布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂靶点占有率评价方法的研究进展

霍一凡[1,2]，刘　丹[2]，满素勤[2]，邱云良[2*]

（1. 中国医药工业研究总院有限公司，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：布鲁顿酪氨酸激酶（BTK）在 B 细胞的发育、增殖、分化、活化和细胞因子分泌等方面发挥着关键作用。BTK 抑制剂（BTKI）通过阻断 BTK 或抑制其活性而有效阻断下游细胞信号转导和受体活化，并对与多种疾病发生、发展相关的上游信号分子产生负反馈作用，以发挥治疗作用。在 BTKI 的研发过程中，靶点占有率作为衡量药物与 BTK 结合能力的指标，已成为临床前和临床研究中药效学评价的重要参数，不仅可以反映给药剂量与靶点占有率之间的关系，对于建立药效与靶点占有率之间的联系也有重要意义。文章对 BTKI 靶点占有率的评价方法进行综述，并讨论不同方法的优缺点，以期为 BTKI 研发过程中选择合适的靶点占有率评价方法提供参考。

关键词：布鲁顿酪氨酸激酶（BTK）；BTK 抑制剂；信号转导；靶点占有率；研究进展

中图分类号：R917；R96　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)01-0038-09

引用：霍一凡，刘　丹，满素勤，等．布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂靶点占有率评价方法的研究进展［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(1): 38-46．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.01.003

Advance in Target Occupancy Evaluation Methods for Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors

HUO Yifan[1,2], LIU Dan[2], MAN Suqin[2], QIU Yunliang[2*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Bruton's tyrosine kinase (BTK) plays a crucial role in the development, proliferation, differentiation, activation and cytokine secretion of B cells. BTK inhibitors (BTKIs) can effectively block downstream cell signaling and receptor activation by blocking BTK or inhibiting its activity, and produce negative feedback on upstream signaling molecules related to the occurrence and development of various diseases, so as to playing a therapeutic role. In the research and development of BTKIs, the target occupancy, serving as an evaluation indicator of the binding affinity of drugs to BTK, has become an important pharmacodynamic parameter in preclinical and clinical studies. Besides, it not only reflects the relationship between dose and target occupancy, but also has important significance for establishing the relationship between efficacy and target occupancy. This paper reviews the evaluation methods of BTKI target occupancy, and discusses the advantages and disadvantages of these methods, aiming to provide some references for selecting suitable target occupancy evaluation methods in the research and development process of BTKI.

Key Words: Bruton's tyrosine kinase (BTK); BTK inhibitor; signal transduction; target occupancy; research progress

布鲁顿酪氨酸激酶（Bruton's tyrosine kinase，BTK）是一种膜结合蛋白，属于胞质非受体酪氨酸激酶中的肝细胞肝癌表达的酪氨酸激酶（tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma，TEC）家族。BTK 在除 T 细胞、自然杀伤细胞（natural killer cell，NK 细胞）和浆细胞外的所有造血细胞系细胞（如 B

收稿日期：2024-03-09

基金项目：上海市科委工程技术研究中心专项项目（17DZ2252900）

作者简介：霍一凡（1995—），女，硕士，从事临床前 / 临床生物标志物的分析和研究。

通信作者：邱云良（1978—），男，研究员，博士生导师，从事药物毒理学、生物标志物及非临床依赖性的研究。

E-mail：ylqiu@innostar.cn

细胞、中性粒细胞、单核 / 巨噬细胞等）中均有表达，是 B 细胞抗原受体（B cell receptor，BCR）信号转导的关键激酶，也是肥大细胞和巨噬细胞中 Fc 受体信号转导的关键调节器，在 B 细胞的发育、增殖、分化、活化和细胞因子分泌等方面发挥着关键作用[1—2]。其中，BCR 信号转导是 B 细胞恶性肿瘤发生、发展的关键机制，而 BTK 突变是促进肿瘤细胞增殖和生存的关键。因此，BTK 已成为多种疾病，特别是与 B 淋巴细胞相关的造血恶性肿瘤和自身免疫性疾病的理想靶点[3—11]。BTK 抑制剂（BTK inhibitor，BTKI）是常用的以 BTK 为作用靶点，通过阻断 BTK 或抑制其活性而有效阻断下游细胞信号转导和受体活化，以及对与多种疾病发生、发展相关的上游信号分子产生负反馈作用，从而发挥抗肿瘤的治疗效果[3,12—13]。

在 BTKI 的临床前和临床研究中，靶点占有率作为衡量药物与 BTK 结合能力的指标，是 BTKI 研究中重要的药效学参数。评估靶点占有率不仅对发现新型 BTKI、研究抑制机制至关重要，而且在证明和确定耐受剂量下能否实现稳健的靶点抑制以及建立药效与靶点抑制之间的联系方面有重要意义[1,14—17]。本文介绍了 BTK、BCR 信号通路以及 BTKI，并综述靶点占有率的评价方法，以期为 BTKI 研发过程中选择合适的靶点占有率评价方法提供参考。

1 BTK 与 BCR 信号通路

BTK 包含 5 个结构域，分别为具有氨基末端的同源结构域（pleckstrin homology，PH）、肉瘤基因（sarcomagene，*Src*）结构域 3（*Src* homology 3，SH3）和 *Src* 结构域 2（SH2）、富含脯氨酸的 TEC 结构域（TEC homology，TH）以及催化结构域。PH 可以结合磷脂酰肌醇三磷酸（phosphatidylinositol triphosphate，PIP3），并将 BTK 招募到细胞膜上。TH 包含锌指基序，在维持 BTK 活性和稳定性方面起重要作用[18—20]。SH2、SH3 通过结合相关蛋白上磷酸化的酪氨酸残基来控制蛋白 - 蛋白相互作用，从而调控信号转导通路。

在稳态条件下，BTK 以低催化活性的磷酸化形态存在于细胞质中，而 BTK 的活化是一个复杂的过程（图 1）[21—22]。BCR 与白细胞分化抗原 79α/β（cluster of differentiation 79α/β，CD79α/β）异二聚体结合形成 BCR 复合物[18] 后，募集和活化下游 Lck/yes 相关蛋白酪氨酸激酶（Lck/yes-related tyrosine kinase，LYN）等 Src 激酶家族分子，并且进一步诱导 CD79α/β 胞内段的免疫受体酪氨酸激活基序（immunoreceptor tyrosine based activation motif，ITAM）发生磷酸化；随后，磷酸化的 ITAM 募集脾酪氨酸激酶（spleen tyrosine kinase，SYK）至细胞膜处并磷酸化 SYK[23]。同时，LYN 磷酸化 BCR 共受体 CD19 尾部的酪氨酸残基，使其能结合并磷酸化磷脂酰肌醇 3- 激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）；PI3K 将其膜上的磷脂酰肌醇 -4,5- 二磷酸（phosphatidylinositol-4,5-biphosphate，PIP2）转化为第二信使 PIP3。PIP3 与 BTK 的 PH 相互作用后，将 BTK 短暂募集至细胞膜上[24]。然后，活化的 SYK 和 LYN 催化 BTK 的 Y551 位点磷酸化，同时促进 Y223 位点自磷酸化，从而完全激活 BTK[20,25—27]。完全活化的 BTK 通过磷酸化活化磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C-γ2（phospholipase C γ2，PLC-γ2），进一步激活包括丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）、细胞外调节蛋白激酶（extracellular

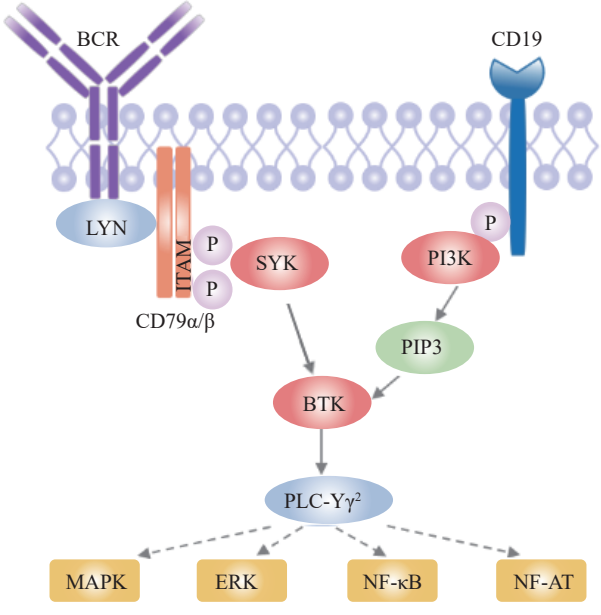


图 1 BCR 信号转导示意图

Fig.1 Schematic Diagram of BCR Signal Transduction

regulated protein kinases，ERK）、核因子κB（nuclear factor κB，NF-κB）、活化T细胞核因子（nuclear factor of activated T cells，NF-AT）在内的多条下游信号通路，从而调控基因和细胞因子的表达，影响B细胞的存活、增殖、凋亡、分化和抗体分泌等多种生物学过程[28—29]。

2 BTKI的作用机制和上市产品

近年来已报道了许多小分子BTKI的研究。根据BTKI与BTK催化结构域的结合模式，可将BTKI分为2类：可逆抑制剂和不可逆抑制剂。不可逆BTKI通过与BTK的保守非催化半胱氨酸残基（Cys481）发生共价结合，从而实现强结合[30]。尽管不可逆BTKI与BTK的结合力较强，但存在耐药性和易脱靶等不良反应。可逆抑制剂则通过较弱的、可逆的作用力，如氢键、范德华力和疏水作用力等，与BTK进行非共价结合，使BTK构象发生特定改变，从而发挥抑制作用。该作用机制不依赖与Cys481的结合[31]，故可用于治疗对不可逆BTKI产生耐药性的患者。

迄今为止，已上市的BTKI共6个（表1）。全球首个上市的BTKI是依布替尼（ibrutinib），是第一代不可逆BTKI。依布替尼的出现彻底改变了B细胞恶性肿瘤的治疗前景，但脱靶效应导致的不良反应以及Cys481突变产生的耐药性限制了依布替尼的临床应用[32]。相较于依布替尼，第二代不可逆BTKI[包括阿卡替尼（acalabrutinib）、泽布替尼（zanubrutinib）、替拉鲁替尼（tirabrutinib）和奥布替尼（orelabrutinib）]显示出更高的选择性和更低的脱靶效应，从而大幅减少了不良反应的发生。但第二代不可逆BTKI同样通过与Cys481的共价结合而发挥抑制作用，并未解决Cys481突变引起的耐药性问题[14,33—35]。第三代可逆BTKI吡托布替尼（pirtobrutinib）正式开启了BTKI的“非共价时代”。吡托布替尼与BTK的结合不依赖Cys481，因此对Cys481突变的BTK具有更好的抑制作用和更高的安全性，可在产生对不可逆BTKI耐药的套细胞淋巴瘤患者中重新建立BTK抑制[36—37]。

3 靶点占有率的评价方法

目前已报道的靶点占有率基本上是通过检测给药前后游离BTK的浓度，计算二者比值而间接得到（计算公式如式①所示）。表2汇总了几种BTKI在临床前或临床研究中采用的靶点占有率评价方法及研究结果。本文将游离BTK的检测策略分为外源性BTKI处理、以总蛋白归一化，以及以总BTK归一化三大类别进行综述。

$$\text{BTK 占有率} = 100\% - \text{给药后游离 BTK 占比} \quad ①$$

3.1 外源性BTKI处理法

该方法基于ELISA分析，通过添加过量外源性BTKI，以结合样品中游离BTK，用于校正与游离BTK无关的背景信号。样品采集后，用含蛋白酶抑制剂混合物的裂解液将外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）裂解后提取上清液，并分为2份，其中1份加入过量的外源性BTKI进行处理。将经或不经外源性BTKI处理的PBMC裂解液样品与生物素化的BTKI（biotin-BTKI）共孵育，以标记PBMC裂解液中游离BTK。然后加至预先包被抗BTK抗体的96孔板内进行孵育，使样品中的游离BTK被捕获至板底。采用链霉亲和素（streptavidin，SA）-辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记biotin-BTKI，用酶标仪检测HRP的浓度。该方法中游离BTK占比的计算方法如式②所示。其中，以给药前未经外源性BTKI处理样品中的游离BTK占比为100%（即BTK占有率为0），给药前经外源性BTKI处理样品中的游离BTK占比为0（即BTK占有率为100%）[4,11,41—42]，进行归一化处理。

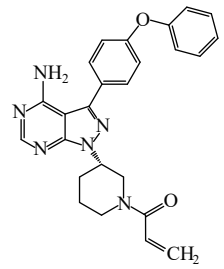
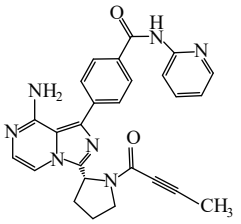
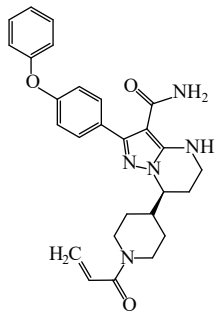
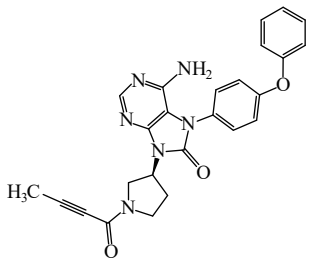
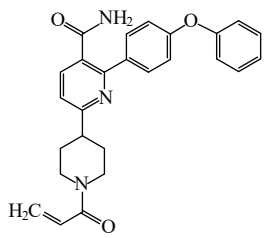
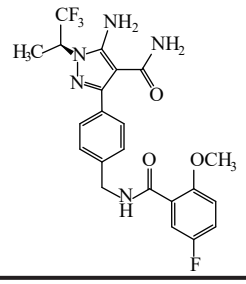
$$\text{游离 BTK}_{\text{给药后}} = \frac{\text{给药后信号值} - \text{给药后信号值}_{(+\text{外源性 BTKI})}}{\text{给药前信号值} - \text{给药前信号值}_{(+\text{外源性 BTKI})}} \times 100\% \quad ②$$

3.2 以总蛋白浓度进行归一化的方法

该方法同样基于ELISA法，通过测定PBMC裂解液样品中的总蛋白浓度，将游离BTK归一化至单位总蛋白。用biotin-BTKI标记PBMC裂解液样品中的游离BTK后，加至预先包被SA的96孔板中，通过SA与biotin的结合将其中的游离BTK捕获至板底。加入抗BTK抗体作为检测抗体，再加入连有HRP的抗-抗体将HRP连接到复合物上，显色后用酶标仪检测吸光强度。通过重组人BTK蛋白构建的

表 1　全球获批上市的 BTKI 类药物

Tab.1　BTKI Drugs Approved Worldwide

分类	药物名称	适应证	获批年月	批准机构	原研公司	药物化学结构
第一代不可逆抑制剂	依布替尼	慢性淋巴细胞白血病，套细胞淋巴瘤，小淋巴细胞淋巴瘤，华氏巨球蛋白血症，边缘区淋巴瘤，移植物宿主病	2013 年 11 月	FDA	美国强生公司，美国 Pharmacyclics 公司	
第二代不可逆抑制剂	阿卡替尼	小淋巴细胞淋巴瘤，B 细胞慢性淋巴细胞白血病，套细胞淋巴瘤	2017 年 1 月	FDA	英国阿斯利康公司	
	泽布替尼	套细胞淋巴瘤，华氏巨球蛋白血症，B 细胞慢性淋巴细胞白血病，小淋巴细胞淋巴瘤	2019 年 11 月	FDA	百济神州有限公司	
	替拉鲁替尼	原发性中枢神经系统淋巴瘤，华氏巨球蛋白血症	2020 年 3 月	日本厚生劳动省	日本小野制药公司	
	奥布替尼	小淋巴细胞淋巴瘤，B 细胞慢性淋巴细胞白血病，套细胞淋巴瘤	2020 年 12 月	NMPA	北京诺诚健华医药科技有限公司	
可逆抑制剂	吡托布替尼	套细胞淋巴瘤	2023 年 1 月	FDA	美国礼来公司	

标准曲线计算裂解液中的游离 BTK 浓度，同时测定 PBMC 裂解液样品中的总蛋白浓度（如 BCA 法）。该方法中游离 BTK 占比的计算方法如式③所示。其中，给药前样品中的游离 BTK 占比为 100%（即 BTK 占有率为 0）[40]。

$$游离\ BTK_{给药后}=\frac{给药后游离\ BTK\ 浓度\ /\ 给药后总蛋白浓度}{给药前游离\ BTK\ 浓度\ /\ 给药前总蛋白浓度}\times 100\% \quad ③$$

3.3 以总 BTK 浓度进行归一化处理的方法

该方法分别检测样品中的游离 BTK 和总 BTK，将游离 BTK 归一化至单位总 BTK，再将游离 BTK 占比表示为给药后每单位总 BTK 中游离 BTK 浓度与给药前每单位总 BTK 中游离 BTK 浓度的比值（式④）。根据检测平台的不同，将检测游离和总 BTK 的方法分为 ELISA 法、电化学发光（electrochemiluminescence，ECL）法、SDS-PAGE 和荧光凝胶扫描法、时间分辨（time-resolved，TR）- 荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）法进行综述。

$$游离\ BTK_{给药后}=\frac{给药后游离\ BTK/\ 给药后总\ BTK}{给药前游离\ BTK/\ 给药前总\ BTK}\times 100\% \quad ④$$

3.3.1 ELISA 法

ELISA 法依据抗原 - 抗体特异性结合的原理检测样品中的游离或总 BTK。用 biotin-BTKI 标记 PBMC 裂解液样品中的游离 BTK，并加至包被了 SA 的 96 孔板中，使游离 BTK 被捕获。采用基于 HRP 的“三明治夹心”法，用酶标仪测定吸光度以检测游离 BTK 浓度。检测总 BTK 时，将抗 BTK 抗体作为捕获抗体包被至 96 孔板，未经处理的 PBMC 裂解液加入 96 孔板以捕获总 BTK，将另 1 种抗 BTK 抗体作为检测抗体，同样采用基于 HRP 的“三明治夹心”法，用酶标仪检测总 BTK 浓度。其中，游离或总 BTK 浓度检测用的标准曲线均使用重组人 BTK 蛋白分别建立 [9]。

3.3.2 ECL 法

ECL 法是化学发光法和电化学法的结合。首先将化学发光中的“三明治夹心”结构固定在电极表面，然后添加电子供体（通常为三丙胺），并施加一定的电压，使电子转移而发生特异性化学发光反应，再通过检测发光强度以计算蛋白浓度。检测游离 BTK 浓度时，先用 biotin-BTKI 标记 PBMC 裂解液中的游离 BTK，加至 SA 包被的 Meso Scale Discovery（MSD）96 孔板中捕获游离 BTK，以 ECL 法检测；检测总 BTK 浓度时，将未经处理的 PBMC 裂解液样品加至包被抗 BTK 抗体的 MSD 96 孔板中以捕获总 BTK，将另 1 种抗 BTK 抗体作为检测抗体，以 ECL 法检测 [5,39]。2 种方法的标准曲线均采用重组人 BTK 蛋白建立。

3.3.3 SDS-PAGE 和荧光凝胶扫描法

SDS-PAGE 和荧光凝胶扫描法是先利用 SDS-PAGE 分离蛋白质，然后采用荧光凝胶扫描法测定

表 2　部分靶点占有率的评价方法及研究结果

Tab.2　Some Evaluation Methods and Results of Target Occupancy

待测物名称	检测方法	靶点占有率结果
依布替尼	游离 BTK：SDS-PAGE 法和荧光凝胶扫描；总蛋白：蛋白质印迹法	给药后 4 h，>95%，至少持续 24 h（犬临床前试验，剂量 2.5 ～ 12.5 mg/kg）[19,38]
泽布替尼	游离 BTK：ELISA；总 BTK：ELISA	所有剂量给药后 4 h，>95%（临床Ⅰ期）[39]
埃沃布替尼（evobrutinib，M2951）	游离 BTK：ELISA；总 BTK：ELISA	单次给药：25、50、100、200、350、500 mg 的剂量下，分别为 58.00%、72.85%、91.90%、98.90%、100%、100% 多次给药：给药后 D1 和 D14 分别为 70.4%（51.6%～88.9%）、94.7%（91.8%～98.3%）；75 和 200 mg 剂量组在给药后 D14 达到最大疗效，分别为 98.2%（94.0%～98.8%）和 100%（100%～100%）（临床Ⅰ期）[9]
斯贝布替尼（spebrutinib，CC-292，AVL292）	游离 BTK：ELISA；总蛋白：BCA 法	给药后 4 h，>98%；给药后 8 ～ 24 h，>75%（小鼠临床前试验，2 mg/kg）[40]
布拉布替尼（branebrutinib，BMS-986195）	LC-MS/MS	10 mg 剂量组给药后 24 h 达到 100%（临床Ⅰ期）[8]

目标蛋白质的含量。用荧光探针（即 BTKI 荧光衍生物）标记 PBMC 中的游离 BTK 后，在含有还原剂的样品缓冲液中进行裂解。裂解液用 SDS-PAGE 法分离蛋白质，再通过荧光扫描仪进行荧光凝胶扫描以测定游离 BTK 浓度。总 BTK 浓度采用标准的蛋白质印迹法测定[19,43—44]。

3.3.4 TR-FRET

TR-FRET 结合了 TR 荧光检测技术和 FRET 检测技术。该技术将铽（Tb）标记的抗 BTK 抗体作为能量供体，将 2 种与 BTK 不同表位结合的 D2 标记的抗 BTK 抗体作为能量受体，利用 Tb 的双波长发射特性，为 2 种具有不同激发和发射光谱的荧光能量受体提供能量，产生 FRET 效应[34]。2 种与 BTK 不同表位结合的 D2 标记的抗 BTK 抗体被分别用于标记样品中的游离 BTK 和总 BTK。将能量供体和受体按一定比例混合后与样品共孵育，再用激光阅读器或多功能酶标仪进行检测。采用重组人 BTK 蛋白建立标准曲线，分别计算样品中游离 BTK 和总 BTK 的浓度。

3.4 其他

3.4.1 LC-MS/MS 法

LC-MS/MS 法利用 LC 技术实现混合物中各组分的分离和纯化，采用 MS 技术对一定纯度的化合物进行定性、定量以及结构分析。样品采集后立即加入过量淬灭剂以阻止样品采集后药物继续与游离 BTK 结合。与淬灭剂结合的 BTK 称为淬灭剂结合 BTK（quench binded BTK，QB-BTK），与药物结合的 BTK 称为药物结合 BTK（drug binded BTK，DB-BTK）。对样品进行免疫捕获以富集 QB-BTK 和 DB-BTK 后，用胰蛋白酶进行消化，通过 LC-MS/MS 对 QB-BTK 和 DB-BTK 进行分离、纯化和定量，BTK 占有率的计算方法如式⑤所示[8,45]。

$$\text{BTK 占有率} = \frac{\text{DB-BTK}}{\text{DB-BTK} + \text{QB-BTK}} \times 100\% \qquad ⑤$$

3.4.2 生物发光共振能量转移（bioluminescence resonance energy transfer，BRET）

BRET 利用荧光蛋白与其他生物分子发生共振能量转移，从而实现能量传递和发光效应。用荧光蛋白标记 BTK，并加入可与 BTK 可逆结合的荧光探针，两者结合可发生 BRET。当加入未标记的 BTKI（样品）时，未标记的 BTKI 与荧光蛋白标记的 BTK 会竞争性地结合荧光探针，导致 BRET 减弱，从而反映 BTK 靶点的占有情况。基于此机制，分别检测样品 BRET（即添加荧光探针和样品）、背景 BRET（即不添加荧光探针和样品）以及总 BRET（即添加荧光探针但不添加样品），就可按式⑥计算样品的 BTK 占有率[46]。

$$\text{BTK 占有率} = (1 - \frac{\text{样品 BRET} - \text{背景 BRET}}{\text{总 BRET} - \text{背景 BRET}}) \times 100\% \qquad ⑥$$

3.5 不同方法比较

在不同的靶点占有率检测方法中，基于外源性 BTKI 处理的方法，虽然可校正与游离 BTK 无关的背景信号，但无法消除或减轻不同样品在 PBMC 提取和裂解过程中产生的差异，变异性较大；基于总蛋白浓度归一化的方法在一定程度上提高了不同采血时间点结果之间的可比性和可靠性；基于总 BTK 浓度归一化的方法更加科学、准确、可靠，检测不同样品时所得的结果之间更有可比性，是许多 BTKI 临床或临床前药效学研究中的常用策略之一。

在基于总 BTK 浓度归一化的检测方法中，SDS-PAGE 和荧光凝胶扫描法操作简单，但需要交替使用 2 种平台，使游离 BTK 和总 BTK 之间缺乏直接可比性，且分析通量较低[19]；ELISA 和 ECL 可用同一平台进行检测，不仅操作简便、快速，且使用 96 孔板，分析通量高，特异性和灵敏度好，但需要分别检测游离和总 BTK，样品需求量较大[18,40]；TR-FRET 和 BRET 通过能量供体和受体在特定激发光条件下产生的能量共振转移来检测 BTK 占有率，操作简便、耗时短、通量大，可以实现活细胞实时检测，但需筛选合适的能量供体和受体，方法开发难度较大；LC-MS/MS 可以同时量化同一样品中的总 BTK 和游离 BTK，选择性高、变异性小，但灵敏度相对较低[47—48]。总之，不同检测方法各有优缺点，研究者在选择检测方法或平台时需权衡利弊，以寻找更适合的检测方法。

4 总结与展望

BTKI 改变了 B 细胞恶性肿瘤的治疗前景，而评

估靶点占有率对于新型BTKI的开发、靶点抑制与生物效应或药效之间联系的建立至关重要。对于基于抗体的药物，靶点占有率通常通过流式细胞术测定，可使用特异性抗体，采用对靶点有竞争性的抗体来测定游离受体，非竞争性抗体来测定总受体。然而，对于小分子抑制剂，如BTKI，目前还没有抗体试剂可用于流式细胞术直接检测靶点占有率。因此，对于BTK占有率的评估，通常需要借助其他平台进行检测，再通过计算给药前后的比值而间接求得。

在BTK占有率的检测过程中，更大的挑战在于不同实验室之间、不同方法之间的可比性较差，且目前没有统一的方法或标准对BTK占有率的检测进行规范，样品处理方式、抗体筛选以及检测平台选用等均会对检测结果产生重大影响。本文综述了几种评价BTK占有率的检测方法及其优缺点，以期为在BTKI研发过程中选择合适的靶点占有率评价方法提供参考。在BKTI的临床前以及临床研究中，选择灵敏度高、特异性好、稳定、可靠、方便、快速的BTK占有率检测方法至关重要。未来，需要更多关注BTK占有率检测方法的统一和规范，以提高不同实验室检测结果之间的可比性，使BTK占有率的分析更有临床意义。

参考文献：

[1] MCDONALD C, XANTHOPOULOS C, KOSTARELI E. The role of Bruton's tyrosine kinase in the immune system and disease [J]. *Immunology*, 2021, **164**(4): 722-736.

[2] BROW R E. Hematology: basic principles and practice. 5e [Book Review] [J]. *Aust J Med Sci*, 2009, **30**(3): 105-106.

[3] LIANG C Y, TIAN D N, REN X D, *et al*. The development of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors from 2012 to 2017: a mini-review [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, **151**: 315-326.

[4] GOESS C, HARRIS C M, MURDOCK S, *et al*. ABBV-105, a selective and irreversible inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, is efficacious in multiple preclinical models of inflammation [J]. *Mod Rheumatol*, 2018, **29**(3): 510-512.

[5] PULZ R, ANGST D, DAWSON J, *et al*. Design of potent and selective covalent inhibitors of Bruton's tyrosine kinase targeting an inactive conformation [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, **10**(10): 1467-1472.

[6] HENDRIKS R W, YUVARAJ S, KIL L P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14**(4): 219-232.

[7] HASELMAYER P, CAMPS M, LIU-BUJALSKI L, *et al*. Efficacy and pharmacodynamic modeling of the BTK inhibitor evobrutinib in autoimmune disease models [J]. *J Immunol*, 2019, **202**(10): 2888-2906.

[8] CATLETT I M, NOWAK M, KUNDU S, *et al*. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of branebrutinib (BMS-986195), a covalent, irreversible inhibitor of Bruton's tyrosine kinase: randomised phase Ⅰ, placebo-controlled trial in healthy participants [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2020, **86**(9): 1849-1859.

[9] BECKER A, MARTIN E C, MITCHELL D Y, *et al*. Safety, tolerability, pharmacokinetics, target occupancy, and concentration-QT analysis of the novel BTK inhibitor evobrutinib in healthy volunteers [J]. *Clin Transl Sci*, 2020, **13**(2): 325-336.

[10] SMITH C I, ISLAM T C, MATTSSON P T, *et al*. The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species [J]. *BioEssays*, 2001, **23**(5): 436-446.

[11] BARF T, COVEY T, IZUM R, *et al*. Acalabrutinib (ACP-196): a covalent Bruton tyrosine kinase inhibitor with a differentiated selectivity and *in vivo* potency profile [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, **363**(2): 240-252.

[12] LEMERY S J, ZHANG J, ROTHMANN M D, *et al*. U.S. Food and Drug Administration approval: ofatumumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia refractory to fludarabine and alemtuzumab [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, **16**(17): 4331-4338.

[13] SAKUMA C, SATO M, TAKENOUCHI T, *et al*. Specific binding of the WASP N-terminal domain to Btk is critical for TLR2 signaling in macrophages [J]. *Mol Immunol*, 2015, **63**(2): 328-336.

[14] SUN C, NIERMAN P, KENDALL E K, *et al*. Clinical and biological implications of target occupancy in CLL treated with the BTK inhibitor acalabrutinib [J]. *Blood*, 2020, **136**(1): 93-105.

[15] HANSEN R, FIRDAUS S J, LI S W, *et al*. An internally controlled quantitative target occupancy assay for covalent inhibitors [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 14312.

[16] BUNNAGE M E, CHEKLER E L P, JONES L H. Target validation using chemical probes [J]. *Nat Chem Biol*, 2013,

9(4): 195-199.

[17] BUNNAGE M E, GILBERT A M, JONES L H, *et al*. Know your target, know your molecule [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, **11**(6): 368-372.

[18] WEN T Y, WANG J S, SHI Y K, *et al*. Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances [J]. *Leukemia*, 2021, **35**(2): 312-332.

[19] BRADSHAW J M. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches [J]. *Cell Signal*, 2010, **22**(8): 1175-1184.

[20] MOHAMED A J, YU L, BÄCKESJÖ C M, *et al*. Bruton's tyrosine kinase (BTK): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain [J]. *Immunol Rev*, 2009, **228**(1): 58-73.

[21] HONIGBERG L A, SMITH A M, SIRISAWAD M, *et al*. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(29): 13075-13080.

[22] WANG X J, BARBOSA J, BLOMGREN P, *et al*. Discovery of potent and selective tricyclic inhibitors of Bruton's tyrosine kinase with improved drug-like properties [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, **8**(6): 608-613.

[23] KIM M K, PAN X Q, HUANG Z Y, *et al*. Fc gamma receptors differ in their structural requirements for interaction with the tyrosine kinase Syk in the initial steps of signaling for phagocytosis [J]. *Clin Immunol*, 2001, **98**(1): 125-132.

[24] SATTERTHWAITE A B, CEROUTRE H, KHAN W N, *et al*. Btk dosage determines sensitivity to B cell antigen receptor cross-linking [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**(24): 13152-13157.

[25] QIU Y, KUNG H J. Signaling network of the Btk family kinases [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(49): 5651-5661.

[26] MARCOTTE D J, LIU Y T, ARDUINI R M, *et al*. Structures of human Bruton's tyrosine kinase in active and inactive conformations suggest a mechanism of activation for TEC family kinases [J]. *Protein Sci*, 2010, **19**(3): 429-439.

[27] VALLA K, FLOWERS C R, KOFF J L. Targeting the B cell receptor pathway in non-Hodgkin lymphoma [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, **27**(6): 513-522.

[28] PAL SINGH S, DAMMEIJER F, HENDRIKS R W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies [J]. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 57.

[29] JONGSTRA-BILEN J, PUIG CANO A, HASIJA M, *et al*. Dual functions of Bruton's tyrosine kinase and Tec kinase during Fcγ receptor-induced signaling and phagocytosis [J]. *J Immunol*, 2008, **181**(1): 288-298.

[30] SINGH J, PETTER R C, BAILLIE T A, *et al*. The resurgence of covalent drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, **10**(4): 307-317.

[31] JOHNSON A R, KOHLI P B, KATEWA A, *et al*. Battling BTK mutants with noncovalent inhibitors that overcome Cys481 and Thr474 mutations [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, **11**(10): 2897-2907.

[32] BOND D A, WOYACH J A. Targeting BTK in CLL: beyond ibrutinib [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, **14**(3): 197-205.

[33] HILLMEN P, BROWN J R, EICHHORST B F, *et al*. ALPINE: zanubrutinib versus ibrutinib in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma [J]. *Future Oncol*, 2020, **16**(10): 517-523.

[34] YU H, TRUONG H, MITCHELL S A, *et al*. Homogeneous BTK occupancy assay for pharmacodynamic assessment of tirabrutinib (GS-4059/ONO-4059) target engagement [J]. *SLAS Discov*, 2018, **23**(9): 919-929.

[35] AKINLEYE A, CHEN Y, MUKHI N, *et al*. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, **6**(1): 59.

[36] THOMPSON P A, TAM C S. Pirtobrutinib: a new hope for patients with BTK-inhibitor refractory lymphoproliferative disorders [J]. *Blood*, 2023, **141**(26): 3137-3142.

[37] GOMEZ E B, EBATA K, RANDERIA H S, *et al*. Pirtobrutinib preclinical characterization: a highly selective, non-covalent (reversible) BTK inhibitor [J]. *Blood*, 2023, **142**(1): 62-72.

[38] ADVANI R H, BUGGY J J, SHARMAN J P, *et al*. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies [J]. *J Clin Oncol*, 2013, **31**(1): 88-94.

[39] TAM C S, TROTMAN J, OPAT S, *et al*. Phase 1 study of the selective BTK inhibitor zanubrutinib in B-cell malignancies and safety and efficacy evaluation in CLL [J]. *Blood*, 2019, **134**(11): 851-859.

[40] EVANS E K, TESTER R, ASLANIAN S, *et al*. Inhibition of Btk with CC-292 provides early pharmacodynamic assessment of activity in mice and humans [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, **346**(2): 219-228.

[41] ALSADHAN A, CHEUNG J, GULRAJANI M, *et al*. Pharmacodynamic analysis of BTK inhibition in patients with

chronic lymphocytic leukemia treated with acalabrutinib［J］. *Clin Cancer Res*, 2020, **26**(12): 2800-2809.

［42］ DURHAM T B, BLANCO M J. Target engagement in lead generation［J］. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(5): 998-1008.

［43］ MACGLASHAN D Jr, HONIGBERG L A, SMITH A, *et al*. Inhibition of IgE-mediated secretion from human basophils with a highly selective Bruton's tyrosine kinase, Btk, inhibitor［J］. *Int Immunopharmacol*, 2011, **11**(4): 475-479.

［44］ SMITH P F, KRISHNARAJAH J, NUNN P A, *et al*. A phase Ⅰ trial of PRN1008, a novel reversible covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, in healthy volunteers［J］. *Br J Clin Pharmocol*, 2017, **83**(11): 2367-2376.

［45］ ZHENG N Y, CATLETT I M, TAYLOR K, *et al*. Determination of real time *in vivo* drug receptor occupancy for a covalent binding drug as a clinical pharmacodynamic biomarker by immunocapture-LC-MS/MS［J］. *Anal Chem*, 2019, **91**(13): 8443-8452.

［46］ ONG L L, VASTA J D, MONEREAU L, *et al*. A high-throughput BRET cellular target engagement assay links biochemical to cellular activity for Bruton's tyrosine kinase［J］. *SLAS Discov*, 2020, **25**(2): 176-185.

［47］ STEVENSON L, GAROFOLO F, DESILVA B, *et al*. 2013 White Paper on recent issues in bioanalysis: 'hybrid'-the best of LBA and LCMS［J］. *Bioanalysis*, 2013, **5**(23): 2903-2918.

［48］ NEUBERT H, PALANDRA J, FERNÁNDEZ OCAÑA M. Quantification of biotherapeutic targets: new opportunities with immunoaffinity LC-MS/MS［J］. *Bioanalysis*, 2014, **6**(13): 1731-1733.

