1b에 나타낸 약물 및 퀸처 화합물은 각각 브리스톨-메이어스 스퀴브 (Bristol-Myers Squibb, 뉴저지주 프린스턴)의 리서치 & 디벨로프먼트 (Research & Development)에 의해 합성되었다. 비오티닐화된 토끼 항-BTK 모노클로날 항체 (로트 번호: D3H5, 카탈로그 번호: 12624) 및 10 x 용해 버퍼 (카탈로그 번호: 9803)는 셀 시 그널링 테크놀로지 (메사추세츠주 댈버스)에서 구입하였다. 디나비드스 미온 (Dynabeads Myone) 스트렙타비딘 T1 비드 (카탈로그 번호: 65602)는 씨모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific, 캘리포니아주 칼스바드)에서 구입하였다. 재조합 BTK 단백질 (카탈로그 번호: PV3587)은 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies, 캘리포니아주 칼스바드)에서 구입하였다. 프로테이제 억제제 (카탈로그 번호: 539134)는 밀리포어 시그마 (Millipore Sigma, 매사추세츠주 빌레리카)에서 구입하였다. 검정에 사용된 내부 표준 (IS)인 N 및 C 말단 모두에 플랭킹 아미노산을 함유하는 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>, <sup>15</sup>N]-QB-QRP (표 8)는 브리스톨-메이어스 스퀴브 (BMS, 미국 뉴저지주 프린스턴)의 화학합성부에서 합성되었다. 원숭이 ACD-A 전혈은 바이오레클라메이션 인크. (Bioreclamation Inc., 뉴욕주 웨스트버리)에서 구입하였다. 다른 모든 시약은 분석 등급이었다. 마그나보트 96 자기 분리 디바이스 (MagnaBot 96 Magnetic Separation Device) (카탈로그 번호: V8151)는 프로메가 코포레이션 (Promega Corporation, 위스콘신주 매디슨)에서 구입하였다.

[0085]

#### 약물 결합된 BTK (DB-BTK)에 대한 참조 표준의 제조

[0086]

재조합 BTK (5.9 μM, 200 μL)를 400 μL의 PBS와 배합하고, 이어서 15 μL의 1.0 mg/mL 아세토니트릴 중 약물 용액 (도 1a에 나타낸 화합물) (2701 μM 약물, 15 μL)으로 스파이킹하였다. 이어서, 용액을 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하여 1919 nM의 DB-BTK 농도를 얻었다. 과량의 약물의 존재 하에서 유리 BTK의 DB-BTK로의 전환이 ~100%였기 때문에, DB-BTK 농도는 반응에 사용된 총 유리 BTK 양을 기준으로 하였다.

[0087]

#### 퀸처 결합된 BTK (QB-BTK)에 대한 참조 표준의 제조

[0088]

재조합 BTK (5.9 μM, 200 μL)를 400 μL의 PBS와 배합하고, 이어서 15 μL의 1.0 mg/mL 아세토니트릴 중 퀸처 용액 (도 1b에 나타낸 화합물) (2806 μM 퀸처, 15 μL)으로 스파이킹하였다. 이어서, 용액을 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하여 1919 nM의 QB-BTK 농도를 얻었다. 과량의 퀸처의 존재 하에서 유리 BTK의 QB-BTK로의 전환이 ~100%였기 때문에, QB-BTK 농도는 반응에 사용된 총 유리 BTK 양을 기준으로 하였다.

- [0090] 퀸처를 함유하는 용해 버퍼 카테일의 제조: 0.0133 $\mu$ M 프로테아제 억제제 및 1.5  $\mu$ M의 퀸처 용액을 갖는 2x 용해 버퍼:
- [0091] 15 mL의 10x 용해 버퍼를 함유하는 하나의 바이알을 1.0 mL의 프로테아제 억제제 및 80  $\mu$ L의 0.5 mg/mL DMSO 중 퀸처 용액 (도 1b에 나타낸 화합물)과 혼합하였다. 이어서, 용액을 총 부피 75 mL로 59 mL의 탈이온수로 회석하였다.
- [0092] 약물을 함유하는 용해 버퍼 카테일의 제조: 0.0133 $\mu$ M 프로테아제 억제제 및 1.5  $\mu$ M의 약물 용액을 갖는 2x 용해 버퍼
- [0093] 15 mL의 10x 용해 버퍼를 함유하는 하나의 바이알을 1.0 mL의 프로테아제 억제제 및 83  $\mu$ L의 0.5 mg/mL DMSO 중 약물 용액 (도 1a에 나타낸 화합물)과 혼합하였다. 이어서, 용액을 총 부피 75 mL로 59 mL의 탈이온수로 회석하였다.
- [0094] 원숭이 혈액으로부터 용해물+433 (100% QB-BTK)의 제조
- [0095] 원숭이 ACD-A 전혈 (3.5 mL)을 1.5  $\mu$ M의 퀸처 (도 1b에 나타낸 화합물)를 함유하는 7 mL의 용해 버퍼와 배합하였다. 샘플을 실온에서 1시간 동안 진탕하였다.
- [0096] 원숭이 혈액으로부터 용해물+195 (100% DB-BTK)의 제조
- [0097] 원숭이 ACD-A 전혈 (3.5 mL)을 1.5  $\mu$ M의 약물 (도 1a에 나타낸 화합물)을 함유하는 7 mL의 용해 버퍼와 배합하였다. 샘플을 실온에서 1시간 동안 진탕하였다.
- [0098] 내인성 BTK를 함유하는 혈액 용해물을 사용한 품질 관리 샘플 (QC)의 제조
- [0099] BTK RO QC를 상이한 백분율의 용해물+433 및 용해물+195를 혼합하여 제조하였다. 표 7에 나타난 바와 같이 각각 2250/750, 1500/1500, 300/2700 (v/v)로 용해물+433/용해물+195를 혼합함으로써 25%, 50% 및 90%의 BTK RO%를 갖는 낮은 QC (LQC), 중간 QC (MQC) 및 높은 QC (HQC)를 제조하였다.
- [0100] <표 7>
- 내인성 BTK를 함유하는 원숭이 혈액 용해물을 사용한 품질 관리 샘플의  
제조
- | BTK RO<br>QC | 이론적 BTK<br>첨유율 (%) | 용해물+433 <sup>a</sup><br>( $\mu$ L) | 용해물+195 <sup>b</sup><br>( $\mu$ L) | 총<br>부피 ( $\mu$ L) |
|--------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| QC_25% RO    | 25                 | 2250                               | 750                                | 3000               |
| QC_50% RO    | 50                 | 1500                               | 1500                               | 3000               |
| QC_90% RO    | 90                 | 300                                | 2700                               | 3000               |
- <sup>a</sup> 용해물+433은 원숭이 용해물을 퀸처 용액 (도 1b)으로 전처리하여 수득되었다.
- <sup>b</sup> 용해물+195는 원숭이 용해물을 약물 용액 (도 1a)으로 전처리하여 수득되었다.
- [0101]
- [0102] DB-BTK (BTK+195) 표준 곡선의 제조: 원숭이 혈액 용해물+433을 사용
- [0103] 0.250, 0.500, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0 및 12.5 nM의 DB-BTK에서의 캘리브레이션 표준 (STD)을 DB-BTK 스톡 용액 (버퍼 중 1919 nM)의 독립적 회석에 의해 0% DB-BTK를 함유하는 원숭이 혈액 용해물에서 제조하였다. 제조하는 동안, DB-BTK에 대한 200 및 20 nM의 중간 회석액을 1919 nM의 DB-BTK 스톡 용액을 혈액 용해물+433으로 회석하여 제조하고, 이어서 최종 STD 샘플로 추가 회석하였다. 공칭 농도는 혈액 부피를 기준으로 하였으며, 혈액 용해물 중 실제 농도는 회석 계수 3으로 인해 각각의 1/3이었다.
- [0104] QB-BTK (BTK+433) 표준 곡선의 제조: 원숭이 혈액 용해물+195를 사용
- [0105] 0.125, 0.250, 0.500, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0 및 12.5 nM의 QB-BTK에서의 캘리브레이션 표준 (STD)을 QB-BTK 스톡 용액 (버퍼 중 1919 nM)의 독립적 회석에 의해 0% QB-BTK를 함유하는 원숭이 혈액 용해물에서 제조하였다. 제조하는 동안, QB-BTK에 대한 200 및 20 nM의 중간 회석액을 1919 nM의 QB-BTK 스톡 용액을 혈액 용해물+195로 회석하여 제조하고, 이어서 최종 STD 샘플로 추가 회석하였다. 공칭 농도는 혈액 부피를 기준으로

하였으며, 혈액 용해물 중 실제 농도는 회석 계수 3으로 인해 각각의 1/3이었다.

**[0106] 항-BTK 비오티닐화된 항체를 갖는 스트렙타비딘 T1 포획 비드의 제조.** 면역침전을 위한 디나비드스 미온 스트렙타비딘 T1 비드의 농도는 10 mg/mL였다. 비오티닐화된 mAb에 대한 결합 능력은 20  $\mu\text{g}$  mAb/mg 비드였다. 총 25 mL의 스트렙타비딘 T1 비드를 각각 2.5 mL의 10개의 투브에 분취하였다. 샘플을 3 mL의 PBST 용액으로 세척하였다. 디나마그(DynaMag)<sup>TM</sup>-5 자석을 사용하여 액체 샘플 매트릭스로부터 자기 비드를 분리하였다. 마지막 세척물을 버린 후, 비드를 각각의 투브에서 2.5 mL의 PBST에 재현탁하고, 이어서 0.500 mL의 비오티닐화된 항-BTK 항체 (1 mg/mL, 로트 번호: D3H5)를 첨가하였다. 10개의 투브 (0.500 mL) 내의 샘플을 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비드를 용액으로부터 분리하고, 각각의 투브 내의 비드를 3 mL의 PBST로 세척하였다. 투브 내의 비드를 2.5 mL의 PBST에 재현탁하였다. 최종 항-BTK 항체 농도는 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  비드였다. 샘플을 향후 사용을 위해 4°C에 저장하였다.

**[0107] 혈액 용해물로부터 약물 결합된 BTK (DB-BTK) 및 퀸치 결합된 BTK (QB-BTK) 농축을 위한 면역포획.** 대조군 원숭이 혈액 용해물, 캘리브레이션 표준, 품질 관리 샘플 또는 원숭이 연구 샘플에 대한 3000  $\mu\text{L}$  혈액 용해물 샘플의 분취량을 실온에서 원심분리하였다. 비드 상의 항-BTK 포획 항체 (0.2  $\mu\text{g}$  mAb/ $\mu\text{L}$  비드에서 60  $\mu\text{L}$ )를 원심분리된 샘플의 상청액에 첨가하고, 샘플을 RT에서 120분 동안 인큐베이션한 후 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, PBST를 비드 샘플에 첨가하였다. 샘플을 테칸 (TECAN) 액체 핸들러 상의 로우바인드 (LowBind) 96-웰 플레이트로 옮기고, 마그나보트 96 자기 분리 디바이스의 상단에 배치하였다. 비드를 800  $\mu\text{L}$ 의 PBST로 2회 세척한 다음, 0.05% 트윈-20 (Tween-20)을 갖는 500  $\mu\text{L}$ 의 25 mM NH<sub>4</sub>OAc로 세척하였다. 세척 버퍼를 제거한 후, 로우바인드 96-웰 웰 플레이트 내의 비드를 하기에 기재된 바와 같이 트립신 분해에 사용하였다.

**[0108] 트립신 분해.** 블랭크 용해물 (여기에는 0.05% 트윈-20을 갖는 100  $\mu\text{L}$ 의 25 mM NH<sub>4</sub>OAc이 첨가됨)을 제외하고, IS (0.05% 트윈-20을 갖는 25 mM NH<sub>4</sub>OAc 중 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SIL-QB-QRP 100  $\mu\text{L}$ )를 96-웰 플레이트 내의 비드에 첨가한 후, 25  $\mu\text{L}$ 의 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 각각의 샘플에 첨가하였다. 샘플을 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 중 160 ng/ $\mu\text{L}$ 로 새로 제조된 트립신 용액 25  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 분해하고, 50°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 20  $\mu\text{L}$ 의 50%/50% MeOH/포름산 (v/v)으로 퀸칭하였다. 샘플을 간단히 볼텍싱하고, 이어서 마그나보트 96 디바이스의 상단에 놓고, 상청액을 새로운 96-웰 플레이트로 옮긴 후, 4000 rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 샘플을 LC-MS/MS로 분석하였다.

**[0109] UHPLC-MS/MS 분석.** 검정 검증 및 샘플 분석을 위해, 사이엑스 (Sciex, 캘리포니아주 포스터 시티)로부터의 AB 사이엑스의 트리플 콰드 5500 질량 분광기를 LC-MS/MS 데이터 수집에 사용하였다.

**[0110]** 하기 LC-MS/MS 조건이 검정 검증 및 PD 샘플 분석에 사용되었다. 각각의 처리된 샘플에 대해, 50  $\mu\text{L}$  부피의 분해물을 초고성능 액체 크로마토그래피 (UHPLC) 시스템 (모델 LC-30AD, 시마즈 사이언티픽 인스트루먼츠, 인크. (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., 메릴랜드주 콜롬비아))에 주입하였다. 하기 기재된 UHPLC-MS/MS 조건은 원숭이 혈액 용해물에서 점유되고 퀸칭된 BTK의 정량화를 위해 특별히 사용되었다. 워터스 (Waters)의 코르텍스(CORTECS)<sup>TM</sup> UPLC C18+ 컬럼 (2.1 × 100 mm, 1.6  $\mu\text{m}$ , 워터스 코포레이션 (Waters Corporation, 매사추세츠주 밀포드))을 DB-QRP 및 QB-QRP 웹티드 분석에 사용하였다. 이동상 A는 물 중 0.1% 포름산으로 구성되었고; 이동상 B는 아세토니트릴 중 0.1% 포름산이었다. UHPLC 분리는 15% B로 시작하여 0.5 분 동안 유지한 다음, B%를 2.5분 내에 15%로부터 30%로 변경하고, 이어서 B%를 4.9분 내에 30%로부터 45%로 변경하고, 이어서 B%를 0.1분 내에 45%로부터 90%로 증가시키고, 이어서 1분 동안 유지하고, 이어서 B%를 0.1분 내에 95%로부터 15%로 감소시키고, 1.0분 동안 유지하고, 10.0분에 정지시키는 구배 용출을 이용하여 수행하였다. 유속은 0.600 mL/min이었고, 컬럼 온도는 60°C였다. 스위칭-밸브 구성으로, UHPLC 용출물을 AB 사이엑스 (캘리포니아주 포스터 시티)에서 구입된 터보 이온 스프레이 소스가 장착된 트리플 콰드 5500<sup>TM</sup> 질량 분광기에 3.0-6.5분의 시간 창으로 도입하였다. 질량 분광기는 하기 설정으로 포지티브 전기분무 이온화 모드로 작동하였다: 커튼 가스, 30 단위; CAD 가스, 9 단위; 가스 1, 65 단위; 가스 2, 65 단위; 포지티브 4000V의 터보 이온 스프레이 전압 및 600°C의 터보 프로브 온도. 질량 분광기는 각각 QB-QRP, DB-QRP 및 SIL-QB-QRP (IS)에 대해  $m/z$  962.493 > 755.40, 967.174 > 755.40, 및 965.825 > 765.50의 전환으로 MRM 모드로 작동하였다 (표 8). 미가공 데이터를 크로마토그래피 피크 통합을 위해 어널리스트(Analyst)<sup>®</sup> 소프트웨어 (버전 1.6.2, AB 사이엑스)를 사용하여 처리하였으며, 처리된 결과를 캘리브레이션 표준의 회귀 및 QC 및 다른 샘플의 농도 계산을 위해 왓슨 림스(Watson LIMS)<sup>TM</sup> (버전 7.4, 씨모피셔 사이언티픽 인크.)로 보내졌다. 검정 성능에 관한 통계 데이터 (ANOVA)를 왓슨 림스<sup>TM</sup>를 사용하여 계산하였다.

[0111]

&lt;표 8&gt;

대용 펩티드 및 그들의 안정한 동위원소 표지된 내부 표준에 대한 LC-MS/MS 검출에 사용된 MRM 전환.

대용 펩티드	대용 펩티드 서열	[M+3H] <sup>3+</sup>	MRM 전환
DB-QRP <sup>a</sup> (AA# 467-487)	 <b>QRPIFIITEYMANGLCLLNLYR</b> 화학식: C <sub>135</sub> H <sub>205</sub> FN <sub>34</sub> O <sub>32</sub> S <sub>2</sub>	966.8368	m/z 967.17 → 755.4
QB-QRP <sup>a</sup> (AA# 467-487)	 <b>QRPIFIITEYMANGLCLLNLYR</b> 화학식: C <sub>134</sub> H <sub>203</sub> FN <sub>34</sub> O <sub>32</sub> S <sub>2</sub>	962.1649	m/z 962.50 → 755.4
[ <sup>13</sup> C <sub>9</sub> , <sup>15</sup> N]-QB-QRP <sup>b</sup> (내부 표준)	 <b>TRQRPI(F*)ITEYMANGLCLLNLYR</b> 트립신 분해 후의 화학식: C <sub>125</sub> H <sub>203</sub> F <sup>15</sup> NN <sub>33</sub> O <sub>32</sub> S <sub>2</sub>	965.5073	m/z 965.83 → 765.5

<sup>a</sup> 대용 펩티드는 트립신분해 펩티드에서 21개 아미노산의 처음 3개의 아미노산 기호를 기준으로 하여 QRP로 명명된다. DB-QRP = 약물 결합된 QRP 펩티드; QB-QRP = 퀸처 결합된 QRP 펩티드.

<sup>b</sup> F\*의 기호는 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>, <sup>15</sup>N]-페닐알라닌을 나타낸다. 밑줄을 갖는 펩티드 절편은 트립신분해 펩티드였으며, LC-MS/MS 검정에서 모니터링되었다.

[0112]

[0113]

**검정 검증.** 검정 검증은 BTK RO QC의 동결-해동, RT 및 장기 안정성을 포함한 추가의 안정성 평가와 함께 3개의 정확도 및 정밀도 실행으로 이루어졌다. 방법의 선형성은 모든 검증 실행에서 7개의 DB-BTK (0.250 nM-12.5 nM) 또는 8개의 QB-BTK (0.125 nM-12.5 nM) 캘리브레이션 곡선 포인트를 사용하여 평가되었다. 1/x 가중을 갖는 이차 회귀 모델이 정량화에 사용되었다. 허용 기준은 하기와 같았다: 각각의 실행에서 캘리브레이션 표준의 최소 2/3에 대해, 역-계산된 농도의 그들의 공정 값과의 편차는 ± 20.0% (LLOQ 수준에서 ± 25.0%) 이내였다. BTK RO QC의 경우, 각각의 수준에서 QC의 적어도 50%에 대해, 측정된 BTK RO%와 이론적 BTK RO% 간의 차이는 ± 5% 이내여야 한다. 예컨대, BTK RO QC\_25%의 경우, 측정된 BTK RO%는 25.0 ± 5.0% 이내여야 한다. 검정 선택성은 블랭크 혈액 용해물 단독인 QCO (IS만 갖는 블랭크 용해물)를 사용하여 평가되었다.

[0114]

실시예 2

[0115]

원숭이 PD 연구에 대한 적용.

[0116]

확립된 ELISA 기반 검정과 비교하여 LC-MS/MS에 의한 BTK RO 검정의 유용성 및 견고성을 평가하기 위해, 도 1a에 나타낸 화합물의 단일 증량 연구가 수행되었다. 시노몰구스 원숭이에게 약물 화합물 1A를 0.1, 0.2 및 0.5 mg/kg PO로 투여하였다. 혈액 샘플을 LC-MS/MS에 의한 BTK RO 검정 뿐만 아니라 실시예 3에 기재된 리간드 결합 검정 (LBA)을 사용하여 PK 평가를 위해 제1일에 1, 3, 5, 7 및 24시간에 수집하였고, PD 평가를 위해 투여 전, 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 144 및 168시간에 수집하였다.

[0117]

LC-MS/MS에 의한 BTK RO 검정을 위한 PD 샘플.

[0118]

PD 샘플 수집 전에, 0.0133x 프로테아제 억제제를 갖는 2x 용해 버퍼 및 1.5 μM의 퀸처 (도 1b에 나타낸 화합물) 용액을 함유하는 하기 용해 버퍼 각테일을 제조하였다: 15 mL의 10x 용해 버퍼를 함유하는 하나의 바이알을 1.0 mL의 프로테아제 억제제 및 80 μL의 0.5 mg/mL DMSO 중 퀸처 화합물 1B와 혼합하였다. 이어서, 용액을 총

부피 75 mL로 59 mL의 탈이온수로 희석하였다.

[0119] 상기에서 언급된 바와 같이, 2 mL의 혈액 샘플을 설정된 시점에서 수집하였다. 1.5 mL의 수집된 혈액을 웬처화합물 1B를 함유하는 3 mL의 용해 버퍼 칵테일로 용해시켰다. 혼합 직후, 샘플을 실온에서 1시간 동안 진탕하였다. 혈액 용해물 샘플을 수집 직후 -70°C 이하에서 저장하였다. 샘플을 LC-MS/MS 검정으로 면역포획에 사용하였다.

### [0120] 실시예 3

#### [0121] LBA에 의한 BTK RO 검정

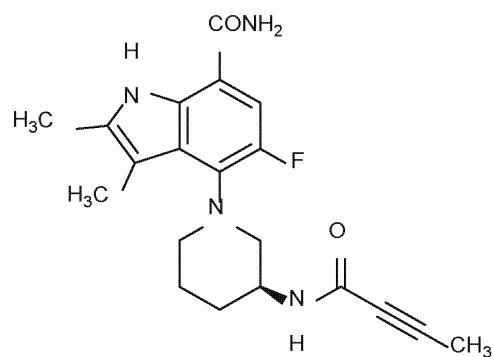
[0122] 원숭이 ACD-A 처리된 전혈을 투여 후 설정된 시점에서 수집하고, 96-웰, V-바닥, 2 mL 플레이트 (코스타 (Costar), 카달로그 # 3960)에 첨가하고, 프로테아제 억제제 (칼비오켐 (Calbiochem), 카달로그 # 539134) 및 비오티닐화된 프로브 (BMT-105186)를 함유하는 2x 용해 버퍼 (셀 시그널링 (Cell Signaling), 카달로그 # 9803)으로 용해하였다. 용해물을 스트렙타비딘-코팅된 플레이트 (씨모피셔 사이언티픽, 뉴트르아비딘 (neutrAvidin)® 카달로그 # 15128)로 옮기고, 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 세척 후, 항-BTK 항체 (셀 시그널링, 카달로그 # 8547, PBS + 0.05% 트윈20 + 0.5% BSA 중 1:1000 희석)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 다음, PBS+0.05% 트윈20+0.5% BSA에서 1:2,500 희석으로 염소 항-토끼 양고추냉이 페옥시다제 이차 항체 (인비트로겐, G21234)를 첨가하였다. ELISA를 테트라메틸 벤지딘 (TMB) (시그만 (Sigma), 카달로그 # T0440)을 첨가하여 현상하고, 2.0 N 황산을 첨가하여 현상을 정지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 판독하고, 연구 샘플의 BTK 불활성화의 상대적 %를 용해 전에 완전한 BTK 불활성화를 고려하여 2 μM BMT-126867로 전처리된 혈액으로부터의 켄칭된 용해물과 혼합된 정상 원숭이 혈액으로부터의 용해물의 상이한 비율을 함유하는 샘플의 표준 곡선으로부터 계산하였다.

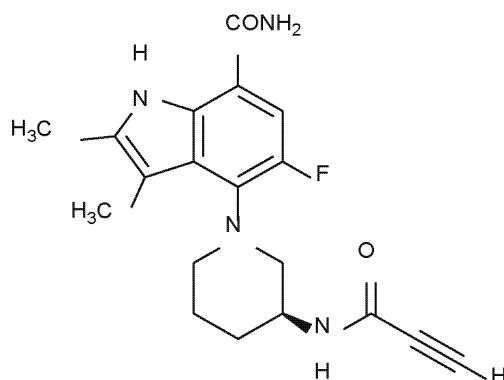
#### [0123] LC-MS에 의한 약동학 분석

[0124] PK 평가를 위해 설정된 시점에서 0.5 mL의 원숭이 혈액을 수집하였다. 각각의 혈액 샘플을 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 10 μL의 125 μM 웬처 용액 (도 1b에 나타낸 화합물)을 즉시 200 μL의 혈장에 첨가하였다. 혼합 후, 샘플을 -20°C에서 저장하고, LC-MS/MS 분석에 사용하였다.

### 도면

#### 도면 1a



**도면1b****도면2**

```

SP|Q06187|BTK_HUMAN      MAAVILESIFLKRQQKKKTSPLNFKKRLFLTVHKLSYYEYDFERGRGSKKGSIDVEK 60
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  MAAVILESIFLKRQQKKKTSPLNFKKRLFLTVHKLSYYEYDFERGRGSKKGSIDVEK 60
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      ITCVETVVPEKNPPPERQIPRRGEESSEMEQISIIIERFPYPFQVVYDEGPLYVFSPTEEL 120
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  ITCVETVVPEKNPPPERQIPRRGEESSEMEQISIIIERFPYPFQVVYDEGPLYVFSPTEEL 120
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      RKRWIHQQLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCQILENRNGSLKPSS 180
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  RKRWIHQQLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCQILENRNGSLKPSS 180
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      HRKKKPLPPTPEEQILKKPLPPEPAAPVSTSELKKVVALYDYPMPMNANDLQLRKGD 240
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  HRKKKPLPPTPEEQILKKPLPPEPAAPVSTSELKKVVALYDYPMPMNANDLQLRKGD 240
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      YFILEESNLPNWRARDKNGQEYIIPSNYVTEAEDSIEMYEWYSKHMTRSQAELLKQEGK 300
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  YFILEESNLPNWRARDKNGQEYIIPSNYVTEAEDSIEMYEWYSKHMTRSQAELLKQEGK 300
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      EGGFIVRDSSKAGKYTVSVFAKSTGDPQGVIRHYVVCS TPQSQYYLAEKHLFSTIPELIN 360
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  EGGFIVRDSSKAGKYTVSVFAKSTGDPQGVIRHYVVCS TPQSQYYLAEKHLFSTIPELIN 360
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      YHQHNSAGLISRLKYPVSQQNKNAPSTAGLGYGWSIEDPKDLTFLKELGTGQFGVVKY 420
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  YHQHNSAGLISRLKYPVSQQNKNAPSTAGLGYGWSIEDPKDLTFLKELGTGQFGVVKY 420
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      WRQYDVAIKMIEKGMSDEFIEAKVMMLSHKLVQLYGVCTKQRPIIFIITEYMANG 480
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  WRQYDVAIKMIEKGMSDEFIEAKVMMLSHKLVQLYGVCTKQRPIIFIITEYMANG 480
*****  

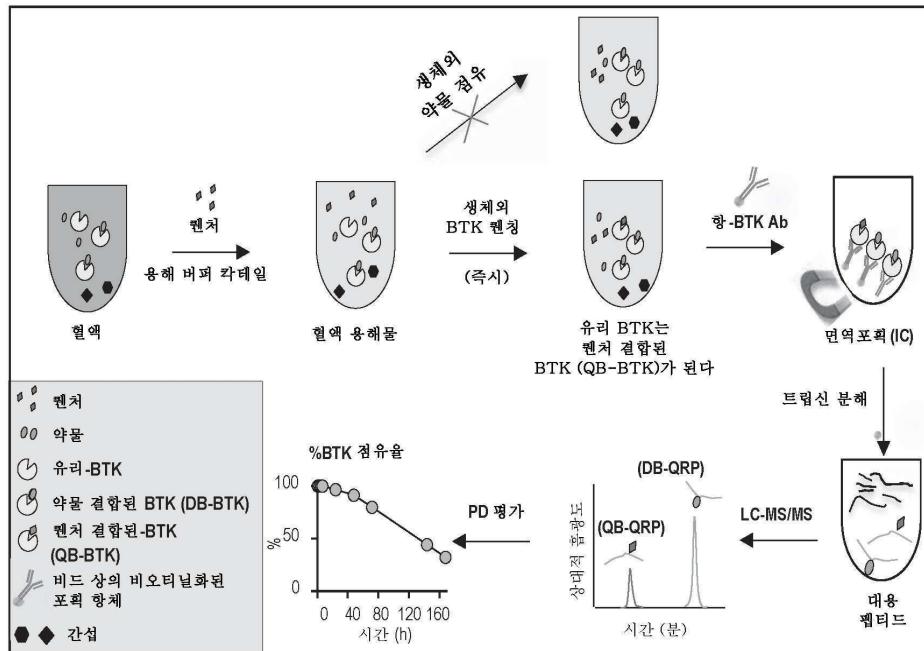
↓  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      CLNYLR|EMRHRFQTQQLLEMCKDVCEAMEYLESKQFLHRDLAARNCLVNDQGVVKVSDF 540
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  CLNYLR|EMRHRFQTQQLLEMCKDVCEAMEYLESKQFLHRDLAARNCLVNDQGVVKVSDF 540
*****  

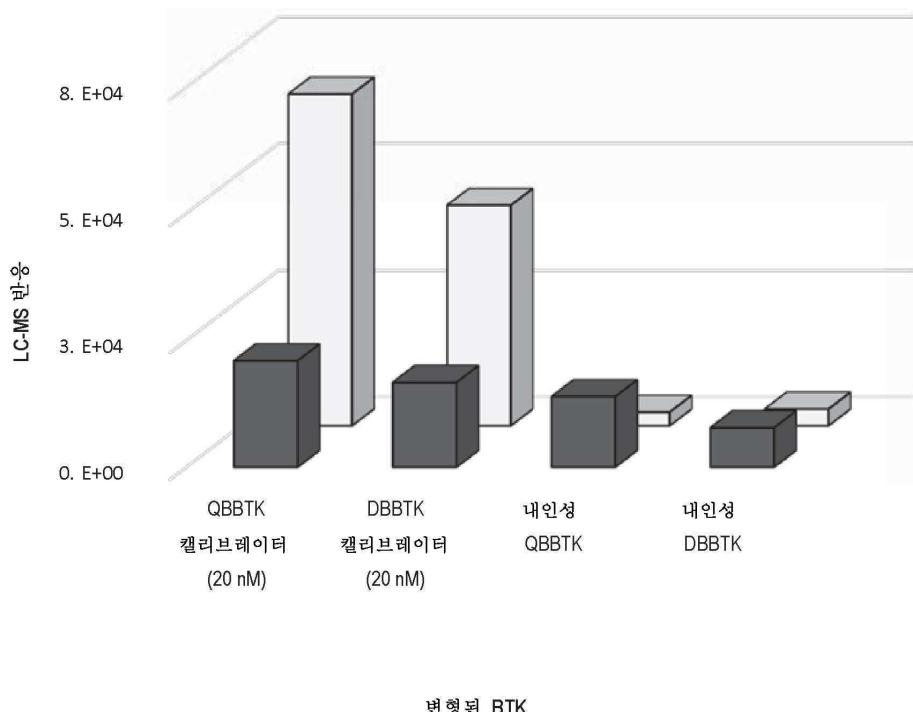
SP|Q06187|BTK_HUMAN      GLSRYVLDEYTSSVGSKFPVRNSPPEVLMYSKFSSKSDIWAFGVLMWEIYSLGKMPYER 600
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  GLSRYVLDEYTSSVGSKFPVRNSPPEVLMYSKFSSKSDIWAFGVLMWEIYSLGKMPYER 600
*****  

SP|Q06187|BTK_HUMAN      FTINSETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVYTIMSCWHEKADERPTFKILLSNILOVMDEES 659
TR|F6V0I6|F6V0I6_MACMU  FTINSETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVYTIMSCWHEKADERPTFKILLSNILOVMDEES 659
*****
```

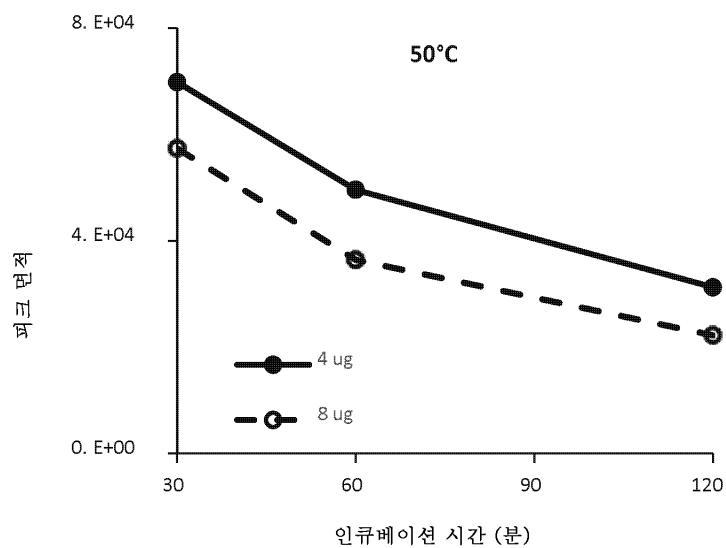
## 도면3



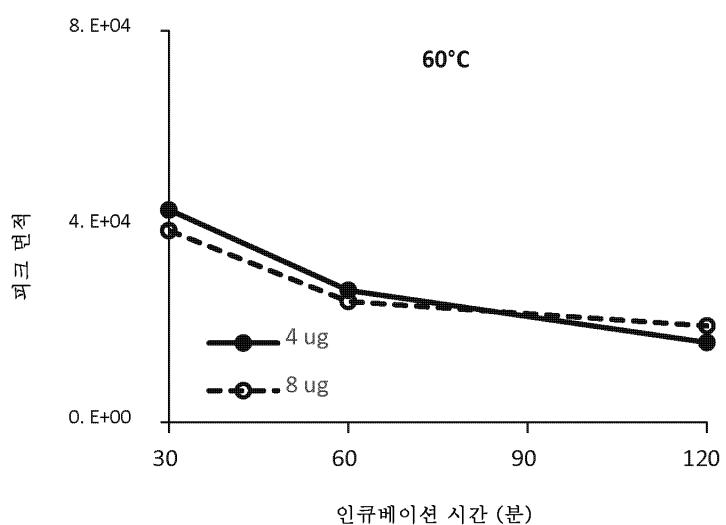
## 도면4



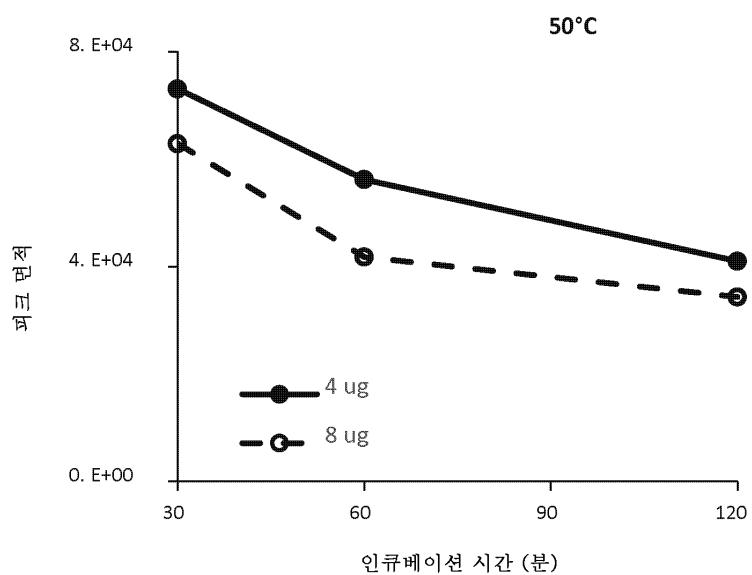
도면5a



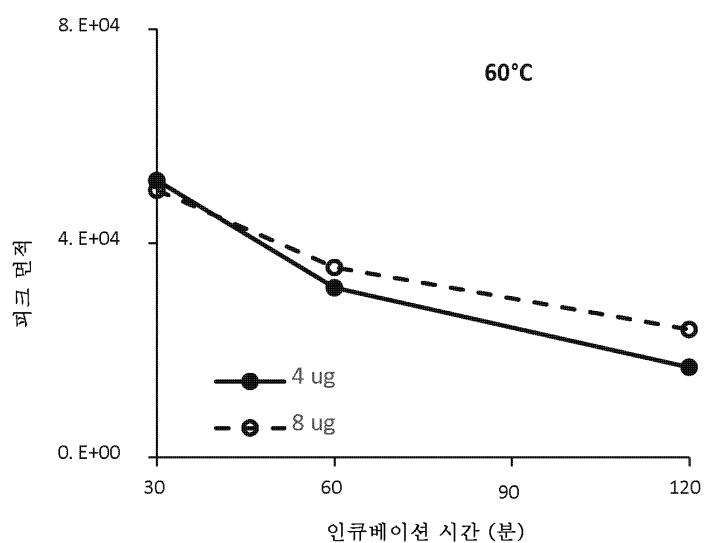
도면5b



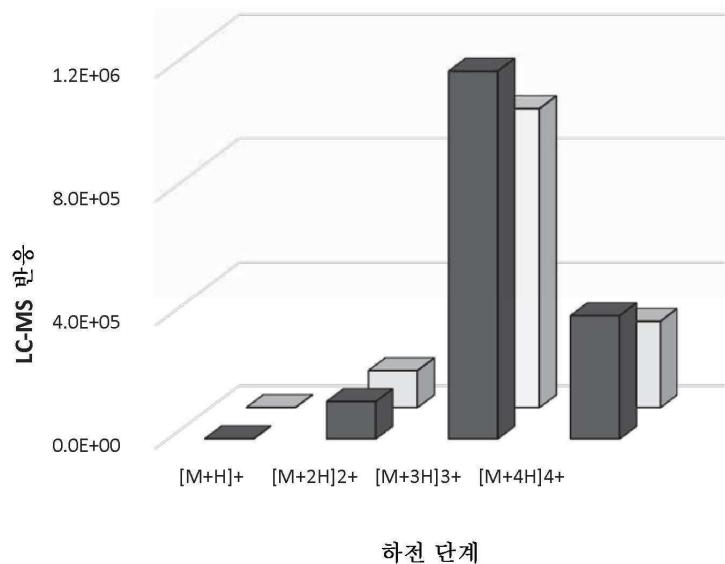
## 도면5c



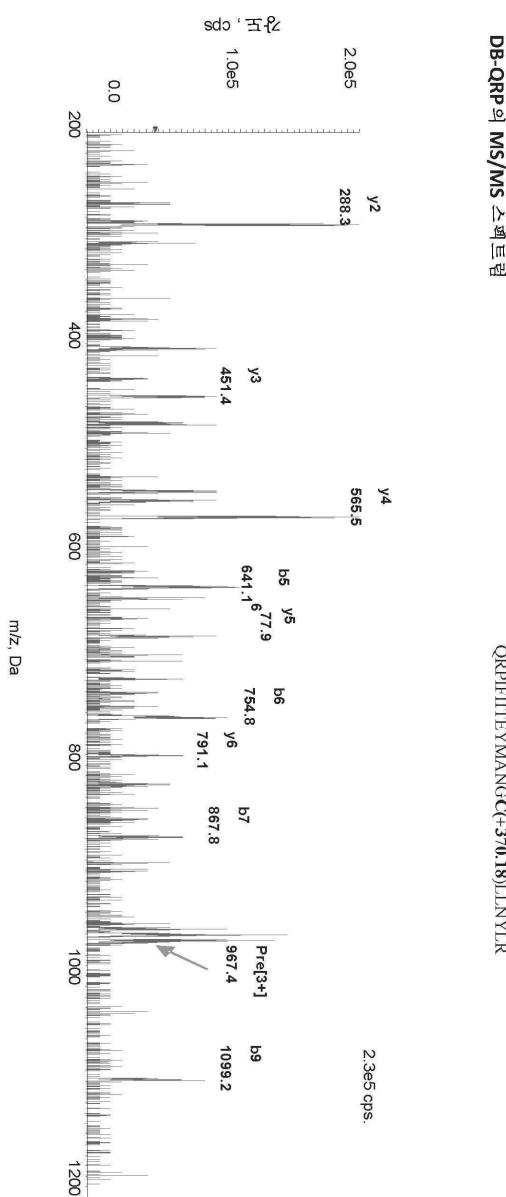
## 도면5d



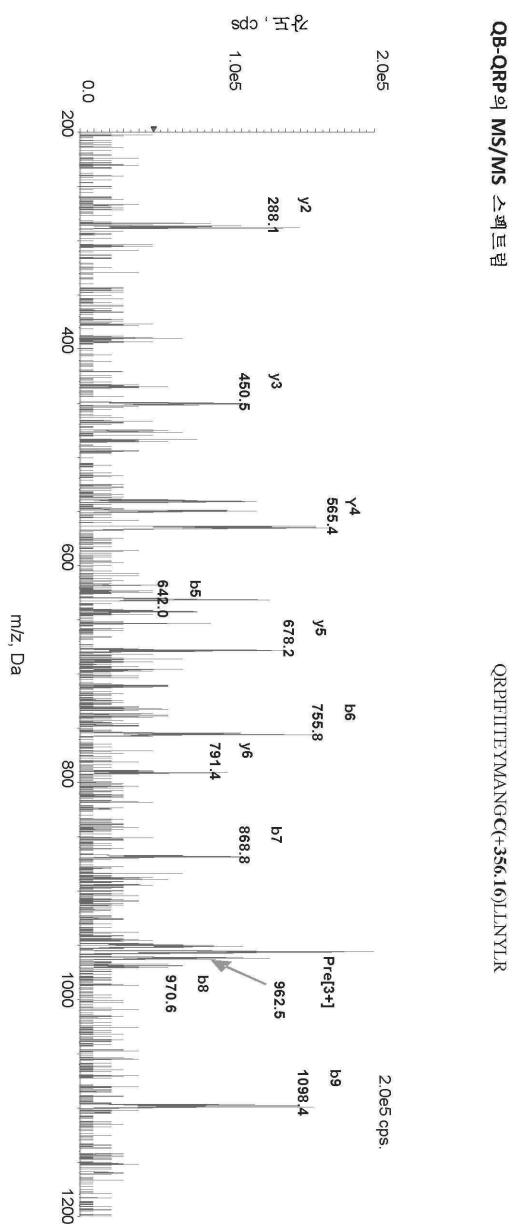
## 도면6



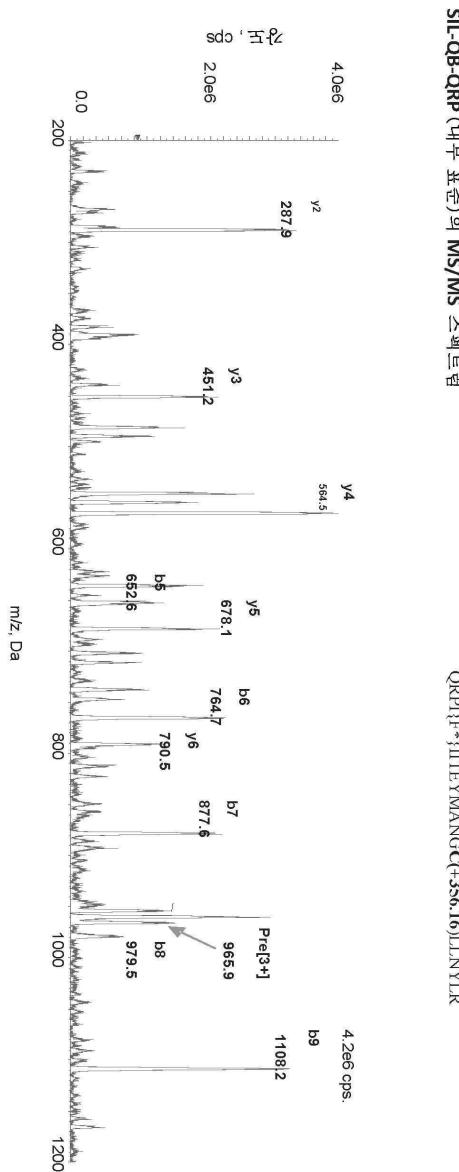
도면7a



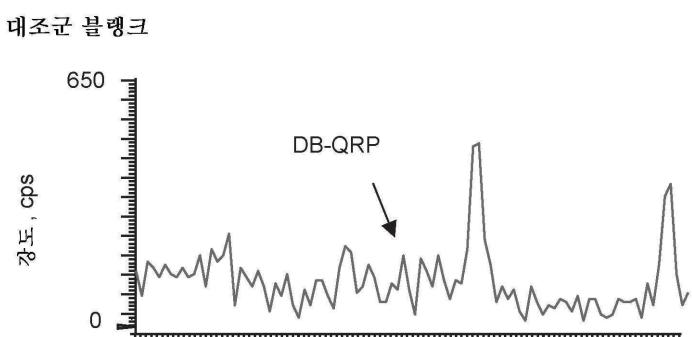
도면7b



### 도면7c

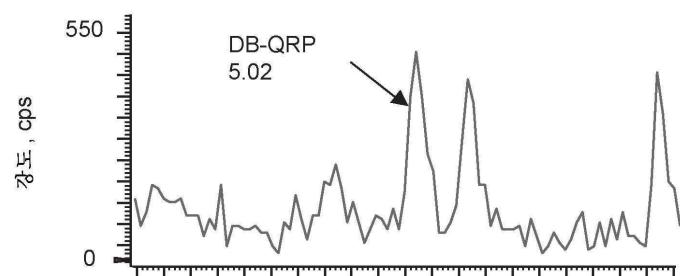


### 도면8a



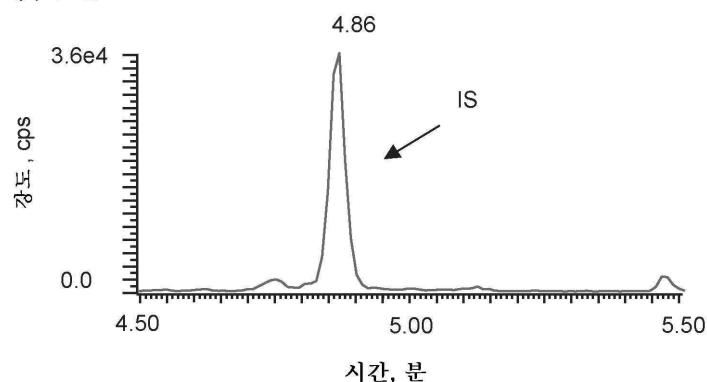
## 도면8b

LLOQ (0.250 nM)



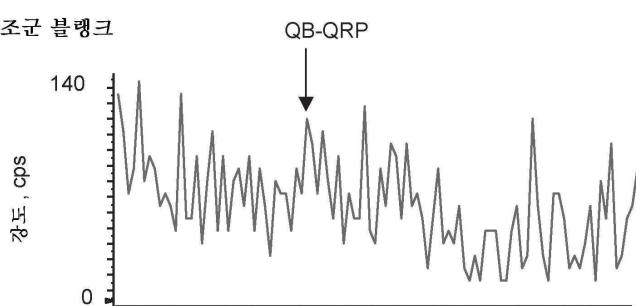
## 도면8c

내부 표준



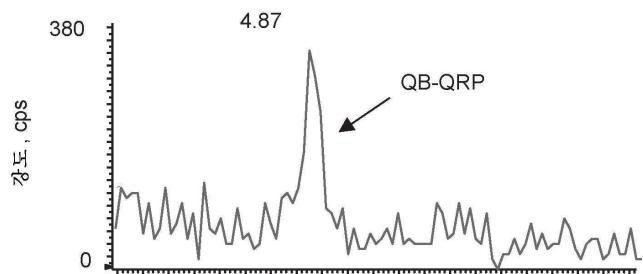
## 도면8d

대조군 블랭크

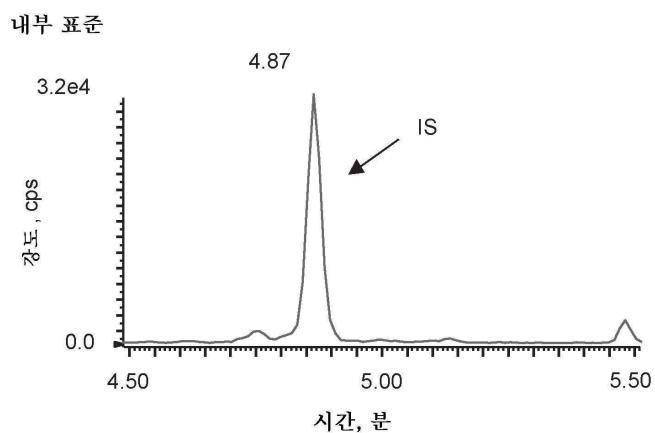


## 도면8e

LLOQ (0.125 nM)

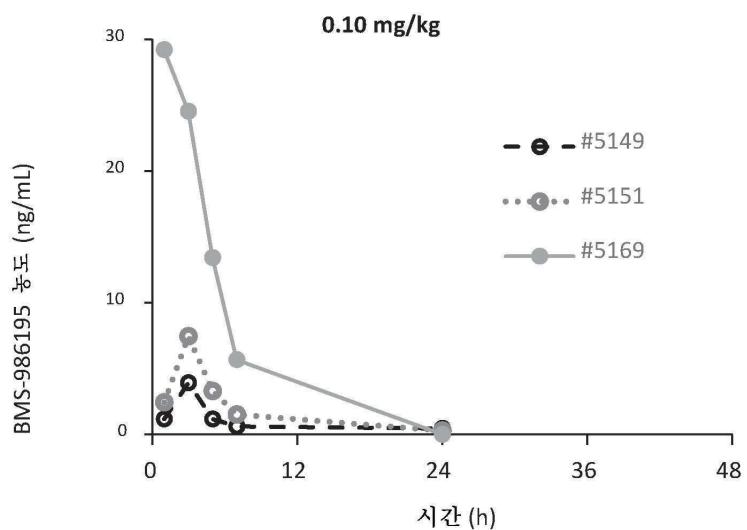


## 도면8f



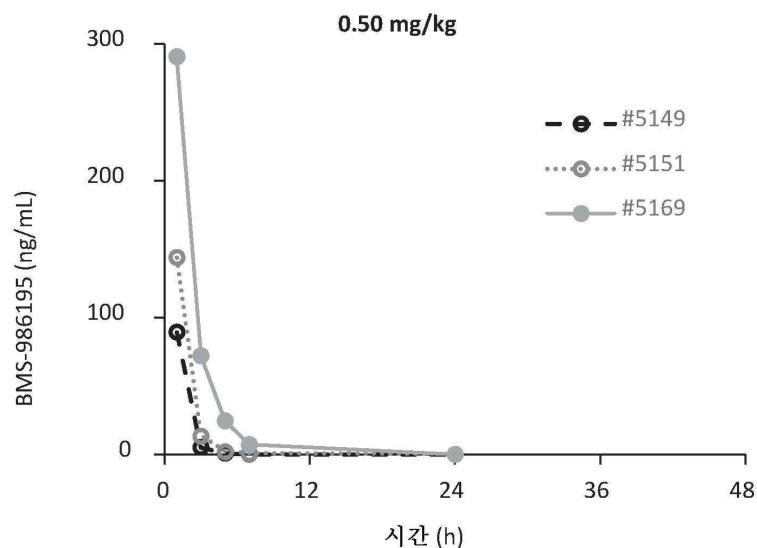
## 도면9a

혈장 BMS-986195 농도 대 시간 프로파일



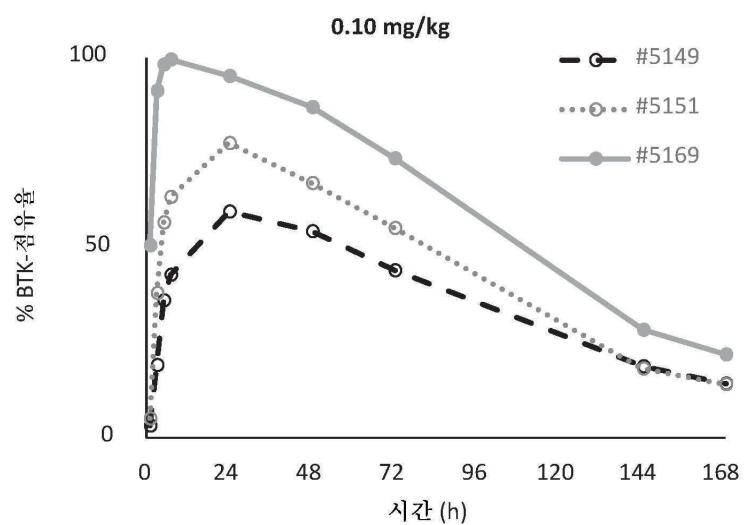
## 도면9b

혈장 BMS-986195 농도 대 시간 프로파일



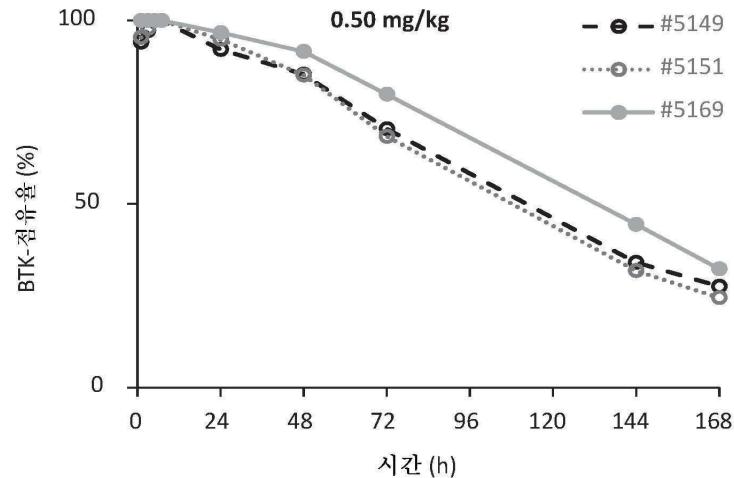
## 도면9c

% BTK-점유율 대 시간 프로파일



## 도면9d

% BTK-점유율 대 시간 프로파일



## 서열목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

&lt;120&gt; ASSAY TO DETERMINE IN VIVO RECEPTOR OCCUPANCY

&lt;130&gt; 12728-WO-PCT

&lt;150&gt; 62/669442

&lt;151&gt; 2018-05-10

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(21)

<223> Cys at position 15 is the binding site of an irreversible  
quencher or compound of interest

&lt;400&gt; 1

Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu

1 5 10 15

Leu Asn Tyr Leu Arg

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(9)

<223> Cys at position 5 is the binding site of an irreversible quencher  
or compound of interest

&lt;400&gt; 2

Met Ala Asn Gly Cys Leu Leu Asn Tyr

1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(13)

<223> Cys at position 6 is the binding site of an irreversible quencher  
or compound of interest

&lt;400&gt; 3

Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu

1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(37)

<223> Cys at position 15 is the binding site of an irreversible  
quencher or compound of interest

&lt;400&gt; 4

Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu

1 5 10 15

Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln Gln Leu

20 25 30

Leu Glu Met Cys Lys

35

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(37)

<223> Cys at position 16 is the binding site of an irreversible  
quencher or compound of interest

<400> 5

Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys

1 5 10 15

Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln Gln

20 25 30

Leu Leu Glu Met Cys

35

<210> 6

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(64)

<223> Cys at position 42 is the binding site of an irreversible  
quencher or compound of interest

<400> 6

Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val Met Met Asn Leu Ser His Glu

1 5 10 15

Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe

20 25 30

Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg

35 40 45

Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys

50 55 60

<210> 7

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(65)

<223> Cys at position 59 is the binding site of an irreversible  
quencher or compound of interest

<400> 7

Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile Lys Glu Gly Ser Met Ser

1 5 10 15

Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val Met Met Asn Leu Ser His

20 25 30

Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys Thr Lys Gln Arg Pro Ile

35 40 45

Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu Leu Asn Tyr Leu

50 55 60

Arg

65

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phe at position 7 is [13C9,15N]-phenylalanine; Cys at position 17  
is the binding site of an irreversible quencher

<400> 8

Thr Arg Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly

1 5 10 15

Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Ala

20

25

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 659

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Val Pro Glu Lys Asn Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85 90 95

Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr

100 105 110

Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro

130 135 140

Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys

145 150 155 160

Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys

165 170 175

Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro

180 185 190

Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ala Ala

195	200	205
Ala Pro Val Ser Thr Ser Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp		
210	215	220
Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Asp Glu		
225	230	235
Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg Asp		
245	250	255
Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Glu Ala		
260	265	270
Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr Arg		
275	280	285
Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Phe		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Phe		
305	310	315
Ala Lys Ser Thr Gly Asp Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val Val		
325	330	335
Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe		
340	345	350
Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly		
355	360	365
Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Gln Gln Asn Lys Asn Ala		
370	375	380
Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys		
385	390	395
Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val		
405	410	415
Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile		
420	425	430
Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val		
435	440	445

Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys

450	455	460
Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly		
465	470	475
Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln		
485	490	495
Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu		
500	505	510
Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu		
515	520	525
Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg		
530	535	540
Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro		
545	550	555
Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser		
565	570	575
Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser		
580	585	590
Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu		
595	600	605
His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu		
610	615	620
Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu		
625	630	635
Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp		
645	650	655
Glu Glu Ser		

<210> 10

<211> 659

<212> PRT

&lt;213&gt; Rhesus cytomegalovirus

&lt;400&gt; 10

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Val Pro Glu Lys Asn Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85 90 95

Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr

100 105 110

Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro

130 135 140

Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys

145 150 155 160

Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys

165 170 175

Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro

180 185 190

Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ala Ala

195 200 205

Ala Pro Val Ser Thr Ser Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp

210 215 220

Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Asp Glu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg Asp

245	250	255
-----	-----	-----

Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Glu Ala

260	265	270
-----	-----	-----

Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr Arg

275	280	285
-----	-----	-----

Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly Phe

290	295	300
-----	-----	-----

Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Phe

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ala Lys Ser Thr Gly Asp Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val Val

325	330	335
-----	-----	-----

Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe

340	345	350
-----	-----	-----

Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly

355	360	365
-----	-----	-----

Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Gln Gln Asn Lys Asn Ala

370	375	380
-----	-----	-----

Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val

405	410	415
-----	-----	-----

Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile

420	425	430
-----	-----	-----

Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val

435	440	445
-----	-----	-----

Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys

450	455	460
-----	-----	-----

Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln

485	490	495
-----	-----	-----

Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu

500	505	510
-----	-----	-----

Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu

515	520	525
-----	-----	-----

Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg

530	535	540
-----	-----	-----

Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro

545	550	555	560
-----	-----	-----	-----

Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser

565	570	575
-----	-----	-----

Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser

580	585	590
-----	-----	-----

Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu

595	600	605
-----	-----	-----

His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu

610	615	620
-----	-----	-----

Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu

625	630	635	640
-----	-----	-----	-----

Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp

645	650	655
-----	-----	-----

Glu Glu Ser