

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení postupných protonačních rovnováh cytostatika Ibrutinibu  
spektrofotometricky a potenciometricky

Veronika Mikešová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Mikešová**  
Osobní číslo: **C15619**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Stanovení postupných protonačních rovnováh cytostatika  
Ibrutinibu spektrofotometricky a potenciometricky**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**


### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte rešerši dosavadních publikací a poznatků o protonačních rovnováhách cytostatika Ibrutinib.
2. Stanovte všechny disociační konstanty Ibrutinib regresní analýzou spekter.
3. Stanovte všechny i překrývající se disociační konstanty Ibrutinibu regresní analýzou potenciometrických titračních dat.
4. Zhodnoťte oba fyzikálně-chemické postupy a výsledky komentujte.
5. Pokuste se připravit své výsledky k publikování v impaktovaném časopise.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

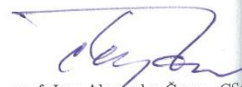
Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**  
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne .....

Veronika Mikešová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Milanovi Melounovi, DrSc., vedoucímu mé diplomové práce za odborné připomínky a rady, které mi pomohly při psaní této práce.

Mé poděkování patří rovněž prof. Ing. Miloši Sedlákovvi, DrSc. a doc. Ing. Filipovi Burešovi, PhD., kteří nám poskytli cenné konzultace týkající se struktury molekuly léčiva a predikce pKa programem MARVIN.

V neposlední řadě děkuji rovněž svým rodičům, ale i celé rodině a přátelům za jejich trpělivost, porozumění a podporu, kterou mi poskytly během celého období studia.

## ANOTACE

Pomocí spektrofotometrické a potenciometrické pH-titrace protinádorového léčiva Ibrutinib byly stanoveny disociační konstanty. Tento lék je určen pro terapii chronické lymfocytární leukémie, Waldenströmovy makroglobulinémie, lymfomů z plášťových buněk a dalších B-buněčných malignit. Nelineární regresí pH spekter (REACTLAB, SQUAD 84) a pH titrací (ESAB) byly determinovány čtyři disociační konstanty. Ibrutinib vykazuje čtyři protonovaná centra v rozmezí pH 2-10, kde pouze dvě jsou dobře oddělena ( $\Delta pK > 3$ ), zatímco ostatní disociační konstanty jsou velice blízké a překrývající se. Neutrální molekula  $LH_2$  se může protonovat na částice  $LH_3$ ,  $LH_4$  a disociovat na  $LH$  a  $L$ . Sada měřených spekter dokazuje citlivost chromoforů na pH v oblasti 220-300 nm. Vzhledem k tomu, že při  $pH > 10$  a  $pH < 5$  dochází v titrovaném roztoku ke vzniku velmi jemných sraženin, tato část potenciometrické křivky nepodléhá regresní analýze za účelem odhadů disociačních konstant. Byly stanoveny termodynamické disociační konstanty ze závislosti disociačních konstant na jednotlivé iontové síly pro teploty  $25^{\circ}C$  a  $37^{\circ}C$ :  $pK_{a1}^T = 3.22$  a  $3.22$ ;  $pK_{a2}^T = 4.17$  a  $5.21$ ;  $pK_{a3}^T = 6.77$  a  $6.75$ ;  $pK_{a4}^T = 9.82$  a  $9.81$ .

## KLÍČOVÁ SLOVA

Disociační konstanty; Ibrutinib; spektrofotometrická titrace, REACTLAB, SQUAD 84; ESAB

## TITLE

Determination of consecutive protonation constants of anti-tumor drug Ibrutinib using UV/VIS spectroscopy and potentiometry

## ANNOTATION

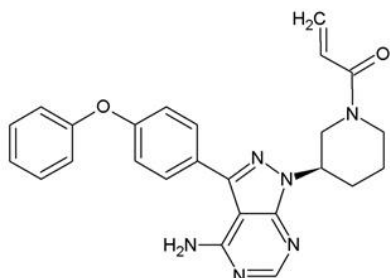
Potentiometric and spectrophotometric pH-titrations of the antitumor drug Ibrutinib for dissociation constants determination were compared. Ibrutinib is targeting B-cell malignancies, for treatment of chronic lymphocytic leukemia, and Waldenstrom's macroglobulinemia. Chemometrics approach to the nonlinear regression of the pH-spectra (REACTLAB, SQUAD84) and pH-titration (ESAB) determines four dissociation constants. Ibrutinib exhibits four protonatable centers in a pH range of 2 to 10, where only two  $pK$  are well separated ( $\Delta pK > 3$ ), while the others are near dissociation constants of overlapping equilibria. The molecule  $LH_2$  can protonate to  $LH_3$  and  $LH_4$  and dissociate to  $LH$  and  $L$ . The set of spectra for pH from 2 to 11 in 220 to 300 nm exhibits chromophore sensitivity to a pH change. Since pH above 10 and pH below 5 occurs in a titrated solution of a very fine precipitate of Ibrutinib, this part of the potentiometric titration curve pH over 10 and pH below 5 did not undergo regression analysis to estimate  $pK_a$ 's. Depending on ionic strength the thermodynamic dissociation constants were estimated at 25°C and 37°C:  $pK_{a1}^T = 3.22$  and 3.22,  $pK_{a2}^T = 4.17$  and 5.21,  $pK_{a3}^T = 6.77$  and 6.75,  $pK_{a4}^T = 9.82$  and 9.81.

## KEYWORDS

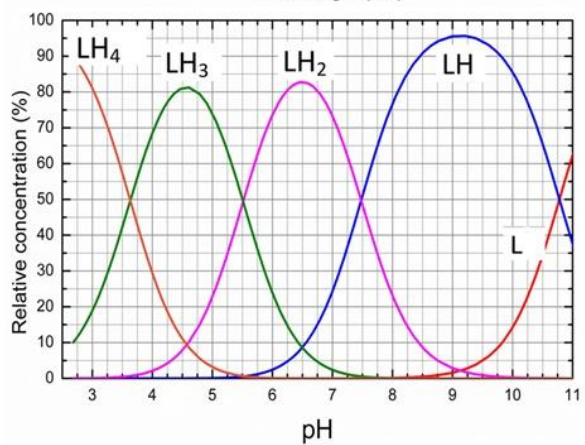
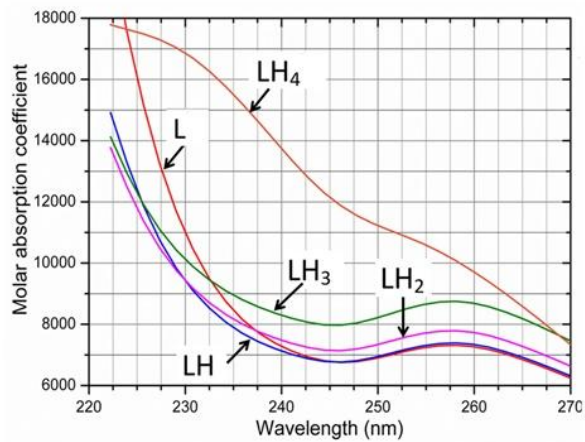
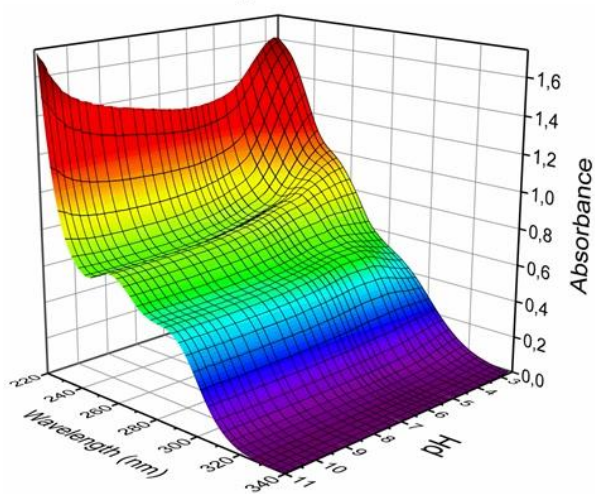
Dissociation constants; Ibrutinib; spectrophotometric titration; REACTLAB; SQUAD 84; ESAB

# GRAFICKÝ ABSTRAKT

## Ibrutinib (antitumor drug)



Dissociation constants:  
 $pK_1 = 3.22$   
 $pK_2 = 4.17$   
 $pK_3 = 6.77$   
 $pK_4 = 9.82$   
at 25°C





## **NOVELTY**

Ibrutinib je léčivo, jenž je cíleno proti B-buněčným leukémiím jako je chronická lymfocytární leukémie, Waldenströmova makroglobulinémie a dalším hematologickým onemocněním. Medicína a farmakologie potřebuje mnoho informací o nových protinádorových léčích, mezi něž patří i fyzikální údaje (spektra, pK's, rozpustnost). K dnešnímu dni nebyla naměřena žádná spektra, nebyly stanoveny žádné disociační konstanty ani pH distribuční diagramy relativních koncentrací různě protonovaných částic nového těžko rozpustného léčiva Ibrutinibu. Prostřednictvím nelineární regrese byly určeny čtyři disociační konstanty analýzou naměřených spekter, jejichž spolehlivost byla dokázána. Vzhledem k tomu, že protonační rovnováhy jsou velice blízké, byly disociační konstanty stanovovány vedle spektrofotometrické analýzy také potenciometrickou analýzou dat. V závislosti na iontové síle byly odhadnuty termodynamické konstanty Ibrutinibu při 25<sup>0</sup>C a 37<sup>0</sup>C.

## **NOVELTY**

Ibrutinib is an antitumor drug targeting B-cell malignancies, for treatment of chronic lymphocytic leukemia, and Waldenström's macroglobulinemia. Medicine and pharmacology needs physical constants (spectra, pK's, solubility, etc.) of new drugs. To date, no spectra, no dissociation constants or pH-distribution diagrams of the relative concentration of variously protonated ions of the new sparingly soluble drug Ibrutinib have ever been published in professional literature. Four dissociation constants were estimated using a computer-assisted pH-absorbance spectra analysis when the reliability of the used regression analysis was proven. Due to the strongly overlapping protonation equilibria and a limited solubility behind the spectrophotometric, potentiometric data analysis was also used to evaluate mixed pKa. By using a dependence on the ionic strength, thermodynamic dissociation constants at 25°C and 37°C were estimated.

## OBSAH

0.	Úvod.....	14
1.	Literární část .....	15
1.1.	Ibrutinib.....	15
1.1.1.	Mechanismus účinku.....	15
1.1.2.	Farmakokinetika.....	16
1.1.3.	Nežádoucí účinky.....	16
1.1.4.	Klinický význam .....	16
1.1.5.	Rezistence.....	18
2.	Teoretická část .....	21
2.1.	Thermodynamické disociační konstanty.....	21
2.2.	Určení počtu světlo-absorbujících částic .....	21
2.3.	Spektrofotometrie.....	24
2.3.1.	Regrese A-pH spekter .....	24
2.3.1.1.	Distribuční diagram.....	25
2.3.1.2.	Dekonvoluce absorbanční matice.....	25
2.3.1.3.	Stanovení protonačního modelu a kritérií věrohodnosti .....	25
2.4.	Potenciometrie.....	27
2.4.1.	Potenciometrická titrace .....	27
2.4.2.	Potenciometrické stanovení $pK_a$ .....	28
3.	Experimentální část.....	30
3.1.	Použité roztoky a chemikálie .....	30
3.2.	Standardizace odměrných roztoků .....	31
3.2.1.	Standardizace kyseliny chlorovodíkové, HCl .....	31
3.2.2.	Standardizace hydroxidu draselného, KOH .....	32
3.3.	Pístová mikrobyreta a její kalibrace.....	33

3.4.	Přístrojové vybavení.....	33
3.5.	Experimentální uspořádání.....	34
3.5.1.	Přístrojové uspořádání a postup spektrofotometrické titrace .....	34
3.5.2.	Přístrojové uspořádání a postup potenciometrické titrace.....	35
4.	Výsledky a jejich diskuze .....	36
4.1.	Predikce pK.....	36
4.2.	Analýza spekter .....	38
4.2.1.	Určení počtu světlo-absorbujících částic.....	39
4.2.2.	Výstavba protonačního modelu.....	40
4.2.3.	Rozdíl absorbancí ve spektrech.....	46
4.3.	Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant .....	48
4.4.	Analýza dat potenciometrické titrace.....	49
5.	Diskuse.....	53
6.	Závěr .....	54
7.	Použitá literatura .....	55

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1	Strukturní vzorec Ibrutinibu.....	15
Obr. 2	Strukturní spojení BTK s Ibrutinibem.....	19
Obr. 3	Kankareho metoda.....	23
Obr. 4	Experimentální uspořádání spektrofotometrické titrace.....	34
Obr. 5	Schéma možných protonačních center Ibrutinibu.....	36
Obr. 6	Fragmenty s predikovanými, literárními a experimentálními odhady $pK_a$ .....	37
Obr. 7	Stanovení počtu světlo-absorbujících částic.....	39
Obr. 8	Hledání protonačního modelu.....	41
Obr. 9	Reprodukovatelnost 25 <sup>0</sup> C.....	44
Obr. 10	Dekonvoluce naměřených spekter.....	45
Obr. 11	Rozdíl absorbancí ve spektrech Ibrutinibu.....	46
Obr. 12	Vliv iontové síly na protonaci chromoforů.....	47
Obr. 13	Stanovení thermodynamických disociačních konstant spektrofotometricky.....	49
Obr. 14	Stanovení thermodynamických disociačních konstant potenciometricky.....	51
Obr. 15	Potenciometrická titrace.....	52
Tabulka 1	Závislost pH standardizovaných pufrů na teplotě.....	30
Tabulka 2	Standardizace odměrného roztoku HCl.....	32
Tabulka 3	Standardizace odměrného roztoku KOH.....	32
Tabulka 4	Standardizace mikrobyret.....	33
Tabulka 5	Určení protonačního modelu.....	42

## **SEZNAM ZKRATEK**

BTK	Brutonova tyrosin kináza
CCL	Chronická lymfocytární leukémie
FA	Faktorová analýza
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IgM	Imunoglobulin třídy M
MCL	Lymfom z pláštěvých buněk
PCA	Analýza hlavních komponent

## 0. Úvod

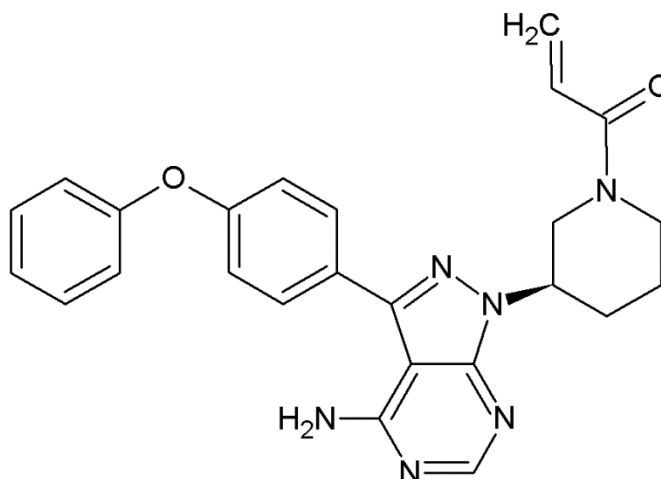
Úkolem mé diplomové práce bylo stanovit všechny disociační konstanty cytostatika Ibrutinibu spektrofotometricky i potenciometricky. Léčivo bylo dodáno společností ZENTIVA GROUP, a.s.(Praha) s deklarovanou čistotou nad 99% kontrolovanou metodou HPLC a s požadavkem na stanovení disociačních konstant, které dosud nebyly publikovány. Disociační konstanty léčiv jsou pro lékaře a farmaceuty významné veličiny při aplikaci medikamentu. Cytostatika jsou charakteristická svou acidobazicitou, která významně ovlivňuje jejich farmakologické vlastnosti. Disociační konstanta má vliv na ionizační stav molekuly a tím určuje výši vstřebávání léku přes střevní membrány. Bylo dokázáno, že kyseliny s hodnotami  $pK_a$  nižšími než 3 byly v zásaditém prostředí střev špatně vstřebávány [1, 2].

pH-potenciometrická titrace je považována za velmi dobrou metodu stanovení rovnovážných konstant roztoků dobře rozpustných sloučenin. [3]. Za alternativní metodu potenciometrické titrace je pokládána UV-VIS spektrofotometrická titrace, která je vysoce citlivá pro málo koncentrované roztoky [4].

# 1. Literární část

## 1.1. Ibrutinib

Ibrutinib neboli 1-[(3R)-3-[4-amin-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]-1-piperidinyl]-2-propen-1-on je farmakum, jehož sumární vzorec je  $C_{25}H_{24}N_6O_2$  a molekulová hmotnost činí 440.4971 g/mol. Tato sloučenina patří do skupiny organických molekul známých jako difenylethery. To jsou aromatické sloučeniny obsahující dvě benzenová jádra vzájemně propojených přes etherovou skupinu.



Obr. 1 Strukturní vzorec Ibrutinibu [7]

Na trhu lze najít Ibrutinib rovněž pod obchodními synonymy jako Imbruvica nebo PCI 32765. Ibrutinib je málo rozpustný ve vodě. Rozpouští se až v alkalických roztocích a také s rostoucí teplotou.

Ibrutinib byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2013 pro léčbu lymfomů z pláštěvých buněk a poté v únoru 2014 také pro léčbu chronické lymfocytární leukémie. Podává se rovněž pacientům trpícím Waldenströmovou makroglobulinémií [5].

### 1.1.1. Mechanismus účinku

Po navázání antigenu na B buněčný receptor lymfocytu se aktivuje mnoho signálních drah. B lymfocyty tím zahájí svou aktivaci, proliferaci a produkci protilátek. Jeden z hlavních enzymů těchto drah je Brutonova tyrosin kináza. Fosforylací této bílkoviny dojde k aktivaci fosfolipázy Cy2. Z důvodu její významné role v aktivaci B-lymfocytů bylo zjištěno, že hraje klíčovou roli v etiopatogenezi B-lymfoproliferativních onemocnění.

Ibrutinib (Imbruvica) je první perorální inhibitor Brutonovy tyrosin kinázy. Léčivo vytváří silnou kovalentní vazbu s cysteinovým zbytkem Cys 481 BTK, čímž zabraňuje její fosforylaci. V důsledku toho, dojde k blokaci přenosu signálů, a tím i k zabránění přežití a růstu maligních B lymfocytů. K celkové inhibici kinázy dochází při užití minimálně 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti [6].

### **1.1.2. Farmakokinetika**

Farmakum je po orálním podání absorbováno a eliminováno. Maximální koncentrace v plazmě dosahuje po 1-2 hodinách, s jídlem se jeho vstřebávání zvyšuje 2 krát až 4 krát. Kovalentní vazba na BTK umožňuje denní podávání [7].

Léčivo je metabolizováno především játry, vylučování ledvinami je minimální. V játrech je odbouráván hlavně cytochromem P450 [7, 8, 9].

### **1.1.3. Nežádoucí účinky**

Většina nežádoucích účinků se řadí mezi nezávažné komplikace 1. a 2. stupně. Jde o obtíže, které nevyžadují okamžité přerušení léčebného procesu tímto léčivem. Mezi běžné nežádoucí účinky zahrnujeme infekce horních cest dýchacích, pneumonie, nauzea a únava. Velmi vzácně se objevují komplikace 3. a 4. stupně, které jsou především hematologické, anémie, neutropenie a trombocytopenie. Mezi nehematologické se řadí zápal plic a infekční komplikace. Specifickými projevy léčby jsou lymfocytózy, fibrilace síní a krvácivé stavy, které jsou způsobeny blokadí Brutonovy tyrosin kinázy. Tyto komplikace ohrožují další pokračování v terapii. [6, 7].

### **1.1.4. Klinický význam**

#### **Ibrutinib a chronická lymfocytární leukémie (CCL)**

Chronická lymfocytární leukémie je hematologické onemocnění, které je založeno na klonální proliferaci maligně zvrhlých lymfocytů, ve většině případů se jedná o B-lymfocyty.

Tyto transformované krevní buňky nepodléhají programované buněčné smrti (apoptóze) tak rychle jako jejich zdravé protějšky. Z tohoto důvodu dojde k akumulaci nádorově zvrhlých lymfocytů v krvi, kostní dřeni a lymfatických orgánech (slezina, mízní uzliny). Postihuje zejména muže ve věku kolem 65 let, a proto je mužské pohlaví bráno za jeden z negativních prognostických faktorů [10].



Ibrutinib je prvním orálním kovalentním inhibitorem Brutonovy tyrosin kinázy, který byl schválen pro léčbu pacientů s chronickou lymfocytární leukémií, kteří již podstoupili alespoň jednu předchozí terapii a jako primární léčba pro pacienty s chromozomální delecí 17p13.1 [11].

Byla provedena studie s cílem vyhodnotit bezpečnost, účinnost, farmakokinetiku a farmakodynamiku léčiva Ibrutinib, cytostatika určeného pro léčbu B-buněčných nádorů u pacientů s relabující či refrakterní formou CLL. Do studie se zapojilo 85 pacientů, z nichž většina měla velice špatnou prognózu onemocnění. 51 pacientů užívala denně 420 mg tohoto cytostatika a 34 pacientů 840 g.

Výsledky léčby byly velice optimistické. Toxické účinky léčiva se týkaly převážně 1. a 2. stupně, které nezabránilly pacientům v dalším užívání léčiva. Bylo zjištěno, že rozdíly ve vedlejších účincích léčby podávání 420mg a 840 mg nebyly významné a celková míra přežití bez progresu byla stanovena na 83 %.

Bylo prokázáno, že terapie Ibrutinibem je spojena s dobrými výsledky především u rezistentních pacientů na jinou chemoterapii a u pacientů s genetickou zátěží [12].

### **Ibrutinib a lymfom z pláštěvých buněk (MCL)**

Zhruba jednu desetinu všech ne-Hodgkinových lymfomů tvoří lymfomy z pláštěvých buněk z ang. (MCL). Toto hematologické onemocnění je definováno jako neoplazie B-řady, která je charakteristická typickou morfologií lymfoidních buněk nesoucí chromozomální translokaci t(11, 14) (q13;q32) (1). Toto onkologické onemocnění postihuje více muže než ženy s mediánem výskytu kolem 60. roku života. Nemoc se diagnostikuje zpravidla až u jejích pokročilých stádií, která se projevuje infiltrací kostní dřeně a lymfadenopatií [13].

Studie prokázala, že Ibrutinib u pacientů s relabující či refrakterní formou lymfomů z pláštěvých buněk vykazuje vysokou míru odezvy dosahující až 68 % za poměrně krátkou dobu asi 17,5 měsíců. Údaje o toxicitě stanovují, že komplikace 3. a 4. stupně byly u léčby Ibrutinibem méně časté a závěrem lze říci, že Ibrutinib je vysoce účinné cytostatikum v monoterapii tohoto onemocnění. [14].

### **Ibrutinib a Waldenströmovou makroglobulinémií**

Waldenströmova makroglobulinémií je maligní mutací B-lymfocytů, která vyúsťuje ve vznik lymfoplazmocytních buněk, jenž produkují monoklonální imunoglobulin třídy IgM. Jedná se o hematologické onemocnění a řadí se mezi monoklonální gamapatie.

Klinicky se projevuje infiltrací kostní dřeně lymfoplazmatickými buňkami, chronickou únavou, osteolýzou a dalšími projevy způsobenými samotným monoklonálním imunoglobulinem IgM. Poprvé byla popsána v roce 1944 švédským lékařem Janem G. Waldenströmem, po kterém nese své označení [15].

Velmi častými mutacemi objevující se u Waldenströmovy makroglobulémie jsou mutace genu MYD88 a CXCR4, které pravděpodobně spouští růst nádorových buněk prostřednictvím Brutonovy tyrosin kinázy. Právě proto je inhibitor Brutonovy kinázy-Ibrutinib účinným v léčbě tohoto onkologického onemocnění. Ve studii, kde byla sledována terapeutická účinnost Ibrutinibu bylo sledováno 63 pacientů s tímto onemocněním. Bylo zjištěno, že léčba Ibrutinibem způsobila u pacientů významné snížení hladiny sérového imunoglobulinu IgM a u žádného z pacientů nedošlo během léčby k jeho opětovnému navýšení. Střední dobou alespoň minimální reakce byly 4 týdny a velmi dobrých léčebných odpovědí bylo dosaženo u většiny pacientů.

Vedlejší účinky léčení zahrnovaly komplikace 2. stupně, neutropenie se objevila u 22 % pacientů a trombocytopenie u 14 %.

Celkově lze doložit, že nežádoucí účinky byly mírné a léčivo Ibrutinib dosahuje velmi dobrých výsledků u nemocných trpících Waldenströmovou makroglobulinémií a je jeden z hlavních léků užívajících se u tohoto typu onemocnění krve [16].

Ibrutinib (PCI 32765) je silný selektivní inhibitor Brutonovy tyrosin kinázy, který má velmi dobré výsledky v léčbě B buněčných malignit. Jedná se léčivo s protinádorovou aktivitou, které představuje dobrou alternativu léčebných postupů zlepšující prognózu průměrné délky pacienta. Výzkum prokázal podstatný klinický přínos u lidí trpících hematoonkologickým onemocněním, zejména u Waldenströmovou makroglobulinémiie, lymfomu z plášťových buněk a chronické lymfocytární leukémie. V budoucnu se bude studovat efekt Ibrutinibu v kombinaci se stávajícími i novými léčivými přípravky u relapsů onemocnění [17]. U většiny těchto chorob se ovšem objevuje u některých rezistentních pacientů nízká léčebná odpověď. Jednotlivé rezistence vůči Ibrutinibu jsou popsány níže.

### **1.1.5. Rezistence**

S rezistencí na léčbu protinádorového léčivého přípravku Ibrutinib (Imbruvica) se setkáváme u čím dál většího procenta léčených pacientů. Příčin může být mnoho, nejvýznamnější z nich budou v dalších řádcích uvedeny.

Rezistenci můžeme rozdělovat na dva typy: primární a sekundární, přičemž s primární se setkáváme častěji, asi u 13-43 % léčených pacientů [12, 18], zatímco sekundární postihuje kolem 30 % nemocných [19]. Důvodem rezistence vůči Imbruvici jsou pravděpodobně mutace v kinázách signálních drah MAPK, PI3K [20].

### Rezistence Ibrutinibu u chronické lymfocytární leukémie

Výzkumné studie ukazují, že Ibrutinib, inhibitor, který se váže kovalentně na C481 vazebné místo BTK, disponuje překvapivými léčebnými odpověďmi. U pacientů s relabující formou chronické lymfocytární leukémie dochází u 5.3 % k primární rezistenci na léčbu. Mechanismus rezistence je do značné míry neznámý, ovšem klíčovým místem se zdá mutace na úrovni právě zmíněného spojení cysteinu C481S se serinem ve vazebném místě BTK, kde se protinádorové léčivo váže [21].

### Rezistence Ibrutinibu u lymfomu z pláštěvých buněk

Inhibitor Brutonovy tyrosin kinázy má až 70% pozitivních léčebných odpovědí u nemocných trpících lymfomem z pláštěvých buněk. Je tedy zřejmé, že 30 % pacientů je k léčbě Ibrutinibem nějakým způsobem nereagujících. Primární rezistence je způsobená pravděpodobně aktivací neklasické NFκB cesty a sekundární rezistence již zmíněné mutace vazebného místa BTK C481S pro léčivo.



Obr. 2 Strukturální spojení BTK s Ibrutinibem [21]

Některé studie se zaměřily na využití inhibice proteinu Hsp90, který dokáže tuto rezistenci „překonat.“ Inhibice Hsp90 dokáže zprostředkovat indukci degradace Brutonovy tyrosin kinázy a IκB kinázy α u refrakterních buněk a CD40 dependentních B lymfocytů, což způsobí inhibici nežádoucí neklasické NFκB signalizace [22].

## **Rezistence Ibrutinibu u Waldenströmovy makroglobulinémie**

Waldenströmová makroglobulinémie je onemocnění krve, které označuje maligní mutaci B-lymfocytů. Důsledkem je kromě jiného rovněž produkce monoklonálního makroglobulinu (IgM), který produkuje patologická populace plasmatických buněk [23]. Sekvenováním genomu u lidí trpící tímto hematologickým onemocněním byla u většiny pacientů zjištěna somatická mutace L265P v genu MyD88.

Tato mutace způsobuje záměnu aminokyseliny leucinu L na pozici 265 za aminokyselinu prolinu P aminokyselinovém řetězci. Další mutací, která se často objevuje u Waldenströmovy makroglobulinémie je v genu CXCR4, která způsobuje změny v receptoru CXCR4, který tento gen kóduje. Tento receptor zastává významnou roli na povrchu buňky, kde zprostředkovává přenos informací dovnitř buňky. Lidé s tímto onemocněním, kteří jsou navíc zasaženi těmito mutacemi, mají zpravidla horší prognózu. U pacientů s mutací v genu CXCR4 dochází častěji k rezistenci na léčebný přípravek Ibrutinib [24, 25].

## 2. Teoretická část

### 2.1. Thermodynamické disociační konstanty

Disociační konstanta kyseliny či disociační konstanta báze jsou rovnovážnými konstantami, které vystihují protolytickou rovnováhu. Protolytické (acidobazické) reakce jsou reakce spojené s výměnou protonů. K ustanovení této rovnováhy dochází v případě, když v roztoku dojde k disociaci kyseliny či zásady. K tomuto štěpení látky nejčastěji dosáhneme jejím rozpuštěním ve vodném roztoku.

Sílu kyselin, tedy její aciditu lze usuzovat z hodnoty rovnovážné disociační konstanty ( $K_A$ ), mírou síly zásady je disociační konstanta bazicity ( $K_B$ ). Tyto hodnoty jsou tabelovány a slouží ke klasifikaci těchto chemických látek. Pro některé kyseliny či báze jsou hodnoty disociačních konstant velice nízké, proto se v praxi uvádí jako pK, což je záporný dekadický logaritmus K. Při převedení hodnot disociačních konstant na pK<sub>A</sub> pro kyseliny a na pK<sub>B</sub> pro zásady platí, že nízké pK patří k silné kyselině či zásadě a naopak. Disociační konstanty lze stanovit pomocí analytických metod UV-VIS spektrofotometrie, pH potenciometrické titrace a dalších.

Z definice rovnovážné konstanty a aktivitního koeficientu lze vyjádřit vztah závislosti smíšené rovnovážné konstanty pK na iontové síle. Tento vztah označujeme jako rozšířený Debey-Hückelový zákon

$$\log K_{1r,smíš} = \log K_{1r}^T - \frac{A(z_+z_-)\sqrt{I}}{1+Ba^\circ\sqrt{I}} + Cl \quad (1)$$

Ve velmi zředěných roztocích, kde ( $I \leq 0.1$ ) lze tato závislost smíšené disociační konstanty na iontové síle redukovat na tzv. zkrácenou Debey-Hückelovu rovnici,

$$\log K_{1r,smíš} = \log K_{1r}^T - \frac{A(z_+z_-)\sqrt{I}}{1+Ba^\circ\sqrt{I}} \quad (2)$$

[26]

### 2.2. Určení počtu světlo-absorbujících částic

Pro určení světlo absorbujících částic je možno použít metodu analýzy hlavních komponent (PCA) nebo faktorové analýzy (FA). Tato metoda je jednou z nejčastěji využívaných metod vícerozměrné statistické analýzy dat a umožňuje i analýzu spektrofotometrických dat. Cílem PCA nebo FA je určení počtu tzv. latentních proměnných, které popisují variabilitu datové matice  $A$  o  $l$  řádcích a  $m$  sloupcích, kde  $l$  řádků zde popisuje jednotlivá naměřená spektra a  $m$  sloupce zobrazují příslušné vlnové délky.

Datová matice by však neměla být zatížena experimentální chybou. Počet statisticky významných latentních proměnných absorbanční matice  $A$  určuje počet světlo- absorbujičích částic.

Prvním bodem analýzy dat pomocí metody PCA je rozklad absorbanční matice  $A$  o  $n$  řádcích a  $k$  sloupcích na součin matic  $T$  a  $P^T$  a matici nepopsané variability  $E$  dle rovnice

$$A = TP^T + E \quad (3)$$

Kde  $T$  je matice latentních proměnných o rozměrech  $n \times k$  (sloupcové vektory, které značí hlavní komponenty), matice  $P$  je matice zátěží o rozměrech  $n \times k$ , kde  $k$  jsou sloupcové vektory určující míru příspěvku jednotlivých latentních proměnných k variabilitě absorbanční matice [27, 28, 29].

### **Určení počtu světlo-absorbujících částic faktorovou analýzou**

Znalost počtu světlo-absorbujících částic je potřebná pro návrh protonačního modelu, na jehož základě se nelineární regresí programy REACTLAB [30] A SQUAD 84 [31, 32, 33] stanovují odhady protonačních konstant a molárních absorpčních koeficientů.

Pro studium disociačních konstant léčiv a jejich protonačních rovnováh spektrofotometrickou titrací mnoha vlnových délek je velice důležité určit počet přítomných chromoforů ve zkoumaném roztoku. Prvním bodem pro stanovení disociačních konstant léčiva Ibrutinibu je výpočet světlo-absorbujících částic v rovnovážné směsi.

K určení počtu světlo-absorbujících částic v rovnovážné směsi je vhodné využít některých metod faktorové analýzy. V programu S-PLUS byl na pracovišti vytvořen algoritmus INDICES [34]. Tento program poskytuje 12 metod faktorové analýzy. Faktorová analýza je metoda statistického zpracování dat, která umožňuje zjednodušení a redukci velkého množství původních proměnných.

Redukcí rozumíme náhradu původních znaků novými proměnnými-faktory. Porovnáním výsledků těchto metod lze stanovit finální počet světlo-absorbujících částic v roztoku.

Prvním grafickým výstupem metody faktorové analýzy FA je Cattelův graf úpatí vlastních čísel, kde je zřejmá závislost vypočtené funkce  $f(k)$  na počtu komponent  $k$ . Pro přesnější vyhodnocení zlomu na křivce se vynáší závislost počtu komponent  $k$  proti dekadickému logaritmu vypočtené funkce  $f(k)$ . U většiny metod faktorové analýzy je determinujícím kritériem zlom na křivce [34].

## Metody faktorové analýzy

Z velmi mnoha metod faktorové analýzy bylo nutné zjistit, které jsou nejpříjemnější pro analýzu spekter za účelem určení počtu přítomných barevných částic v roztoku. K určení latentních proměnných  $k$  lze rozdělit metody dle jejich kritérií pro stanovení:

- A. Dle zlomu na křivce: Catellův graf úpatí vlastních čísel.
- B. Dle reziduálové směrodatné odchylky: Precizní metody.
- C. Dle testačních kritérií: Aproximativní (přibližné) metody.
- D. Dle druhé derivace, třetí derivace, resp. poměr derivací.

### Precizní metody

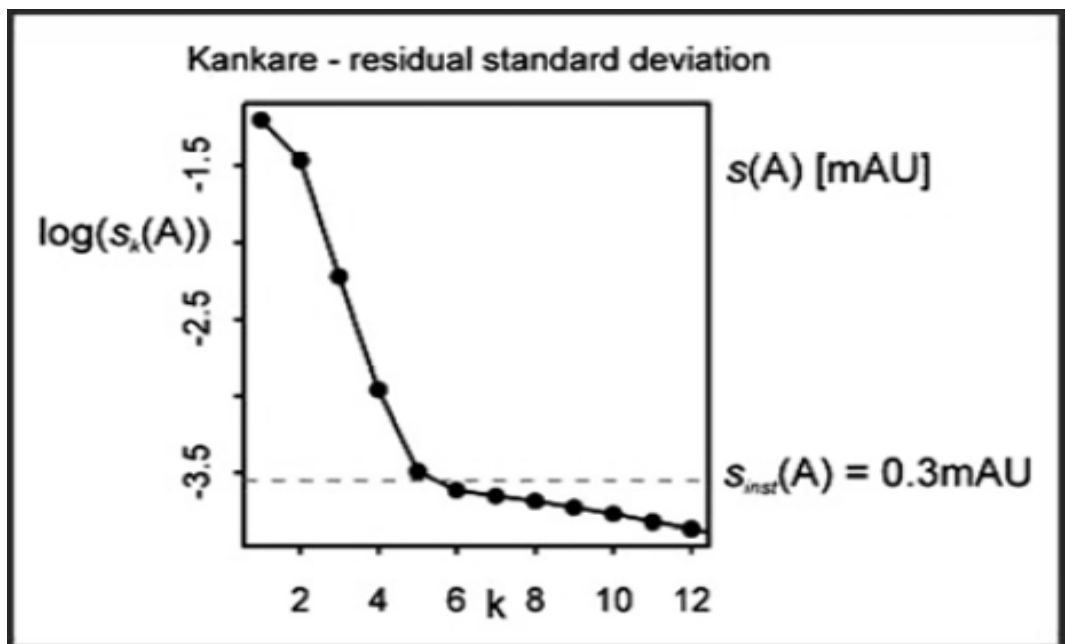
#### Kankareho reziduálová směrodatná odchylka absorbance $s_k(A)$

Prvky matice jsou zatíženy šumem, jenž je dán hodnotou instrumentální chyby přístroje  $s_{inst}(A)$ . Výsledná reziduálová směrodatná odchylka je v závislosti na počtu latentních proměnných  $k$  všech vybraných metod vynesena do Catellova grafu, kde instrumentální odchylka přístroje  $s_{inst}(A)$  tvoří segment na ose vlastních čísel.

Pro Kankareho- Wernimontovu metodu platí:

$$s_k(A) = f(k) \quad (4)$$

Jako stanovovaný počet latentních proměnných se přijme taková hodnota  $k$ , při které  $s_k$  nejlépe aproximuje  $s_{inst}$ .



Obr. 3 Kankareho metoda [35]

Výpočet Kankareho reziduální směrodatná odchylky vychází z druhého momentu dané absorbanční matice o rozměrech  $k$  (počet spekter) a  $m$  (počet vlnových délek a lze vypočítat z následujícího vzorce, kde  $M$  je  $tr(M)$  je stopa matice  $M$ ,  $M$  je druhý moment matice,  $A$  je absorbanční matice,  $k$  je počet latentních proměnných shodný s počtem barevných částic v roztoku.

$$M = \frac{1}{n} A^T A \quad (5)$$

$$s_k(A) = \sqrt{\frac{tr(M) - \sum_{a=1}^k r_a}{M-k}} \quad (6)$$

[34,36,41]

## 2.3. Spektrofotometrie

Pomocí nelineární regrese jsou hledány nejlepší odhady parametrů  $\beta$  účelové funkce  $y = (x, \beta) + e$ . Hodnotám nezávisle proměnných  $x$ , které jsou konstantní a pevně určeny experimentátorem, odpovídají vlnové délky nebo přídavky titrantu do titrovaného roztoku titrandu. Pro tyto proměnné jsou monitorována experimentální data závislé proměnné  $y$  absorbance, které jsou zatíženy náhodnou chybou  $\epsilon$ . Výhodou nelineární regrese je modelace obtížných reálných dějů a predikce požadovaných parametrů.

Vypočtenou regresní křivkou spektra jsou proložena naměřená experimentální data absorbance a potom je posuzována těsnost proložení, která značí míru shodnosti vypočtených a naměřených dat a vypovídá tím také o věrohodnosti nalezených odhadů hledaných parametrů. Vyčíslené parametry  $\beta$  jsou dále analyzovány řadou diagnostik, které rovněž vypovídají o správnosti experimentálních dat a statistické významnosti navrženého modelu.

### 2.3.1. Regrese A-pH spekter

A-pH spektra jsou studována za účelem stanovení počtu světlo-absorbujících částic a jejich molárních absorpčních koeficientů, vedoucí k určení co nejpřesnějších odhadů disociačních konstant  $pK_a$ . V literatuře nejpoužívanějšími a nejvýznamnějšími regresními programy regresní analýzy spekter v rovnováhách v roztocích jsou SQUAD84 a REACTLAB nebo jeho předchozí verze SPECFIT [37]. Nelineární regresí analyzují danou absorbanční matici a poskytují hledané odhady neznámých parametrů navržené hypotézy regresního protonačního modelu.



K nalezení nejlepších odhadů hledaných parametrů jako jsou disociační konstanty a molární absorpční koeficienty lze dojít právě analýzou naměřených absorbančních responzních matic programy REACTLAB A SQUAD 84 prostřednictvím těchto informací:

#### **2.3.1.1. Distribuční diagram**

Distribuční diagram znázorňuje relativní koncentrační zastoupení všech různě protonovaných částic v závislosti na pH a poskytuje specifický obraz protonačního modelu. To umožňuje chemický výklad navrhovaného chemického modelu, provádět jeho opravu a interpretovat příspěvky majoritních i minoritních složek rovnovážné směsi. Rovněž odhaluje procentuální zastoupení částic rovnovážné směsi roztoku při daném pH.

#### **2.3.1.2. Dekonvoluce absorbanční matice**

Rozklad každého experimentálního spektra do spekter jednotlivých částic ukazuje, zda je navržený experimentální rozsah přijatelný. Dekonvoluce rozloží každé naměřené spektrum do absorpčních příspěvků jednotlivých chromoforů v roztoku. Zobrazuje, jaké jednotlivé protonované částice přispívají pro různá pH do finálního výsledku naměřeného spektra. Pásky jednotlivých částic jsou vektorově analyzovány a upravovány. Cílem je vytvořit výsledné spektrum absorpčních pásek rozličně protonovaných částic pro vybrané pH.

#### **2.3.1.3. Stanovení protonačního modelu a kritérií věrohodnosti**

Dle Brønsted-Lowryho teorie může v roztoku docházet k výměně protonu mezi kyselinou a zásadou, tedy může docházet k disociaci či protonaci dané molekuly. Pokud uvažujeme protonační ustanovování postupných rovnováh mezi protonem H a aniontem L (náboje jsou pro názornost vynechány), mohou vznikat rozličně protonované částice L, LH, LH<sub>2</sub>, LH<sub>3</sub>... atd., obecně LH<sub>p</sub>, které vedou k určení protonační konstanty β<sub>p</sub> [38].

Disociace molekuly při konstantní iontové síle je definována smíšenou disociační konstantou ve tvaru:

$$K_{a,j} = \frac{LH_{j-1}}{LH_j} \quad (7)$$

Stanovení protonačního modelu umožňují programy REACTLAB A SQUAD84, které vychází z Bougert -Lambert Beerova zákona, kdy pro absorbanci  $A_{ij}$   $j$ -tého roztoku při  $i$ -té vlnové délce platí:

$$A_{ij} = \sum_p \varepsilon_{p,i} * \beta_p [H]^p [L] \quad (8)$$

kde  $A_j$  je absorbance  $j$ -tého roztoku při  $i$ -té vlnové délce a při jednotkové délce kyvety. Vstupními daty pro REACTLAB i SQUAD84 je naměřená absorbanční matice, koncentrace komponent H a L, navrhovaný počet světlo-absorbujících částic a jejich stechiometrie. Pomocí těchto informací jsou oba programy schopny využitím nelineární regrese minimalizací účelové funkce  $U = \sum \sum (A_{i,j,exp} - A_{i,j,vyp})^2$  stanovovat nejlepší odhady protonačních konstant  $\beta_p$  a hodnoty molárních absorpčních koeficientů  $\varepsilon_{p,i}$ .

Vyhodnocením UV-VIS spektrofotometrické titrace na rozdíl od jiných metod je umožněno stanovení odhadů protonačních konstant a nalézt zásadní informace o rozličně protonovaných chromoforech v molekule. Programy REACTLAB a SQUAD84 lze též vyčíslit rovnovážné koncentrace pro jednotlivé složky. Věrohodnost nalezeného protonačního modelu je ovšem třeba prověřit několika dokazujícími diagnostikami:

- A) První diagnostika dokazuje fyzikální smysl parametrů  $s(\beta_p)$  a  $s(\varepsilon_{p,i})$ , které musí být nezáporné a jejich směrodatné odchylky musí být malé v požadované toleranci náhodných chyb měření. Tato diagnostika umožňuje prokázat navrženou hypotézu dobře podmíněného protonačního modelu.
- B) Těsnost proložení spekter vyjadřuje míru shody proložení experimentálních a vypočtených spekter a rovněž potvrzuje správnost navržené hypotézy protonačního modelu [38,39].

### **Program REACTLAB**

Je software pracující na soft modelingové metodě, která nevyžaduje pevně zadaný protonační model. Program nabízí rovněž počet chromoforů v roztoku faktorovou analýzou a především umožňuje nalézt odhady protonačních konstant a molárních absorpčních koeficientů.

### **Program SQUAD 84**

SQUAD84 nabízí stejné výsledky jako předešlý REACTLAB a navíc provádí dokonalou statistickou analýzu reziduí, čímž prokazuje těsností proložení věrohodnost nalezených odhadů reziduí.

Analýza reziduí nabízí především *Aritmetický průměr reziduí*  $E(e)$ , který by měl být co nejnižší a blížit se k nulovým hodnotám, dále *průměrné reziduuum*  $E(e)$  a *směrodatnou odchylku predikované absorbance*  $s(A)$ , která by měla být v ideálním případě blízka velikosti šumu  $s(\epsilon)$ . Hamiltonův R-faktor odhaluje správně navržený protonační model, pokud je jeho hodnota menší než 0,5%.

Program pracuje v systému MS-DOS a má oproti REACTLABU náročnější vkládání dat a požaduje detailnější popis problematiky, aby proběhla správná regresní analýza experimentálních dat.

Jde o hard-modelingový program s pevně zadaným chemickým modelem. Nelineární regresí metodou nejmenších čtverců determinuje a zjemňuje nadefinované parametry (disociační konstanty, stechiometrické koeficienty) [40,41].

## 2.4. Potenciometrie

### 2.4.1. Potenciometrická titrace

Potenciometrické měření pH se řadí mezi elektrochemické metody, jejichž podstatou je měření rovnovážného napětí galvanického článku. Tento článek se skládá vždy ze 2 elektrod, měrné (indikační) a referentní (srovnávací.). V praxi se jako srovnávací elektroda nejčastěji aplikuje argentchloridová elektroda, jejíž potenciál je známý a je dokonale konstantní. Potenciál měrné elektrody (nejčastěji skleněné) se mění s jednotlivými pH, tedy s koncentrací stanovovaného protonu. Rozdíl těchto dvou potenciálů odpovídá rovnovážnému napětí, které je mírou koncentrace sledované látky. Galvaniho potenciál [42] závisí na potenciálu obou elektrod, a jejich rozdíl označujeme jako elektrodové napětí. Elektrodový potenciál je definován Nernstovou rovnicí odvozenou ze vztahu:

$$E = \Delta\varphi_1 - \Delta\varphi_2 \quad (9)$$

$$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 = \frac{u_i^0 - u_2^0}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} * \ln \frac{a_{i(1)}}{a_{i(2)}} \quad (10)$$

pokud  $\varphi_2$  je považován za srovnávací a budeme k němu vztahovat všechny elektronové potenciály  $\varphi_2$ , pak je možné  $\varphi_2$  zvolit nulový a  $\varphi_1$  pak můžeme nahradit symbolem E-potenciál elektrody a výraz:

$$\frac{\mu_{i(1)}^0 - \mu_{i(2)}^0}{z_i F} \quad (11)$$

Označíme-li  $E^0$  jako standardní elektroodový potenciál paka finální Nernstovu rovnici [42] získáme ve tvaru

$$E = E_{\frac{iont(l)}{kov(z)}}^0 + \frac{RT}{nF} * \ln a_{iont(l)} \quad (12)$$

kde  $E$  je napětí článku, která je složen ze dvou elektrod (měrné a srovnávací),  $E^0$  je standardní elektroodový potenciál poločlánkové reakce,  $R$  je molární plynová konstanta (8.314 J/K.mol),  $F$  je Faradayova konstanta (96 485 C/mol),  $n$  je počet vyměněných elektronů,  $T$  je teplota v kelvinech,  $a$  je aktivita jednotlivých složek reakce.

Elektroodový potenciál můžeme též vyjádřit jako rozdíl standardního elektroodového potenciálu skleněné elektrody a záporného dekadického logaritmu aktivity vodíkových kationtů resp. pH

ve tvaru: 
$$E = E^o - S * pH = E^o + S * \log a_{H^+} \quad (13)$$

Vedle spektrofotometrického stanovení disociačních konstant studovaných drog je za druhou vhodnou nezávislou metodou považována pH potenciometrická titrace, která ovšem neposkytuje informace a přítomných chromoforech v roztoku.

#### 2.4.2. Potenciometrické stanovení $pK_a$

Program ESAB [43, 44] pracuje na principu nelineární regrese a pomocí minimalizace účelové funkce metody nejmenších čtverců prokládá experimentální data křivkou tak, aby bylo dosaženo co nejtěsnější proložení experimentálními daty. Primární data jsou vkládána do software, což jsou přídatky titračního činidla, naměřené hodnoty pH, koncentrace léčiva na počátku titrace a koncentrace  $H^+$  na počátku titrace. Minimalizací reziduálního součtu čtverců hodnot pH jsou cílové parametry čili disociační konstanty postupně zjemňovány až do velmi malých hodnot reziduálních odchylek, blízcích se nule. Účelovou funkci lze popsat rovnicí

$$U = \sum_{i=1}^n w_i (V_{T,i} - V_{T,vypr,i})^2 = \sum_{i=1}^n w_i \cdot \hat{\epsilon}_{j,i}^2 \quad (14)$$

kde  $w_i$  je statistická váha, která je zpravidla rovna jedné avšak v programu ESAB je vyčíslena pomocí rovnice o propagaci chyb ve tvaru:

$$\frac{1}{w_i} = s_i^2 = s_E^2 + \left[ \frac{dE_i}{dV_i} \right]^2 \cdot s_v^2 \quad (15)$$

V běžném experimentu je obecně  $s_E = 0.01$  jednotky pH a  $s_v = 0.0001 \text{ cm}^3$ , kde  $V_{T, i}$  je počáteční objem titrované látky,  $V_{T, \text{vyp}, i}$  je vypočítaný objem,  $\hat{e}_v^2$  je čtverec reziduí,  $\hat{e}_v^2$  kde je minimální vzdálenost k nejlepší regresní křivce. Odchytky reziduí lze vypočítat dle rovnice  $e_i = (V_{\text{exp}, i} - V_{\text{vyp}, i})$  uvedené v rovnici účelové funkce.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité roztoky a chemikálie

**Hydroxid draselný, KOH (1 M):** V 1 litru redestilované vody, která byla 30 minut probublávána inertním plynem argonem, byla rozpuštěna navážka pevného KOH (Aldrich Chemical Company, USA). Připravený 1M roztok byl ponecháván po celou dobu výzkumu v polyethylenové nádobě, jež byla umístěna v exikátoru v argonové atmosféře. Standardizace 1M KOH se uskutečnila pomocí pH potenciometrické titrace standardizovanou kyselinou chlorovodíkovou.

**Kyselina chlorovodíková, HCl (1M):** Ředěním koncentrované kyseliny chlorovodíkové (p.a. Lachema Brno) byl připraven 1M roztok. Její standardizace byla provedena acidobazickou potenciometrickou titrací na navážku pevného oxidu rtuťnatého za přítomnosti nadbytečného množství jodidu draselného a za neustálého probublávání argonem.

**Oxid rtuťnatý, HgO** (p.a. Lachema Brno) a **jodid draselný, KI** (p.a. Lachema Brno) byly využity pro standardizaci 1M roztoku HCl.

**Chlorid draselný, KCl (2 M)** Roztok byl připraven rozpuštěním navážky pevného KCl (p.a. Lachema Brno) ve vypočteném množství redestilované vody. Roztok 2M chloridu draselného byl přidáván do zkoumaného roztoku pro nastavení příslušné iontové síly.

**Fosfátový pufr** Byl připraven fosfátový pufr o  $c = 0.1 \text{ mol/l}$ , které byl využíván pro udržení pH roztoku při experimentálních měřeních.

#### Standardní komerční pufrы

Tabulka 1. Závislost pH standardizovaných pufrů na teplotě

T [°C ]	1	2	3
25	4.006	6.865	9.180
37	4.024	6.841	9.088

Puf 1 : roztok ftalanu draselného

Puf 2 :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$

Puf 3 : roztok Boraxu a NaOH

### **Redestilovaná voda**

Byla opatřena destilací deionizované vody a odebrána z centrální ionexové úpravny. Byla využita pro přípravu všech uvedených roztoků ale i roztoků jednotlivých měření.

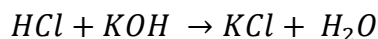
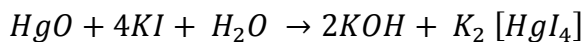
### **Léčivo: Ibrutinib (*Imbruvica*)**

Léčivo Ibrutinib bylo dodáno společností Zentiva Group a.s (Praha) s deklarovanou čistotou nad 99% kontrolovanou metodou HPLC. Léčivo bylo rozpuštěno v alkalických vodných roztocích a krátké homogenizaci v digitální ultrazvukové lázni. Koncentrace roztoku léčiva pro potenciometrii se pohybovala okolo  $5 \times 10^{-4}$  mol/l, zatímco pro spektrofotometrickou titraci asi  $5.8 \times 10^{-5}$  mol/l.

## **3.2. Standardizace odměrných roztoků**

### **3.2.1. Standardizace kyseliny chlorovodíkové, HCl**

Do 25 ml redestilované vody, která byla 30 minut probublávána argonem, byl přidán 1 g KI, který byl zcela rozpuštěn a vypočtená navážka HgO na teoretickou spotřebu kyseliny chlorovodíkové 250  $\mu\text{l}$ . Celý objem roztoku byl převeden do měřicí nádoby a za intenzivního míchání a probublávání inertním plynem (argonem) byl titrován připraveným standardním roztokem HCl. Standardní roztok kyseliny chlorovodíkové byl přidáván z pístové mikrobyrety a bylo sledováno měnění se rovnovážné napětí resp. pH na pH metru. V roztoku probíhaly následující chemické reakce:



Bod ekvivalence byl určen metodou druhé derivace. Standardizace kyseliny chlorovodíkové byla 4x zopakována a aritmetický průměr vypočtených koncentrací se rovná 1.04417 mol/l.

Tab. 2 Standardizace odměrného roztoku HCl

Číslo opakované standardizace	Navážka HgO [ g ]	Spotřeba HCl [μl]	Koncentrace HCl, c = [mol/l]
1.	0.0272	242.219	1.0369
2.	0.0274	243.712	1.0382
3.	0.0276	243.712	1.0457
4.	0.0277	242.219	1.0559
<b>Aritmetický průměr [g/mol]</b>	<b>1.04417</b>		

### 3.2.2. Standardizace hydroxidu draselného, KOH

pH potenciometrickou titrací na standardizovanou HCl byla určena přesná koncentrace KOH. Standardizace byla provedena 4 krát při teplotě 25<sup>0</sup>C. Do měřicí nádoby bylo umístěno 15 ml redestilované vody předem 30 minut probublávané argonem. K roztoku bylo přidáno 250 μl standardizované kyseliny chlorovodíkové z pístové mikrobyrety. Roztok byl titrován za stálého míchání připraveným roztokem hydroxidu draselného přidávaného rovněž z mikrobyrety a po každém přidavku byla zaznamenána změna rovnovážného napětí (pH). Bod ekvivalence byl obdobně jako u předchozí standardizace stanoven metodou druhé derivace. Byl vypočten aritmetický průměr koncentrací získaných 3 titracemi a stanoven jako c= 0.81387 mol/l.

Tab. 3 Standardizace odměrného roztoku KOH

Číslo opakované standardizace	Spotřeba KOH [μl]	Spotřeba HCl [μl]	Koncentrace HCl, c = [mol/l]
1.	318.713	250	0.8125
2.	316.722	250	0.8203
3.	321.209	250	0.8088
<b>Aritmetický průměr [g/mol]</b>	<b>0.81387</b>		



### 3.3. Pístová mikrobyreta a její kalibrace

Pístová mikrobyreta se používá pro přesné dávkování anorganických roztoků (HCl, NaOH, KOH apod.) nebo jiných organických látek. Chyba dávkování mikrobyreta se odhaduje menší než 0.02 %.

Mikrobyreta byly před experimentem řádně kalibrována a to tak, že se vážila redestilovaná voda po úpravě argonem vytlačena mikrobyretou do skleněné váženky. Vypočet vytlačeného objemu vody mikrobyretou byl korigován vzhledem k její teplotě.

Tab. 4 Standardizace mikrobyret

<b>Rožtok v mikrobyretě</b>	<b>HCl</b>	<b>KOH</b>
<b>Teoretický objem [ml]</b>	1.250	1.250
<b>Skutečný objem [ml]</b>	1.247	1.181
<b>Směrodatná odchylka [<math>\mu</math>l]</b>	0.44	0.36

### 3.4. Přístrojové vybavení

#### Standartní pH kombinovaná elektroda

pH kombinovaná elektroda THETA '90 je prvotně určena pro přesná nepřetržitá měření. Kombinují měrnou pH skleněnou elektrodu a referentní argentchloridovou elektrodu v jednom těle, od měřeného roztoku je dělí pouze diafragma v podobě keramické frity. Uchovávacím roztokem pro tuto elektrodu byl rožtok značený (THETA '90). Největší výhodou této elektrody je vysoká stabilita daných parametrů.

#### Termostat (Julabo, model series ED-5)

Tento model je vhodný pro základní a rutinní aplikace. Otevřená vana umožňuje vnitřní i vnější použití. Výhodou je přesné nastavení teploty s krokem 0.1 °C , která lze uložit a po každém spuštění se automaticky přepne na žádanou teplotu.

## Digitální pH- metr: typ HI 3220 HANA

Tento pH metr je využit pro měření rovnovážného napětí v rozsahu  $\pm 2000.00$  mV (pH -2 až 20) a rozsahu teplot -20 až 100 °C. Přesnost jednotlivých experimentů je okolo 0.2 mV. Před každým měřením byla provedena tři bodová kalibrace pH kombinované elektrody THETA '90 prostřednictvím standartních komerčních pufrů a nastavena tak Nernstovská směrnice.

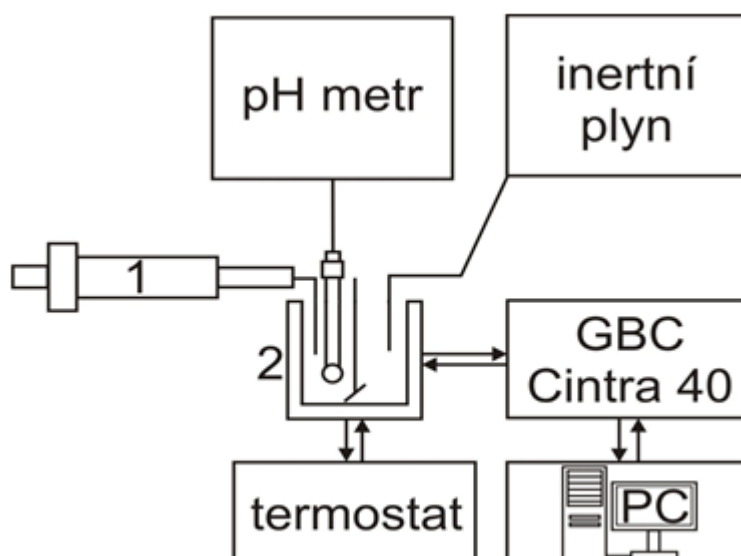
## Spektrofotometr GBC Cintra 40

Zdrojem záření spektrofotometru pro viditelnou oblast je wolfram-halogenová lampa o výkonu 50W a pro ultrafialovou oblast deuterová lampa o výkonu 30W. Rozsah měření vlnových délek je 200-800nm a šířka štěrbin je udávána jako 0.5nm. Při absorbanci  $A=1$  je šum toho spektrofotometru pod hranicí 0.0001. Významná je rovněž rychlost měření, která je stanovena v rozmezí 5-7000nm.min<sup>-1</sup>.

### 3.5.Experimentální uspořádání

#### 3.5.1. Přístrojové uspořádání a postup spektrofotometrické titrace

Při měření A-pH spekter u spektrofotometrické titrace byla využita pro měření rovnovážného napětí kombinovaná skleněná elektroda THETA '90 připojena k digitálnímu pH -metru typ HI 3220 HANA. Před každým měřením byla provedena tři-bodová kalibrace této elektrody pomocí tří komerčních pufrů pro 25<sup>0</sup>C (4.006; 6.865; 9.180) a pro 37<sup>0</sup>C (4.024; 6.841; 9.088).



Obr. 4 Experimentální uspořádání spektrofotometrické titrace [35]

Do termostátového reaktorku, který byl řádně vmyt a vysušen, bylo odpipetováno 20 ml roztoku léčiva o příslušné koncentraci, který byl temperován na 25<sup>0</sup>C či 37<sup>0</sup>C. Do roztoku bylo přidáváno příslušné množství pufrů pro udržení pH, KCl pro nastavení příslušné iontové síly. Roztok byl po celou dobu analýzy intenzivně míchán elektrickým míchadlem a probubláván argonem nad hladinou roztoku pro odstranění veškerého množství oxidu uhličitého.

Následně byla na spektrofotometru GBC Cintra 40 nastavena base-line redestilovanou vodou. Po ustálení pH (resp. rovnováhy) roztoku bylo proměřeno počáteční spektrum a odečteno příslušné pH na pH-metru. Poté byly pomocí pístových mikrobyret dávkovány přídavky (HCl, KOH) do roztoku. Po každém přídavku bylo po homogenizaci roztoku ustálení rovnováhy proměřeno dané spektrum a odečteno příslušné pH. Tento postup byl neustále opakován až do proměření celé titrační křivky. V průběhu titrace byla neustále sledována teplota na digitálním termostatu (JULABO) ED-5 v rozmezí 25<sup>0</sup>C±0.1<sup>0</sup>C a 37<sup>0</sup>C±0.1<sup>0</sup>C. Po ukončení titrace byla data uložena a celé spektrum bylo podrobena podrobné analýze.

### **3.5.2. Přístrojové uspořádání a postup potenciometrické titrace**

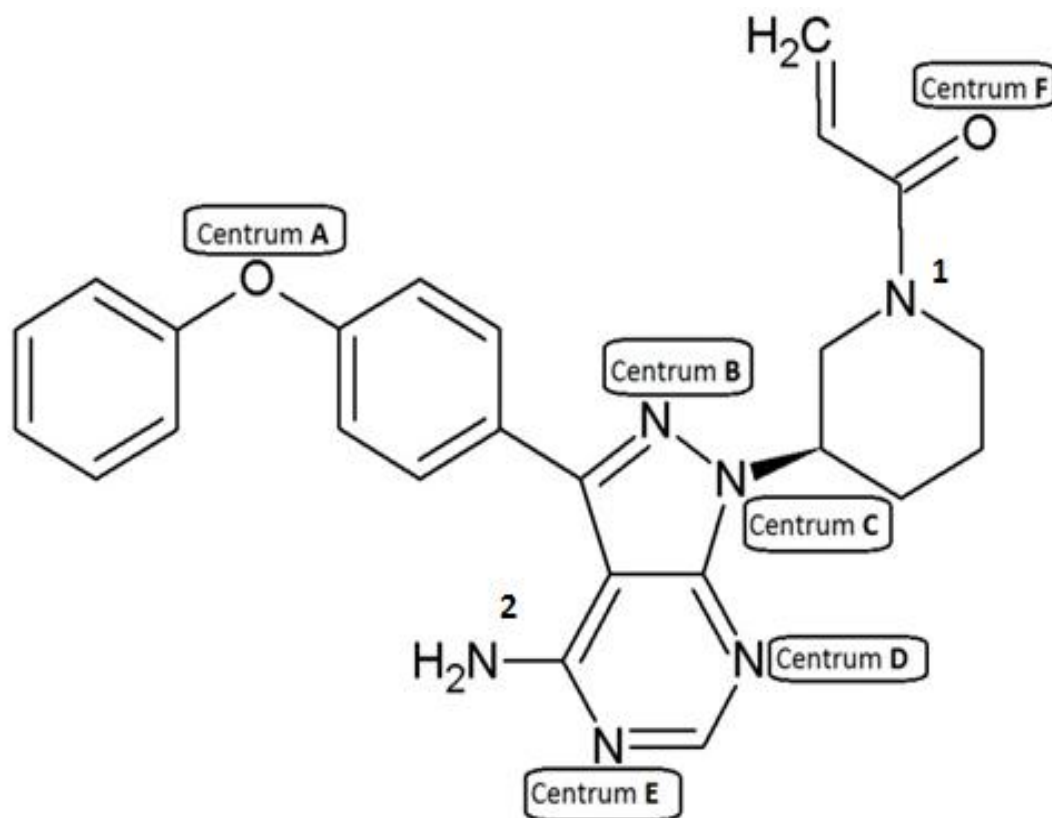
Pro pH potenciometrickou titrací stanovovaného léčiva byla využita již zmíněná kombinovaná skleněná elektroda připojená na pH metr HI 3220. Před každým měřením byla provedena tří-bodová kalibrace elektrody, aby byla nastavena Nernstovská směrnice. Roztok léčiva o objemu 20 ml o příslušné koncentraci byl umístěn do předem vmyté a vysušené měřicí nádoby, která byla vytemperována na příslušnou teplotu 25<sup>0</sup>C±0.1<sup>0</sup>C nebo 37<sup>0</sup>C ±0.1<sup>0</sup>C. Do roztoku bylo dávkováno příslušné množství KCl pro nastavení určité iontové síly. Za stálého míchání a probubláváním argonem pro zajištění inertní atmosféry byla realizována pH-potenciometrická titrace. Do roztoku bylo dávkováno určité množství 1M KOH či 1M HCl prostřednictvím pístové mikrobyrety a po stanovení chemické rovnováhy bylo odečteno na pH metru příslušné rovnovážné napětí resp. pH. Po celou dobu analýzy byla udržována stálá teploty na digitálním termostatu (JULABO) ED-5 na hodnotách 25<sup>0</sup>C±0.1<sup>0</sup>C nebo 37<sup>0</sup>C ±0.1<sup>0</sup>C a bylo kontrolováno probublávání argonem nad hladinou roztoku. Po ukončení titrace byla data uložena a podrobena detailnímu rozboru.

## 4. Výsledky a jejich diskuze

### 4.1. Predikce pK

Ibrutinib má k dispozici 6 center, kde může docházet k protonaci či disociaci, které jsou označeny písmeny A, B, C, D, E F (obr. 5). Dvě ionizace mohou být spojeny s atomy kyslíku, 4 ionizace pak s atomy dusíku. Dusík, jenž je na obr. 5 označený číslem 1 se protonovat nemůže, jelikož aminy se protonují na kyslíku. Dalším atomem, u něhož protonace není možná z důvodu snížené elektronové hustoty je označen jako číslo 2.

U predikce disociačních konstant léčiva Ibrutinib jsme vycházeli z jeho chemické struktury. Celá molekula na obr. 5 byla rozdělena do několika fragmentů na obr. 6, ve kterých byly hledány funkční skupiny, na nichž by mohlo docházet k protonaci.



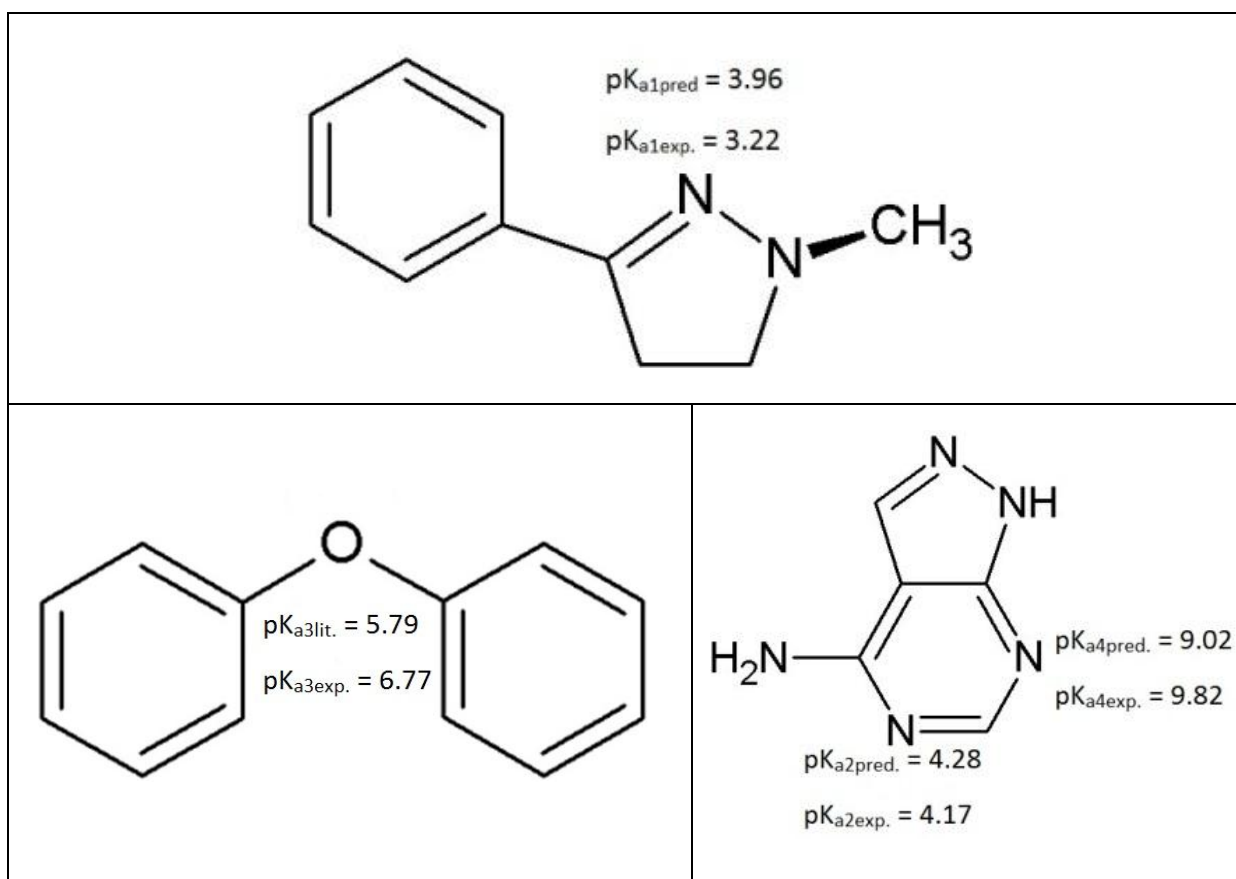
Obr. 5 Schéma možných protonačních center Ibrutinibu

Prvním, nejvíce bazickým atomem, který bude ochotně přijímat proton je atom dusíku označený na obr. 5 jako Centrum D. Predikční program MARVIN [45] právě zde stanovil  $pK_{a4} = 9.02$ , hodnota se blíží k námi naměřené experimentální hodnotě  $pK_{a4}^T = 9.82$ .

Další protonace bude probíhat na atomu kyslíku, na obr. 5 označeném jako Centrum A. V literatuře byla hledána hodnota  $pK_a$  fragmentu difenyletheru na obr. 6, kde bylo nalezeno, že je protonovanou bází s  $pK(BH^+) = 5.79$  [46] a hodnota se blíží námi určené experimentální hodnotě  $pK_{a3}^T = 6.77$ .

Jako třetí atom, jenž bude přijímat proton se jeví atom dusíku označený na obr 5 jako Centrum E. Pro tento atom MARVIN predikuje hodnotu disociační konstanty  $pK_{a2} = 4.28$ . Námi stanovená termodynamická disociační konstanta je  $pK_{a2} = 4.17$ . Predikovaná a experimentální hodnota  $pK_{a2}^T$  jsou proto v dobré shodě.

Poslední proton  $H^+$  bude akceptován atomem dusíku ve fragmentu, který obsahuje pětičlenný cyklus. Na obr. 5 je označen, jako Centrum B. Tento atom dusíku je elektronově bohatý, bude se tedy protonovat dříve než druhý dusík v pětičlenném cyklu. Program MARVIN stanovil hodnotu  $pK_{a1} = 3.96$ , která je podobná námi naměřené hodnotě  $pK_{a1}^T = 3.22$ .



Obr. 6 Fragментy s predikovanými, literárními a experimentálními odhady  $pK_a$

## 4.2. Analýza spekter

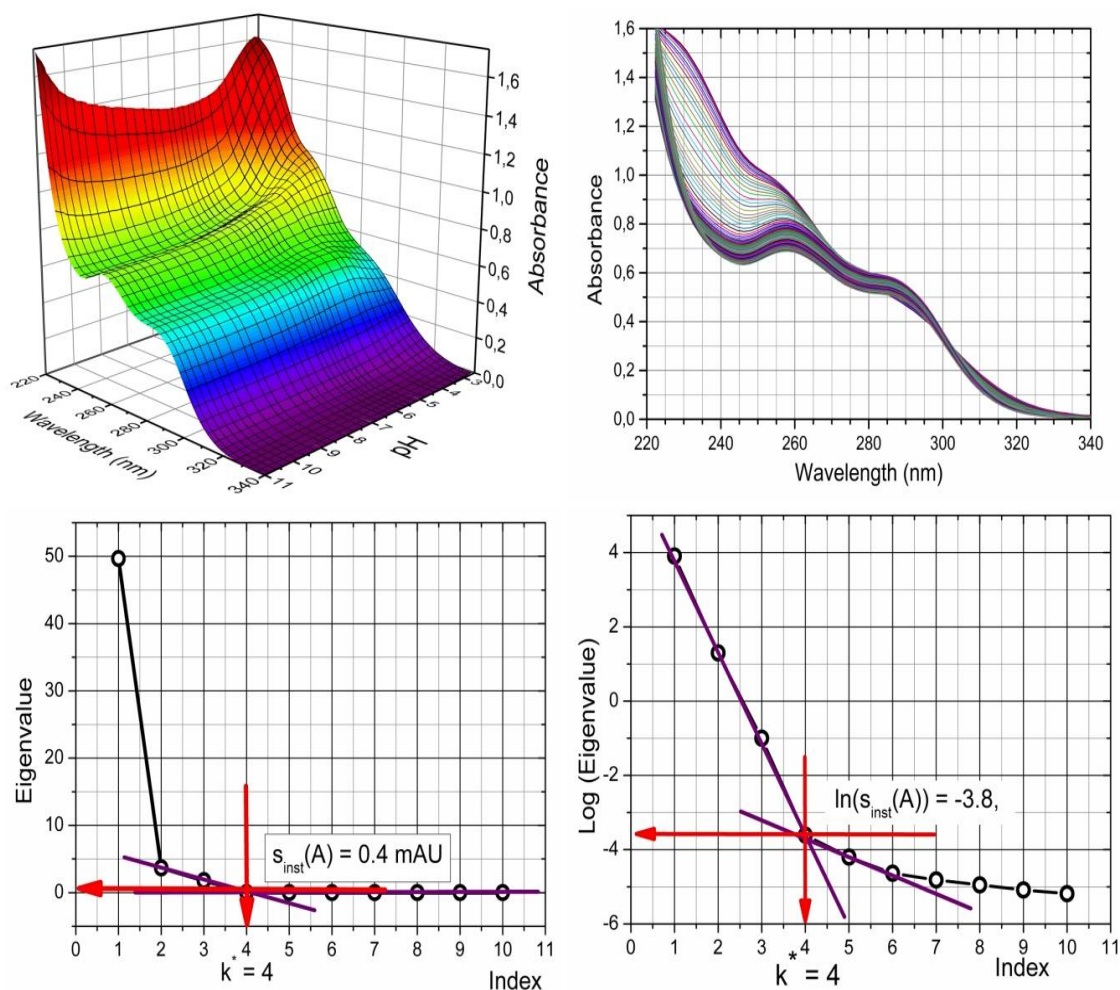
Rigorózní interpretace spekter si klade za cíl zhodnotit kvalitu datového souboru spekter, odstranit rušivé elementy a nalézt všechny regresní parametry, nezbytné k popisu experimentálních dat. Analýza protonačních rovnováh léčiva Ibrutinibu zahrnuje několik kroků, které vedou k co možná nejlepšímu odhadu disociačních konstant.

Za prvé je nezbytné nalézt počet světlo-absorbujících částic v roztoku. Dalším krokem je navrhnout správný protonační model, který kalkuluje s nalezeným počtem světlo-absorbujících částic, jejich stechiometrii s využitím programů SQUAD a REACTLAB.

U soft-modelingového softwaru REACTLAB není nutné zadávat nulté přiblížení daných parametrů, zatímco u hard-modelingového programu SQUAD je toto nulté přiblížení nezbytné. Z tohoto důvodu je výhodné nejdříve pracovat v programu REACTLAB a nalezené odhady parametrů vnášet do softwaru SQUAD. Verze SQUAD84 je Melounovou modifikací Leggettova programu SQUAD.

### 4.2.1. Určení počtu světlo-absorbujících částic

Ibrutinib obsahuje složitou molekulární strukturu, uvedenou na Obr 1.



Obr. 7 Stanovení počtu světlo-absorbujících částic ve směsi. **Horní část:** 3D- a 2D-absorbanční responzní plocha UV-VIS absorpčních spekter Ibrutinibu pro 25<sup>0</sup>C představuje vstupní data programů SQUAD84 a REACTLAB. **Dolní část:** Cattellův indexový graf úpatí vlastních čísel Kankareho modifikace faktorové analýzy stanovuje hodnotu absorbanční matice Ibrutinibu,  $k^* = 4$ , což vede ke čtyřem světlo-absorbujícím částicím a odhadu instrumentální směrodatné odchylky  $s_{inst}(A) = 0.4 \text{ mAU}$ . **Experimentální podmínky:**  $5.8 \times 10^{-5} \text{ M}$  Ibrutinibu ve fosfátovém pufru ( $I = 0.004$ ) při 25<sup>0</sup>C byl titrován 0.814 M KOH nebo 1.044 M kyselinou chlorovodíkovou. Absorbanční responzní plocha byla o 70 hodnotách pH a 63 vlnových délkách (INDICES S-PLUS, ORIGIN).

SQUAD84 totiž obsahuje více metod a regresních diagnostik k určení hledaných parametrů, jako je například Kankareho metoda modifikovaného grafu vlastních čísel, statistická analýza reziduí, dekonvoluce spekter, atd. Je proto nutné analyzovat protonační rovnováhy léčiva ve dvou již zmíněných základních krocích.

První spektrální data spektrofotometru GBC Cintra40 byla podrobena faktorové analýze k určení počtu nezávislých světlo-absorbujících částic v roztoku pomocí algoritmu INDICES [34]. Pomocí Kankareho modifikace faktorové analýzy [34] byl stanoven počet světlo-absorbujících částic. V Cattelově grafu úpatí vlastních čísel bylo stanoveno ze zlomu na křivce, že  $k = 4$  s odpovídající odchylkou  $s_{inst}(A) = 0.4$  mAU, která představuje aktuální instrumentální chybu spektrofotometru CINTRA5 (GBC, Austrálie). Počet světlo-absorbujících částic je vždy prvním a základním parametrem, který je třeba nalézt a díky kterému je možné určit protonační model. Z toho vyplynulo, že faktorová analýza preferuje čtyři částice ve směsi, ovšem spolehlivější regresní analýzou (REACTLAB, SQUAD84) bylo stanoveno, že nejlepším modelem protonace je ten se 4 disociačními konstantami a ve směsi bude tedy přítomno pět částic: LH<sub>4</sub>, LH<sub>3</sub>, LH<sub>2</sub>, LH a L (Tabulka 5). V následujícím textu jsou náboje iontů vynechány pro jednoduchost a ionty jsou označovány jako různě protonované částice.

Z důvodu velkého kolísání indexů v grafu závislosti směrodatné odchylky  $s_{inst}(A)$  na počtu vlastních čísel  $k$  je směrodatná odchylka vynesena jako  $\log(s_{inst}(A))$  a počet světlo-absorbujících částic  $p$  lze usuzovat dle zlomu na křivce, kde  $PC(k) = f(k)$ , a tedy  $\log k = -3,8$  (Obr. 7).

#### 4.2.2. Výstavba protonačního modelu

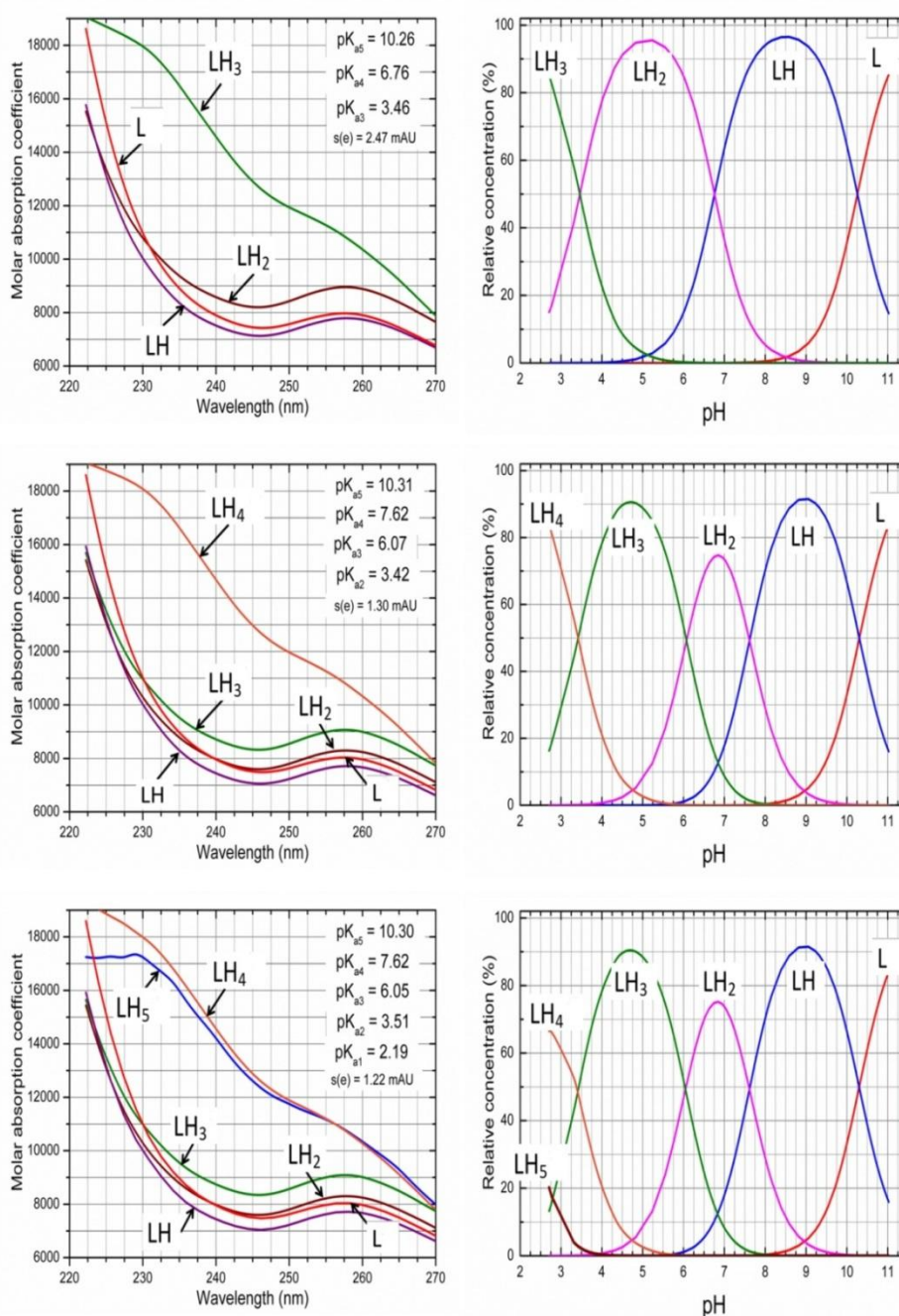
Hledání nejlepšího protonačního modelu, který obsahuje buď 3, 4 nebo 5 disociačních konstant je znázorněno na obr. 8. Graficky jsou vykreslena spektra pro vybrané rozsahy vhodných vlnových délek, ve kterých se nacházejí chromofory, které vystihují protonace či disociace v molekule Ibrutinibu. Nejlepším protonačním modelem je ten, který nejlépe splňuje všechna regresní kritéria a vykazuje nejlepší těsnost proložení vypočtené absorbanční responzní plochy naměřenými experimentálními spektry.

Výstavba protonačního modelu byla provedena pomocí dvou regresních programů: SQUAD84 a REACTLAB, ve kterých byly také porovnány odhady disociačních konstant (Tabulka 5). Směrodatná odchylka reziduí a Hamiltonův *R-faktor* naznačují, že proložení bylo u modelu protonace s 5 a 4 disociačními konstantami téměř totožné, ovšem z důvodu překrývajících se molární absorpčních koeficientů částic LH<sub>4</sub> a LH<sub>5</sub>, byly preferovány 4 disociační konstanty a tedy pět přítomných částic ve směsi.

Pomocí regresních programů SQUAD84 a REACTLAB byly stanoveny hrubé odhady čtyř disociačních konstant  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$  a pět molárních absorpčních koeficientů



protinádorového léčiva Ibrutinibu  $\epsilon_L$ ,  $\epsilon_{LH}$ ,  $\epsilon_{LH_2}$ ,  $\epsilon_{LH_3}$ ,  $\epsilon_{LH_4}$ . Spolehlivost odhadů byla testována použitím následně uvedených regresních diagnostik [47]:



Obr. 8 Hledání protonačního modelu ze tří navržených hypotéz pro Ibrutinib v rozsahu pH 2 - 11 pro tři, čtyři a pět disociačních konstant  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ ,  $pK_{a5}$  titrací  $5.8 \times 10^{-5}$  M roztoku Ibrutinibu při  $I = 0.002$  pro  $25^{\circ}\text{C}$ . **Levý panel:** Spektra molárních absorpčních koeficientů v závislosti na vlnových délkách pro všechny různě protonované částice. **Pravý panel:** Distribuční diagramy relativních koncentrací různě protonovaných částic v závislosti na pH. **Horní řádek:** Hypotéza tří  $pK_a$ . **Střední řádek:** Hypotéza čtyř  $pK_a$ . **Dolní řádek:** Hypotéza pěti  $pK_a$ . **Experimentální podmínky:** stejné jako u obr. 7 (SQUAD 84, ORIGIN).

Tabulka 5 Určení protonačního modelu

Protonation model contains	Five $pK_a$ 's	Four $pK_a$ 's	Three $pK_a$ 's
<b>Cattel's scree plot indicating the rank of the absorbance matrix (INDICES)</b>			
Number of spectra measured, $n_s$		63	
Number of wavelengths, $n_w$		70	
Number of light-absorbing species, $k$		4 or 5	
Residual standard deviation, $s_k^2(A)$ [mAU]		0.53 or 0.44	
<b>Estimates of dissociation constants in the searched protonation model</b>			
Dissociation constant	Program		
$pK_{-1}(s_1), LH_5 = H^+ + LH_4$	SQUAD84	2.08(774)	XX
	ReactLab	1.88(116)	XX
$pK_{-2}(s_2), LH_4 = H^+ + LH_3$	SQUAD84	3.40(04)	3.42(02)
	ReactLab	3.39(03)	3.42(00)
$pK_{-3}(s_3), LH_3 = H^+ + LH_2$	SQUAD84	6.04(02)	6.08(02)
	ReactLab	6.04(01)	6.07(01)
$pK_{-4}(s_4), LH_2 = H^+ + LH$	SQUAD84	7.61(01)	7.62(01)
	ReactLab	7.62(03)	7.62(01)
$pK_{-5}(s_5), LH = H^+ + L$	SQUAD84	10.30(01)	10.31(01)
	ReactLab	10.30(01)	10.31(01)
<b>Goodness-of-fit test with the statistical analysis of residuals</b>			
Mean residual $E \varepsilon $ [mAU]	SQUAD84	0.77	0.79
	ReactLab	0.60	0.62
Standard deviation of residuals $s(\varepsilon)$ [mAU]	SQUAD84	1.23	1.27
	ReactLab	0.84	0.89
Sigma from ReactLab [mAU]	SQUAD84	---	---
	ReactLab	1.26	1.30
Hamilton R-factor from SQUAD84 [%]	SQUAD84	0.28	0.30
	ReactLab	XX	XX
Hypothesis about the protonation model is		Rejected	Accepted
			Rejected

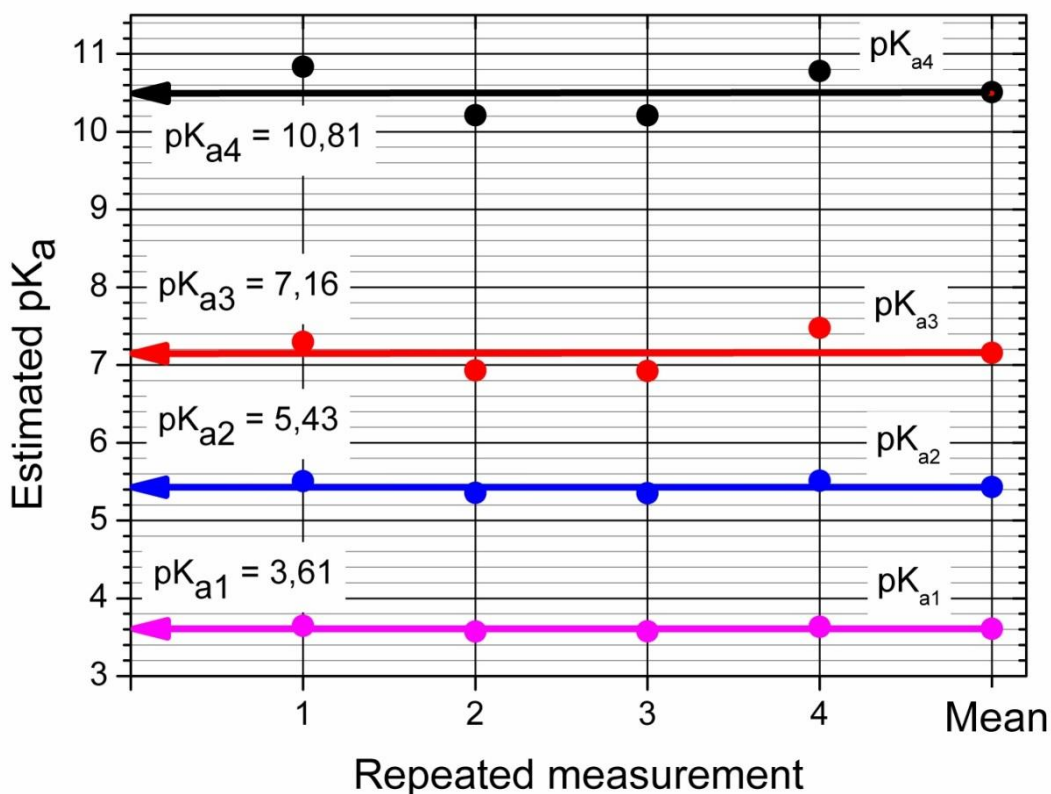
První diagnostika indikuje, zda všechny odhady  $pK_{a,r}$  a  $\epsilon_r$  mají fyzikální smysl a nabývají reálných hodnot fyzikálně-chemického smyslu. Směrodatné odchylky  $s$  ( $\log pK_{a,r}$ ) a  $s$  ( $\epsilon_r$ ) jsou podstatně nižší, než odhady jejich parametrů. Všechny protonované částice jsou tedy statisticky významné na hladině významnosti  $\alpha = 0.05$ . Na obr. 8 jsou znázorněny odhadované molární absorpční koeficienty všech různě protonovaných částic  $\epsilon_L$ ,  $\epsilon_{LH}$ ,  $\epsilon_{LH_2}$ ,  $\epsilon_{LH_3}$ ,  $\epsilon_{LH_4}$ ,  $\epsilon_{LH_5}$  Ibrutinibu s ohledem na vlnovou délku.

Druhá diagnostika zkoumá, zda všechny vypočtené volné koncentrace různě protonovaných částic v distribučním diagramu v % mají fyzikální smysl. Diagram je znázorněn v pravém sloupci obrázku 8 a ukazuje postupné protonace částic  $LH_4$ ,  $LH_3$ ,  $LH_2$ ,  $LH$  a  $L$ . Při neutrální hodnotě pH od 5 - 8 léčivo Ibrutinib převažuje ve formě neutrální molekuly  $LH_2$  a  $LH_3$ . Od pH 6 až 9 se vyskytuje ve stavu  $LH$ . Alkalizací léčiva od pH 6 až 10 neutrální molekula deprotonuje na částice  $LH$  a  $L$ . Naopak okyselením neutrální molekuly  $LH_2$  nejprve dojde k vytvoření částice  $LH_3$ . Od pH 4 až 2 se Ibrutinib vyskytuje z 80% ve formě  $LH_4$ . Pokud léčivo ještě více okyselíme, může se v rozmezí pH 4 až pH 1 vytvořit částice  $LH_5$ . Ibrutinib je v koncentracích  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$  dostatečně rozpustný, a proto všechny jeho disociační konstanty lze spektrofotometricky naměřit a vyčíslit.

Další diagnostika se týká těsnosti proložení. I když statistická analýza reziduí poskytuje nejpřísnější testy míry proložení, jsou ještě použity doplňkové empirické testy. Spolehlivost všech odhadovaných parametrů je prokazována dalšími metodami statistické analýzy všech reziduí  $e$ , které potvrzují dosažení minima eliptického hyperpalaboloidu RSS (Tabulka 5):

Velice citlivým měřítkem těsnosti proložení je směrodatná odchylka reziduí  $s(E)$  a průměr absolutních hodnot reziduí  $E|\bar{e}|$ , které vždy dosahují velice nízkých hodnot pod hranicí 2 mAU, což je méně než 0,2 % naměřených hodnot absorbance. Pomocí mnoha kritérií a statistických analýz bylo tedy prokázáno, že dosažená těsnost proložení je vynikající. Odhady disociačních konstant stanovených pomocí regresních programů SQUAD84 a REACTLAB jsou ve velmi dobré shodě. Vyhodnocení spekter softwarem SQUAD84 podléhá velice přísným testům, zejména velice detailní statistické analýze reziduí. Analýza dat pomocí obou regresních programů naměřených spekter u opakovaných měření léčiva Ibrutinib při 25°C vede ke stanovení čtyř disociačních konstant  $pK_{a1} = 3.61$ ;  $pK_{a3} = 7.16$ ;  $pK_{a4} = 10.81$ .

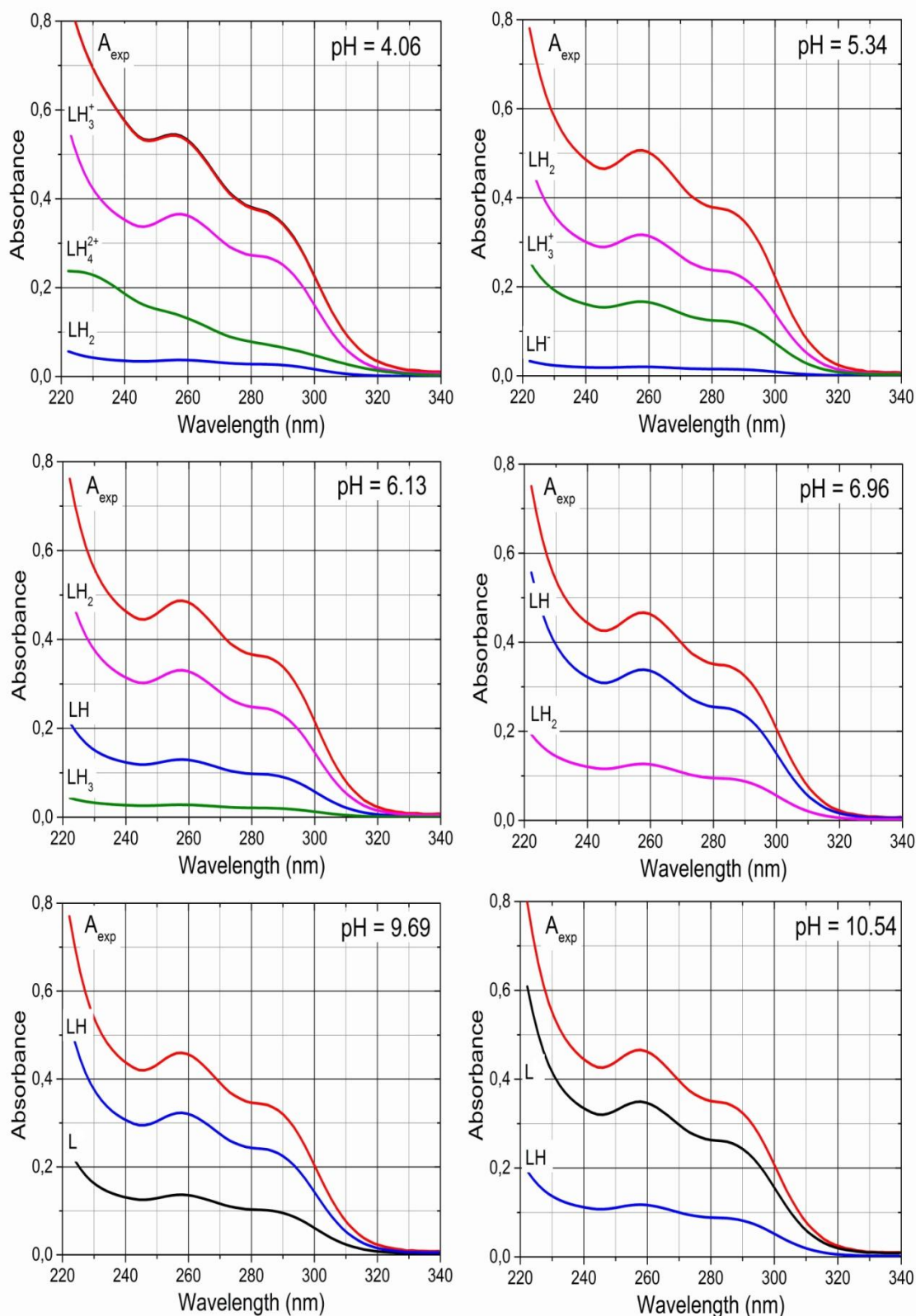
Tyto tři disociační konstanty jsou velice dobře podmíněny modelem, proto je jejich stanovení poměrně spolehlivé. Druhá disociační konstanta  $pK_{a2} = 5.43$  není dobře podmíněna regresním modelem. Tvar hyperboloidu tohoto parametru bude proto talířovitý bez výrazného minima. Výpočet všech souřadnic takového minima je mnohem obtížnější a odhady parametrů jsou tudíž méně spolehlivé a hodnota  $pK_{a2}$  je proto poněkud nejistá (Obr. 9)



Obr. 9 **Reprodukovatelnost 25<sup>0</sup>C.** Opakovanou titrací Ibrutinibu byly stanoveny disociační konstanty  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$  analýzou absorbanční matice o koncentraci  $5.8 \times 10^{-5}M$  pro  $I = 0.004$  při 25<sup>0</sup>C programem SQUAD 84 A REACTLAB.

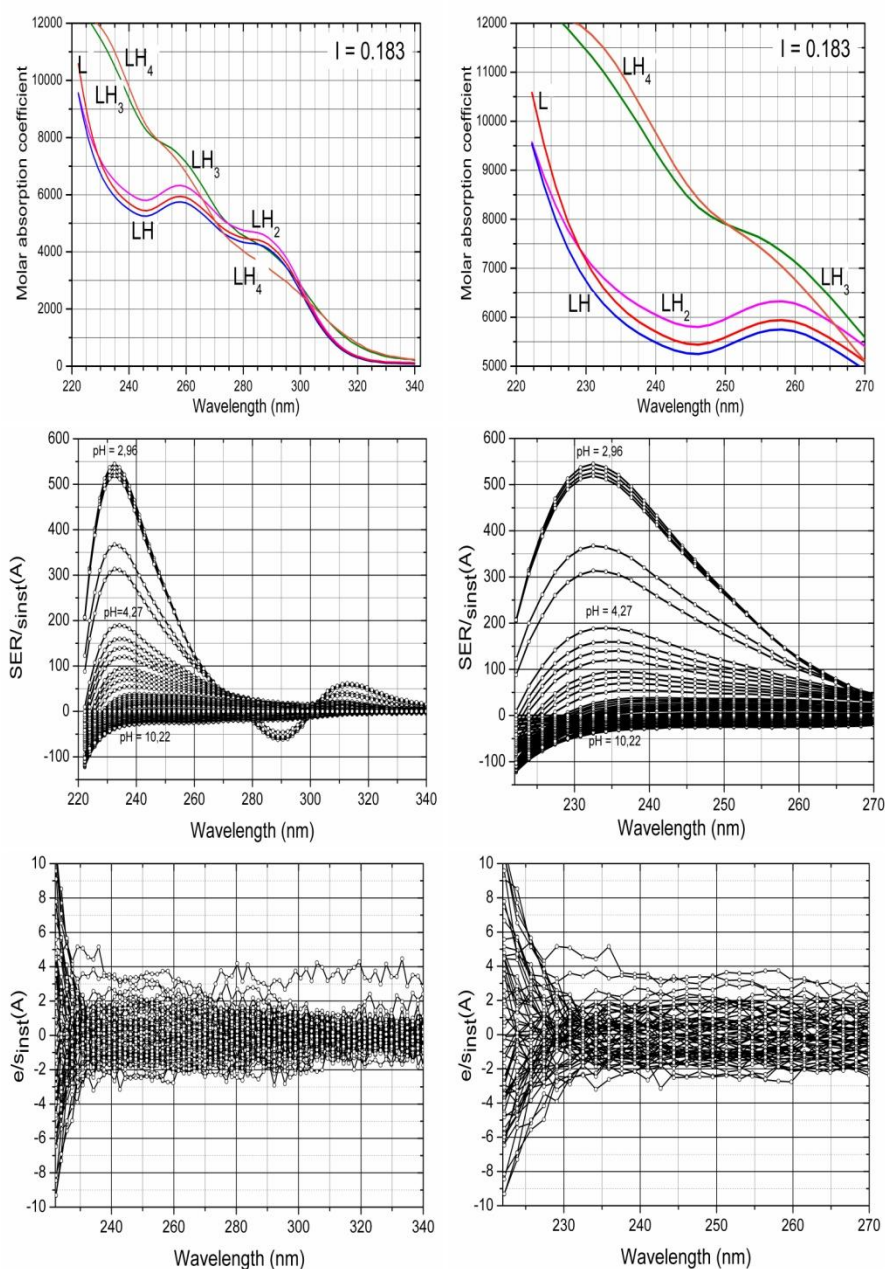
V obrázku 10 můžeme pozorovat změny probíhající v roztoku pro šest po sobě jdoucích deprotonací v rozmezí pH 4.06 až 10.54. Každé experimentální spektrum bylo rozloženo do spekter jednotlivých protonovaných částic ve směsi, tzn., byla provedena dekonvoluce spekter. Při pH = 4.06 se v roztoku objevuje  $LH_4$ , který doprovází  $LH_3$ , jenž ve směsi převládá. Pro pH = 5.34 se v roztoku nachází společně s neutrální částicí  $LH_2$  rovněž částice  $LH_3$ , jejíž absorpční pás dosahuje pro tuto vlnovou délku svého absorpčního maxima  $\lambda_{max}$ .

Při pH 6.13 a 6.96 se experimentální spektrum rozloží do dvou absorpčních pásů (obr. 10), kde je znázorněno jak neutrální částice  $LH_2$  disociuje směrem k  $LH$ . Pro pH 9.69 se již částice  $LH$  deprotonovala a ve směsi se vyskytuje ve formě částic  $LH$ ,  $L$  a koncentrace  $L$  se neustále zvyšuje až na určitou hodnotu pro pH 10.54.



Obr. 10 Dekonvoluce naměřených spekter  $5.8 \times 10^{-5}$  M Ibrutinibu při  $I = 0.004$  a  $25^{\circ}C$  do spekter jednotlivých různě protonovaných částic ve směsi, rozložených u hodnot pH: 4.06; 5.34; 6.13; 6.96 a 10.54 programem SQUAD 84.

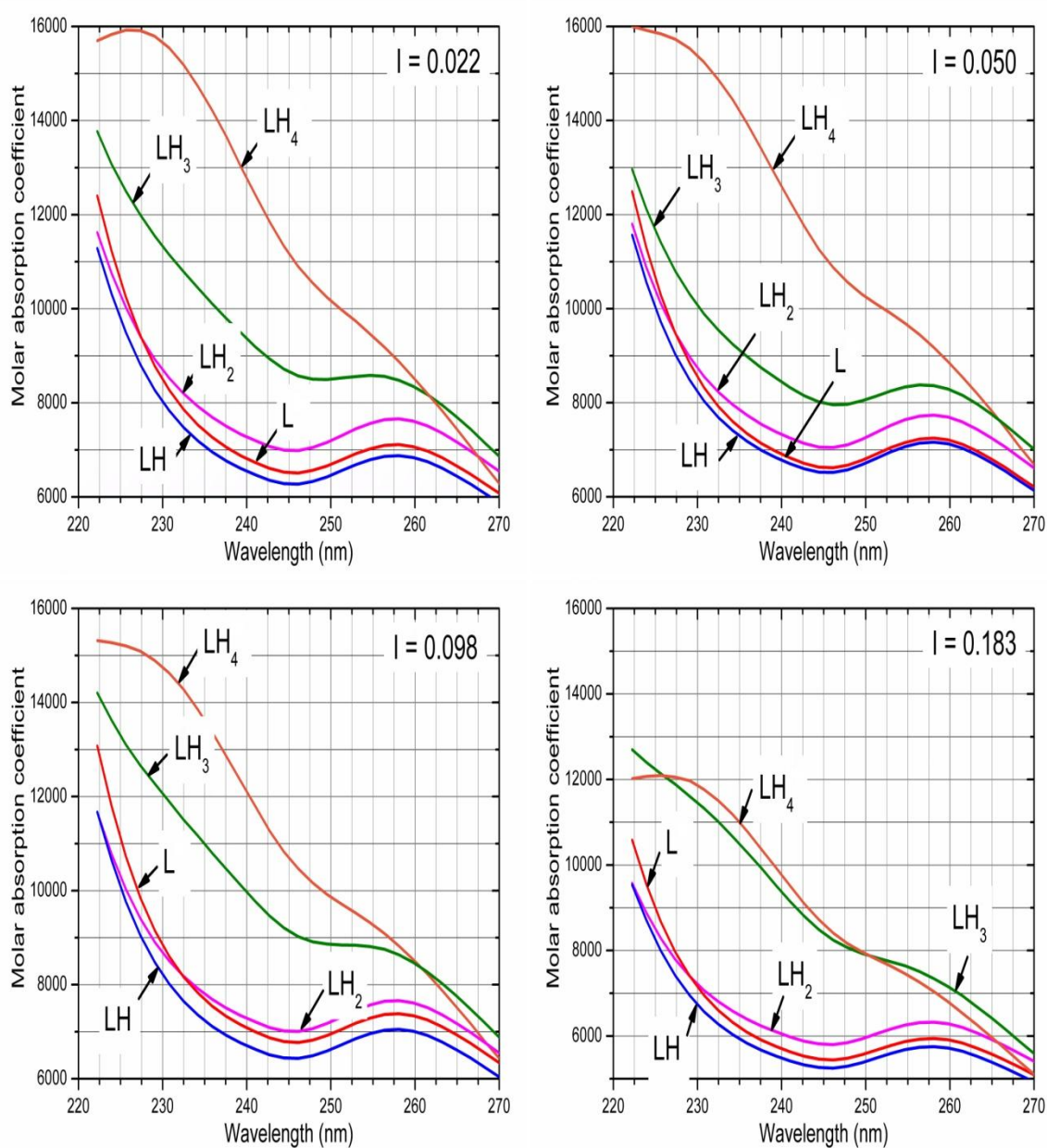
### 4.2.3. Rozdíl absorbancí ve spektrech



Obr. 11 Rozdíl absorbancí ve spektrech Ibrutinibu. *Levý panel:* rozsah 220-340 nm, *Pravý panel:* 220-270 nm, *Horní řada:* Graf molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic v závislosti na vlnové délce  $\lambda$  (nm). *Střední řada:* Hodnota rozdílů absorpance pro  $j$ -tou vlnovou délku a  $i$ -té spektrum lze vypočítat dle rovnice:  $\Delta A_{ij} = A_{ij} - A_{i,kys}$ , kde  $\Delta A_{ij}$  je děleno instrumentální směrodatnou odchylkou  $s_{inst}(A)$  a výsledný poměr  $SER/s_{inst}(A)$  je vyneseno v závislosti na vlnové délce pro všechny maticové prvky, kde  $A_{i,kys}$  je počáteční spektrum kyselé formy léčiva. *Dolní řada:* Graf závislosti poměru  $e/s_{inst}(A)$  poměru reziduí a směrodatné odchylky  $s_{inst}(A)$  v závislosti na vlnové délce pro všechny maticové prvky v případě, že rezidua jsou stejně velká jako instrumentální šum.

Hodnoty rozdílů absorbancí v naměřených spektrech lze vypočítat pro  $j$ -tou vlnovou délku  $i$ -té spektrum dle rovnice  $\Delta A_{ij} = A_{ij} - A_{i,kys}$  dle cit. [48].

Vyčíslená hodnota  $\Delta A_{ij}$  se následně podělí instrumentální směrodatnou odchylkou  $s_{inst}(A)$  a poměr  $\Delta A_{ij}/s_{inst}(A)$  se označuje jako poměr *SER*.



Obr. 12 Vliv iontové síly na protonaci chromoforů, nastavené neutrálním elektrolytem KCL na protonaci chromoforů v molekule Ibrutinib při 25<sup>0</sup>C vede k některým změnám molárních absorpčních koeficientů v závislosti na vlnové délce. Analyzováno regresními programy SQUAD84 a REACTLAB.

V grafu je *SER* znovu dělen instrumentální směrodatnou odchylkou  $s_{inst}(A)$  a tato hodnota je vynesena v závislosti na vlnové délce  $\lambda$  pro celou absorbanční matici, kde  $A_{i,kys}$  je počáteční spektrum kyselé formy léčiva měřené pro nejkyselější pH.

Platí, že pokud je poměr  $SER$  větší než 10, faktorová analýza dokáže předpovědět správný počet světlo-absorbujících částic v rovnovážné směsi.

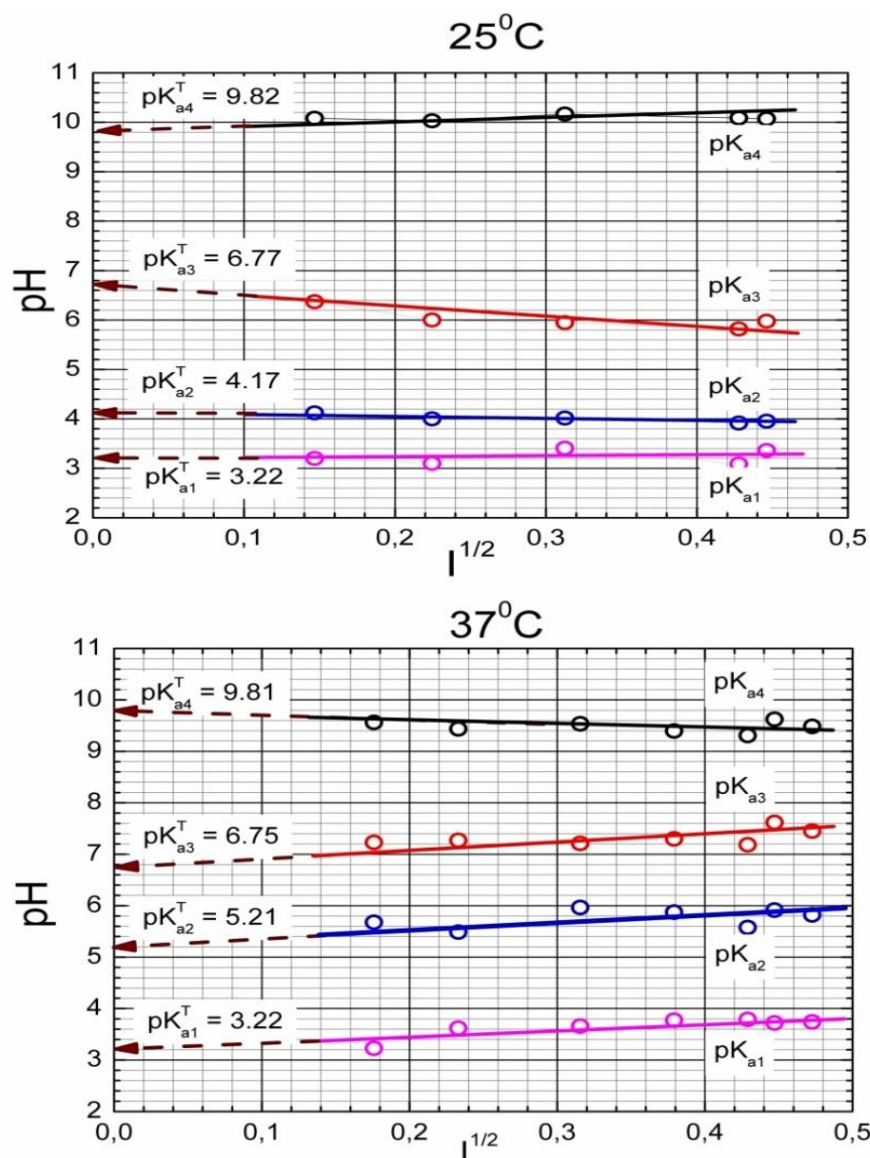
Aby bylo prokázáno, že tyto data mohou být analyzována nelineární regresí, je nezbytné vytvořit graf poměru reziduí  $e$  podělený instrumentální směrodatnou odchylkou  $s_{inst}$  ( $A$ ), která je závislá na vlnové délce  $\lambda$  pro celou matici reziduí. Obr. 11 tedy znázorňuje, že většina reziduí má stejnou velikost jako instrumentální směrodatná odchylka  $s_{inst}(A)$  a data mohou být dále zpracovávána nelineární regresí.

### 4.3. Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant

Z výzkumu účinku iontové síly na protonaci chromoforů je patrné, že tvar spekter tří částic  $LH_2$ ,  $LH$  a  $L$  u nízkých iontových sil od  $I = 0.022 - 0.183$  není významně ovlivněn. Oproti tomu spektra částic  $LH_3$  a  $LH_4$  při měření v čisté vodě jsou od sebe poměrně vzdálena. S rostoucí iontovou silou ale rozdíl  $\epsilon_{LH3}$  a  $\epsilon_{LH4}$  klesá a pro iontovou sílu  $I = 0.2$  je rozdíl téměř nulový (Obr. 12).

Odhady thermodynamických disociačních konstant byly již stanoveny pomocí nelineární regrese metodou nejmenších čtverců. Tyto konstanty jsou ovšem ovlivněny iontovou silou použitého pufru ( $NaH_2PO_4$ )  $I = 0.003 - 0.006$ . Thermodynamické disociační konstanty pro nulovou iontovou sílu lze stanovit, pokud známe hodnoty  $pK_a$  pro různé iontové síly, a to extrapolací na nulovou hodnotu iontové síly. Odhady smíšené disociační konstanty  $pK_a$  prokládáme limitní verzí Debye-Hückelovy rovnice pro nízké iontové síly, kde  $pK_a$  je závislou proměnnou a hodnoty iontových sil představují nezávisle proměnné (obr. 13). Thermodynamické disociační konstanty jsou stanovovány pro teploty  $25^0\text{ C}$  a  $37^0\text{ C}$ , jelikož tyto teploty jsou pro lékaře a farmaceuty zásadní.





Obr. 13 Stanovení thermodynamických disociačních konstant  $pK_a^T$  při 25<sup>0</sup>C a 37<sup>0</sup>C spektrofotometrickou titrací Ibrutinibu grafickou extrapolací na nulovou iontovou sílu.

#### 4.4. Analýza dat potenciometrické titrace

Potenciometrická titrace Ibrutinibu ve vodném roztoku hydroxidu draselného kyselinou chlorovodíkovou byla provedena při 25<sup>0</sup>C a 37<sup>0</sup>C. Programem ESAB byly vyhodnoceny smíšené disociační konstanty a po odstranění odlehlých bodů titrační křivky byly parametry zjemňovány při dosažení nejlepší těsnosti proložení. Finální hodnoty thermodynamických disociačních konstant byly stanoveny graficky, a to regresní analýzou naměřených smíšených  $pK_a$  v závislosti na nastavené iontové síle (Obr. 15).

Extrapolací závislosti na nulovou hodnotu iontové síly byly nalezeny hodnoty termodynamických disociačních konstant.

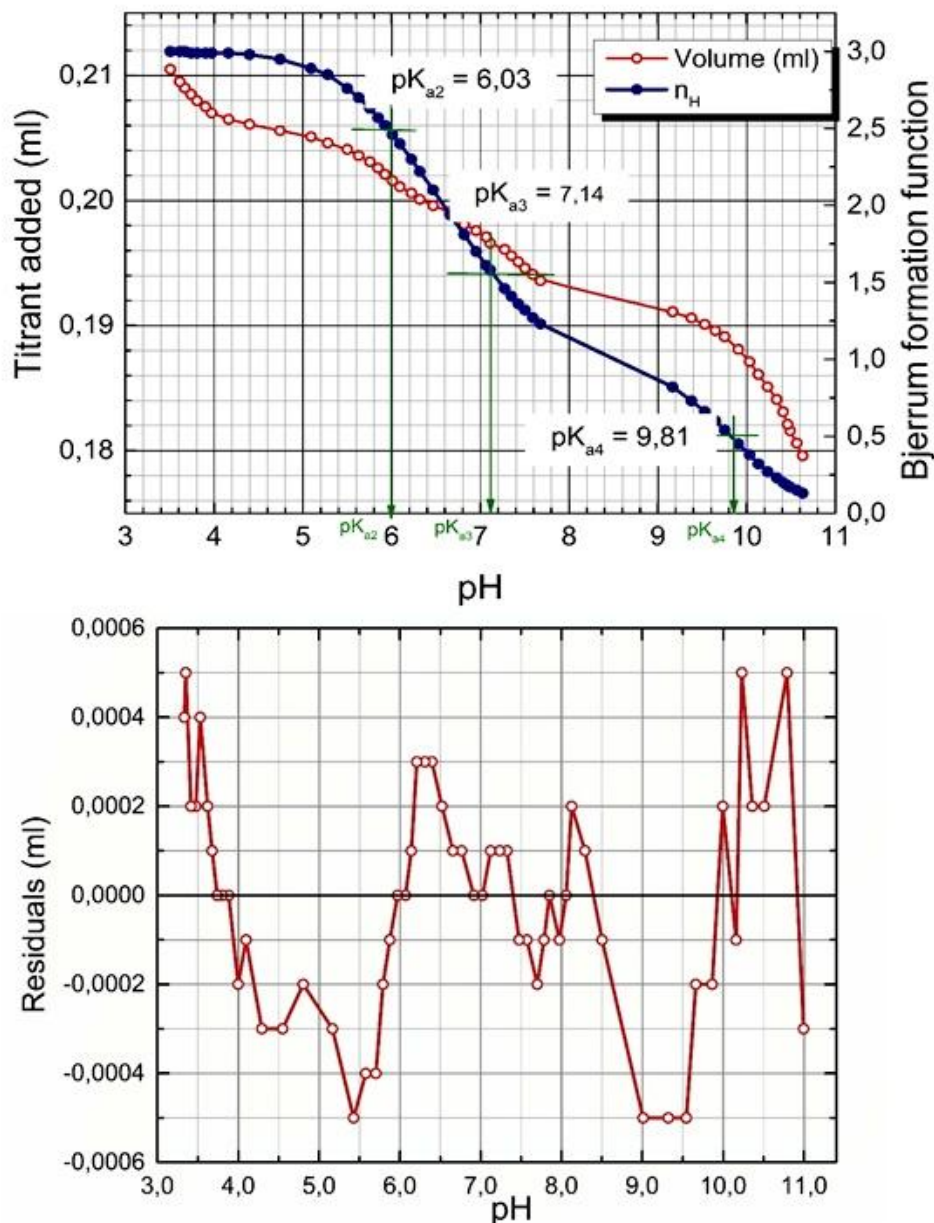
Vzhledem k tomu, že Ibrutinib vykazuje tři blízké disociační konstanty, titrační křivka má tvar hladké monotónní křivky, a proto je numerický odhad disociačních konstant nemožný bez použití počítačového programu nelineární regrese.

Regresní analýza byla použita zejména pro střední část titrační křivky, která se týká alkalické oblasti. Program ESAB také vyčíslí hodnoty Bjerrumovy tvorné funkce, které jsou znázorněny v grafu na obr. 14. Odhady tří disociačních konstant  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$  jsou vyneseny v grafu na vykreslené křivce Bjerrumovy tvorné funkce vždy pro poloviční hodnotu  $n_H$ . Experiment ukázal, že při pH větším než 9 a pro pH menší než 5 se v titrovaném roztoku tvoří velmi jemná sraženina ze začátku jemné opalescence. Proto byla titrace léčiva Ibrutinib prováděna pouze v rozmezí pH 5 až 10, a jen tato část titrační křivky byla použita pro regresní analýzu, a proto byly stanoveny pouze tři disociační konstanty této části titrační křivky, a to  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$ , (Obr. 14).

Vstupními daty programu ESAB byly proměnné pH a objem titračního činidla čili titrantu  $V$ . Další vstupní data byla tvořena vedle nultého přiblížení společných parametrů  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$ ,  $pK_{a4}$  specifické parametry  $L_0$  a  $H_T$ , které byly programem ESAB také zjemňovány. Nejlepší odhady všech parametrů byly prokazovány nejtěsnějším proložením vypočtené titrační křivky naměřenými body titrační křivky. Bylo zjištěno, že po upřesnění specifického parametru  $L_0$  čili počáteční koncentrace Ibrutinibu, se výrazně zlepšila těsnost proložení titrační křivky. Rezidua, definovaná jako rozdíl mezi naměřeným a vypočteným objemem titračního činidla, pak dosahovala minimálních hodnot, blízkých experimentální chybě nezávisle proměnné  $s(V)$ . Věrohodnost disociačních konstant byla posuzována dle dosažené těsnosti proložení, kterou je možné sledovat statistikami podrobné statistické analýzy reziduí.

Dostatečně objektivním kritériem těsnosti proložení je především průměr absolutních hodnot reziduí  $E|\bar{e}|$ , který je porovnávám s instrumentálním šumem mikrobyrety  $s_{inst}(V)$ , která byla v našem případě rovna  $s(V) = 0.0002$  ml. Bylo proto prokázáno dostatečné proložení, protože průměr absolutních hodnot  $E|\bar{e}| = 0,0001$  a směrodatná odchylka reziduí  $s(e) = 0.0002$  ml nabývaly skoro stejných hodnot jako je instrumentální chyba mikrobyrety  $s(V) = 0.0002$  ml.

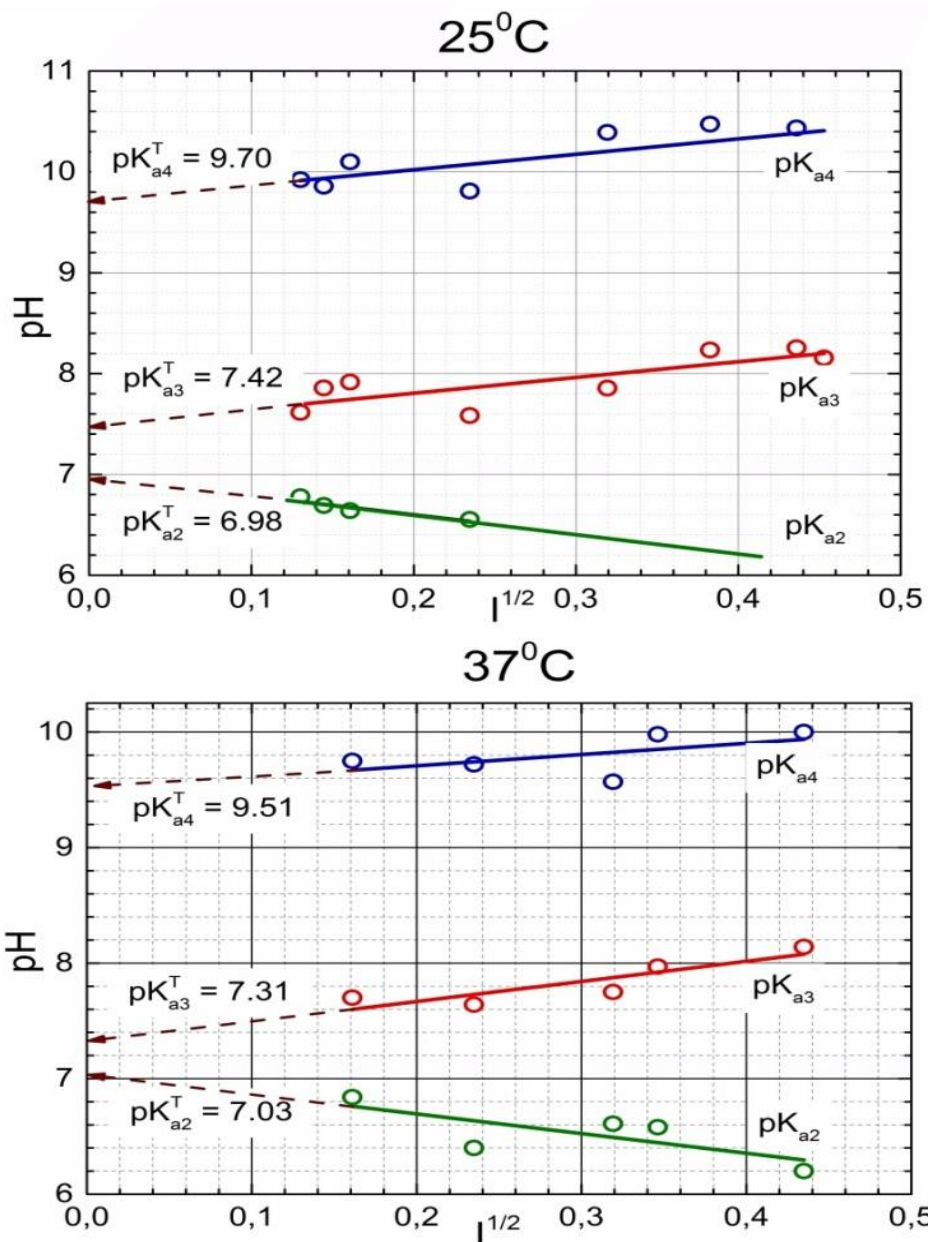
Všechna rezidua oscilují mezi horní a dolní mezí Hoaglinova pásu neurčitosti [49] a žádná rezidua neleží vně toho pásu, což ukazuje, že na titrační křivce nejsou žádné odlehle body. Tím bylo dostatečně potvrzeno, že odhady disociačních konstant získané potenciometrickou titrací jsou spolehlivé.



Obr. 14 **Potenciometrická titrace.** *Horní část:* Křivka potenciometrické titrace alkalizovaného Ibuprofenu kyselinou chlorovodíkovou je vynesena spolu s Bjerrumovou tvornou funkcí a odhady  $pK_{a_i}$ , vyčíslené programem ESAB. *Dolní část:* Závislosti reziduí na pH prokazuje věrohodnost odhadů  $pK_{a_i}$ . **Společné parametry:**  $pK_{a2} = 6.03(03)$ ,  $pK_{a3} = 7.14(04)$ ,  $pK_{a4} = 9.81(06)$ .

**Specifické parametry:**  $L_0 = 3.87 \mu\text{mol/l}$ .

**Konstanty:**  $H_T = -0.8138 \text{ M}$ ,  $t = 25.0^\circ\text{C}$ ,  $pK_W = 13.9799$ ,  $V_0 = 20.22 \text{ ml}$ ,  $s(V) = s_{inst}(V) = 0.0002 \text{ ml}$ ,  $s(\text{pH}) = s_{inst}(\text{pH}) = 0.01$ ,  $I_0 = 0.004$  (titrand),  $c$  (titrant v byretě) =  $0.8138 \text{ M KOH}$  nebo  $c$  (titrant v byretě) =  $1.00 \text{ M HCl}$ , (ESAB, ORIGIN).



Obr. 15 Stanovení thermodynamických disociačních konstant pH-potenciometrickou titrací. Extrapolace smíšených disociačních konstant Ibrutinibu na odmocnině iontové síly vede k odhadům thermodynamických disociačních konstant  $pK_a^T$  při 25°C a 37°C.

## 5. Diskuse

Spektrofotometrická titrace tvořila alternativní metodu ke stanovení hodnot  $pK_a$  léčiva Ibrutinib, měřeného kvůli omezené rozpustnosti v nízkých koncentracích (až  $10^{-5}$  M). Nicméně léčivo, které je předmětem studia musí mít chromofor v blízkosti centra ionizace, aby protonované/disociované částice vykazovaly dostatečnou spektrální odlišnost. UV-spektrofotometrická titrace protinádorového léčiva Ibrutinib poskytuje vějíře spekter, naměřených pro různé hodnoty pH. Okyselením roztoku dojde k protonaci neutrální molekuly  $LH_2$  na částice  $LH_3$ ,  $LH_4$  a  $LH_5$ , a může dojít až k vysrážení z roztoku. Vysrážení Ibrutinibu se projevuje zejména u vyšších koncentrací než 0.0005 M. Z toho důvodu nelze při potenciometrické titraci získat  $pK_{a1}$ , jelikož v kyselém prostředí se léčivo vysráží. Oproti potenciometrické titraci je UV-VIS spektrofotometrická titrace velmi citlivá a dobře monitoruje protonaci molekuly i při nízkých koncentracích, a proto byla použita analýza spekter regresními programy SQUAD84 a REACTLAB ke stanovení protonačního modelu Ibrutinibu a odhadů čtyř disociačních konstant. Koncentrace ve spektrofotometrii byla  $5,8 \times 10^{-5}$  M. UV-spektrofotometrická titrace léčiva bylo měřena při teplotách  $25^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , jelikož obě teploty jsou pro farmaceuty a lékaře důležité. Studií bylo zjištěno, že rozdíly v hodnotách disociačních konstant při teplotách  $25^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  nejsou významné.

Programem ESAB lze minimalizovat vektor reziduí  $e_i = (V_{\text{exp},i} - V_{\text{vyp},i})$  až k hodnotám reziduí blízkým se experimentálnímu šumu, v našem případě 0.1 nebo 0.2  $\mu\text{l}$ , což prokazovalo vynikající proložení. Lze proto dojít k závěru, že věrohodnost stanovených disociačních konstant byla dostatečně prokázána, i když specifické parametry  $L_0$ ,  $H_T$  nebyly v regresním modelu dobře podmíněny. Těsnost proložení potvrdila dostatečnou spolehlivost odhadů čtyř disociačních konstant protinádorového léčiva Ibrutinib při  $25^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ . Z tohoto důvodu lze odhady disociačních konstant regresními programy pokládat za spolehlivé. Protože v případě odhadu blízkých disociačních konstant bývají odhady  $pK_a$  méně jisté, byly použity dvě nezávislé instrumentální metody (spektrofotometrie a potenciometrie) a výsledky vyhodnocovány několika nezávislými programy za účelem porovnání stanovených odhadů disociačních konstant. Hodnoty disociačních konstant stanovené predikčním programem MARVIN se lišily od experimentálních odhadů konstant  $pK_a$ . V takovémto případě považujeme za určité selhání predikčního programu MARVIN, protože výsledky pH-potenciometrické titrace i UV-VIS spektrofotometrické titrace jsou ve shodě při dosažení výtečného regresního proložení. Proto považujeme experimentálně určené disociační konstanty Ibrutinibu za věrohodné a popisují skutečnou disociaci léčiva Ibrutinib.

## 6. Závěr

Prostřednictvím spektrofotometrické a potenciometrické pH titrace byly experimentálně určeny čtyři disociační konstanty léčiva Ibrutinib (Imbruvica). Protože v rozmezí pH nad 10 a pod pH 5 vzniká při potenciometrické titraci sraženina, odhady  $pK_a$  pro pH vyšší než 10 a nižší než 5 nejsou z potenciometrické titrace dostatečně spolehlivé.

1) Omezeně rozpustná forma  $LH_2$  je schopna protonace a dochází k vytvoření částic  $LH_3$  a  $LH_4$ . Naopak ke vzniku  $LH$  a  $L$  dochází v čisté vodě při neutrálním pH. Graf závislosti molárních absorpčních koeficientů různě protonovaných částic na vlnové délce ukazuje, že spektrum částic  $LH_2$ ,  $LH$  a  $L$  se ve tvaru spekter liší minimálně, zatímco protonace chromoforů  $LH_2$  a  $LH_3$ ,  $LH_4$  má větší vliv na chromofory v molekule Ibrutinibu (Obr. 8).

2) Bylo prokázáno, že v rozmezí pH 2 až 10 se nachází čtyři disociační konstanty, které lze spolehlivě odhadnout z naměřených spekter, kdy byla použita nižší koncentrace Ibrutinibu  $5,8 \times 10^{-5}$  M. Z důvodu použití pufru k udržení pH, byla při měření nastavena iontová síla  $I = 0.004$  a stanovené smíšené disociační konstanty byly určeny pro tuto hodnotu iontové síly. Pomocí regresních programu SQUAD84 a REACTLAB byly stanoveny srovnatelné odhady disociačních konstant:  $pK_{a1} = 3.61(02)$ ,  $pK_{a2} = 5.43(02)$ ,  $pK_{a3} = 7.16(01)$  a  $pK_{a4} = 10.81(01)$ . Pro teplotu  $37^\circ\text{C}$  je  $pK_{a1} = 3.12(04)$ ,  $pK_{a2} = 6.01(03)$ ,  $pK_{a3} = 7.61(05)$ ,  $pK_{a4} = 9.22(06)$ . Směrodatné odchylky posledních platných číslic jsou zde uvedeny v závorkách.

3) Pomocí pH-potenciometrické titrace byly stanoveny pouze tři disociační konstanty pro vyšší (potenciometrickou) koncentraci Ibrutinibu  $4 \times 10^{-4}$  M. Prostřednictvím vyhodnocení v programu ESAB byly stanoveny disociační konstanty s hodnotou iontové síly  $I = 0.006$ ,  $pK_{a2} = 6.39(04)$ ;  $pK_{a3} = 7.68(04)$ ;  $pK_{a4} = 9.96(05)$  pro  $25^\circ\text{C}$  a  $pK_{a2} = 6.02(03)$ ,  $pK_{a3} = 6.96(03)$ ,  $pK_{a4} = 9.65(05)$  pro  $37^\circ\text{C}$ .

4) Predikce disociačních konstant Ibrutinibu byla provedena programem MARVIN. Porovnáním predikce a experimentu bylo zjištěno, že predikční odhady  $pK_a$  a naměřené  $pK_a$  se v některých případech liší. Výborná těsnost proložení naměřených dat prokázala vysokou věrohodnost stanovených  $pK_a$ .

5) Uplatněním Debey-Hückelovy rovnice závislosti smíšené disociační konstanty na iontové síle, byly stanoveny termodynamické disociační konstanty s hodnotou iontové síly  $I = 0$  pro  $25^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$  dvěma nezávislými metodami: pH potenciometrickou titrací a UV-VIS spektrofotometrickou titrací (Obr 13 a 15).

## 7. Použitá literatura

1. Manallack D. T., Prankerd R. J., Yuriev E., Oprea T. I., Chalmers D. T.: The significance of acid/base properties in drug discovery. *Chemical Society Reviews*. 2013, roč. 42, č. 2, s. 485-496.
2. Box K. J., Donkor R. E., Jupp P. A., Leader I. P., Trew D. F., Turner C. H.: The chemistry of multi-protic drugs: Part 1: A potentiometric, multi-wavelength UV and NMR pH titrimetric study of the micro-speciation of SKI- 606. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, roč. 47, č. 2, s. 303-311.
3. Benet, L.Z., Goyan J.E.: Potentiometric determination of dissociation constants. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1967, roč. 56, č. 6, s. 665-680.
4. Takács-Novák K., Box K. J., Avdeef A.: Potentiometric pK a determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, roč. 151, č. 2, s. 235-248.
5. *DrugBank* Ibrutinib [databáze] dostupné z <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09053>.
6. Fečková-Mihályová J., Ďuraš J., Zuchnická J., Kaščák M., Hájek R.: Ibrutinib v hematonekologii. *Klinická Farmakologie a Farmacie*. 2016, roč. 30, č. 3, s. 8– 14.
7. Davids M. S., Brown J. R.: Ibrutinib: a first in class covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase. *Future Oncology*. 2014., roč.10, č. 6, s. 957-967.
8. Advani, R H., Buggy J. J, Sharman J. P., Smith S. M., Boyd T. E., Grant B., Kolibaba K. S., Furman R. R., Rodriguez S., Chang B.Y., et al.: Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *Journal of Clinical Oncology*. 2012, roč. 31, č. 1, s. 88-94.
9. Cameron, F., Sanford, M.: Ibrutinib: First Global Approval. *Drugs*. 2014, roč 74, č. 2, s. 263-271.

10. Češka R.: *Interna.1*, 1.Vydání, Praha: Triton, 2010, 855s. ISBN 978-80-7387-423-0.
11. Burger, J.A., Tedeschi A., Barr P.M., Robak T., Owen C., Ghia P., Bairey O., Hillmen P., Bartlett N.L., Li J., Simpson D., et al.: Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2015, roč. 373, č. 25, s. 2425-2437.
12. Byrd J. C., M. D., Furman R. R., Coutre S. E., Flinn I.W., Jan A. Burger J.A., Kristie A. Blum K.A., Grant B., Sharman J.P., Coleman M., et al.: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013, roč. 369, č. 1, s. 32-42.
13. Šálek, D., Janíková A., Veselá P., Mayer J.: Nové perspektivy v patogenezi a diagnostice lymfomu z pláštěvých buněk (mantle cell lymfomu). *Onkologie*. 2013, roč. 7, č. 3, s. 121-126.
14. Wang M. L., Rule S., Martin P., Goy A., Auer R., Kahl B. S., Jurczak W., Advani R.H., Romaguera J.E., Williams et al.: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2013, roč. 369, č. 6, s. 507-516.
15. Dítě P.: *Vnitřní lékařství*, 2.Vydání, 2007, Praha : Galén, 2007, 586s. ISBN 978-807-2624-966.
16. Treon S. P., Tripsas C. K., Meid K., Warren D., Varma G., Green R., Argyropoulos K.V., Yang G., Cao Y., Xu L. et al.: Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine*, 2015, roč. 372, č. 15, s. 1430-1440.
17. Gayko U., Fung M., Clow F., Sun S., Faust E., Price S., James D., Doyle M., Bari S., Zhuang S.H.: Development of the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib for B cell malignancies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, roč. 1358, č. 1, s. 82-94.



18. Zhang S.Q., Smith S.M., Zhang S.Y., Lynn Wang Y.: Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *British journal of haematology*. 2015, roč. 170, č. 4, s. 445-456.
19. Byrd J.C., Brown J.R., O'brien S., Barrientos J.C., Kay N.E., Reddy N.M., Coutre S., Tam C.S., Mulligan S.P., Jaeger U. et al.: Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014, roč. 371, č. 3, s. 213-223.
20. Woyach J.A., Johnson A.J.: Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood*. 2015, roč. 126, č. 4, s. 471-477.
21. Furman R.R., Cheng S., Lu P., Setty M., Perez A., Guo A., Racchumi J., Xu G., Wu H., Ma J., Steggerda S.M., Coleman M., Leslie C., Wang Y.L.: Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014, roč. 370, č. 24, s. 2352-2354.
22. Jacobson C., Kopp N., Layer J.V., Redd R.A., Tschuri S., Haebe S., Van Bodegom D., Bird L., Christie A.L. et al.: HSP90 inhibition overcomes ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016., roč. 128, č. 21, s. 2517-2526.
23. Owen R.G., Treon S.P., Al-Katib A., Fonseca R., Greipp R.P., McMaster M.L., Morra E., Pangalis G.A., San Miguel J.F., Branagan A.R., Dimopoulos M.A.: Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Seminars in oncology*. 2003, roč. 30., č. 2., s. 110-115.
24. Treon, S.P., Xu L., Yang G., Liu X., Cao Y., Sheehy P., Manning R.J., Patterson C.J., Tripsas C., Arcaini L., et al.: MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine*. 2012, roč. 367, č. 9, s. 826-833.

25. Hunter Z.R., Xu L., Yang G., Zhou Y., Liu X., Cao Y., Manning R.J., Tripsas C., Patterson C.J., Sheehy P., Treon S.P.: The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014., roč. 123, č. 11, s. . 1637-1646.
26. Debye, P., Hückel E.: De la theorie des electrolytes. I. abaissement du point de congelation et phenomenes associes. *Physikalische Zeitschrift*. 1923, roč. 24, č. 9, s. 185-206.
27. Čepan M., Pelikán .P., Liška M.: *Chem. Listy*. 1991, č. 85, s. 1057.
28. Pytela O.: *Chemometrie pro organické chemiky*, 1. Vydání, Pardubice: VŠCHT Pardubice, 1993.
29. Malinowski E.R.: Determination of the number of factors and the experimental error in a data matrix. *Analytical Chemistry*. 1977, roč. 49, č. 4 , s. 612-617.
30. Maeder M., King P.: *Chemometrics in Practical Applications*, 1. Vydání, Rijeca: InTech, 2012, 326s. ISBN 978-953-51-0438-4.
31. Leggett D.J, McBryde W.A.E.: General computer program for the computation of stability constants from absorbance data. *Analytical Chemistry*. 1975, roč. 47, č. 7, s. 1065-1070.
32. Leggett D.J.: Numerical analysis of multicomponent spectra. *Analytical chemistry*. 1977, roč. 49, č 2, s. 276-281.
33. Leggett D.J., Kelly S. L, Shiue L. R, Wu Y.T, Chang D, Kadish K.M.: A computational approach to the spectrophotometric determination of stability constants—II: Application to metalloporphyrin-axial ligand interactions in non-aqueous solvents. *Talanta*. 1983, roč. 30, č. 8, s. 579-586.

34. Meloun, M., Čapek, J., Mikšík, P., Brereton, R. G.: Critical comparison of methods predicting the number of components in spectroscopic data. *Analytica Chimica Acta*. 2000, roč. 423, č. 1, s. 51-68.
35. Meloun M.: Univerzita Pardubice [online] 2017[cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://meloun.upce.cz/docs/publication/198.pdf>.
36. Meloun M., Syrový T., Vrána A.: Determination of the number of light-absorbing species in the protonation equilibria of selected drugs. *Analytica Chimica Acta*. 2003, roč. 489, č. 2, s. 137-151.
37. Gampp H., Meader M., Mayer C.J., Zuberbühler A.D.: Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data--II: SPECFIT: two user-friendly programs in basic and standard FORTRAN 77. *Talanta*. 1985, roč. 32, č. 4, s. 257-264.
38. Málková H.: *Stanovení disociačních konstant léčiv faktorovou a regresní analýzou absorbanční matice*. Diplomová práce, Pardubice 2011, VŠCHT Pardubice.
39. Brereton, R.G.: *Data Handling in Science and Technology: Multivariate pattern recognition in chemometrics, Data Reduction Using Principal Components Analysis*. 9. Vydání, Amsterdam-London-New York-Tokyo: Elsevier, 1992, 324s.
40. Ferenčíková Z.: *Termodynamické disociační konstanty vybraných cytostatik a imunosupresiv*. Diplomová práce, Pardubice 2009, VŠCHT Pardubice.
41. Ghasemi, J., Nayebi S, Kubista M, Sjogreen B.: A new algorithm for the determination of protolytic constants from spectrophotometric data in multiwavelength mode: Calculations of acidity constants of 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) in mixed nonaqueous-water solvents. *Talanta*. 2006 roč. 68, č. 4, s. 1201-1214.
42. Bagotsky V. S.: *Fundamentals of Electrochemistry*, 2. Vydání, Hoboken: Wiley Interscience, 2006, 752s. ISBN 978-0-471-70058-6.

43. Rigano, C., Grasso M., S. Sammartano S.: Computer-Analysis of Equilibrium Data in Solution-a Compact Least-Squares Computer-Program for Acid-Base Titrations. *Annali Di Chimica*. 1984. roč. 74, č. 7-8, s. 537-532.
44. Destefano, C., Princi P, C Rigano C., S. Sammartano S.: Computer-Analysis of Equilibrium Data in Solution Esab2M-An Improved Version of the Esab Program. *Annali di Chimica*, 1987. roč. 77, č.7-8, s. 643-675.
45. Manchester, J., Walkup G., Rivin O., You Z.: Evaluation of p K a estimation methods on 211 druglike compounds. *Journal of chemical information and modeling*. 2010, roč. 50, č. 4, s. 565-571.
46. Riddick, J.A., Bunger W.B., Sakano T.K.: *Techniques of Chemistry 4th ed., OrganicSolvents.* , 2. Vydání, New York: John Wiley and Sons, 1985, 321s.
47. Meloun M, Bordovská S., Syrový T., Vrána A.: Tutorial on a chemical model bilding by least-squares non linear regression of multivawelength spectrophotometric pH-titration data. *Analytika Chemica Acta*. 2006, roč. 580, č. 1, s.107-121.
48. Meloun M, Bordovská S, Syrový T.: A novel computational strategy for the pK(a) estimation of drugs by non-linear regression of multiwavelength spectrophotometric pH titration data exhibiting small spectral changes. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2007, roč. 20, č. 9, s. 690-701.
49. Meloun M., Militký J., Forina M.: *Chemometrics for analytical chemistry, PC-Aided Statistical Data Analysis.*, 1. Vydání, Chichester: Ellis Horwood, 1992, 330s. ISBN 0-13-123788-7.