

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Катедра по Клинична лаборатория**

---

---

**МИГЛЕНА ВАСИЛЕВА СМЕРИКАРОВА**

**РАЗРАБОТВАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ НА АНАЛИТИЧНИ  
МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРАНСТИРЕТИНОВИ  
КИНЕТИЧНИ СТАБИЛИЗАТОРИ В БИОЛОГИЧНА СРЕДА**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”**

**Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт**

**Професионално направление: 7.1 Медицина**

**Докторска програма: Клинична лаборатория**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**Проф. д-р Добрин Аврамов Свинаров, дмн**

**Доц. Ваня Николова Масларска, дф**

**София, 2023**

# Съдържание

Съдържание.....	2
Използвани съкращения.....	5
Въведение.....	7
<b>1. Литературен обзор.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Преалбумин – структура, синтез, функции в организма.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Дисоциация на транстиретина вследствие на мутации в транстиретиновия ген.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Амилоидни фибрилни отлагания и развитие на амилоидоза. Същност, класификация и типове амилоидоза.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Транстиретинова амилоидоза – разпространение, антиципация, начало и продължителност на заболяването, симптоматика и диагностициране.....</b>	<b>15</b>
1.4.1. Разпространение, антиципация, начало и продължителност на заболяването.....	15
1.4.2. Симптоматика.....	20
1.4.3. Ранно диагностициране и стадии на заболяването.....	26
<b>1.5. Терапевтични подходи за лечение на транстиретиновата амилоидоза.....</b>	<b>27</b>
1.5.1. Потискане на синтеза.....	28
1.5.2. Лечение чрез разграждане/реабсорбция на амилоидните фибрили.....	29
<b>1.6. Стабилизатори на транстиретиновата молекула – представители, структура, биологични свойства.....</b>	<b>29</b>
<b>1.7. Аналитични и биоаналитични техники за определяне на транстиретинови стабилизатори в биологична среда.....</b>	<b>33</b>
1.7.1. Пробоподготовка на биологичните проби.....	33
1.7.2. Апаратен анализ.....	40
1.7.3. Валидиране на биоаналитични методи.....	45
<b>Обобщение.....</b>	<b>46</b>
<b>2. Цел и задачи.....</b>	<b>48</b>
<b>3. Материали и методи.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Материали.....</b>	<b>49</b>
3.1.1. Апаратура.....	49
3.1.1.1. Течно-хроматографска система.....	49
3.1.1.2. UV-VIS Спектрофотометър.....	49
3.1.1.3. Ултрацентрифуга.....	49
3.1.1.4. Други апарати.....	49
3.1.2. Реактиви.....	49
3.1.3. Клиничен материал.....	50
<b>3.2. Методи.....</b>	<b>52</b>
3.2.1. Анализ на спектрите на лекарствените вещества TAF и DIF и вътрешните стандарти - IS-T и IS-D.....	52
3.2.1.1. Принцип на процедурата.....	52
3.2.1.2. Приготвяне на разтворите за анализ.....	52
3.2.1.3. Спектрофотометричен анализ.....	53

3.2.2.	Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на ТАФ в кръвна плазма.....	53
3.2.2.1.	Принцип на процедурата.....	53
3.2.2.2.	Приготвяне на работни разтвори.....	54
3.2.2.3.	Приготвяне на калибрационни разтвори и разтвори за качествен контрол.....	55
3.2.2.4.	Пробоподготовка.....	56
3.2.2.5.	HPLC анализ.....	56
3.2.3.	Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на DIF в кръвна плазма.....	57
3.2.3.1.	Принцип на процедурата.....	57
3.2.3.2.	Приготвяне на работни разтвори.....	57
3.2.3.3.	Приготвяне на калибрационни разтвори и разтвори за качествен контрол.....	58
3.2.3.4.	Пробоподготовка.....	59
3.2.3.5.	HPLC анализ.....	60
3.2.4.	Статистически методи.....	60
<b>4.</b>	<b>Резултати и обсъждане.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.</b>	<b>Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Tafamidis....</b>	<b>61</b>
4.1.1.	Оптимизиране на метода за изследване.....	61
4.1.2.	Валидиране на хроматографския метод.....	64
4.1.2.1.	Предварително зададени критерии за приемане.....	64
4.1.2.2.	Селективност и специфичност.....	64
4.1.2.3.	Линейност.....	65
4.1.2.4.	Точност, достоверност и възпроизводимост.....	68
4.1.2.5.	Граница на откриване и граница на количествено определяне (LOD/ LOQ).....	69
4.1.2.6.	Тестове за пригодност на системата.....	70
<b>4.2.</b>	<b>Прилагане на разработения метод за количествен анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза.....</b>	<b>71</b>
4.2.1.	Проследяване на плазмените концентрации на Tafamidis при българската кохорта пациенти носители на мутацията Glu89Gln.....	71
4.2.2.	Обработка и анализ на получените резултати. Определяне на степента на корелация между плазмената концентрация на лекарствения продукт и някои клинични характеристики на избраната група пациенти.....	74
4.2.2.1.	Плазмена концентрация и пол.....	75
4.2.2.2.	Плазмена концентрация и възраст.....	77
4.2.2.3.	Плазмена концентрация и продължителност на терапията.....	78
4.2.2.4.	Ограничения на проучването.....	80
4.2.3.	Проследяване и анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти носители на мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu.....	80
<b>4.3.</b>	<b>Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Diflunisal....</b>	<b>85</b>

4.3.1. Оптимизиране на метода за изследване.....	85
4.3.2. Валидиране на хроматографския метод.....	88
4.3.2.1. Предварително зададени критерии за приемане.....	88
4.3.2.2. Селективност и специфичност.....	88
4.3.2.3. Линеиност.....	89
4.3.2.4. Точност, достоверност и възпроизводимост.....	92
4.3.2.5. Граница на откриване и граница на количествено определяне (LOD/ LOQ).....	93
4.3.2.6. Тестове за пригодност на системата.....	94
<b>4.4. Ограничения свързани с прилагането на метода при българската група         пациенти с транстиретинова амилоидоза.....</b>	<b>95</b>
<b>5. Заключение.....</b>	<b>96</b>
<b>6. Изводи.....</b>	<b>97</b>
<b>7. Приноси.....</b>	<b>98</b>
<b>8. Литература.....</b>	<b>99</b>

## Използвани съкращения

<b>AK</b> – аминокиселини	<b>HPLC-UV</b> – високоефективна течна хроматография с ултравиолетова детекция
<b>КЕНИМУС</b> – Комитет по етика на научните изследвания към Медицински университет София	<b>HQC</b> – проба за качествен контрол с висока концентрация
<b>НСПВС</b> – нестероидни противовъзпалителни средства	<b>ICH</b> – Международна конференция по хармонизация на техническите изисквания при регистриране на лекарствени продукти за хуманна употреба
<b>AA</b> – амилоид А	<b>IT</b> – мас анализатор за улавяне на йони
<b>ACN</b> - ацетонитрил	<b>LC-MS</b> – течна хроматография с мас детекция
<b>AL</b> – леко-верижна амилоидоза (първична амилоидоза)	<b>LLE</b> – течна-течна екстракция
<b>APCI</b> – химическа йонизация при атмосферно налягане	<b>LLOQ</b> – долна граница на количествено определяне
<b>APP</b> – амилоид прекурсорен протеин	<b>LOD</b> – граница на откриване
<b>ASOs</b> – антисенс олигонуклеотиди	<b>LOQ</b> – граница на количествено определяне
<b>ATTR</b> – амилоидоза от транстиретинов тип	<b>LQC</b> – проба за качествен контрол с ниска концентрация
<b>AUC</b> – площ под кривата плазмена концентрация/ време	<b>LT</b> – чернодробна трансплантация
<b>BNP</b> – В-тип натриуретичен пептид	<b>MP</b> – подвижна фаза
<b>COMP</b> – Комитет по лекарствата сираци към ЕМА	<b>MQC</b> – проба за качествен контрол със средна концентрация
<b>CV%</b> - коефициент на вариация	<b>MS</b> – мас-спектрометрия
<b>DAD</b> – детектор с фотодиодна матрица	<b>NIS</b> – Neuropathy Impairment Score
<b>DIF</b> - Diflunisal	<b>NLT</b> – не по-малко от
<b>EDTA</b> – етилендиаминтетраоцетна киселина	<b>NMT</b> – не повече от
<b>EGCG</b> – епигалокатехин-3-галат	<b>Norfolk QOL-DN</b> – Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy
<b>ЕМА</b> – Европейска агенция по лекарствата	<b>NP-HPLC</b> – нормалнофазова високоефективна течна хроматография
<b>ESI</b> – йонизация с електроспрей	<b>NT-pro BNP</b> – неактивен прекурсор на BNP
<b>FAP</b> – фамилна амилоидна полиневропатия	<b>ODS</b> – октадецилсилан (C18)
<b>FDA</b> – Американска асоциация по храните и лекарствата	<b>OS</b> – октилсилан (C8)
<b>FLD</b> – флуоресцентен детектор	
<b>HPLC-FLD</b> – високоефективна течна хроматография с флуоресцентна детекция	

**Ph. Eur.** – Европейска фармакопея  
**PND** – полиневропатна инвалидност  
**PPT** – протеинна преципитация  
**PSE** – протеинна преципитация с разделяне на фазите  
**QC** – проба за качествен контрол  
**QMS** – квадруплен мас анализатор  
**RBP** – ретинол-свързващ протеин  
**RP-HPLC** – обратнофазова високоефективна течна хроматография  
**SAP** – серумен амилоиден Р компонент  
**SD** – стандартно отклонение  
**SFM** - спектрофлуориметрия  
**siRNAs** – малки интерфериращи РНКи  
**SP** – неподвижна фаза  
**SPE** – твърдофазна екстракция  
**SPM** - спектрофотометрия  
**SS** – стационарно състояние  
**T<sub>3</sub>** - трийодтиронин  
**T<sub>4</sub>** - тироксин  
**TAF** - Tafamidis  
**TBG** – тироксин-свързващ протеин  
**TCA** – трихлороцетна киселина  
**TFA** – трифлуороцетна киселина  
**THAOS** – Transthyretin Amyloidosis  
Outcome Survey  
**TOF** – мас анализатор за времето на полет  
**TTR** - транстиретин  
**TTR-FAC** – наследствена транстиретинова амилоидна кардиомиопатия  
**TTR-FAP** – наследствена транстиретинова амилоидна полиневропатия  
**TUDCA** – тауроурсодезоксихолова киселина  
**ULOQ** – горна граница на количествено определяне  
**UV** – ултравиолетова светлина  
**VIS** – видима светлина

## Въведение

Транстиретиновата амилоидоза, дължаща се на мутация в гена за транстиретин е сред най-честите наследствени амилоидози. Наличието на мутация в гена кодиращ синтеза на протеиновия тетрамер води до неправилно нагъване на белтъчните вериги и образуване на амилоидни фибрили отлагачи се в тъканите и водещи до фамилна амилоидна полиневропатия, фамилна амилоидна кардиомиопатия, див тип или сенилна амилоидоза. Транстиретиновата амилоидна полиневропатия е рядко заболяване с честота на разпространение 1.1/100000 в предимно засегнатите държави като Португалия, Швеция, Япония и Бразилия, а разпространението в САЩ и Европа се представя като 1/100000.

Най-разпространената мутация по света е Val30Met, като тя е и най-проучена до момента. В югоизточна Европа са установени няколко мутации като предимно доминиращи – Glu89Gln, Gly47Gln и Ser77Tyr. Мутацията Glu89Gln е характерна предимно за България и Италия, а проучванията върху нея са в етап на разработка. Установено е, че клиничният ѝ фенотип е различен от този на Val30Met като при нея се наблюдава смесено неврологично и кардиологично засягане.

Първото прилагано лечение в световен мащаб е чернодробната трансплантация, основавайки се на факта, че транстиретинът се синтезира в черния дроб. Неприложимостта на трансплантационното лечение в много от специфичните случаи в клиничната практика води до разработване на неоперативно лечение с използване на средства инхибиращи амилоидогенезата на различни етапи и стабилизиращи тетрамера на транстиретина. През ноември 2011г. одобрен от Европейската медицинска агенция е препаратът Tafamidis. Механизмът му на действие е захващане за T<sub>4</sub> залавните места на протеина и посредством това стабилизиране на тетрамера. Прилага се при първи стадий на заболяването, когато болните не се нуждаят от помощно средство при придвижване/ходене. Ефикасността на Tafamidis в забавянето на развитието на полиневропатията е доказана, а в момента се правят проучвания и върху ефекта му при кардиомиопатия. При болните с неврологично засягане, поставени на лечение с Tafamidis се наблюдава удължаване на преживяемостта с над седем години, а натрупаните до момента данни показват, че макар и доста по-кратко (около 3.5 г.) е наблюдавано удължаване на преживяемостта и при болните с доминираща кардиомиопатия, причинена от наследствена или сенилна амилоидоза (наречена още „див тип” амилоидоза). И в двата случая обаче съществена роля играе ранната диагноза

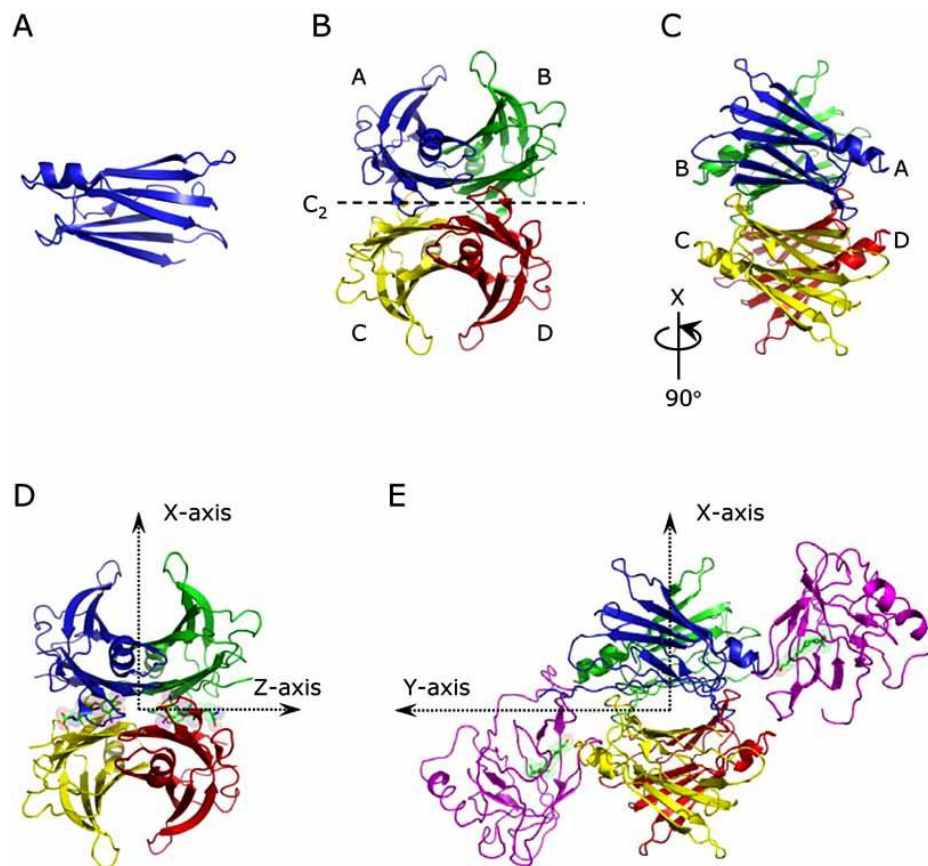
и ранното започване на лечение. Транстиретиновата амилоидна кардиомиопатия е все по-разпознаваема причина за сърдечна недостатъчност, но Tafamidis като първа одобрена от FDA терапия, често има високо доплащане от пациентите. За разлика от нея Diflunisal (нестероидно противовъзпалително лекарство), първоначално използван като противовъзпалителен продукт, днес се използва извън терапевтичната си насоченост при кардиомиопатия причинена от амилоидоза, но ефектът на двете терапии не е сравнен.

Анализът на лекарствените плазмени концентрации (нар. терапевтичен лекарствен мониторинг) дава възможност за оптимизиране на терапевтичната схема при всеки пациент, както и намаляване на нежеланите странични ефекти от медикаментите. Тъй като мутацията обект на изследването е сред най-редките в света, но има висока честота на проявление в България, това ни накара да насочим изследователската си работа към разработването на бърз, надежден и чувствителен HPLC метод за определяне на плазмените нива на Tafamidis при пациенти с Glu89Gln мутация и изследване на възможната връзка между нивата на плазмените концентрации и проследяваните клинични показатели по време на лечението.

# 1. Литературен обзор

## 1.1 Преалбумин – структура, синтез, функции в организма

Човешкият плазмен преалбумин (транстиретин, TTR) представлява разтворим негликозилиран протеин изграден от четири полипептидни вериги (общо 127 аминокиселини (АК)), синтезиращ се предимно в черния дроб [1-5], а в по-малко количество в хороидния плексус на мозъка и ретиналния пигментен епител на окото. [2,5] Синтезираният TTR в хороидния плексус се секретира предимно в цереброспиналната течност, а не в серума. Секретирането на протеина започва още през ембрионалното развитие и продължава през целия живот, но е доказано, че не е жизненоважен, тъй като след проведено изследване на увредени мишки е наблюдавано нормално фетално развитие и нормална продължителност на живота. [5] TTR циркулира в плазмата като тетрамер с маса 55 kDa заедно с малко количество дисоциирани мономери. [4,6] Изследването на TTR тетрамера с рентгенова дифракция води до установяване на точната вторична, третична и четвъртична структура на протеина (Фигура 1). [5,7]



Фигура 1. Структура на TTR протеина [5]

Формирането на четвъртичната структура се осъществява чрез протичане на взаимодействия между симетрично еквивалентните мономерни вериги в TTR - I/ II, III/ IV, I/ IV и II/ III, наречени мономер – мономерни или димер – димерни взаимодействия [7]. Синтезът на TTR в организма се кодира от ген намиращ се на дългото рамо на хромозома 18, позиция 12.1 (18q11.2-q12.1) [3,8-10] като обхваща приблизително област от 7 килобази, включваща 4 екзона и 3 интрона. [11]

Функцията на TTR в организма се състои в пренос на тироксин ( $T_4$ ) и образуване на комплекс с ретинол-свързващия протеин (RBP) за пренос на ретинол. [5] При протичането на димер - димерните взаимодействия за образуване на четвъртичната структура на протеина и специфичното разположение в пространството се формира канал разполовяван симетрично от оста  $C_2$  (Фигура 1B) [5] освобождавайки две свързващи места с висок афинитет към тироидните хормони – трийодтиронин ( $T_3$ ) и  $T_4$ . [2] Каналът е с диаметър около 8 Å и е стеснен в средната част (близо до центъра). Проведените анализи с рентгенови лъчи на TTR при наличие на  $T_3$  и  $T_4$  показват, че свързващите места за двата хормона са локализирани в цилиндричен канал на разстояние 4 - 16 Å от центъра [12] и са идентични, тъй като са свързани чрез двойна симетрия.

Над 75% от общо циркулиращия в кръвообръщението  $T_4$  се свързва с тироксин - свързващия глобулин (TBG), поради високия си афинитет към него [2], а около 10 - 15% се свързват с TTR и албумин. [5] В резултат на високия афинитет и ниската плазмена концентрация на TBG (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), по-малко от 1% от TTR тетрамерите участват в преноса на  $T_4$ . Концентрацията на TTR е значително по-висока [5], но афинитетът му на свързване е по-нисък, докато албуминът, който има най-висока плазмена концентрация има най-нисък афинитет към  $T_4$ . [2] За разлика от транспорта на  $T_4$  в плазмата, в цереброспиналната течност TTR е главният преносител (над 80% от  $T_4$  се транспортира с TTR). [5]

Друга важна функция на TTR е свързването с RBP и образуването на комплекс  $\text{holoRBP}$ , използвайки симетричните места за свързване от външната страна на протеина. [13] Формирането на комплекса е възможно и *in vitro* като структурата му може да се определя чрез метода на молекулно заместване. Кристалографската асиметрична единица на комплекса съдържа един TTR тетрамер и две молекули RBP. В този хексамер  $y$ -оста на TTR е запазена, докато двете молекули RBP се свързват с тетрамера по оста, която е паралелна на TTR  $x$ -оста (Фигура 1E). Това е достатъчно за да предотврати потенциално свързване на още две молекули RBP и това да доведе до

образуване на октамерен комплекс. [5,13] Много особености установени при наблюдението на рентгеновата структура на комплекса обясняват експерименталните наблюдения. Доказано е, че образуването на комплекса стабилизира свързването на ретинола с RBP, а заместването на този лиганд може да наруши или да възпрепятства свързването на двете макромолекули. Това потвърждава наблюдението, че ОН-група на ретинола участва във връзката с TTR. Свързването на T<sub>4</sub> е идентично и в двата случая – при свързване с комплекса и с изолираната макромолекула, което доказва, че мястото на свързване с лиганда е разположено в област на молекулата, която не участва във формирането на комплекса. Установено е, че в областта на взаимодействие с TTR, от RBP има два свободни остатъка лизин 89 и 99 и два триптофан 67 и 91, осъществяващи връзката с TTR. В повечето случаи местата на свързване са установени в запазени области, което обяснява кръстосаното взаимодействие между RBP и TTR от различни видове. [13] Образуването на комплекса протича в ендоплазматичния реткулум, с последващо секретирание в плазмата. [5]

Концентрацията на TTR в серума е в границите 3.6 – 7.2  $\mu\text{mol/L}$ . След раждането серумните нива на TTR постепенно нарастват до достигане на тези стойности, а след 50 годишна възраст постепенно започват да намаляват. [5] Като се има предвид средната концентрация на TTR в серума и неговия полуживот (2 - 4 дни) [14] е установено, че хората произвеждат и разграждат по около 250 - 500 mg TTR дневно. [5] За количественото му определяне свързано със стабилността на четвъртичната структура се използват методи като киселинно – медирано агрегиране и образуване на фибриларни формации, агрегиране измервано чрез турбидиметрия, измерване количествата на разтворим и неразтворим TTR, тиофлавин триптофан или ресвератрол свързана флуоресценция, трансмисионна електронна микроскопия и други. [15]

## **1.2 Дисоциация на транстиретина в следствие на мутации в транстиретиновия ген**

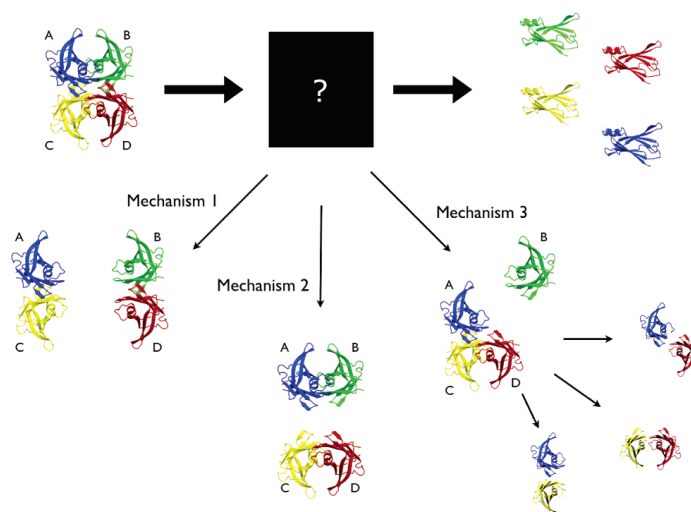
Под влияние на денатуриращи условия или при физиологични условия е възможно дисоцииране на TTR молекулата или частично разгъване, вследствие на което се наблюдава агрегиране на отделните мономери и поставяне на началото на процеса на амилоидогенеза. В резултат се образуват агрегати, наречени амилоидни фибрили или амилоидни плаки, чието отлагане е асоциирано с развитие на амилоидоза. [16,17]

Предпоставки за образуване и отлагане на амилоидни фибрили са скоростноограничаващата дисоциация на TTR и неправилното му нагъване причинено от над 100 точкови мутации на TTR гена. [18,19]

Все още не е установено дали фибрилите или малките разтворими агрегати, които предхождат фибрилите са токсични и медиращи патологията. [16] Независимо от това коя е причината за появяването на патология най-добрият начин за превенция е повлияването на дисоциацията, тъй като това не би позволило да започне целия процес на амилоидогенеза. Процесите на дисоциация и агрегация на TTR протичат изключително бавно при физиологични условия [20] и за осигуряване на наблюдението им при лабораторни условия се използват методи като кисела частична денатурация. [16]

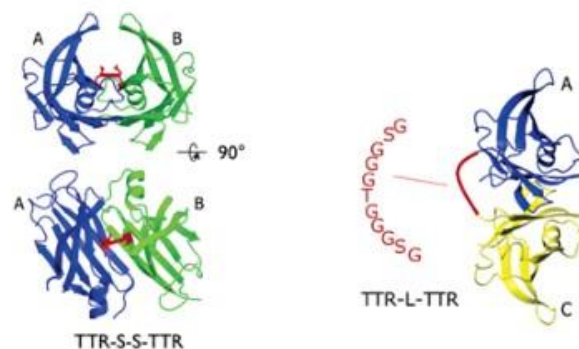
Обикновено между двете свързващи места на  $T_4$  съществува алостерично взаимодействие, което води до съвместно свързване с лиганда. [21] Установено е, че свързването на лиганда дори само с едно от двете свързващи места води до стабилизиране на цялата кватернерна структура, като по този начин се предотвратява дисоциацията и амилоидогенезата чрез селективно стабилизиране на тетрамерното основно състояние за разлика от дисоциативното преходно състояние. [16,22]

Има три възможни пътя на дисоциация на TTR тетрамера до мономери (Фигура 2), като два от тях протичат с образуването на междинни продукти (димери). Третият път на дисоциация протича чрез образуване на тример, дисоциирането му до един от трите възможни димера и последващо разделяне на димерите до мономери. [16]



Фигура 2. Дисоциация на TTR тетрамера [16]

За да се установи дисоциационната последователност на TTR молекулата и следователно стабилността на връзките са разгледани две различни конструкции:  $(\text{TTR-SS-TTR})_2$  и  $(\text{TTR-L-TTR})_2$  (Фигура 3). [16,22] Първата конструкция се характеризира с кръстосана връзка между A и B субединици и симетрично еквивалентните им C и D субединици, медирана от дисулфидната връзка F-F' на  $\beta$ -домените. [16] Втората конструкция  $(\text{TTR-L-TTR})_2$  има пептиден линкер, който свързва ковалентно A и C субединиците и симетричните им B и D субединици. [16,22] Установено е, че димер-димерният комплекс AB/CD разделен от кристалографската ос  $C_2$  е по-нестабилен и е по-вероятно да се разпадне първи (механизъм 2), за разлика от другия димер-димерен комплекс AC/BD (механизъм 1). Освен това при взаимодействието на AB и CD димерите се наблюдават и допълнителни водородни връзки и междумолекулни взаимодействия между страничните вериги, което допълнително ги стабилизира и затруднява дисоциацията им. За разлика от това стабилизирането на другата конструкция  $(\text{TTR-L-TTR})_2$  се осъществява само от хидрофобни връзки. В близост до оста  $C_2$  има разположени остатъци от лизин 15, които имат дестабилизиращ електростатичен ефект и подпомагат разпадането по механизъм 2. Дестабилизацията намалява чрез увеличаване на йонната сила на буфера или чрез мутация до незареден остатък. Доказано е, че механизъм 3 за дисоциация на TTR включващ инкубиране на  $(\text{TTR-L-TTR})_1$ :  $(\text{FT})_2$  молекули е кинетично стабилен в продължение на поне девет месеца, а проучванията за обмен на субединиците не показват нарастване на пиковете на  $(\text{TTR-L-TTR})_2$ :  $(\text{FT})_4$ . Тези резултати показват, че механизъм 3 не е вероятен път за дисоциация на TTR. [22]



Фигура 3. Дисоциационна последователност на TTR молекулата [16]

Мономерите образували се при трите пътя на дисоциация се агрегират и отлагат в различни органи и тъкани на организма под формата на амилоидни фибрили причиняващи прогресивна дисфункция. [23-28]

### **1.3 Амилоидни фибрилни отлагания и развитие на амилоидоза. Същност, класификация и типове амилоидоза**

Амилоидните плаки се отлагат под формата на неразтворими фибрили, главно в извънклетъчните пространства в органите и тъканите. Отлаганията в тъканите са нишковидни, твърди и неразклонени, с диаметър около 10 nm, оцветяващи се в червено от багрилото Конго червено и показващи зелено, жълто или оранжево двулъчепречупване при наблюдение на оцветените отлагания чрез поляризационна микроскопия. При изолиране от тъканите и анализиране с помощта на рентгенова дифракция, нишките показват характерен кръстосан  $\beta$ -дифракционен модел. [26,27] Откритите над 30 вида амилоидни прекурсори са систематизирани в „Списък на номенклатурата на амилоидните фибрили“ за първи път през 1974г. [24] Изменения и допълнения на този списък са правени през период от две години - 2012 [25], 2014 [26], 2016 [28], 2018 [29], а последният вариант е публикуван през 2020 г. [30]

Въпреки, че процесът на образуване на амилоидните фибрили *in vivo* все още не е напълно изяснен, се предполага, че мономерите взаимодействат помежду си чрез образуване на междумолекулни водородни връзки, а новосформираните плаки могат да се отлагат на едно или няколко места по тялото. От там идва и разделянето на амилоидозите на локализирана и системна. [23] За локализираната амилоидоза е характерно отлагането на амилоид само на едно определено място (един орган) или само в един вид тъкан, докато при системната амилоидоза се наблюдава отлагане в няколко различни органа или тъкани. Обща характеристика за всички видове системна амилоидоза е експресирането на прекурсорния протеин на едно определено начално място, последвано от освобождаването му в плазмата и пренасянето и депозирането му, докато при локализираната – синтеза на прекурсорния протеин се осъществява в близост до мястото му на депозиране. Затова може да се направи допълнение към определенията за системна и локализирана амилоидоза: системната амилоидоза се определя като получена от плазмените протеини, а локализираната – като получаваща се от протеини, експресирани от клетки на мястото на отлагане. [23] Локализираната амилоидоза може да бъде два вида локализирана леко-верижна (AL) амилоидоза (първична амилоидоза) и „старчески“ локализирана амилоидни форми (болест на

Алцхаймер и отлагане на амилоид прекурсорен протеин (APP) в Лангерхансовите острови, типичен за диабет тип 2). [23,31] Докато типове системна амилоидоза са: AL амилоидоза, амилоид А (AA) амилоидоза (вторична амилоидоза), фамилна амилоидоза, амилоидоза свързана с възрастта (старческа амилоидоза) и някои по – рядко срещани фамилни амилоидози. [23,31-33]

#### **1.4 Транстиретинова амилоидоза – разпространение, антиципация, начало и продължителност на заболяването, симптоматика, диагностициране.**

##### **1.4.1 Разпространение, антиципация, начало и продължителност на заболяването**

Общият термин е амилоидоза от транстиретинов тип, съкратено АТТН независимо от това кой орган е основно увреден. Има няколко варианта, които причиняват фамилна АТТН и са по-често срещани в популацията, докато други са редки и характерни за определени групи от населението. Прието е ТТН вариантите да се изписват с нормалната аминокиселина, която се намира на съответната позиция в протеина, следвана от номера на аминокиселината от аминотерминалния край, както и от вариантната аминокиселина. [34] Означените АК могат да бъдат записани с помощта на 3-буквен или еднобуквен аминокиселинен код. Късата сигнална последователност от 20 АК в N-крайния домен на ТТН се отстранява при зрееенето на протеина, а това води до изместване в номерацията на аминокиселините при описването на мутациите в ТТН гена. Номенклатурата прилагана в практиката е комбинирана, а съгласно Mutations in Hereditary Amyloidosis [19,34,35] най-често срещаните ТТН варианти са следните:

- Val30Met (p.Val50Met): Първият открит и описан патогенен генетичен вариант през 1952 г. в Португалия [36], а по – късно и в Япония, Швеция, Франция, Испания и Германия. [37] При всички засегнати е установено носителство на ТТН със заменен валин с метионин на позиция 30, произтичащ от точкова мутация. Един от симптомите на заболяването е периферна невропатия, но в действителност пациентите имат системна амилоидоза, с депозити в сърцето, стомашно-чревния тракт, очите и др. Това е най-добре изучената мутация до момента и служи като прототип за АТТН вариантна последователност.

- Gly6Ser (p. Gly26Ser): Това е най-често срещаният вариант (носен от 10% от европейците), но не е свързан с поява на амилоидоза.
- Leu58His (p. Leu78His): Среща се в Германия и САЩ и обикновено засяга капилярния лигамент и нервите на горните крайници.
- Thr60Ala (p. Thr80Ala): За първи път е открита в Ирландия, води до системна амилоидоза с късно начало проявяваща се със сърдечно и неврологично засягане.
- Ser77Phe (p. Ser97Phe): Открита е за първи път във Франция през 1998 г. В България също има регистрирани случаи на тази мутация, но без обособен ендемичен регион. Проявява се с полиневропатия.
- Glu89Gln (p. Glu109Gln): Открита е за първи път в Италия през 1992 г. [38] В България това е най-разпространената мутация с обособен ендемичен регион – Кюстендилска и Благоевградска област. Фенотипно заболяването се проявява с полиневропатия съпроводена с рестриктивна кардиомиопатия – смесен фенотип.
- Val122Ile (p. Val142Ile): Най-голям брой носители са регистрирани в Западна Африка (над 5% от населението) и сред афро-американците – 3.9%. Проявява се с периферна невропатия.

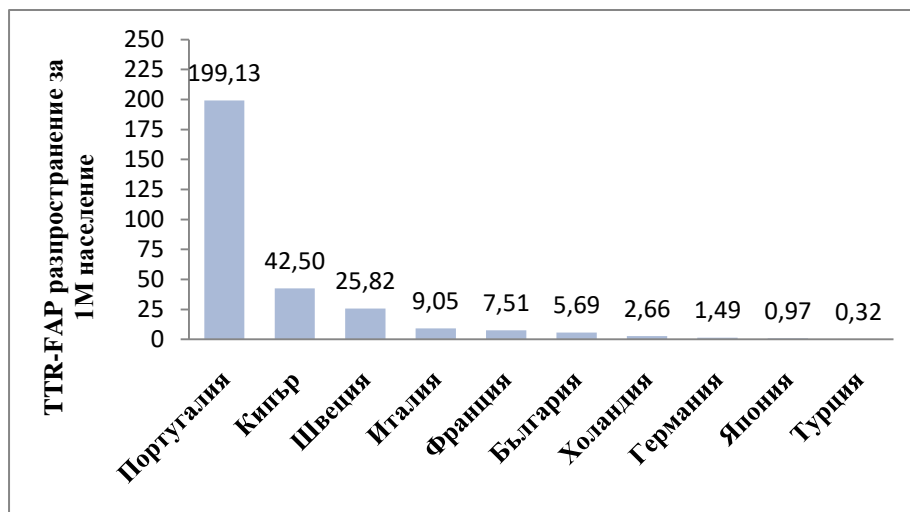
Европа е континента с най-широко разпространение на наследствена транстиретинова амилоидна полиневропатия (TTR-FAP). Първият описан клиничен случай е през 1929 г. във Великобритания, но той е бил погрешно диагностициран като Дежери-Сотас синдром, а по-късно през 1952 г. в Португалия за първи път е поставена диагнозата TTR-FAP. [36] Четири години по-късно през 1956 г. за първи път е изолиран TTR протеина от човешки серум. В Швеция през 1965 г. чрез биопсия е потвърдена диагнозата TTR-FAP, а след това последователно и в голяма част от останалите страни в Европа – 1970-1975 г. – Франция, 1976 г. – Испания, 1986 г. – Гърция, 1990 г. – Италия и Турция. През 1978 г. е установено, че серумния преалбумин е прекурсор за развитие на амилоидоза, по-късно през 1983-1984 г. е доказано и наличието на точкова мутация в гена кодиращ синтеза на протеина, водеща до погрешно нагъване на протеина или неговата дисоциация. [39]

Първият клиничен случай на TTR амилоидоза публикуван в литературата за България е през 2008 г. [35], когато след проведени обстойни клинични изследвания на двама пациенти от ендемичната за България област Благоевград са установени

амилоидни отлагания при взета ректална биопсия и оцветяване с Конго червено. Диагнозата е потвърдена чрез провеждане на ДНК секвенционен анализ, а резултатите показват наличие на Glu89Gln мутация и при двата пациента. По-късно през 2008 и 2009 г. в района на Благоевград са установени още 4 случая на TTR амилоидоза, а секвенирането на ДНК при тях показва освен наличие на Glu89Gln и още една мутация - Val30Met. От този момент нататък започва активно изследване на пациенти със съответната клинична картина за TTR амилоидоза. Рутинното генетично диагностициране е въведено в България през 2010 г. [37] в една от медико-генетичните лаборатории в страната, а до края на 2017 г. са установени над 53 семейства с болни и асимптомни носители. [40]

Проявяването на заболяването се отнася до вероятността генетичните и фенотипните характеристики да бъдат изразени при хора, които носят генната мутация (пенетрантност). Ако пенетрантността е под 100% или непълна, носителите на гена могат да останат безсимптомни, но въпреки това децата им могат да бъдат засегнати клинично. Значително по-висок е риска от по-ранно начало, когато мутацията се наследява от майката, а не от бащата.

Разпространението на транстиретиновата амилоидоза по света варира географски, което до голяма степен е свързано с миграционните процеси. Общата честота на разпространение по цял свят е определена като 1.1/100 000. Най-висока е честотата в Португалия, Швеция и Япония, като в някои от ендемичните фокуси в тези страни тя може да достигне до 1/1 000 жители. [37] Установено е, че заболяването в ендемичните страни представляват 24% от общия брой болни с TTR-FAP, въпреки че това е само 3% от общото население на света. [41] Сравнително ниският процент се дължи на неендемични държави с високо население (например Индия и Китай). При по-детайлен анализ допълнителни случаи на TTR-FAP могат да бъдат открити при 40% от световното население, живеещо в райони, които са бивши португалски колонии като Ангола, Кабо Верде, Екваториална Гвинея и Мозамбик. [41] На Фигура 4 са представени данните относно разпространението на TTR-FAP за 1 млн. население за някои от ендемичните страни.

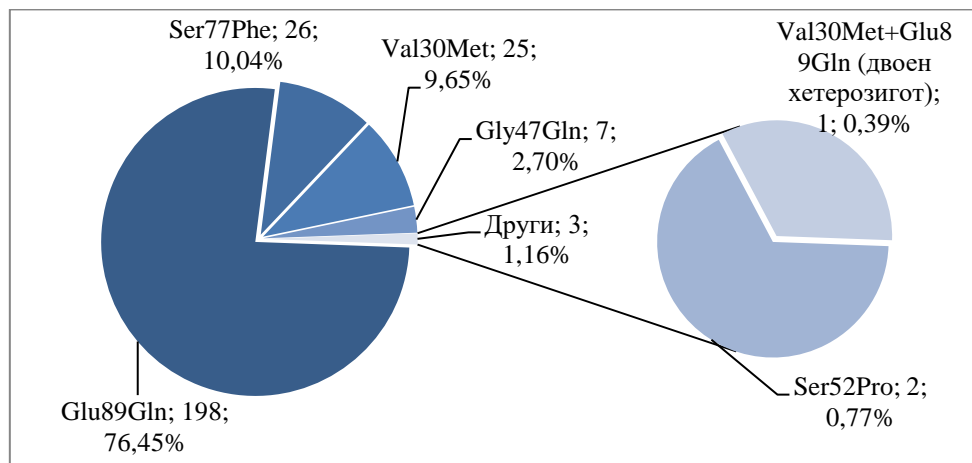


Фигура 4. Екстраполирани данни относно разпространението на TTR-FAP за 1 млн. население за някои от ендемичните страни

Val30Met е най-разпространената мутация по света, в страни като Португалия [42], Бразилия [43,44], Швеция [45] и Япония [46,47], приети за ендемични. Класификацията е направена на база високата честота на разпространение на заболяването, високата осведоменост на лекари и пациенти и своевременното диагностициране. Литературните данни показват връзката между географското разпространение на тази мутация и описаните миграционни процеси. За неендемични са приети страни като Франция [48,49,50], Кипър [51], Балеарски острови (Испания) [52], Турция [53], Германия [54] и други. В страни като САЩ поради мултиетническия характер на населението се наблюдават множество различни мутации – Val122Ile, Thr60Ala, Val30Met и Ser77Tyr [55], като най-често разпространени са Val122Ile и Thr60Ala. Италия е друга страна с намерени разнообразни мутации [56,57], като най-голям е делът на Glu89Gln, Phe64Leu и Thr49Ala. [56] В Унгария като доминиращи са установени мутациите His88Arg и Ile107Val, които са едни от най-малко разпространените по света. [58]

Glu89Gln мутацията е специфична регионална Балканско-средиземноморска мутация характерна за България [59], Италия (Сицилия) [56], Македония и Косово [60] и Турция. [53] На Фигура 5 е представено процентното разпределение на TTR патогенните генетични варианти в България съгласно данните натрупани до 2019г. [35] Открити са пет различни мутации, засягащи TTR гена: Glu89Gln, Ser77Phe, Val30Met,

Gly47Glu и Ser52Pro. Пациентите с най-разпространената в България мутация - Glu89Gln произхождат предимно от югозападния регион на страната в рамките на административните райони Кюстендил и Благоевград (от град Дупница до град Петрич). Поради вътрешна миграция, пациенти с тази мутация се срещат и в Североизточна България (областите Варна, Шумен, Търговище, Добрич, Велико Търново и Русе), Централна България (Ловеч, Плевен, Габрово) и в Югоизточната и Южна България (Хасково, Кърджали, Стара Загора, Сливен, Пазарджик, Пловдив и Смолян). [35]



Фигура 5. Процентно разпределение на TTR патогенните генетични варианти в България от общия брой тествани носители

Географският район, популацията и различните мутации са само част от факторите влияещи върху пенетрантността на заболяването. Проучванията на редица автори от ендемичните райони показват пенетрантност в много широки граници – от 2 до 91% [51,61-64], а според последните данни пенетрантността нараства с възрастта. Кумулативният риск за португалските носители достига до 91% при 70-годишна възраст [61], до 89% на 60-годишна възраст и 91% на 80-годишна възраст при бразилските носители [63] и до 50% на 70-годишна възраст при френските. [62] Значително по-нисък е риска при шведските носители – 1.7% на 30-годишна възраст и 36% на 70-годишна възраст [64], както и при болните от Кипър – 28%. [51]

За TTR-FAP е характерен и процеса на антиципация – начало на заболяването в по-ранна възраст при наследниците в сравнение с родителите. Тази зависимост е установена предимно за Val30Met мутацията при португалски и японски семейства в

случаите на болен мъж, унаследил заболяването от майката. [65-67] Получените данни от направените проучвания показват съответно по-ниска начална възраст с 4 години при мъжете в сравнение с жените [67] и до 16 години по-ранно начало на заболяването при децата в сравнение с родителите без значение от пола и потомството. [66] В популацията на Майорка антиципация е установена при 31 от 37 изследвани двойки родители - деца [66], докато след направеното обширно проучване при 926 португалски двойки потомци, броят на двойките показали антиципация е 291, като при 203 от тях мутацията е била предадена от майката. Двойката майка - син показва антиципация средно 10.4 години, а баща - дъщеря – 1.2 години. [68] Друга мутация с подчертана антиципация е Gly47Glu, описана през 2002 г. след изследване на пет поколения в Италия с 23 болни. [69]

Поради ниската честота на разпространение на заболяването до момента най-много данни са натрупани относно мутацията Val30Met. На база различния клиничен фенотип на проявяване и възрастта на започване на заболяването началото се разделя на ранно – под 50-годишна възраст (early onset) и късно – след 50-годишна възраст (late onset). [70] Сравнителният анализ на португалската и японската популация с мутация Val30Met показва средна възраст на начало на заболяването 32.5 г. при пациентите с ранно начало и 61 г. при късно начало. [70,71] При 90% от случаите на ранно начало е доказано наличието на фамилна предистория на заболяването (93.9% при португалската популация и 86% при японската [70,72]) както и връзката им с ендемичните райони за съответната страна.

#### **1.4.2 Симптоматика**

В литературата са описани различия в първоначално проявяваните симптоми както за отделните патогенни генетични варианти така и за ранното или късно развитие на заболяването. За ранното начало са характерни проявления от страна на автономната нервна система и липса на органно засягане, докато късното начало се характеризира със сетивно-двигателни нарушения, невропатна болка, сърдечни и очни симптоми [70] и уринарни и храносмилателни нарушения. [73] В случаите на сърдечно засягане амилоидните плаки са доказани предимно в предсърдията и субендокарда при ранно начало, и в миокарда при късно начало на заболяването. [74] Отложените амилоидни фибрили при ранното начало са дълги и паралелни, докато при късното начало се наблюдават къси и случайни амилоидни фибрили. [75] Като

вероятна причина се смята разликата в основните патогенни механизми на невропатията. [76]

Данните натрупани относно мутацията Glu89Gln са основно на база изследваните пациенти в двете страни с най-висока честота на разпространение – България и Италия. [77] Характерните проявления са предимно от страна на автономната нервна система и сърдечно-съдовата система, като при българската кохорта пациенти е отчетено преобладаване на кардиологичното засягане [78-82], докато при италианската – преобладава неврологичния фенотип на проявяване. [77] Гастроинтестиналните проявления не винаги присъстват в момента на диагностициране на заболяването, но се засилват значително с неговата продължителност. [83] Ранно начало на заболяването е установено при „дивия тип” TTR амилоидоза, а сравнително късно - при мутантния. [82] Проучванията в областта за проявяване и унаследяване на патогенния генетичен вариант Glu89Gln, потвърждават т. нар. „ефект на основателя” и значението на генетични фактори за проявата на това моногенно заболяване. [84]

Според една от последните класификации на данните от регистъра за проследяване на резултатите от транстиретиновата амилоидоза (Transthyretin Amyloidosis Outcome Survey, TNAOS), създаден през 2007 г., мутациите се разделят на Val30Met (с ранно или с късно начало) и не-Val30Met. Последните от своя страна се разделят на няколко подгрупи според преобладаващия клиничен фенотип – с доминиращо сърдечен (Val122Ile, Leu111Met), с доминиращо полиневропатен (Phe64Leu), със смесен (Glu89Gln), с окулолептоменингеален (Tyr69His, Ala36Pro) и с лептоменингеален (Asp18Gly, Ala25Thr). [85] Особеностите в клиничния фенотип при Val30Met мутацията се определят от възрастта на начало на заболяването, като за ранното начало е характерен предимно полиневропатния фенотип, а за късното – смесен фенотип. [86]

Появата на симптомите може да бъде описана като бимодална, с един пик през третото до четвъртото десетилетие на живота (ранно начало) и друг прекъснат пик през шестото десетилетие на живота (късно начало). Първите прояви на заболяването често са неспецифични и могат да се проявят като слабост и загуба на тегло. В зависимост от конкретния патогенен генетичен вариант на TTR началните симптоми и засегнатите орган(и) могат да бъдат различни. На Фигура 6 са показани клиничните

проявявания при пациентите с TTR-FAP. [87] Най-често отлагането се осъществява в периферните вегетативни нерви [35,88-92], сърцето и периферните кръвоносни съдове. [86,93-97]



Фигура 6. Клинични проявления на TTR амилоидозата

### • Неврологични проявления

Засягането на периферната нервна система е представено от прогресиращ дистален сензомоторен полиневропатен синдром, карпал тунел синдром и засягане на автономната нервна система. Важна особеност при прогресията на периферно-нервното засягане е начало в стъпалата на долните крайници със субективна

хипестезия, парестезия и дистезия и поетапна прогресия със загуба на чувствителност на нервите до глезена. [92] Синдромът на карпалния тунел, предизвикан от амилоидни отлагания в карпалния лигамент и директно компресиране на медианния нерв поради отложен амилоид остава един от водещите симптоми за TTR амилоидоза [92,98] с прогресия във времето, водеща до класически полиневропатен синдром.

Нарушенията от страна на автономната нервна система се проявяват като диария редуваща се със запек, повръщане след нахранване, ортостатична хипотония, потене, задръжка на урина и други, а при мъжете е възможно наблюдаване и на еректилна дисфункция. [40] Установено е, че тези нарушения са по-малко изяви при TTR-FAP с късно начало, и много по-чести при ранно начало на заболяването. [92]

Ранното диагностициране на невропатията е от първостепенно значение за да се осигури лечение и намаляване на прогресията, а забавянето в диагнозата и неправилно поставените диагнози са често наблюдавано явление. [99] При пациентите без фамилен анамнез за заболяването се взема и тъканна биопсия от засегнатия орган за да се докаже извънклетъчното отлагане на амилоид или се провежда тест с Конго червено. В практиката са въведени редица методи и диагностични тестове за поставяне на ранна и надеждна диагноза. [92,99,100-107] Във връзка с проследяването на заболяването и определяне на стадия на развитие е въведена клинична скала за оценка на мускулната сила, рефлексите и сетивността (Neuropathy Impairment Score, NIS) на горните и долните крайници [103], модифицираният NIS+7 [104] и обща оценка на качеството на живот при диабетна невропатия (Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy, Norfolk QOL-DN). [91] Резултатите от проведените клинични проучвания в страни като Франция, САЩ, Португалия и Италия, относно тежестта на невропатията и скоростта на прогресията показват, че прогнозният процент на прогресията на NIS е 14.3 точки/ година, като заедно с това силата на ръчното захващане на дясната ръка, показващо полиневропатна инвалидност (PND), също намалява значително. [105]

- **Сърдечно-съдови проявления**

Засягането на сърдечно-съдовата система по-често се описва при болните с непортугалски фенотип Val30Met [48], мутациите със смесен фенотип като Glu89Gln и Gly47Arg [108] и други специфични мутации протичащи с кардиомиопатия – Val122Ile, Thr60Ala, Ile68Leu, Leu111Met. [86,94,109] Честотата и тежестта на

сърдечното засягане е различна при различните мутации, а в литературата са описани и случаи на тежко кардиологично засягане при мутации с предимно неврологичен фенотип – Val94Ala. [110]

Натрупването на амилоид се наблюдава във всички структури на сърцето [67], а развиващото се сърдечно увреждане протича като инфилтративна кардиомиопатия, проявяваща се със сърдечна недостатъчност, ритъмни и проводни нарушения. [97] Често симптомите са неспецифични и първоначалните оплаквания са от перикардна тежест, сърцебиене, умора, задух при усилие, периферни отоци. Сравнението на кардиологичното засягане при пациенти с мутациите Val30Met и Glu89Gln показва значително по-тежко засягане и по-висок риск от големи сърдечно-съдови събития при носителите на Glu89Gln, отколкото при Val30Met. [111,112]

При диагностицирането на транстиретиновата фамилна амилоидна кардиомиопатия (TTR-FAC) обикновено се използват както инвазивни, така и неинвазивни диагностични тестове, като инвазивните се прилагат за всички форми на сърдечна амилоидоза, а неинвазивните - само за TTR амилоидоза. [113,114] За електрокардиографията много характерен е т.нар. псевдоинфарктен образ (Q-зъбец), ляв преден хемиблок и А-V блок 1-ва степен. [115,116] Критериите при ехокардиографското изследване са: дебелина на стената на лявата камера на сърцето > 12mm, диастолна дисфункция, запазена (>50%) фракция на изтласкване, дилатация на лявото предсърдие, задебеляване на клапните платна и др. [117-119] Сърдечната ATTR амилоидоза може да бъде диагностицирана и чрез свойството на някои радиофармацевтици да се натрупват в миокарда. [119,120]

Откриването и оценката на сърдечна недостатъчност причинена от коронарна болест на сърцето се характеризира и с някои специфични прогностични биомаркери - В-тип натриуретичния пептид (BNP) и неговият неактивен прекурсор (NT-proBNP) [121-129] Според изследванията, пациенти с повишени BNP и NT-ProBNP нива по време на диагнозата имат по-лоша прогноза [130,131], а бързата и точна диагноза на заболяването е предизвикателство пред лекарите поради високата хетерогенност на сърдечните фенотипове и системното участие. [132,133]

- **Стомашно-чревни проявления**

Засягането на стомашно-чревния тракт по-често се описва при болните с наследствена транстиретинова амилоидоза в следствие на мутациите Val30Met и Phe64Ser и много рядко при – Ile68Leu и Leu111Met. [134] Данните показват, че в много малко случаи това е първоначалният симптом, водещ до диагностициране на заболяването. [135,136] Насочващи, но неспецифични симптоми при пациентите на възраст над 30 години са необяснима диария, загуба на тегло, вегетативна дисфункция, малабсорбция или протеинурия, умора, замаяност, анорексия. [137-140] Завишените серумни нива на фекалния калпротектин също са показателни за наличието на гастроинтестинална амилоидоза. [141]

- **Бъбречни проявления**

При някои мутации като Gly47Glu има описани случаи на бъбречно засягане със средно тежка или тежка бъбречна недостатъчност. [142,143] Анемия също често е описвана при португалската популация носител на Val30Met мутацията, като проведените проучвания показват наличие на анемия при около 25% от симптоматичните пациенти с наследствена амилоидна полиневропатия (FAP), придружена с нормални стойности на желязото и фолиевата киселина в кръвта, както и на серумните нива на витамин В<sub>12</sub>. [143]

- **Очни проявления**

Патологичните очни промени при пациенти с FAP са сравнително често разпространени и могат да бъдат наблюдавани при почти всички мутации [144], като често тежестта на очната симптоматика не корелира с проявените симптоми от други системи. [145] Най-често срещания, но неспецифичен симптом е сухото око. [145,146] Описаните случаи на японски трансплантирани пациенти, показват наличие на очно увреждане до три години след трансплантацията, като този интервал е значително по-дълъг при нетрансплантираните пациенти. [147] Ранно засягане на очните структури е наблюдавано и при мутацията Gly83Arg, съчетано с ксерофталмия, разреждане на ретиналните артерии, полиневропатия и кардиомиопатия. [148]

- **Други**

По-нетипични прояви на заболяването също са описани в литературата. Някои от тях са: ставни промени (свързани с остеоартропатия и синовиално отлагане на амилоид в отделни връзки и сухожилия) [149,150], дрезгав или пресипнал глас [151],

суха кашлица [152], кожно отлагане на амилоид (при специфичните мутации Thr60Ala и Gly6Ser, Trp41Leu, Glu89Gln) [153], микроалбуминурия [154] и ортостатична хипотония. [155]

### **1.4.3 Ранно диагностициране и стадии на заболяването**

Най-общо поставянето на диагнозата TTR амилоидоза включва две главни стъпки: физически преглед на пациента с проследяване на фамилната история, което може да насочи към съмнение за заболяването и потвърждаване на диагнозата на база проведени точни диагностични изследвания съпроводени с генетичен анализ. [156-159] Има няколко причини водещи до забавяне на диагнозата и поставяне на грешни диагнози, главно липса на положителна фамилна обремененост и неспецифични клинични прояви на заболяването в началния етап. [156,160] Използваните тестове могат да бъдат разделени в няколко групи – неврологични, кардиологични, гастроентерологични, генетични и хистопатологични. [161-165] Генетичния скрининг и наблюдението на всички членове на семействата позволява идентифициране на най-ранните признаци на заболяването. [166-170]

Протичането на TTR-FAP може да бъде разделено в четири стадия с различна продължителност и особености. [56,171,172] Стадий 0 обикновено протича безсимптомно, без необходимост от специализирана терапия, но задължително с редовно проследяване на състоянието и клиничните показатели. Стадий 1 продължава  $5.6 \pm 2.8$  г., като за него е характерно само засягане на долните крайници, но ходенето може да се осъществява без чужда помощ и има слабо проявена слабост на екстензорите на големите пръсти. Стадий 2 продължава около  $4.8 \pm 3.6$  г. и при него вече са налице затруднения при ходенето (с или без помощта на бастун); започва да се усеща все по-голяма слабост в ръцете и краката. Вторият етап се разделя на три подетапа: ходене без бастун, ходене с помощта на един бастун или ходене с помощта на два бастуна или количка. Стадий 3 е най-кратък – около  $2.3 \pm 3.1$  г., но и най-тежък. Пациентите достигнали до него обикновено са обездвижени на легло или се налага да използват количка за придвижване. На лице са обща слабост на организма и арефлексия. [156,173]

## 1.5 Терапевтични подходи за лечение на транстиретинова амилоидоза

След диагностициране на заболяването се определя етапът на развитие на невропатията и системното засягане, както и най-подходящият курс на лечение с различен подход при пациентите във всеки отделен стадий, за да се забави прогресията на заболяването. От особено важно значение е цялостната системна оценка, включително сърце, очи и бъбреци, за да се гарантира правилното определяне на етапа на болестта. [172] Поради системните проявления на заболяването, лечението на TTR амилоидозата изисква мултидисциплинарен подход, с който да се възпрепятства по-нататъшно производство и/или отлагане на амилоидни агрегати, както и симптоматична терапия на сърдечното, бъбречното и очното засягане. [174] Възможностите за лечение са ограничени, като при леко или умерено заболяване след потвърдена чрез генетично изследване и биопсия диагноза, чернодробната трансплантация е един от основните терапевтични подходи. Въпреки това, симптоматичното лечение за осигуряване на незабавно облекчение също е приоритет, като през последните няколко години са разработени различни терапии предимно за ранните стадии на заболяването. [174-176] Настоящите терапевтични подходи и възможности за лечение на пациенти с TTR амилоидоза са показани на Фигура 7. [173,177,178]



Фигура 7. Терапевтични подходи и възможности за лечение на пациенти с TTR амилоидоза

### 1.5.1 Потискане на синтеза

Чернодробната трансплантация (LT) е първото лечение, модифициращо заболяването, достъпно за пациенти с TTR-FAP въведено през 1990 г. [177] Тъй като TTR се произвежда главно в черния дроб, основната цел на LT е да спре образуването на амилоид, а оттам и прогресията на заболяването, но без възможност за премахване на вече установените симптоми. [171] Основните неблагоприятни прогностични фактори включват напреднала възраст, денутриция/ кахексия, измерена чрез модифициран индекс на телесна маса, напреднала амилоидна кардиомиопатия и тежка автономна невропатия. [179] Натрупаните данни в Световния регистър за трансплантации показват по-добра обща преживяемост след LT при пациентите, носещи мутация на Val30Met [180], в сравнение с не-Val30Met пациентите. Доказано е, че LT удължава преживяемостта на пациентите с FAP - 5-годишната преживяемост е 77% [171], а 20-годишната – 55.3%. [174] В по-късни етапи LT може да бъде усложнена от прогресираща амилоидна кардиомиопатия или невропатия [181,182] и затова при избрани пациенти с напреднала амилоидна рестриктивна кардиомиопатия може да се обмисли комбинирана трансплантация на черен дроб и сърце. [183]

Напредъкът във фармакотерапията неминуемо води до разработването на нови неинвазивни подходи за контрол и лечение на TTR амилоидоза. [171,173,174,178,184-186]

Един от тези подходи включва заглушаване на гени за потискане на ендогенния синтез на мутирал TTR, а проведените изследвания показват възможност за приложение на тези техники независимо от основната болест-причиняваща мутация и да потискат както мутантния, така и синтеза на TTR протеин от „див тип”. [171] До момента са разработени два вида генно заглушаващи терапии - антисенс олигонуклеотиди (ASOs) и малки интерфериращи РНК (siRNAs). [171,185] Две лекарства от първи клас (Patisiran (siRNA) и Inotersen (ASO)), са одобрени в САЩ и Европа за лечение на полиневропатията стадий 1 или 2 при възрастни пациенти. [174]

ASOs са къси синтетични РНК последователности, които се свързват с таргетната РНК по специфичен начин и инхибират нейната трансляция. [171] ASOs използват два различни механизма, в зависимост от техния молекулен дизайн - стерично блокиране (при което се предотвратява трансляцията чрез обикновена заетост на иРНК) и ензимни механизми, предизвикващи разцепване или разграждане на РНК. SiRNAs са некодиращи двуверижни РНКи, инхибиращи експресията на специфични гени чрез медиране на разграждането. [174,187] Терапията е тествана

както в предклинични модели, така и в клинични проучвания с участието на здрави доброволци и пациенти с амилоидоза, като ефикасността във всички подгрупи, независимо от стадия на заболяването, варианта на TTR и възрастта е потвърдена, а подобрене спрямо изходното ниво в резултатите се наблюдава при 56% от участниците, спрямо само 4% в плацебо групата. [174,188-190]

### **1.5.2 Лечение чрез разграждане/ реабсорбция на амилоидните фибрили**

Няколко полициклични полифенолни съединения са изследвани за техните антиоксидантни свойства, като е установено възпрепятстване на амилоидната фибрилогенеза чрез напълно нови механизми. [174,178] Сред тях е епигалокатехин-3-галат (EGCG), основният катехин в зеления чай, който генерира стабилни, нискомолекулни, аморфни агрегати, които не са цитотоксични и не образуват фибрили. Освен това, EGCG също така ремоделира *in vitro* зрели амилоидни фибрили и пре-фибриларни образувания, съставени от различни протеини, в по-малко токсични агрегати без да се конкурира с T<sub>4</sub> за свързване с TTR. [178]

За изчистване на установените тъканни амилоидни отлагания са оценени две схеми за лечение- Доксициклин/ Тауроурсодезоксихолова киселина (TUDCA) и изчерпване на серумния амилоиден Р компонент (SAP). [171,173]

### **1.6 Стабилизатори на транстиретиновата молекула – представители, структура, биологични свойства**

TTR тетрамерните стабилизатори (наречени още кинетични стабилизатори) са агенти, предназначени да стабилизират нормалната циркулираща форма на TTR и по този начин да предотвратят дисоциирането на протеина, претърпяването на конформационни промени и агрегацията му като амилоид. [174] Тъй като дисоциацията на TTR се счита за ограничаваща скоростта стъпка в процеса на образуване на амилоидни фибрили, пероралните лечения са изследвани с цел стабилизиране на TTR тетрамерите. [171] Лигандите с малки молекули (с поне две ароматни ядра) са в състояние да намалят образуването на амилоидни фибрили, а кинетичното стабилизиране е резултат от взаимодействието им с T<sub>4</sub>-свързващите места (> 90% незаети във физиологични условия) чрез хидрофобни взаимодействия и водородни връзки. [191,192] Доказано е, че свързването с висок афинитет на едно

място е достатъчно за въвеждане на значителна стабилност на тетрамера [193], а обширният скрининг на съединенията принадлежащи към различни структурни семейства, идентифицира няколко ароматни малки молекули (противовъзпалителни, флавоноиди и ксантони), показващи комплементарност към свързващите места. Включването на допълнителни халогенни атоми в стратегически позиции доказано повишава афинитета и специфичността на свързване без да влияе върху хормоналната активност на щитовидната жлеза. [178,185] В контролни проучвания са оценени подробно две лекарства – Tafamidis (TAF) и Diflunisal (DIF). [174]

TAF е новоразработена малка молекула, принадлежаща на групата орални кинетични TTR стабилизатори, чийто механизъм на действие се изразява в стабилизиране на мутантния TTR чрез свързване с T<sub>4</sub>-местата и стабилизиране на тетрамера, позволяващо предотвратяване на дисоциацията в амилоидогенни и токсични мономери. [173,185,194] Така установеното свързване с висок афинитет и селективност, индуцира дозозависима кинетична стабилизация на TTR от „див тип” и редица TTR варианти. През ноември 2011 г., TAF е одобрен от Европейската агенция по лекарствата (EMA) за биопсично доказана полиневропатия стадий 1 (перорално, 20 mg веднъж дневно), а през 2019 г. и от Американската асоциация по храните и лекарствата (FDA) за кардиомиопатия (перорално, 80 mg/61 mg веднъж дневно). [178,195,196] Алтернативното лечение позволява на пациентите с противопоказания за LT да се възползват от антиамилоидна терапия. [173,197] По време на терапията състоянието на пациентите се проследява стриктно, а значителната прогресия на невропатията (влошаване на подвижността, ортостатична хипотония, импотентност) или кардиомиопатията (влошаване на стадия на сърдечна недостатъчност) са признак за прилагане на различен терапевтичен подход или LT. [173,198]

Седем проучвания оценяват ефекта на TAF свързан с приложението му при полиневропатия. [199-205] Основното многоцентрово клинично изпитване, включващо 128 Val30Met пациенти показва стабилизиране на TTR при 98% от пациентите и липса на прогресия на невропатията при 60% от пациентите (срещу 38% в групата на плацебо) със запазено качество на живот. [199] Сравними с тези резултати са и данните получени при не-Val30Met мутациите. [202-205] При допълнителната оценка на ефикасността и безопасността е потвърдено благоприятното въздействие на TAF при продължително лечение и в начален етап от хода на заболяването. [200-211] Продължаващите отворени проучвания показват, че прогресията на неврологичното заболяване е по-тежка при пациенти с по-високи

изходни стойности на NIS (т.е. по-напреднали стадии на заболяването), което обосновава необходимостта от ранно започване на лечение. [212] При по-напредналите случаи с късно начало TAF не може да предотврати прогресията на заболяването. [201,205]

Най-обстойно изследваният фармацевтичен продукт по отношение на ефекта му върху амилоидозо - асоциираната кардиомиопатия е TAF. Докладвани са резултати от няколко клинични проучвания [213-216], при които приложението на TAF 20 mg дневно в продължение на 12 месеца води до стабилизиране на заболяването по отношение на сърдечните биомаркери (NT-проBNP и тропонин I), ехокардиографските и електрокардиографските променливи. Въпреки това при индивидуален анализ, около 33% от пациентите показват умерена прогресия на сърдечно заболяване. [213,215,217] Статистически значими резултати са натрупани в рандомизираното, плацебо - контролирано проучване на пациенти с биопсично доказана вариантна TTR амилоидоза (24%) или „див тип” TTR амилоидоза (76%) с кардиомиопатия [214], при което са приложени три терапевтични схеми - TAF 80 mg дневно, TAF 20 mg дневно или плацебо в продължение на 30 месеца. Резултатите потвърждават, че TAF (в двете тествани дози - 20 mg и 80 mg) има по-добри ефекти върху прогресията на кардиомиопатията при пациенти с TTR амилоидоза в сравнение с плацебо [218], при запазване на качеството на живот. [219,220] Разликите в преживяемостта, при отделните групи, достигат значими стойности след 18-месечно лечение, а единствените пациенти, които нямат полза от TAF са тези с по-напреднало заболяване в началото на терапията. [221,222] Тези открития подчертават необходимостта от ранно започване и продължителен период на лечение. [214,223]

Общата честота на нежеланите лекарствени реакции е сравнима с тази на плацебо групите в повечето проучвания и не се увеличава с по-дълго време на експозиция на лекарственото вещество. [184] Най-честите нежелани реакции са инфекции на пикочните пътища (2–17%), редуване на диария с фекална инконтиненция или запек [173]; не е наблюдаван неблагоприятен ефект върху сърдечната проводимост и реполяризация. [224] Специфично е приложението единствено при жените с детероден потенциал, като при тях лекарствената терапия с TAF трябва задължително да бъде съпроводена с подходяща контрацепция. [173,225]

Малката молекула на TAF, принадлежаща към групата на бензоксазол карбоксилните киселини, постига висока перорална бионаличност. [178] Свързва се силно с плазмените протеини (до 99,5%), глюкуронирането е главният ѝ метаболитен

път, а основната циркулираща форма в плазмата е изходното съединение. При здрави доброволци TAF се абсорбира бързо след еднократна перорална доза от 20 mg, като времето ( $T_{max}$ ) за достигане на максимална концентрация ( $C_{max}$ ) е приблизително 2,0 часа. Фармакокинетичните параметри са сходни след еднократно и многократно дозиране, показващо липса на метаболитна индукция или инхибиране. Стационарно състояние (SS) се постига на 14-ия ден със  $C_{max(ss)}$  и  $C_{min(ss)}$  съответно при 2.7 и 1.6 mg/L. Елиминирането е бавно чрез жлъчката, със среден полуживот приблизително 59 часа. [226]

Вторият TTR стабилизатор е DIF. Освен като противовъзпалително средство, DIF се проявява и като силен инхибитор на образуването на TTR амилоидни фибрили *in vitro*. [171,173,227] В дневна доза от 500 mg (2 x 250 mg) той показва високи серумни концентрации [184] и способност да намалява значително прогресията на заболяването при пациенти с TTR амилоидоза в ранен стадий на полиневропатията и носители на различни мутации (главно Val30Met – 54.6%). За оценка на ефективността му са сравнени резултатите получени в две контролни групи – диагностицирани пациенти и плацебо група. [171,178] Приложението му при пациенти с късна проява на TTR амилоидоза е проследено в рандомизирани клинични проучвания, чиито резултати ясно демонстрират значително намаляване на скоростта на прогресия на невропатията [174] и запазване качеството на живот. [184,228-232] Положителните ефекти установени до момента при TTR свързаната кардиомиопатия са предварителни и трябва да бъдат потвърдени в по-големи систематични проучвания. [233-238]

Наблюдаваните нежелани лекарствени реакции са в съответствие с известните странични ефекти на нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС). [171,239] Стомашно-чревните, бъбречните и сърдечно-съдовите събития са само някои от описаните в литературата, причинени от хронична DIF терапия, но внимателното наблюдение на пациентите може значително да намали възможността за появата им. [229,240] Дефицитът на DIF в неговата активност и афинитет на свързване и инхибиране на дисоциацията на тетрамера във всички патогенни генетични варианти се компенсира от наблюдаваните високи плазмени концентрации. [241-243] За повишаване на селективността са изследвани две йодни производни на DIF, но за въвеждането им в практиката са необходими допълнителни анализи. [244] Интересна връзка и кооперативна стабилизация е открита между клъстерин и DIF. Установено е, че DIF частично възстановява нивата на разтворимия клъстерин, а високата концентрация на клъстерин е предпоставка за инхибиране на агрегацията на TTR

мономерите. [245-247]

## **1.7 Аналитични и биоаналитични техники за определяне на транстиретинови стабилизатори в биологична среда**

За биоанализ и количествено определяне на транстиретинови кинетични стабилизатори в литературата са представени аналитични техники като течна хроматография (високо ефективна течна хроматография с ултравиолетова детекция (HPLC-UV), високо ефективна течна хроматография с флуоресцентна детекция (HPLC-FLD), течна хроматография с мас детекция (LC-MS)), спектрофотометрия (SPM) и спектрофлуориметрия (SFM).

Течната хроматография (HPLC-UV и LC-MS) е предпочитан метод за анализ на плазмените концентрации на TAF при терапията на TTR амилоидоза. [248-256] Разработените аналитични процедури имат висока селективност, постигната чрез използването на различни подвижни и неподвижни фази, начини на елуиране и детекция. Основните анализи съобщават за използване на техники за LC-MS [251,254] поради високата селективност и ефективност на разделяне, но обратнофазовата високоефективна течна хроматография (RP-HPLC) [248] също е подходяща за клинично наблюдение със своята по-проста и рентабилна методология. Методът е адаптиран и приложен също за откриване на малкия молекулен кинетичен стабилизатор в цереброспиналната течност и стъкловидното тяло. [256]

Има няколко метода, докладвани в литературата за определяне на DIF в човешка плазма [257-262], урина [260,261,263,264], серум [263-267] или лекарствена субстанция и таблетки [267-271], чрез използването на HPLC [257-261,263,265,268-271], LC-MS [262], SPM [271], SFM [264,266,267,271] или волтметрия. [272,273] Всички плазмени концентрации на DIF са описани при здрави доброволци. [257-262,274] Повечето от аналитичните методи, открити в литературата, са разработени през 80-те години на миналия век [251,260,261,263,265,271], някои през 1990-те и 2000-те години [257,262,264,266,267,269,270,272-274,] и два през 2021 г. [259,268]

### **1.7.1 Пробоподготовка на биологична проба**

Същността на биоанализа се състои в определяне на лекарствените концентрации, техните метаболити и/или примеси в биологични матрици като кръвна плазма, серум, цереброспинална течност, урина и слюнка. Приложението на метода е

широко, а получените резултати играят важна роля за определяне на лекарствената биоеквивалентност, фармакокинетика и токсичност в областта на терапевтичния лекарствен мониторинг и клиничните проучвания. Три са изключително важните стъпки при всеки биоанализ - избор и събиране на биологична проба, допълнителна обработка на пробата (пробоподготовка) и определяне на целевия анализ чрез подходящ аналитичен метод.

Подготовката на пробата е определяща стъпка за провеждането на всяко биоаналитично изследване. Наличието на протеини, ендогенни и екзогенни вещества, пречи на количествения анализ, затова при процеса на предварителна обработка се цели освобождаване на анализа от тях без значителна загуба на част от неговото количество. Най-достъпни и широко използвани методи за пробоподготовка в практиката са преципитацията на протеини (PPT), течно-течната екстракция (LLE) и твърдофазната екстракция (SPE). [275-277]

PPT е една от най-бързите и лесни за изпълнение техники за предварителна обработка на биологични проби. Има четири основни подхода при PPT - добавяне на органичен разтворител, киселина, метални йони или сол към плазмената проба предварително пипетирана в малка центрофужна епруветка в обем 10 - 1 000  $\mu$ l и съдържаща около 8% протеини. Важно е да се подчертае, че PPT не е техника за извличане. При нея целевите анализи остават във водната среда на плазмената проба, а органичните разтворители, използвани като преципитанти, денатурират плазмените протеини. Използването на органични разтворители като утайтел е относително мека процедура и това намалява възможността за разлагане на лабилните анализи. Плазмата и органичният разтворител се смесват за кратък период от време, след това сместа се центрофугира и прозрачната течност над утайката, наречена супернатант, се събира за крайния анализ. Етапът на центрофугиране е важен, а използването на високи обороти (често около 10 000 – 13 000 rpm/min) подобрява разделянето на утайката и супернатанта. Сред различните използвани органични разтворители често се срещат ацетонитрил, ацетон, етанол и метанол, като ефективността намалява както следва: ацетонитрил > ацетон > етанол > метанол. Освен от вида на използвания утайтел, ефективността на утаяване зависи и от неговия обем. Алтернативно, PPT може да се осъществи и чрез добавяне на разтвор на трихлороцетна киселина (TCA) или перхлорна киселина към плазмената проба, като основно предимство се счита фактът, че супернатанта остава воден, за разлика от преципитацията с ацетонитрил, където супернатанта обикновено остава 50 – 66% органичен. Водният супернатант е

съвместим с течнохроматографското определяне, но от друга страна, той става силно кисел ( $pH < 2.0$ ) и това може да предизвика химическата нестабилност на някои от определяните аналити. PPT не се използва за проби от урина, тъй като съдържанието на протеини в урината е много ниско. Основните предимства на PPT могат да бъдат обобщени като: бърза процедура, минимално изисквано оборудване и сравнително просто разработване на метода. Основните недостатъци на PPT могат да бъдат обобщени като: ограничено пречистване на пробата, липса на допълнителен етап за концентриране на целевия аналит и разреждане на пробата с добавянето на утайтеля, в резултат концентрацията на определяния аналит в супернатанта се понижава спрямо оригиналната плазмена проба. [276]

Освен стандартната техника за PPT е разработена и нова модифицирана техника за предварителна обработка на биологични проби наречена протеинна преципитация с разделяне на фазите (PSE). При нея серумът или плазмата се смесват с органичен разтворител (метанол, етанол или ацетонитрил), в присъствието на наситен солеви разтвор, най-често натриев дихидрогенфосфат или дикалиев хидрогенфосфат. След центрофугирането за утаяване на протеините, вместо да се получат два слоя – супернатант (смес от плазмена вода и съответния органичен разтворител) и утайка на дъното на епруветката, се получават три ясно разделени слоя – горна органична фаза, протеинна утайка в средата и долна водна фаза. Този метод комбинира лесният и бърз процес за утаяване на плазмените протеини с допълнителна екстракция и пречистване на пробата, осигурявайки възможност за допълнителен количествен анализ на целевия аналит намиращ се в органичната или във водната фаза. [278]

LLE е предназначен за прехвърляне на целевите аналити от биологична течност към органичен разтворител като същевременно повечето компоненти на матрицата остават в биологичната течност и това води до пречистване на пробата. LLE е най-приложим за съединения с ниска полярност. Водната биологична проба се пипетира в малка центрофужна епруветка, като в някои случаи за регулиране на pH в пробата се прибавя буфер или кисел/основен разтвор. Накрая към епруветката се добавя органичен (екстракционен) разтворител, несмесващ се с водата. Епруветката се разклаща за определен период от време (1-10 мин.), за да се смесят пробата и екстракционния разтворител и по време на това смесване молекулите на аналита се прехвърлят от водната проба към екстракционния разтворител. След това епруветката се оставя да престои, докато двете фази се разделят. За улесняване на разделянето, пробата се центрофугира за 1-3 мин след екстракцията. След центрофугиране

екстракционният разтворител се събира и анализира. За подобряване на ефективността на LLE при киселите анализи средата трябва да бъде подкиселена, докато при основните анализи – алкализирана. [276,277]

Подборът на органичен разтворител също има важно значение. Типът на потенциалните взаимодействия може да бъде предвиден от структурата на съединенията и разтворителя. Преобладаващите молекулни взаимодействия в LLE с нарастваща сила са хидрофобни, дисперсионни, диполни взаимодействия и водородни връзки. Изборът на разтворител трябва да се основава на молекулярната структура на анализа. За много неполярни анализи (въглеводородни вещества без или с много малко функционални групи) подходящи са неполярните разтворители. Типичните екстракционни разтворители са алифатни въглеводороди и често се използват п-пентан, п-хептан и циклохексан. За анализи с ниска до средна полярност или за анализи с ароматен характер, ефективни са ароматните разтворители като толуен или р-ксилол. За още по-полярни анализи трябва да се избере по-полярен разтворител, но все пак не твърде полярен, тъй като разтворителят трябва да не се смесва с вода, за да се образува двуфазна система. Примери за популярни разтворители с добри диполни свойства са дихлорометан и етилацетат. За екстракция на основни анализи, се предпочитат разтворители с донорни свойства на водородна връзка – хлороформ. За киселинни анализи, които се характеризират с техните високи донорни свойства на водородна връзка, за предпочитане трябва да се използват акцепторни разтворители за водородна връзка - диетилов етер и метил-тертбутилов етер. Други свойства на разтворителите също са важни за окончателния избор на LLE разтворител - плътност и вискозитет. Предпочитат се разтворители с нисък вискозитет, тъй като те по-лесно се разпадат на малки капчици и се смесват с водната проба по време на екстракцията, а това е от полза за прехвърлянето на анализа в органичната фаза. Разтворителите с по-ниска плътност от водата ще плуват върху водната проба след екстракция. Това е предимство, ако органичният екстракт се събира с пипета след екстракция от малка центрофужна епруветка. Примери за разтворители с по-малка плътност от водата са п-пентан и етилацетат, а с по-висока - хлороформ и дихлорометан. Летливостта на разтворителя и разтворимостта във вода също са от решаващо значение. Всяко изпаряване на разтворителя след екстракция е много по-бързо с разтворител с ниска точка на кипене, а летливите разтворители обикновено се предпочитат, ако трябва да бъдат изпарени след екстракция. И накрая, за разтворителя, избран за екстракция,

разтворимостта във вода трябва да е ниска, за да се избегне разтварянето на значително количество от екстрахиращия разтворител във водната проба. [275,276]

Вариант на LLE е течно-течната екстракция на твърд носител. При нея водната биологична проба се пропуска през колона запълнена с твърда фаза, най-често диатомит, адсорбирайки се напълно като тънък слой върху твърдата повърхност. След това се пропуска и екстракционният разтворител, като голямата повърхностна площ на границата между органичната и водната фаза повишава ефективността на екстракцията и намалява възможността за образуване на емулсия. Анализираното вещество се елуира, докато разтворителят преминава през колоната, и се събира в подходяща епруветка. Основно предимство на тази техника за екстракция е възможността за избягване на едни от задължителните и времееотнемащи етапи при традиционната LLE, а именно смесване, разклащане и центрофугиране. [276]

SPE е техника за подготовка на проби, която се използва за селективно извличане и обогатяване на следи от аналити, представляващи интерес в различни биологични проби. Механизмът на SPE е подобен на този на течната хроматография, основаващ се на афинитета или взаимодействието между веществата, представляващи интерес - аналити, разтворени в течност (подвижна фаза) и сорбентни материали (неподвижна фаза). Първата стъпка в процедурата включва активиране и кондициониране на колоната първоначално чрез промиване с полярен органичен разтворител (типичен пример е метанолът). Втората стъпка е зареждането на пробата, при което разтворът на пробата се въвежда (накапва) в колоната. По време на зареждането на пробата, аналитите се задържат в колоната чрез различни взаимодействия със стационарната фаза, докато компонентите на матрицата се отстраняват от колоната. В третия етап, колоната се промива с един или повече подходящи по състав разтвори. Целта на промиването е да отстрани допълнителните компоненти на матрицата, докато аналитите все още се задържат в колоната чрез силни взаимодействия с неподвижната фаза. Тази стъпка осигурява пречистване на пробата и е важна за премахване на потенциални смущения в крайния химически анализ. В последния етап, наречен елуиране, малък обем от подходящ разтворител, който се нарича елуент (най-често метанол), се пропуска през колоната, за да се прекъснат взаимодействията между аналитите и неподвижната фаза и да се освободят аналитите от колоната. Този краен разтвор, който се нарича елуат, се събира в епруветка за анализ. Елуатът съдържа аналита, без основни матрични съединения от

пробата, и елуатът се използва за крайния химичен анализ. SPE обикновено е много ефективен метод за извличане, а извличането от екстракция е близо до 100%. Според механизмите на задържане SPE може да бъде класифицирана в четири категории - SPE с нормални фази, SPE с обърнати фази, йонообменна SPE и SPE в смесен режим. [276]

При описаните в литературата методи за количествен анализ на транстиретинови стабилизатори, изборът на техника за пробоподготовка е базиран на свойствата на изследваните лекарствени вещества, вида и свойствата на матриците, както и последващия метод приложен за количествен анализ.

За анализа на TAF в биологична среда пълните кръвни проби се събират в епруветки съдържащи етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA) [251,254] или натриев цитрат [248], като антикоагулант. Кръвта може веднага да се центрофугира на 1500-2000 g за 10-20 min за отделяне на плазмата. [248] Въз основа на проведените изследвания се препоръчва плазмените проби да се съхраняват при температура от -10 до -30°C [251] или при -75°C [248] и да се размразяват при стайна температура непосредствено преди анализа. [248,251,254] Методите за пробоподготовка включват PPT за обработка на човешка кръвна плазма [248,251] и LLE, при анализ на плазма от плъхове. [254]

Разработените методи за PPT включват пипетиране на 20 [248] или 50 µl [251] плазма и използването на 100 µl 1% разтвор на трихлороцетна киселина [248] или 300 µl ацетонитрил [251] като преципитиращи агенти. В първия метод не се използва допълнителен вътрешен стандарт за изследване на точността на разработената аналитична процедура [248], а при метода разработен от Lockwood и съавтори за вътрешен стандарт е избрано стабилно изтопно съединение на TAF. От него е приготвен разтвор с точно определена концентрация, а за анализа са взети 50 µl и смесени с плазмената проба преди същинската протеинна преципитация. [251] След прибавянето на преципитация разтвор пробите са смесени за 30 min при стайна температура и са центрофугирани за 10 min при максимална скорост в ултрацентрофуга. [248] Допълнително разреждане на получения супернатант с 200 µl пречистена вода се използва само в метода разработен от Lockwood и съавтори. [251] Методът за PPT разработен от Нуун и съавтори включва смесване на 50 µl плазма, 50 µl разтвор на вътрешния стандарт (2-CBC) с концентрация 1 mg/L и 50 µl 11.3 µmol/L

HCl в метанол. Органичният разтворител използван за екстракция е 1 ml етилацетат. Сместа се хомогенизира на вортекс за 10 min и се центрофугира за 10 min при 13 500 rpm. Отделения супернатант се отпипетира, прехвърля в епруветка и изпарява до сухо за 40 min при 50°C. Сухият остатък се разтваря в 200 µl подвижна фаза и се подлага на анализ. [254]

Според литературните данни, за количествено определяне на DIF в биологична среда са подходящи и трите основни техники за пробоподготовка – PPT [260,263,266,267], LLE [258,261,265] и SPE. [262]

Разработените методи за PPT са използвани за обработка на плазма [260], серум [263,266,267] и урина [260,263] и включват смесване на 50 - 100 µl проба (плазма/серум от пациенти или допълнително инжектирана с DIF чиста плазма) с 50 - 100 µl разтвор на подходящ вътрешен стандарт (хлориран аналог на DIF [260]) или директно преципитиране на протеините с помощта на 0.1 mol/L разтвор на фосфорна киселина и ацетонитрил [262], ацетонитрил [263], 0.1 mol/L разтвор на трихлороцетна киселина [266] или метанол. [267] Получените проби се смесват на вортекс за 2 min [260,266] или в ултразвукова вана за 5 min [267] и се центрофугират за 4 min при 18 000 rpm [263] или за 5 - 15 min при 2 000 – 4 500 rpm. [260,266,267] Отделеният супернатант се отпипетира и подлага на количествен анализ. Обработката на проба от урина чрез техниката за PPT включва няколко допълнителни стъпки преди етапа на центрофугиране за отделяне на супернатанта: прибавяне на 150 µl 70% разтвор на перхлорна киселина, нагряване за 1 h при температура 90°C, последващо темперирание на пробата, смесването ѝ с 500 µl 5 mol/L разтвор на натриева основа и 200 µl ацетонитрил. [260]

Процедурата LLE е приложима за плазма [258,261], урина [261] и серум. [265] При адаптирането на метода на вътрешния стандарт за този количествен анализ, към биологичната проба се прибавя разтвор на вътрешния стандарт с определена концентрация, смесва се за кратко и лекарственото вещество се екстрахира от водната среда на биологичната проба чрез прибавянето на 4 - 5 ml смесен органичен разтворител – хексан-диетилов етер в обемно съотношение 50:50 (v/v). [258,261,265] За подпомагане на екстракцията и последващото разделяне на двете фази пробите се центрофугират за 15 min при 1500 rpm. [258] Органичният слой се прехвърля в чиста

епруветка, изпарява се до сухо, след което се разтваря в метанол [258] или подвижна фаза [261] и се анализира.

Въпреки многобройните си предимства SPE техниката за пробоподготовка не е широко разпространена при анализа на DIF в биологична среда. Налична е информация единствено за прилагането ѝ при разработването на количествен метод за анализ в плазма. Процедурата включва смесване на 50  $\mu\text{l}$  плазма (получена чрез изкуствено инжектиране на чиста плазма с разтвор на DIF) и 200  $\mu\text{l}$  разтвор на вътрешния стандарт клофибринова киселина с концентрация 50 mg/L. Пробата се хомогенизира на вортекс, прибавя се 2% разтвор на мравчена киселина и така получената смес се пипетира в колоната за SPE. В процеса на елуиране през колоната се пропуска разтвор на ацетонитрил и 5 mmol/L амониев формиат (pH=8) в съотношение 90:10 v/v. Полученият елуат съдържащ целевия аналит се подлага на хроматографски анализ. [262]

### 1.7.2 Апаратен анализ

Хроматографията е техника, използвана за разделяне на сложни смеси, срещани в химически и/или биологични системи, на съставните им компоненти. Веществата се разпределят между две несмесващи се фази – подвижна (газова или течна) и неподвижна (твърда, течна или гел). Класифицирането на хроматографските методи се осъществява на база 5 класификационни критерия - формата на неподвижната фаза, начин на водене на пробата през неподвижната фаза, физичното състояние на подвижната и неподвижната фаза, относителната полярност на двете фази и механизмът на разделянето. [279,280]

Един от най-често използваните типове хроматографски анализ в клиничната лаборатория е високоефективната течна хроматография (HPLC), която по същество представлява вид елуентна колонна хроматография. При нея пробата за анализ се въвежда в началото на колоната, съпътствана от непрекъснато подаване на подвижна фаза, а след напускане детектор измерва определено физико-химично свойство на елуента и го преобразува в електричен сигнал, представян графично във вид на хроматограма. [280] Предимствата на този метод са свързани с неговата бързина, висока разделителна способност, възпроизводимост, специфичност и чувствителност, правейки го подходящ за анализ на много лекарства не само в биологична среда, а и във фармацевтични форми. [276,281]

При HPLC е възможно прилагането както на нормалнофазово (NP-HPLC), така и на обратнофазово елуиране (RP-HPLC), в зависимост от свойствата на определяните вещества и съчетанието на двете фази. Неподвижната фаза може да бъде твърда, течност нанесена върху твърд носител или гел, заредена в колона. Най-често използвани са 8- или 18-атомен въглеродород, свързан със силикатен носител. По-рядко се използват  $Al_2O_3$ , n-октадецил и n-октил. Подвижната фаза е течност, най-често смес от вода и органичен разтворител (метанол или ацетонитрил - за полярни подвижни фази и хептан, хексан, циклохексан,  $CHCl_3$  – за неполярни). В редица случаи водата, като съставна част на подвижната фаза, може да бъде заменена с буфер поддържащ определена рН стойност на средата. [277,280] Приготвената подвижна фаза се филтрува и дегазира за отстраняване на попаднали механични или органични примеси и въздух. Специфичността и ефективността на HPLC техниката за анализ, спрямо класическата течна хроматография, е свързана с химичната природа и големината на частиците на пълнежа в колоната. Използват се размери от 1.7 до 10  $\mu m$ , като с намаляване на големината им, нараства ефективността на разделянето. За инжектиране на пробата за анализ в хроматографската колона, без да се прекъсва потока на подвижната фаза, се използва подходяща спринцовка с вместимост до 20  $\mu l$ . Разделянето на сместа се извършва на база афинитета на веществата към подвижната или неподвижната фаза, а времето на престой в колоната се отбелязва като време на задържане. Ефективността на разделянето, определяна чрез броя на теоретичните тарелки на единица дължина, зависи както от времето на задържане на веществата, така и от ширината на пиковите изобразени на хроматограмата, а селективността, определяна чрез коефициента на селективност, отразява степента на разделяне на отделните вещества в анализираната смес при еднократно разпределяне между подвижната и неподвижната фаза. Детекторите използвани за целите на HPLC анализа обикновено са на спектрофотометричен или флуориметричен принцип и по-рядко на електрохимичен или рефрактометричен. През последните години все по-широко застъпено в практиката е и комбинирането на течната хроматография с мас-спектрометрична детекция (LC-MS).

Детекторът за ултравиолетова (UV) и видима (VIS) абсорбция е най-разпространеният HPLC детектор, тъй като много съединения абсорбират в областта от 190 до 600 nm. Има три различни типа UV детектори: детектори с фиксирана дължина на вълната, детектори сканиращи при различни дължини на вълната и детектори с фотодиодна матрица (DAD), при които светлината се проектира върху

масив от фотодиоди, за получаване на информация в широк диапазон от дължини на вълните наведнъж, а в допълнение, се предоставят и пълни спектри на елуиращите се пикове, които могат да бъдат използвани за подпомагане на идентифицирането им и за наблюдение на коелуиране. [282]

Флуоресцентните детектори (FLD) измерват оптичното излъчване на светлина от молекулите на разтвореното вещество, след като те са били възбудени при по-високо енергийна дължина на вълната (по-ниска дължина на вълната). Приложими са за вещества, които имат собствена флуоресценция или такива, които могат да флуоресцират след дериватизация. Този тип детектори са изключително чувствителни, което ги прави особено полезни при анализа на следи, при ограничения в количеството на пробите за анализ или при ниска концентрация на търсения аналит. [282,283]

В основата на мас-спектрометрията (MS) е идентифицирането на молекулите въз основа на съотношението маса/заряд ( $m/z$ ). Все по-често в практиката се наблюдава използването на MS детекция за фармацевтичния анализ. Висока чувствителност, възможност за структурно определяне и прогнозиране на метаболитите в биологична среда са само част от предимствата на LC-MS анализа. Работната процедура включва изпаряване на пробата, йонизиране в газовата фаза и разделяне въз основа на техните съотношения  $m/z$  в масовия анализатор. Всички събрани йонни сигнали участват в съставянето на масовия спектър на веществото, като в някои ситуации е възможно и усилване на сигнала на отделни йони. Най-често използваните методи за йонизация са йонизация с електроспрей (ESI) и химическа йонизация при атмосферно налягане (APCI). ESI е подходяща за разтворени полярни съединения, докато APCI за по-малко полярни съединения и йонизация в газова фаза. Масовите анализатори използвани за разделяне на йоните биват три вида в зависимост от техните характеристики и приложение: квадруполен мас анализатор (QMS), мас анализатор за улавяне на йони (IT) и мас анализатор за времето на полет (TOF). [277,281]

В литературата са представени три аналитични техники за биоанализ и количествено определяне на транстиретиновия кинетичен стабилизатор TAF в плазма, изцяло насочени в областта на течната хроматография - RP-HPLC [248] и LC-MS. [251,254] Поради своята висока разделителна способност и чувствителност, тя е първи избор за определяне на многокомпонентни лекарствени системи, а възможността за откриване на следи от основното активно вещество в биологичните проби я правят изключително подходяща за адаптиране в процеса на терапевтичен лекарствен

мониторинг. Разработените методи за анализ целят прилагането им в проучванията свързани със определяне на степента на стабилизиране на TTR протеина по време на лечението с TAF [248], оценка на бионаличността и биоеквивалентността на лекарственото вещество при двете прилагани терапевтични схеми за ATTR кардиомиопатия – 61 mg капсули съдържащи TAF под формата на чиста киселина или 4 x 20 mg капсули съдържащи солта TAF meglumine [251] и за анализ в плазма на пльхове. [254]

Ключови фактори за постигане на надеждни резултати са изборът и внимателното оптимизиране на хроматографските условия. Използваните хроматографски колони за определяне на TAF са C18, с размери 50 x 2.1 mm и големина на частиците в пълнежа 3 или 5  $\mu\text{m}$ . Подборът на подходяща подвижна фаза също е от изключително важно значение за извършване на надеждно количествено определяне и получаване на точни резултати. Най-често се използва ацетонитрил смесен с разтвор на трифлуороцетна киселина [248], мравчена киселина [251] или амониев формиат [254], подавани към колоната изократично [254] или градиентно [248,251] със скорост на потока 0.3 или 0.5 ml/min при LC-MS [251,254] анализите и 1.0 ml/min при RP-HPLC. [248] Определянията са извършени при стайна температура. Разработените методи за анализ с мас-спектрометрична детекция включват използването на електроспрей йонизация на веществата в среда от газ азот при температура 550 [251] или 500°C [254] и регистрирани m/z стойности от масовия анализатор при транзиция 305.43-262.2 за TAF. [251,254]

Описаните в литературата методи за анализ на DIF самостоятелно [257,258,260-262,264,272,273] или в комбинация с други лекарствени вещества [259,265-267,269-271], метаболити [263] или примеси [268] определят течната хроматография с обърнати фази като предпочитан бърз и надежден метод за количествено определяне. Разработени са както LC-MS [262] процедури така и HPLC с UV [257,258,263,265,268-271] или FLD детекция [259-261], адаптирани за биоанализ в плазма [257-262], серум [263,265] или урина. [260,261,263]

Хроматографските колони с октадецилсиланов (ODS/C18) пълнеж обикновено са предпочитани като неподвижна фаза, в публикуваните аналитични методи [259,260,262,265,268,270,271], но се отбелязва и приложимостта на октилсилановите (OS/C8) хроматографски колони, осигуряващи различни степени на селективност. [258,261,263,269] Предимно използвани са колони с обърнати фази и размери от 50 x

4.6 mm до 250 x 4.6 mm, като всички дават достатъчно добро разделяне на активното лекарствено вещество от неговите метаболити или сложни лекарствени смеси. Наблюдавано е характерното за дългите колони удължаване във времето на задържане на целевия анализ - 3.3 [262,270] – 3.9 min [271], в сравнение с късите колони – 1.4 min. [260] Установено е, че ефективността и селективността се подобряват с намаляване на размера на частиците на пълнежа от 10  $\mu\text{m}$  [265] до 5  $\mu\text{m}$ . [258,261-263,268-271] Използването на къси и тесни колони намалява времето за анализ и количеството на необходимите разтворители, но не е приложимо за всички лекарствени вещества, тъй като важен определящ фактор е химичната структура на целевия анализ.

Съставът и скоростта на подаване на подвижните фази, както и видът на елуирането оказват пряко влияние върху селективността на разработените аналитични процедури. Метанолът и ацетонитрилът се използват като основни органични компоненти в комбинация с буферни разтвори с различни рН стойности [259-261, 265,268-270], ледена оцетна киселина [257,271], амониев формиат [262] или тетраметиламониев водороден сулфат. [258,263] Метанолът осигурява добро разделяне и по-добри форми на пиковите и поради това е предпочитан като органичен разтворител [257,258,260,261,263,265] при HPLC-UV и HPLC-FLD анализа в смес с фосфатен буфер с рН=3, 3.5 или 7 и съотношения вариращи от 58:42 до 64:36 v/v. Комбинацията ацетонитрил: буфер рН=3.4 (50:50 v/v) или ацетонитрил: амониев формиат (45:55 v/v) е предпочитана при HPLC-DAD и LC-MS. При анализа на съотношенията органичен разтворител:водна фаза е установено забавяне на общото време на анализите и по-широки пикове при повишаване на процента на водната фаза и съответно непълно разделяне - при повишаването на органичния разтворител. [269] В някои случаи към подвижната фаза като допълнителен реактив се прибавя тетраhydroфуран или калиев цитрат за подобряване на симетрията на хроматографския пик. [263,271] Подвижната фаза при HPLC анализите се подава със скорост в границите от 1.0 до 1.8 ml/min, докато при LC-MS, тя е значително по-ниска – 0.6 ml/min, в изократичен или градиентен режим. Температурата е друг фактор използван за оптимизиране на аналитичните процедури. HPLC-UV [257,258,263,265,268,271] и HPLC-DAD [269,270] анализите се провеждат предимно при стайна температура, докато при HPLC-FLD [259-261] анализите протичат при температури на колоната 40-65°C. Понижаването на температурата в тези случаи води до забавяне на анализа [260], а за повишаване на флуоресценцията се използват буфери с по-високи рН стойности. [271] На база

спектъра на DIF разтвор, са определени две области с максимална абсорбция - 230 и 254 nm. Разработените HPLC-UV методи за анализ [257,258,263,265,268,271] използват 254 nm, като референтна дължина на вълната, а HPLC-DAD [269,270] – 225-230 nm. За анализа с флуоресцентна детекция е характерно определянето на две дължини на вълните – на възбуждане и емисия. В описаните количествени методи, това са 260 nm и 315 nm и 418 nm и 389 nm съответно. [260,261]

### 1.7.3 Валидиране на биоаналитични методи

Разработването на биоаналитичен метод за количествено определяне е свързано с подбор на оптимални работни условия, анализ на ограниченията и предимствата на метода за предназначението му и неговото валидиране. Валидирането включва серия от процедури за потвърждаване на приложимостта и ефективността на новоразработените аналитични методи, както и за гарантиране на надеждността на получените резултати. Съществен предварителен етап от този процес е събирането на информация относно физикохимичните свойства на изследваното лекарствено вещество, неговият *in vitro* и *in vivo* метаболизъм и степента му на свързване с плазмените протеини, даващи основа за избор на подходяща техника за предварителна обработка на пробите за извличането на целевия аналит от биологичната матрица. [284]

Валидирането на биоаналитичните методи за количествен анализ се осъществява съгласно Международната конференция по хармонизация на техническите изисквания при регистриране на лекарствени продукти за хуманна употреба (ICH) и ръководствата одобрени от ЕМА и FDA за периода 2018-2019 г. [284,285] Включените за определяне референтни параметри са: селективност, специфичност, матричен ефект, линейност, точност, прецизност, ефект на натрупване, ефект на разреждането, стабилност, граници на откриване и количествено определяне.

## Обобщение

Един от най-често срещаните видове системна амилоидоза е фамилната амилоидоза, характеризираща се с дисоциация на TTR протеина причинена от специфична мутация в TTR ген. Молекулната дисоциация води до образуване на мономери, последващото им агрегиране в амилоидни фибрили или амилоидни плаки, и развитие на амилоидоза. Обща характеристика на всички видове системна амилоидоза е експресията на прекурсорния протеин главно в екстрацелуларните пространства на специфично първично място, а впоследствие неговото освобождаване и транспортиране до други тъкани и органи. Бързото диагностициране и точното определяне на стадия на заболяването, както и степента на системното засягане, са изключително важни за назначаване на най-подходящ курс на лечение и забавяне на прогресията.

Лечението изисква мултидисциплинарен подход за предотвратяване на по-нататъшно производство и/или отлагане на амилоидни агрегати, както и симптоматична терапия на сърдечни, бъбречни и очни прояви. Възможностите за лечение са ограничени, а при лека или умерена форма на заболяването след диагноза, потвърдена с генетично изследване и биопсия, чернодробната трансплантация е един от основните терапевтични подходи. Въпреки това, симптоматичното лечение за осигуряване на незабавно облекчение също е приоритет, като през последните няколко години се разработват различни терапии главно за ранните стадии на заболяването.

Принципът, наречен „кинетична стабилизация“, е използван за първи път през 1996 г., за да опише, възможността за ефективно предотвратяване на протеинната дисоциацията, чрез свързване на лиганд към злавните местата на тироксин или ретинол. Тестваните лекарства са наречени "TTR тетрамерни стабилизатори". До 1999 г. структурно базираният дизайн на TTR стабилизаторите е водещ, като за периода са открити няколко лекарства.

И до момента транстиретиновите кинетични стабилизатори се използват като първа линия на лекарствена терапия при TTR амилоидоза (особено при пациенти, неподходящи за чернодробна трансплантация). Две са лекарствата, предписвани в клиничната практика - TAF и DIF. Различни аналитични методи са разработени и публикувани за определянето им като субстанции (наситни вещества), лекарствени продукти и биологични матрици. Предимно застъпени са спектрофотометрия,

спектрофлуориметрия, високоефективна течна хроматография с ултравиолетова или флуоресцентна детекция и течна хроматография с масспектрометрия. Приложението на разработените методи в лекарственото мониториране позволява поддържане на лекарственото вещество в терапевтични граници, а съпоставянето на установените концентрационни нива по време на курса на лечение и специфични клинични показатели на пациентите може да се използва за предсказване на бъдещото развитие на клиничните прояви при отделните пациенти и прогресията на заболяването във времето.

## **2. Цел и задачи**

### **Цел:**

Разработване и валидиране на ефективни методи за анализ на Tafamidis и Diflunisal в кръвна плазма и прилагането им при пациенти носители на доминантната за българската популация мутация Glu89Gln, както и при носители на други по-редки мутации, за оценка на отговора на терапията въз основа на връзката между определените плазмени концентрации и специфични клинични показатели.

### **Задачи:**

1. Разработване и валидиране на високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Tafamidis в кръвна плазма.
2. Разработване и валидиране на високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Diflunisal в кръвна плазма.
3. Доказване на практическата приложимост на разработения високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Tafamidis в кръвна плазма чрез определяне и проследяване на плазмените концентрации при българските пациенти с Glu89Gln и изследване на връзката между плазмената концентрация, някои клинични характеристики и хода на болестта.
4. Определяне и проследяване на плазмените концентрации на Tafamidis при българските пациенти с мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu.

### **3. Материали и методи**

#### **3.1 Материали**

##### **3.1.1 Апаратура**

###### **3.1.1.1 Течно-хроматографска система**

Течно-хроматографска система „Shimadzu Prominence“, състояща се от квартернерна помпа LC 20AD, вакуум дегазер DGU-20A<sub>5</sub>, автоматичен инжектор SIL-20A, темпериращо устройство CTO-20A и UV-VIS детектор SPD-20A. Резултатите са анализирани чрез използването на Lab Solutions софтуер.

###### **3.1.1.2 UV-VIS Спектрофотометър**

Thermo Scientific „Evolution 300“ UV-VIS спектрофотометър, работещ с ксенонова лампа и Dual Matched Silicon Photodiodes детектор.

###### **3.1.1.3 Ултрацентрифуга**

Heraeus „Biofuge Pico“ ултрацентрифуга с мощност 150 W и максимална скорост на ротора 13 000 rpm.

###### **3.1.1.4 Други апарати**

Ултразвукова вана с нагряване „Bandelin Sonorex“ ТК 52Н, с мощност 240 W, Kartell шейкър/миксер за епруветки (вортекс) ТК3S, хоризонтална клатачна машина с максимална скорост 500 rpm, универсална сушилня RS422, рН метър „Metrohm 723“, техническа и аналитична везна.

##### **3.1.2 Реактиви**

Субстанциите на лекарствените вещества Tafamidis (2-(3,5-dichlorophenyl)-1,3-benzoxazole-6-carboxylic acid) и Diflunisal (5-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxybenzoic acid) както и на вътрешните стандарти - Clofibrilic acid (IS-D) (2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoic acid) и 2-CBC (2-(2-chlorophenyl)-1,3-benzoxazole-5-carboxylic acid; IS-T) са закупени от „Sigma-Aldrich“ Germany. Органичните разтворители ацетонитрил и метанол HPLC grade, както и човешката плазма стандарт (plasma from human P9523) също са закупени от „Sigma-Aldrich“ Germany. Допълнителните реактиви като трифлуороцетна киселина (TFA), трихлороцетна киселина (TCA), амониев формиат, октансулфонова киселина, динатриев хидрогенфосфат и натриев

дихидрогенфосфат са закупени от „Merck” и „Sigma-Aldrich”. Всички реактиви, използвани при анализите, отговарят на изискванията за добра лабораторна практика.

### 3.1.3 Клиничен материал

Клиничната група се състои от диагностицирани болни, посещаващи Клиниката по неврология на УМБАЛ „Александровска” и включени в регистъра на TTR-FAP, с клинична симптоматика и носителство на една от установените в България мутации – Glu89Gln, Ser77Phe, Val30Met и Gly47Glu. Всички пациенти са дали информирано съгласие, съгласно установените изисквания на Комитета по етика на научните изследвания към Медицински университет София (КЕНИМУС).

Критериите за включване на пациентите са: възраст над 18 години, наличие на TTR амилоидоза стадий 1, генетично потвърдена мутация в TTR протеина причиняваща заболяването и провеждане на терапия с TAF (20 mg дневно). Критериите за изключване от проучването са: прогресия на заболяването в стадий 2, прекратяване на терапията с TAF или неспазване на терапевтичния режим.

Общият брой на пациентите е 60 с Glu89Gln (29 мъже и 31 жени), 7 с Ser77Phe (3 мъже и 4 жени), 4 с Val30Met (3 мъже и 1 жена) и 3 с Gly47Glu (1 мъж и 2 жени). Поради преобладаващото разпространение на мутацията Glu89Gln в България, пациентите са разделени в две големи групи – носители на Glu89Gln мутация и носители на не-Glu89Gln мутация. По време на проучването броят на пациентите в групата Glu89Gln намаля, тъй като 8 от тях бяха изключени поради прогресиране на заболяването до стадий 2 и прекратяване на терапията с TAF или преминаване към друга терапевтична схема (siRNA терапия). В Таблица 1 са обобщени демографските характеристики на пациентите включени в проучването.

Таблица 1. Демографски характеристики на пациентите с мутация Glu89Gln, включени в проучването

Характеристики		Стойност
Брой пациенти	(брой, N)	60
Възраст, години	медиана $\pm$ SD (обхват)	58 $\pm$ 8.2 (40-75)
Пол	мъже (брой,%)	29 (47.69%)
	жени (брой,%)	31 (52.31%)
Продължителност на терапията	медиана (обхват)	2.9 (0.9-8.6)
Брой проби за пациент	медиана (обхват)	5 (2-6)

SD: стандартно отклонение

Групата на болните с не-Glu89Gln мутация се състои от общо 14 пациента (7 мъже и 7 жени) на възраст между 34 и 79 г. и средна продължителност на провежданата терапия с TAF 3.9 г. В Таблица 2 са обобщени демографските характеристики на пациентите включени в проучването.

Таблица 2. Демографски характеристики на пациентите с не-Glu89Gln мутация, включени в проучването

Характеристики		Стойност
Брой пациенти	(брой, N)	14
Възраст, години	медиана $\pm$ SD (обхват)	63 $\pm$ 13.3 (34-79)
Пол	мъже (брой,%)	7 (50.00%)
	жени (брой,%)	7 (50.00%)
Продължителност на терапията	медиана (обхват)	3.9 (2.3-7.5)
Брой проби за пациент	медиана (обхват)	5 (3-6)

SD: стандартно отклонение

Проспективното клинично проучване е проведено за период от три години – март 2019 – март 2022 г., като рутинното проследяване на състоянието включва: определяне на неврологичния статус (сухожилни рефлексии, мускулен тонус, сетивни нарушения, хипотрофия и др.), ликворни и биохимични изследвания, невроофтальмологични изследвания, нервна проводимост на двигателни и сетивни влакна, хистопатологични изследвания, невроизобразяващи изследвания и ДНК анализ. Всички изследвания се провеждат в Клиниката по неврология при УМБАЛ „Александровска”, Лабораторията по ликворология и неврогенетика към същата клиника, както и Медико-генетична лаборатория „Геника”. Част от наличните данни за пациентите, събрани в тези звена, са използвани за проследяване на връзката между определените плазмени концентрации и клиничните характеристики на пациентите.

Пробите за проследяване на плазмените концентрации на TAF са взети по време на редовните болнични посещения на пациентите в лабораторията, на всеки 6 месеца. Като биологичен материал се използва плазма, отделена от венозно взета кръв с BD Vacutainer® EDTA епруветки. Пробите се центрофугират на стайна температура (25°C) в продължение на 15 минути при 1 500 грм. Отделеният, след центрофугирането, супернатант (плазма) се прехвърля в пет криоепруветки с вместимост 1.5 ml, които се съхраняват при температура -75°C до момента на анализа.

## 3.2 Методи

### 3.2.1 Анализ на спектрите на TAF, DIF и вътрешните стандарти – IS-T и IS-D

#### 3.2.1.1 Принцип на процедурата

Изследването на спектрите на лекарствените вещества е проведено с „Evolution 300” UV-VIS спектрофотометър. Определена е абсорбцията в UV областта от 200 до 350 nm при спектрална честотна лента 2 nm и спектрална разделителна способност 0.2 nm. Използвани са кювети от кварцово стъкло с оптичен път 10 mm. Органичният разтворител метанол, използван за приготвянето на тест разтворите на анализираните вещества е използван като сравнителен разтвор.

#### 3.2.1.2 Приготвяне на разтворите за анализ

*Приготвяне на изходен разтвор на TAF – TAF-SPM-SS - 500 mg/L:* Субстанция TAF с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор на TAF – TAF-SPM-TS - 50 mg/L:* От изходен разтвор *TAF-SPM-S* се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител до 20.0 ml (мерителна колба, клас А).

*Приготвяне на изходен разтвор на IS-T – IS-T-SPM-SS - 500 mg/L:* Субстанция IS-T с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор на IS-T – IS-T-SPM-TS - 50 mg/L:* От изходен разтвор *IS-T-SPM-SS* се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител до 20.0 ml (мерителна колба, клас А).

*Приготвяне на изходен разтвор на DIF - DIF-SPM-SS - 500 mg/L:* Субстанция DIF с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор на DIF - DIF-SPM-TS - 50 mg/L:* От изходен разтвор *DIF-SPM-SS* се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител до получаване на разтвор с концентрация 50 mg/L. Веднага след приготвянето на разтвора се сменя спектъра на лекарственото вещество.

*Приготвяне на изходен разтвор на IS-D- IS-D-SPM-SS - 500 mg/L:* Субстанция IS-D с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор на IS-D – IS-D-SPM-TS - 50 mg/L:* От изходен разтвор *IS-D-SPM-SS* се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител 20.0 ml (мерителна колба, клас А).

### **3.2.1.3 Спектрофотометричен анализ**

Снемането на спектрите на лекарствените вещества от разтвори *TAF-SPM-TS*, *IS-T-SPM-TS*, *DIF-SPM-TS* и *IS-D-SPM-TS* се осъществява непосредствено след приготвянето им. Наблюдаваните абсорбционни максимуми са: TAF - 300.5 и 308.5 nm, IS-T – 241.5 и 300.3 nm, DIF – 227.3 и 315.3 nm и IS-D – 225.7 и 278.6 nm. Получените спектри за веществата са включени в раздел 4, разглеждащ подробно валидирането на хроматографските методи за анализ.

## **3.2.2 Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на TAF в кръвна плазма**

Разработването и валидирането на аналитичния метод е проведено във Фармацевтичен факултет на Медицински Университет София, съгласно изискванията на ЕМА и FDA за работа в биологична среда.

### **3.2.2.1 Принцип на процедурата**

Определянето на TAF в човешка плазма е проведено по метода на вътрешния стандарт след протеинна преципитация. Разделянето на търсеното лекарство вещество и вътрешния стандарт – IS-T е осъществено с хроматографска колона RP-C18. Детекцията е UV при дължина на вълната 280 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA, разтворена в смес вода: ацетонитрил; анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза. Хроматограмите са обработени със специализирана програма; всички концентрации са представени в  $\mu\text{mol/L}$ .

### 3.2.2.2 Приготвяне на работни разтвори

*Приготвяне на изходен разтвор на TAF – TAF-SS - 250  $\mu\text{mol/L}$ :* Изходният разтвор на TAF се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 7.7 mg в органичен разтворител - метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF1 – 5.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 0.2 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF2 – 10.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 0.4 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF3 – 20.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 0.8 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF4 – 30.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 1.2 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF5 – 40.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 1.6 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF6 – 50.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 2.0 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор TAF7 – 100.0  $\mu\text{mol/L}$ :* От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 4.0 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на изходен разтвор на IS-T – IS-T-SS - 365  $\mu\text{mol/L}$ :* Изходният разтвор се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 10 mg в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на работен разтвор на IS-T – IS-T-WS – 91.25 µmol/L:* От разтвор *IS-T-SS* се пипетира аликвотна част от 25.00 ml и се разрежда със същия разтворител до 100.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на работен разтвор на TCA – TCA-WS – 0.06 mol/L:* Изходният разтвор на TCA се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 500 mg в органичен разтворител - ацетонитрил до 50.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

### **3.2.2.3 Приготвяне на калибрационни разтвори и разтвори за качествен контрол**

За приготвянето на разтворите за калибрация и контрол на качеството е използвана стандартизирана човешка плазма.

Разтворите за калибрация се приготвят чрез смесване на 400 µl чиста плазма и 100 µl от разтвори *TAF1*, *TAF2*, *TAF3*, *TAF4*, *TAF5*, *TAF6* и *TAF7*. Концентрациите на получените разтвори са описани подробно в Таблица 3. Приготвянето на разтворите се осъществява непосредствено преди анализа.

Таблица 3. Приготвяне на разтворите за калибрация в плазма

<b>Калибрационен разтвор</b>	<b>Концентрация (µmol/L)</b>	<b>Тест разтвор, използван за приготвянето</b>
CS-TAF1	1.0	<i>TAF1</i>
CS-TAF2	2.0	<i>TAF2</i>
CS-TAF3	4.0	<i>TAF3</i>
CS-TAF4	6.0	<i>TAF4</i>
CS-TAF5	8.0	<i>TAF5</i>
CS-TAF6	10.0	<i>TAF6</i>
CS-TAF7	20.0	<i>TAF7</i>

Като разтвори за контрол на качеството при разработването и валидирането на метода са използвани разтворите CS-TAF1 (долна граница на количествено определяне, LLOQ), CS-TAF2 (проба за качествен контрол с ниска концентрация,

LQC), CS-TAF3 (проба за качествен контрол със средна концентрация, MQC) и CS-TAF4 (проба за качествен контрол с висока концентрация, HQC).

В процеса на приготвяне, посочените обеми от изходните разтвори се пипетират и смесват внимателно с празната плазма, а получените проби се хомогенизират на вортекс за 2 min и се инкубират за 12 ч. при температура 37°C.

#### **3.2.2.4 Пробоподготовка**

Процедурата за пробоподготовка, използвана в този метод, включва следните стъпки: хомогенизиране на темпериранията плазма на вортекс за 1 min, смесване на аликвотна проба плазма с обем 160 µl с 40 µl от разтвор *IS-T-WS* и 800 µl разтвор *TCA-WS*, за преципитиране на протеините. Пробите се смесват на вортекс в продължение на 10 min, обработват се с ултразвук за 15 min и се разклащат на стайна температура (25°C) за 20 min при 500 rpm. За отделяне на супернатанта пробите се центрофугират в ултрацентрофуга за 10 min при максимална скорост - 13 000 rpm. След това 800 µl от супернатанта се филтруват през сиридж филтър (Whatman, PVDF филтър за спринцовка, 0,45 µm) и се анализират. Приготвянето на пробите се осъществява непосредствено след размразяването им при стайна температура.

#### **3.2.2.5 HPLC анализ**

Съгласно изискванията на EMA и FDA, всяка аналитична серия включва анализа на празна проба (стандартизирана чиста плазма), нулева проба (съдържаща разтвор на вътрешния стандарт), калибрационни стандарти (поне в 6 концентрационни нива), проби за качествен контрол (QC проби) (поне в три концентрационни нива) и определените за цикъла проби от пациенти. За провеждането на анализа е използвана хроматографска колона Purospher<sup>®</sup> RP-C18 (150 x 4.6mm, 5µm) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1) при стайна температура (25°C). Със системата е свързан UV детектор, като за анализа е избрана дължина на вълната 280 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA в смес вода: ацетонитрил, в съотношение 42:58 v/v, филтрувана през мембранен филтър с големина на порите 0.45 µm и дегазирана за 10 min с ултразвукова вана. Анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза със скорост на потока 1.0 ml/min и обем на инжектираните проби 20 µl. Времето за анализ на една проба е 25 min, а времената на задържане на TAF и вътрешния стандарт са съответно 15.9 min и 4.7 min.

Представителни хроматограми са включени в раздел 4, разглеждащ подробно валидирането на хроматографския метод за анализ.

### **3.2.3 Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на DIF в кръвна плазма**

Разработването и валидирането на аналитичния метод е проведено във Фармацевтичен факултет на Медицински Университет София, съгласно изискванията на ЕМА и FDA за работа в биологична среда.

#### **3.2.3.1 Принцип на процедурата**

Определянето на DIF в човешка плазма е проведено по метода на вътрешния стандарт след протеинна преципитация. Разделянето на търсеното лекарствено вещество и вътрешния стандарт – IS-D е осъществено с хроматографска колона RP-C18. Детекцията е UV при дължина на вълната 230 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA в смес вода: ацетонитрил; анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза. Хроматограмите са обработени със специализирана програма; всички концентрации са представени в mg/L.

#### **3.2.3.2 Приготвяне на работни разтвори**

*Приготвяне на изходен разтвор на DIF – DIF-SS - 600 mg/L:* Изходният разтвор на DIF се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 60 mg в органичен разтворител - метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF1 – 2.4 mg/L:* От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 0.02 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF2 – 60 mg/L:* От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 0.5 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF3 – 120 mg/L:* От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 1.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF4 – 240 mg/L:* От разтвор *DIF-SS* се пипетира аликвотна част от 2.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF5 – 360 mg/L:* От разтвор *DIF-SS* се пипетира аликвотна част от 3.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF6 – 480 mg/L:* От разтвор *DIF-SS* се пипетира аликвотна част от 4.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на тест разтвор DIF7 – 600 mg/L:* Изходният разтвор *DIF-SS* се използва за приготвяне на калибрационния стандарт.

*Приготвяне на работен разтвор на IS-D – IS-D-WS – 1875 mg/L:* Работният разтвор се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 187.5 mg в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

*Приготвяне на работен разтвор на TCA – TCA-WS – 10 mg/L:* Изходният разтвор на TCA се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 500 mg в органичен разтворител - ацетонитрил до 50.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

### **3.2.3.3 Приготвяне на калибрационни разтвори и разтвори за качествен контрол**

За приготвянето на разтворите за калибрация и контрол на качеството е използвана стандартизирана човешка плазма.

Разтворите за калибрация се приготвят чрез смесване на 400 µl чиста плазма и 100 µl от разтвори *DIF1*, *DIF2*, *DIF3*, *DIF4*, *DIF5*, *DIF6* и *DIF7*. Концентрациите на получените разтвори са описани подробно в Таблица 4. Приготвянето на разтворите се осъществява непосредствено преди анализа.

Таблица 4. Приготвяне на разтворите за калибрация в плазма

Калибрационен разтвор	Концентрация (mg/L)	Тест разтвор, използван за приготвянето
CS-DIF1	0.48	<i>DIF1</i>
CS-DIF2	12.0	<i>DIF2</i>
CS-DIF3	24.0	<i>DIF3</i>
CS-DIF4	48.0	<i>DIF4</i>
CS-DIF5	72.0	<i>DIF5</i>
CS-DIF6	96.0	<i>DIF6</i>
CS-DIF7	120.0	<i>DIF7</i>

Като разтвори за контрол на качеството при разработването и валидирането на метода са използвани разтворите CS-DIF1 (LLOQ), CS-DIF2 (LQC), CS-DIF4 (MQC) и CS-DIF6 (HQC).

В процеса на приготвяне, посочените обеми от изходните разтвори се пипетират и смесват внимателно с празната плазма, а получените проби се хомогенизират на вортекс за 2 min и се инкубират за 12 ч. при температура 37°C.

#### 3.2.3.4 Пробоподготовка

Процедурата за пробоподготовка, използвана в този метод, включва следните стъпки: хомогенизиране на темпериранията плазма на вортекс за 1 min, смесване на алоквотна проба плазма с обем 160 µl с 40 µl от разтвор *IS-D-WS* и 800 µl разтвор *TCA-WS*, за преципитиране на протеините. Пробите се смесват на вортекс в продължение на 10 min, обработват се с ултразвук за 15 min и се разклащат на стайна температура (25°C) за 20 min при 500 rpm. За отделяне на супернатанта пробите се центрофугират в ултрацентрофуга за 10 min при максимална скорост - 13 000 rpm. След това 800 µl от супернатанта се филтруват през сириндж филтър (Whatman, PVDF филтър за спринцовка, 0,45 µm) и се анализират. Приготвянето на пробите се осъществява непосредствено след размразяването им при стайна температура.

### 3.2.3.5 HPLC анализ

Съгласно изискванията на ЕМА и FDA, всяка аналитична серия включва анализа на празна проба (стандартизирана чиста плазма), нулева проба (съдържаща разтвор на вътрешния стандарт), калибрационни стандарти (поне в 6 концентрационни нива), QC проби (поне в три концентрационни нива) и определените за цикъла проби от пациенти. За провеждането на анализа е използвана хроматографска колона Purospher<sup>®</sup> RP-C18 (150 x 4.6mm, 5µm) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1) при стайна температура (25°C). Със системата е свързан UV детектор, като за анализа е избрана дължина на вълната 230 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA в смес вода: ацетонитрил, в съотношение 42:58 v/v, филтрувана през мембранен филтър с големина на порите 0.45 µm и дегазирана за 10 min с ултразвукова вана. Анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза със скорост на потока 1.0 ml/min и обем на инжектираните проби 20 µl. Времето за анализ на една проба е 10 min, а времената на задържане на DIF и вътрешния стандарт са съответно 7.3 min и 3.8 min. Представителни хроматограми са включени в раздел 4, разглеждащ подробно валидирането на хроматографския метод за анализ.

### 3.2.4 Статистически методи

Събраните данни от проведените анализи са обработени с помощта на програмата GraphPad Prism, software version 9 и Microsoft Excel, software version 2007.

- Изследваните параметри са представени като средна стойност, плюс-минус едно стандартно отклонение или медиана със съответния обхват на анализиранията стойности.
- Дескриптивен анализ е използван за представяне на честотното разпределение на разглежданите признаци в табличен вид.
- Вариационен анализ е използван за изчисляване на средната стойност на определяния параметър и наблюдаваното разсейване, а за визуализация на получените резултати е използван графичен анализ.
- Т-тестът на Стюдънт е използван за проверка на хипотези за различие между две независими извадки, а за сравнение между няколко независими извадки - едностранен ANOVA тест.
- За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, е прието  $p < 0.05$ .

## 4. Резултати и обсъждане

### 4.1 Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Tafamidis

#### 4.1.1 Оптимизиране на метода за изследване

Процедурата за оптимизиране на HPLC метода за количествено определяне на TAF е извършена на база три основни параметъра – неподвижна фаза (хроматографска колона, SP), подвижна фаза (MP) и UV детекция (дължина на вълната).

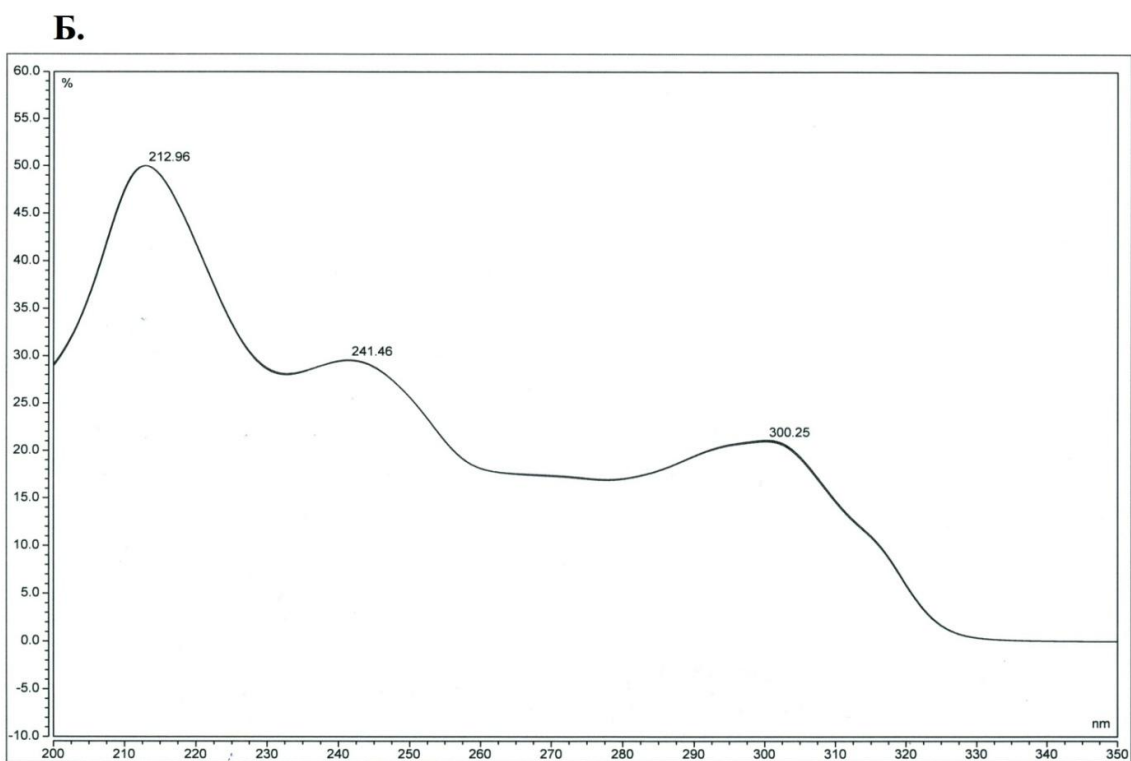
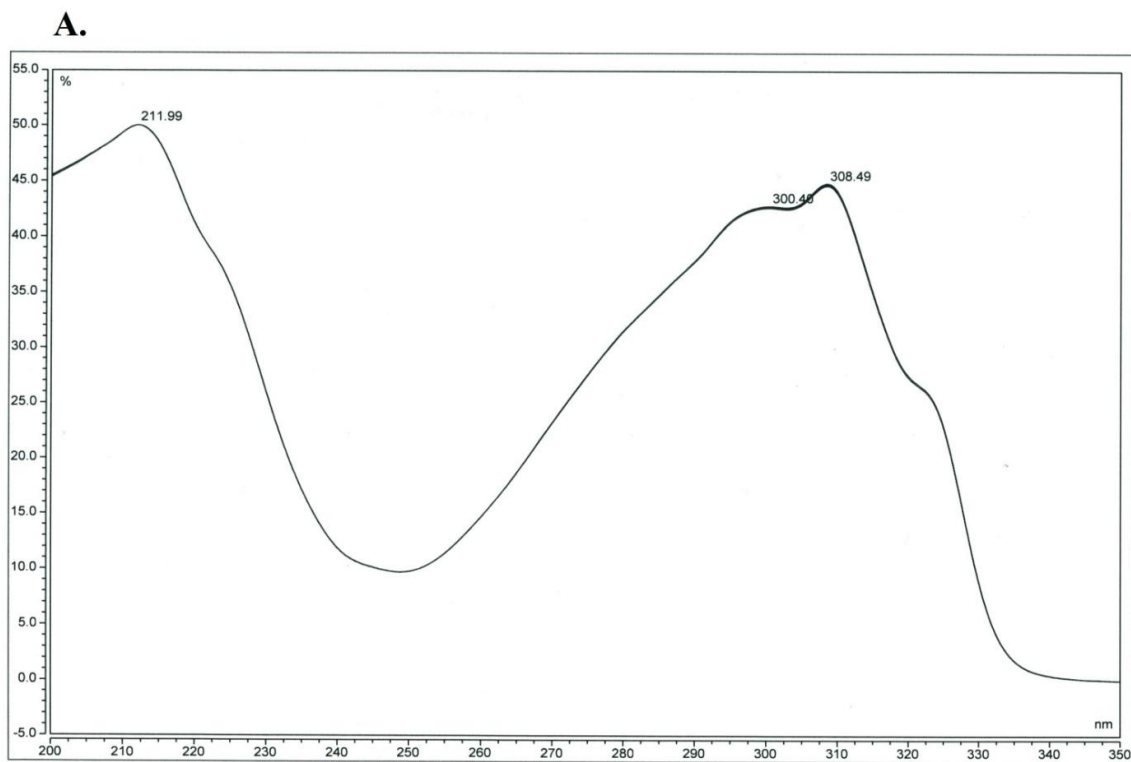
Изборът на колона зависи от предварителното познаване на физикохимичните свойства на анализираните вещества както и свойствата на биологичната матрица. Типът колона и дължината ѝ са оптимизирани при едни и същи хроматографски условия за да се получи най-добро разделяне на веществата за най-кратък период от време. Изпробвани са различни колони с обратни фази – ODS (C18) и OS (C8), като по-добра разделителна способност и чувствителност е установена при ODS в сравнение с OS. Две колони с различна дължина са използвани при разработването на анализа – 150 x 4.6 mm и 250 x 4.6 mm, но като по-подходяща за целите на разработвания метод е избрана колоната с дължина 150 mm във връзка с осигуряване на по-кратко общо време за анализ на всяка проба. Влиянието на размера на частиците на пълнежа също е изследвано, а като най-подходящ е определен 5  $\mu\text{m}$  във връзка с осигуряването на стабилни и надеждни условия за анализ и избягване на риска от запушване на хроматографската колона по време на биологичния анализ. Избраната за анализа колона е Purospher<sup>®</sup> RP-C18 (150 x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1).

Според предварителните литературни данни са тествани различни състави и съотношения на разтворителите в подвижната фаза. Ацетонитрилът (ACN) показва по-добри резултати в сравнение с метанола (CH<sub>3</sub>OH) по отношение на формата и площите на пиковете и затова е избран като предпочитан органичен разтворител. Изследвани са MP със състав 0.01 mol/L амониев формиат (HCOONH<sub>4</sub>) : ACN, буфер pH = 2.1 : ACN и 0.1% TFA в смес вода : ACN. Незадоволителните резултати получени с първите две MP се изразяват в получаване на широки и асиметрични пикове на двете анализирани вещества (TAF и неговият вътрешен стандарт) и бавното им и неефективно елуиране. Най-добри резултати осигурява използването на третата MP - 0.1% трифлуороцетна киселина (TFA) в смес вода : ACN, а процентът на

органичния разтворител влияе пряко върху времената на задържане на анализите и съответно върху селективността на метода. След анализ на серия от различни съотношения в сместа вода : ACN (от 65 : 35 v/v до 35 : 65 v/v), най-подходящо се оказва 42 : 58 v/v, тъй като при него се наблюдава най-добро разделяне на вътрешния стандарт от компонентите на матрицата и се осигурява най-кратко аналитично време. Процедурата за анализ е разработена при изократично елуиране и скорост на потока 1.0 ml/min. Използването на по-ниски скорости на потока доведе до забавяне във времето за анализ, а по-високите – до намаляване на селективността. Оценено е и влиянието на температурата върху аналитичната процедура, но не е установено значително подобряване на хроматографските условия при повишаване на температурата до 40°C. За провеждането на количествения анализ е предпочетена стайната температура (25°C), като най-благоприятна и не криеща риск за стабилността на анализиранията вещества и матрицата.

Използването на UV детекция при разработения метод и липсата на достатъчно литературни данни в тази област, наложи необходимостта от изследване на спектрите на анализите преди избора на подходяща дължина на вълната за анализ. Тъй като поглъщането на светлина може да варира в зависимост от вида на използвания разтворител, и двата спектъра бяха снети от разтвори на веществата приготвени в метанол (Фигура 8). Според получените спектри, най-подходяща за анализа е дължината на вълната 300 nm, но във връзка със специфичността на деутериевата лампа, като източник на светлина, във включения към хроматографската система UV детектор и нейното максимално излъчване при 280 nm като оптимална за анализа е избрана по-късата дължина на вълната.

Подготовката на пробите често е най-важната част от анализа и зависи до голяма степен от физикохимичните свойства на анализите, както и от вида на биологичната матрица. Повечето методи, прилагани за извличане, включват етап на утаяване на протеините или многократни екстракции. На база публикуваните литературни данни е оптимизиран и адаптиран метод за пробоподготовка на кръвната плазма, основаващ се на протеинна преципитация с помощта на 1% разтвор на трихлороцетна киселина в ACN, а допълнителното хомогенизиране на пробата на вортекс и ултразвукова вана е използвано за отстраняване на образувалите се протеинни агрегати в етапа на смесване. Пробите са допълнително разклащани за 20 min, а част от супернатанта отделен след центрофугирането е използван за анализ.



Фигура 8. UV спектри на А. TAF и Б. вътрешния стандарт (IS-T)

#### 4.1.2 Валидиране на хроматографския метод

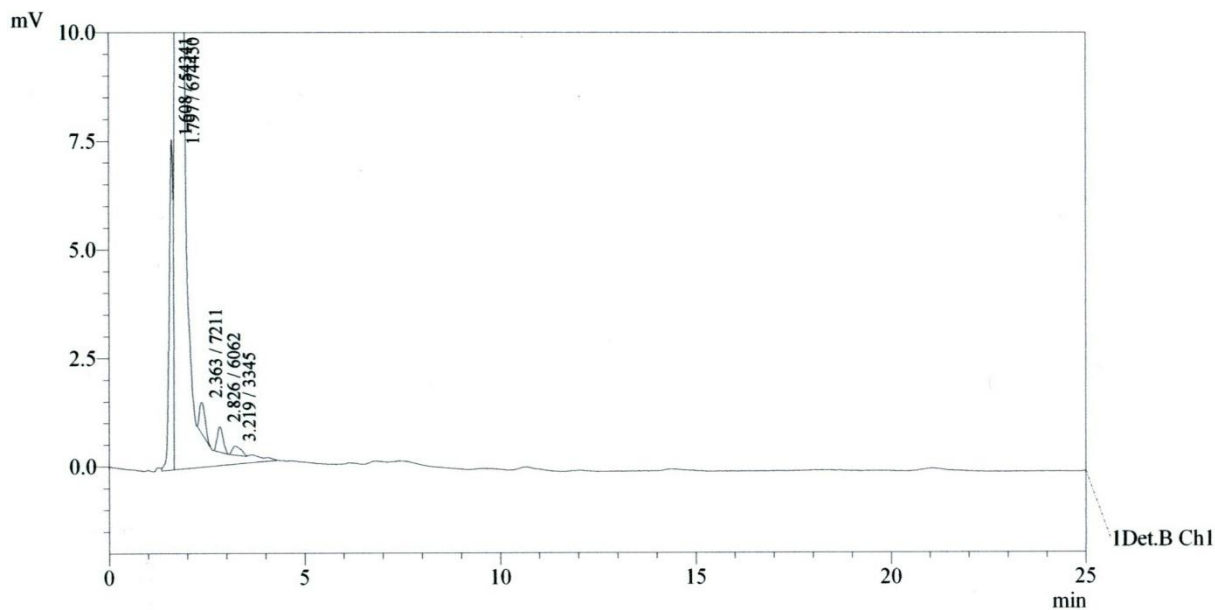
Валидирането на биоаналитичния метод за количествен анализ е осъществено съгласно Международната конференция за хармонизация (ICH) и ръководствата одобрени от ЕМА и FDA за периода 2018-2019 г. [284,285] Включените за определяне референтни параметри са: селективност, специфичност, линейност, точност, прецизност, граници на откриване и количествено определяне.

#### **4.1.2.1 Предварително зададени критерии за приемане**

- Селективност и специфичност - оценена с шест отделни матрици на човешка плазма; допустими стойности са - не повече от 20% от отговора на анализа при LLOQ и не повече от 5% от отговора на IS в пробата LLOQ за всяка матрица.
- Линейност – в рамките на  $\pm 20\%$  от номиналната концентрация при LLOQ и в рамките на  $\pm 15\%$  при всички останали концентрационни нива, при най-малко 75% от стандартите за калибриране; линейност в определения диапазон, с  $R^2 > 0.99$ .
- Точност, недостоверност и невъзпроизводимост - в рамките на  $\pm 15\%$  от обявената концентрация, с изключение на LLOQ, където тя може да бъде в рамките на  $\pm 20\%$ .
- Аналитична серия - най-малко 67% от QC пробите и 50% от всяко концентрационно ниво трябва да бъдат в рамките на  $\pm 15\%$  от номиналните стойности. Ако тези критерии не са изпълнени, серията се отхвърля.

#### **4.1.2.2 Селективност и специфичност**

Разработеният метод е доказан като селективен и специфичен. Не се наблюдава интерфериране от други компоненти (лекарствени вещества) или биолоичната матрица във времената на задържане на TAF и IS-T, които при оптимизираните хроматографски условия са добре разделени. Специфичността е потвърдена чрез анализ на шест различни празни плазмени проби, а представителна хроматограма е показана на Фигура 9. От нея ясно личи, че във времеви интервал от 4 до 25 min не се наблюдават допълнителни интерфериращи пикове във времената на задържане на двата анализа.



Фигура 9. Представителна хроматограма получена при анализа на празна проба

#### 4.1.2.3 Линеиност

Линеиността на метода е доказана в концентрационния интервал 1.00 – 20.00  $\mu\text{mol/L}$  (7 концентрационни нива, трикратен анализ). Резултатите за точността при анализа на всяко концентрационно ниво попадат в интервала от 99.7 до 100.2%, което напълно покрива предварително зададените критерии за приемане (Таблица 5).

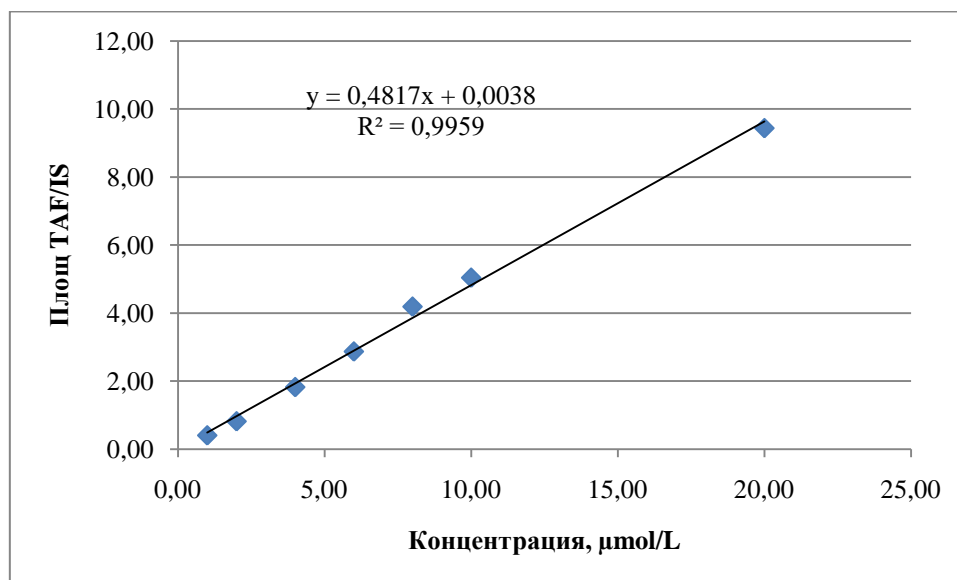
Таблица 5. Резултати за линеиност, точност и прецизност за калибрационната права на TAF (n=3)

Концентрация (C), $\mu\text{mol/L}$	$C_{\text{TAF}} \pm \text{SD}$	Прецизност (CV%)	Точност, %
1.00	$0.998 \pm 0.008$	0.80	99.77
2.00	$2.005 \pm 0.009$	0.45	99.76
4.00	$4.012 \pm 0.021$	0.52	100.06
6.00	$5.989 \pm 0.023$	0.38	99.82
8.00	$8.009 \pm 0.096$	1.20	100.11
10.00	$10.002 \pm 0.043$	0.43	99.92
20.00	$19.960 \pm 0.197$	0.99	99.80

CV% : коефициент на вариация

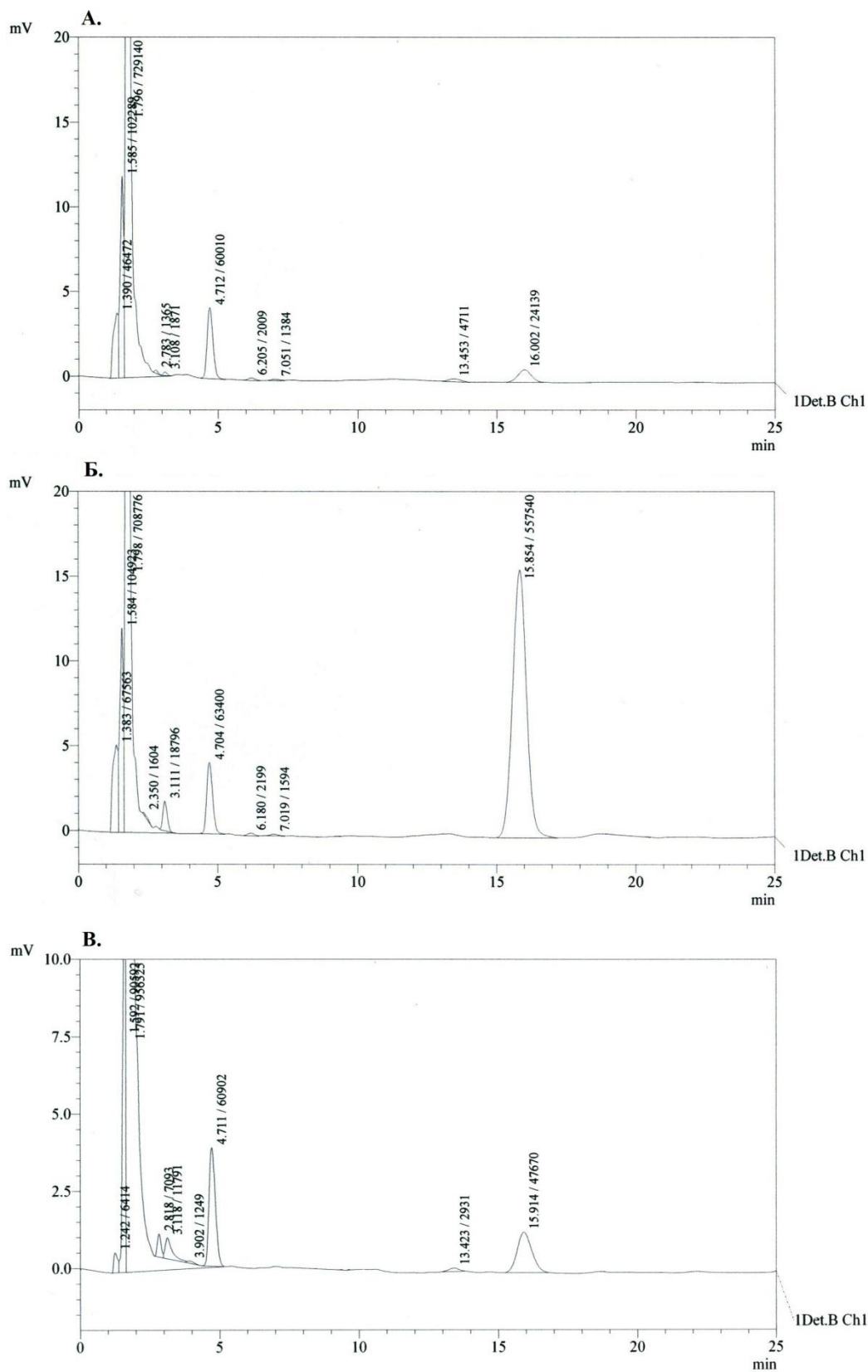
Калибрационната права е построена с помощта на линейна регресия в координати: отношение на площите на TAF и IS-T и концентрация на разтвора

(Фигура 10). Полученият висок корелационен коефициент ( $R^2 = 0.9959$ ) е показател за добра линейност на метода, а ниската стойност на стандартното отклонение (SD) и наклона ( $y = 0.4817x - 0.0038$ ) са индикатори за значителната валидност на калибрационните точки, използвани за построяване на калибрационната права.



Фигура 10. Калибрационна права на TAF

Изследваните концентрационни нива са 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00 и 20.00 µmol/L TAF получени след смесването на чиста плазма с работен разтвор на лекарственото вещество, инкубиране при температура 37°C и продължаваща обработка на аликвотна част от разтворите, за получаване на пречистена проба готова за хроматографски анализ. На фигура 11 А, Б и В са показани представителни хроматограми получени при анализа на най-ниския (LLOQ) и най-високия калибрационен сандарт (ULOQ), както и типична хроматограма получена при анализа на реална проба от пациент. Времената на задържане на TAF и IS-T са съответно 15.9 и 4.7 min.



Фигура 11. Представителни хроматограми на А. LLOQ, Б. ULOQ и В. проба от пациент с концентрация на TAF 1.97  $\mu\text{mol/L}$

#### 4.1.2.4 Точност, достоверност и възпроизводимост

За валидиране на параметрите точност, достоверност и възпроизводимост са изследвани приготвените QC проби при 4 концентрационни нива в рамките на диапазона на калибрационната права: LLOQ (1.00  $\mu\text{mol/L}$ ), LQC (2.00  $\mu\text{mol/L}$ ), MQC (4.00  $\mu\text{mol/L}$ ) и HQC (6.00  $\mu\text{mol/L}$ ). Валидирането в рамките на серия е проведено чрез анализ на 6 отделни проби от четирите концентрационни нива в един ден, а между сериите - чрез повторен анализ на тези проби в продължение на 3 дни. Данните за неточността и недостоверността и невъзпроизводимостта на метода са обобщени в Таблици 6 и 7.

Таблица 6. Точност, достоверност и възпроизводимост в серия (n=6)

LLOQ = 1.00 $\mu\text{mol/L}$			LQC = 2.00 $\mu\text{mol/L}$		
Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%	Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%
1	1.01	1.00%	1	1.97	-1.47%
2	0.96	-4.17%	2	1.94	-3.13%
3	0.95	-4.52%	3	1.97	-1.53%
4	0.90	-10.00%	4	1.96	-2.22%
5	0.91	-8.96%	5	1.96	-1.77%
6	0.89	-11.00%	6	1.93	-3.42%
<b>Average</b>	0.94		<b>Average</b>	1.95	
<b>d%</b>	-6.28%		<b>d%</b>	-2.26%	
<b>SD</b>	0.05		<b>SD</b>	0.02	
<b>CV%</b>	5.32%		<b>CV%</b>	1.03%	
MQC = 4.00 $\mu\text{mol/L}$			HQC = 6.00 $\mu\text{mol/L}$		
Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%	Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%
1	4.00	0.06%	1	6.12	2.00%
2	4.04	0.89%	2	5.91	-1.50%
3	4.00	0.01%	3	6.00	0.00%
4	3.99	-0.32%	4	6.07	1.17%
5	4.00	-0.09%	5	5.98	-0.33%
6	4.03	0.75%	6	6.02	0.33%
<b>Average</b>	4.01		<b>Average</b>	6.02	
<b>d%</b>	0.22%		<b>d%</b>	0.28%	
<b>SD</b>	0.02		<b>SD</b>	0.07	
<b>CV%</b>	0.50%		<b>CV%</b>	1.16%	

Възпроизводимостта в серия е оценена чрез CV%, който е по-малък от 5.5% за всички изследвани нива на концентрация, а точността в серия – чрез процентно отклонение на средната получена концентрация спрямо претеглената (d%), варираща от -6.28 до 0.28%.

Междусерийният анализ също потвърди метода като точен и възпроизводим. Резултатите обобщени в Таблица 7 са групирани за всяка серия от анализи проведени в рамките на три последователни дни и показват CV% по-малък от 1.1% и d% между -8.00 и 0.11%.

Таблица 7. Точност, достоверност и възпроизводимост във време (n=6)

LLOQ = 1.00 µmol/L			LQC = 2.00 µmol/L		
Серия №	Концентрация, µmol/L	d%	Серия №	Концентрация, µmol/L	d%
1	0.92	8.00%	1	1.93	-3.37%
2	0.91	9.00%	2	1.92	-4.18%
3	0.93	7.00%	3	1.95	-2.31%
<b>Average</b>	0.92		<b>Average</b>	1.93	
<b>d%</b>	-8.00%		<b>d%</b>	-3.29%	
<b>SD</b>	0.01		<b>SD</b>	0.02	
<b>CV%</b>	1.09%		<b>CV%</b>	1.04%	
MQC = 4.00 µmol/L			HQC = 6.00 µmol/L		
Серия №	Концентрация, µmol/L	d%	Серия №	Концентрация, µmol/L	d%
1	4.01	0.15%	1	6.01	0.17%
2	3.99	-0.33%	2	5.97	-0.50%
3	4.02	0.50%	3	6.04	0.67%
<b>Average</b>	4.00		<b>Average</b>	6.01	
<b>d%</b>	0.11%		<b>d%</b>	0.11%	
<b>SD</b>	0.02		<b>SD</b>	0.04	
<b>CV%</b>	0.50%		<b>CV%</b>	0.67%	

В заключение може да се потвърди, че точността и прецизността, на метода, отговарят напълно на предварително зададените критерии за приемане.

#### 4.1.2.5 Граница на откриване и граница на количествено определяне (LOD/ LOQ)

За определяне на LOD се използват два подхода – експериментален и изчислителен. Експериментално LOD се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 2 или 3:1, а изчислително по формулата:  $LOD = (3.3 \cdot \sigma) / S$ , където  $\sigma$  е стандартното отклонение на измерените стойности, а  $S$  е наклона на калибрационната права. Аналогично LOQ също може да бъде определена експериментално и изчислително. Експериментално LOQ се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 10:1, а изчислително по формулата:  $LOQ = (10 \cdot \sigma) / S$ . Определените стойности за LOD и LOQ са съответно 0.05 и 1.00 µmol/L,

доказващи възможността на разработения метод за приложение в клиничната практика и определяне дори на следи от лекарственото вещество в плазмата.

#### 4.1.2.6 Тестове за пригодност на системата

Подбраните хроматографски условия осигуряват бързо и ефективно разделяне на TAF и IS-T, доказано чрез извършените тестове за пригодност на системата. За целта е направен шесткратен анализ на калибрационния разтвор с концентрация 4.00  $\mu\text{mol/L}$  избран за MQC проба и са определени параметрите: време на задържане ( $t_R$ ), капацитетен фактор ( $\kappa$ ), селективност ( $\alpha$ ), брой теоретични тарелки ( $N$ ), степен на разделяне ( $R_S$ ) и пикова асиметрия (tailing factor,  $T$ ). Обобщените резултати получени след серията анализи са представени в Таблица 8. Определените параметри на хроматографската система, характеризиращи задържането и ефективността на разделяне, отговарят напълно на изискванията на Европейската фармакопея с получени стойности за  $\kappa \geq 2.0$ ,  $\alpha \geq 1.9$ ,  $N \geq 2300$ ,  $R_S \geq 4.0$  и  $T \leq 1.2$ .

Таблица 8. Резултати от теста за пригодност на системата

Параметър	Критерий за приемане	TAF	IS-T
Време на задържане ( $t_R$ )	-	15.93	4.71
Капацитетен фактор ( $\kappa$ )	Ph.Eur. NLT 2.0	10.46	2.40
Селективност ( $\alpha$ )	Ph.Eur. NLT 1.0	1.91	1.92
Брой теоретични тарелки ( $N$ )	Ph.Eur. NLT 2000	5007	2347
Степен на разделяне ( $R_S$ )	Ph.Eur. NLT 2.0	9.49	4.05
Пикова асиметрия (tailing factor, $T$ )	Ph.Eur. NMT 2.0	1.04	1.16

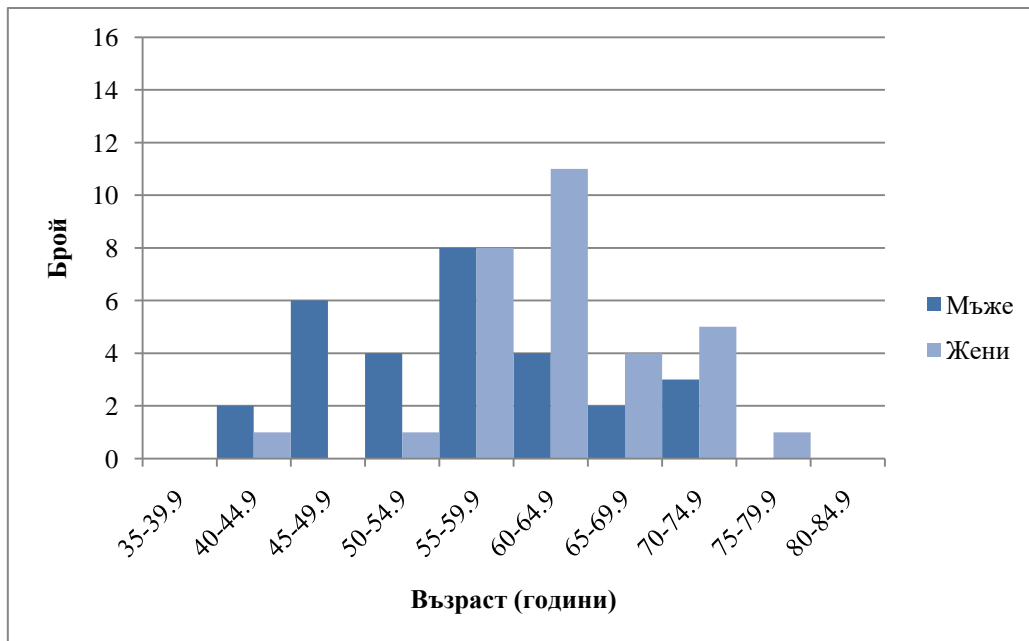
Ph. Eur.: Европейска фармакопея; NLT: не по-малко от; NMT: не повече от;

## **4.2 Прилагане на разработения метод за количествен анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза**

### **4.2.1 Проследяване на плазмените концентрации на Tafamidis при българската кохорта пациенти носители на мутацията Glu89Gln**

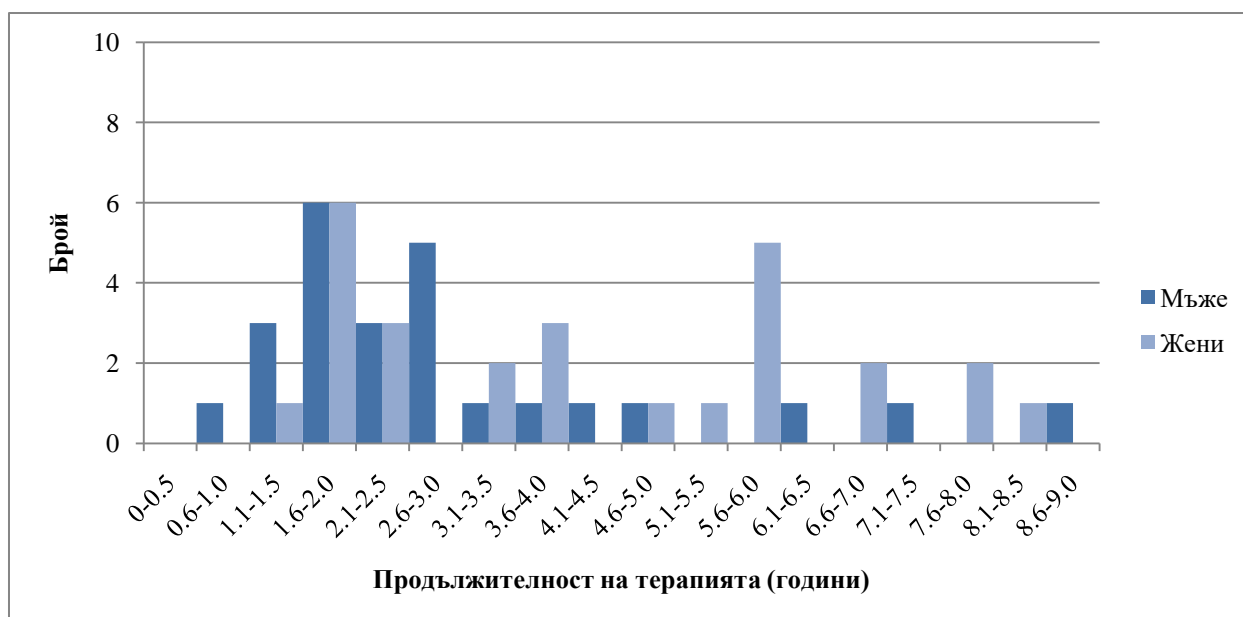
Проведеното проучване за определяне на средните плазмени концентрации при пациентите провеждащи терапия с ТАФ продължи три години (март 2019 – март 2022), на територията на два основни центъра – Клиниката по неврология към УМБАЛ „Александровска“ и Фармацевтичния факултет на Медицински университет – София. Рутинното вземане на кръв за проследяване на плазмените концентрации се извърши по време на редовните болнични посещения на пациентите на всеки 6 месеца. Одобрената терапевтична схема (20 mg препоръчителна дневна доза), за приложение на лекарствения продукт при пациентите с TTR амилоидоза, не предвижда корекции в дозовия режим във връзка с постигнатия ефект от терапията.

Общият брой на пациентите е 60 – 29 мъже (47.7%) и 31 жени (52.3%) на възраст от 40 до 75 години. На Фигура 12 е представено подробно разпределение на участниците в изследването по групи. Средната възраст на пациентите е  $58 \pm 8.2$  години. Възрастовата група 55 – 59.9 години е с най-голям брой пациенти от мъжки пол (10), а групата 65 – 69.9 е с най-нисък брой (1). При жените 60 - 64.9 е с най-висок брой (13), следвана от групата 55 - 59.9 години с 9, а най-малко (1) е във възрастовите групи 40 - 44.9 и 50 - 54.9 години. Изводът, който може да се направи от представените данни е, че при жените възрастта на проявление и диагностициране на заболяването е значително по-висока, отколкото при мъжете. Причините за наблюдаването на тази тенденция е по-лекото протичане на заболяването при тях, както и дългият безсимптомен период, водещ до забавяне на диагнозата и започване на лечение.



Фигура 12. Разпределение на пациентите с мутация Glu89Gln по пол и възраст

Продължителността на терапията, при включените в изследването пациенти, варира от 0.9 до 8.6 години. На Фигура 13 е представено подробно разпределението по групи. Средната продължителност на терапията отчетена при пациентите в началото на периода на проследяване е 2.9 години. Изводът, който може да се направи от представените обобщени данни е, че при жените средната продължителност на терапията е значително по-голяма, в сравнение с мъжете и причина за това е по-лекото протичане на заболяването и по-бавната прогресия в симптоматиката. При мъжете е установено значително по-бързо и агресивно прогресиране на заболяването до стадий 2, което от своя страна води до прекратяване на терапията с TAF.



Фигура 13. Разпределение на пациентите с мутация Glu89Gln по пол и продължителност на терапията

За периода на изследването са събрани общо 246 плазмени проби от пациентите носители на мутацията Glu89Gln, съхранявани при подходящи условия до момента на анализирането им. Измерените плазмени концентрации варират от 1.24 до 18.91  $\mu\text{mol/L}$  със средна стойност 5.13  $\mu\text{mol/L}$ ,  $SD \pm 2.64 \mu\text{mol/L}$  и общ CV% 51.43%. Индивидуалният коефициент на вариация в плазмените нива при всеки пациент по време на проследяването е средно 18.50% (от 2.39 до 46.55%).

В Таблица 9 са представени индивидуалните характеристики на пациентите, включващи: пол, брой взети проби за периода, средна концентрация и коефициент на вариация. Анализът на обобщените данни в таблицата не показва значителна разлика в средните коефициенти на вариация в групите мъже/жени - 18.99% и 18.28%. Следователно индивидуалната вариация в плазмените концентрации не зависи от пола на пациентите и от броя събрани проби за анализ.

Таблица 9. Демографски характеристики и плазмени концентрации на пациентите включени в изследването

№	Пол	Брой проби	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	CV%	№	Пол	Брой проби	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	CV%
1	Ж	6	4.83	16.10	31	Ж	4	5.56	26.23
2	Ж	6	6.22	14.63	32	Ж	4	6.09	17.02
3	М	6	4.79	9.85	33	М	4	9.01	11.04
4	М	6	1.94	32.66	34	Ж	4	3.92	20.07
5	М	6	5.47	17.34	35	М	4	4.08	13.12
6	М	6	3.10	30.84	36	Ж	4	8.25	8.17
7	М	6	4.09	14.30	37	Ж	4	5.06	40.79
8	Ж	6	2.78	36.09	38	Ж	4	9.25	7.68
9	М	6	3.13	26.88	39	Ж	4	15.58	15.43
10	Ж	6	7.73	21.86	40	Ж	4	4.37	12.14
11	Ж	6	4.26	18.40	41	М	4	2.89	21.06
12	Ж	6	4.89	26.16	42	М	4	4.52	21.35
13	М	6	3.22	18.99	43	Ж	4	4.46	9.26
14	Ж	6	7.17	19.32	44	Ж	3	6.84	10.39
15	М	6	4.01	21.41	45	Ж	3	5.83	12.83
16	М	6	2.28	32.56	46	М	3	5.89	24.63
17	М	5	1.57	12.69	47	М	3	4.66	10.44
18	Ж	5	4.13	12.35	48	Ж	3	8.37	30.88
19	М	5	2.05	22.02	49	М	2	3.85	2.39
20	Ж	5	6.66	23.54	50	М	2	4.65	14.46
21	М	5	3.61	19.42	51	М	2	2.44	16.56
22	Ж	5	9.33	4.87	52	Ж	2	7.19	5.61
23	Ж	5	7.60	18.56	53	М	1	9.20	-
24	Ж	5	3.66	46.55	54	М	1	9.44	-
25	М	5	3.83	19.57	55	Ж	1	1.24	-
26	М	5	3.04	23.77	56	М	1	7.74	-
27	Ж	5	8.00	12.82	57	Ж	1	6.46	-
28	Ж	4	7.78	5.75	58	Ж	1	9.54	-
29	М	4	1.90	19.92	59	Ж	1	4.92	-
30	М	4	5.04	17.37	60	М	1	7.90	-

#### 4.2.2 Обработка и анализ на получените резултати. Определяне на степента на корелация между плазмената концентрация на лекарствения продукт и някои клинични характеристики на избраната група пациенти

Статистическият анализ е извършен с помощта на GraphPad Software версия 9. Средните плазмени концентрации при всеки пациент са показани като средна стойност и SD, а вариабилността - като CV%. Сравнението на някои специфични параметри (абсолютни стойности или проценти) между отделните групи за целия

период на изследване се основава на анализа на дисперсията или t-теста. Едностранныят ANOVA тест и регресионният анализ са използвани за оценка на корелацията и потвърждаване или отхвърляне направените твърдения. *P*-стойност по-ниска от 0.05 се счита за статистически значима.

#### 4.2.2.1 Плазмена концентрация и пол

Съществено влияние, върху плазмените концентрации на определено лекарствено вещество, оказва полът на пациентите. За периода на проучването е направен анализ на зависимостта на измерените плазмени концентрации на TAF от пола; в анализа са включени пациенти с взети повече от 2 последователни проби (Таблица 10).

Таблица 10. Вариационен анализ на плазмената концентрация на TAF спрямо пола при болните с мутация Glu89Gln

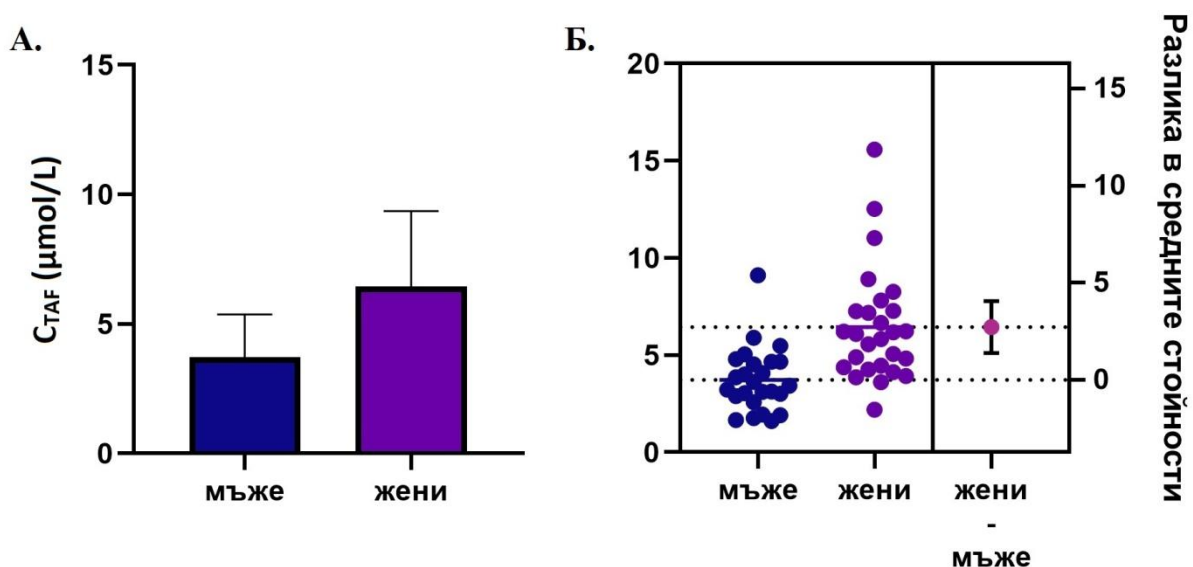
Група	Брой	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	SD	Min	Max
Мъже	25	3.80	1.59	1.57	2.78
Жени	27	6.51	2.55	9.01	15.58
<b>Общо</b>	<b>52</b>	<b>5.21</b>	<b>2.53</b>	<b>1.57</b>	<b>15.58</b>

При мъжете установената средна плазмена концентрация достига едва 58.37% от концентрацията при жените (Фигура 14 А и Б).

Получените резултати относно концентрационните нива в двете групи пациенти са обработени и анализирани чрез едностранин ANOVA тест за потвърждаване на статистически значимо различие в средните стойности ( $p < 0.05$ ). Анализът потвърди работната хипотеза за статистическа значимост на разликата в двете концентрационни нива с ниво на сигнификантност  $p < 0.0001$ . Важно е да се отбележи клинично установения факт, че жените от наблюдаваната група развиват значително по-късно прогресия на процеса и то - с подчертано по-ниска агресивност. На основата на посочените статистически и клинични данни може да се издигне хипотезата, че изразеното забавяне на болестната прогресия при пациентите от женски пол се дължи и на практически двукратно по-високите равновесни плазмени концентрации на TAF в сравнение с мъжете. В подкрепа на тази хипотеза се явява и установената в нашето проучване зависимост между възрастта, плазмените концентрации и хода на болестта - при млади възрастни се наблюдава по-ранна и бърза прогресия при по-ниски

плазмени концентрации в сравнение с пациенти над 61 г. (виж следващия раздел – 4.2.2.2.) Тези наблюдения за първи път показват потенциала на фармакокинетичния лекарствен мониторинг за индивидуализация на терапията и за постигане на оптимални лечебни резултати. За целта са необходими допълнителни проспективни проучвания за изследване на връзката концентрация-ефект и за установяване на оптимална терапевтична концентрационна област на медикамента.

Анализът на вариабилността в двете групи (мъже/жени) не показва статистически значима разлика на средните стойности. Получените резултати са съответно  $18.99 \pm 7.30\%$  за мъжете и  $18.28 \pm 10.68\%$  за жените, а  $p = 0.7831$ . Следователно вариацията в концентрационните нива не зависи от пола на пациентите. Причините могат да бъдат няколко: различия в метаболизма, стойност на модифицирания индекс на телесната маса и прием на храна с лекарствения продукт, но най-важната от всички е стриктното спазване на дозовия режим по време на целия терапевтичен курс.



Фигура 14. Плазмени концентрации на ТАФ при пациенти от мъжки и женски пол. А. Средни концентрации със стандартно отклонение. Б. Графика за оценка на разликата в средните стойности

#### 4.2.2.2 Плазмена концентрация и възраст

За оценка на връзката между плазмените концентрации на TAF и възрастта, изследваната популация е разделена в три възрастови групи: млади възрастни (<50 години), пациенти на средна възраст (51 - 60 години) и пациенти в напреднала възраст (>61 години) (Таблица 11). В анализа са включени пациенти с взети повече от 2 последователни проби за анализ.

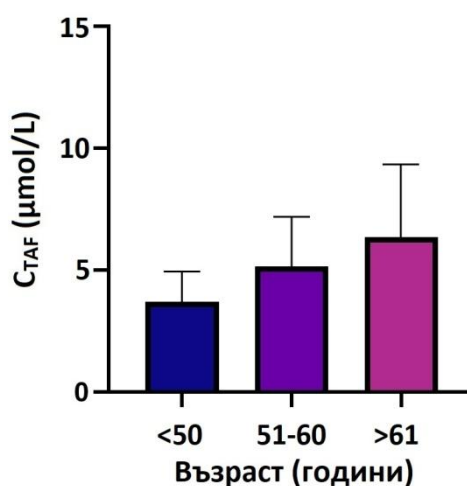
Таблица 11. Вариационен анализ на плазмената концентрация на TAF спрямо възрастта при болните с мутация Glu89Gln

Група	Брой	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	SD	Min	Max
< 50 години	12	3.84	1.27	2.05	6.84
51 - 60 години	22	5.03	2.26	1.57	9.33
>61 години	18	6.34	3.01	2.78	15.58
<b>Общо</b>	<b>52</b>	<b>5.07</b>	<b>2.18</b>	<b>1.57</b>	<b>15.58</b>

Резултатите от проведения вариационен анализ показват почти два пъти по-ниски нива на TAF в групата до 50 г. в сравнение с групата над 61 г. и минимална разлика в средните стойности между групите 51 - 60 г. и над 61 г. За периода на изследването не са установени разлики в експозицията на TAF във всички групи пациенти. Една от възможните причини за наблюдаваните повишени плазмени концентрации при възрастни над 61 г. трябва да бъде свързана с физиологични промени в организма, които водят до по-малък обем на разпределение на лекарственото вещество и до по-ниска скорост на метаболизма, а това от своя страна резултира в отчетена по-висока пикова плазмена концентрация, удължаване на плазмения полуживот, и забавена елиминация. За потвърждение на тази хипотеза е необходим подробен анализ и включване на допълнителни клинични показатели.

Прилагането на едностранен ANOVA тест за изследване на хипотезата за връзка между възрастта на пациентите с мутация Glu89Gln и определените концентрационни нива на TAF, даде положителен резултат. При предварително определено ниво на сигнификантност  $p < 0.05$ , полученият резултат от анализа е  $p = 0.0235$ , което потвърждава първоначалната работна хипотеза. (Фигура 15)

Пациентите под 50 годишна възраст показват среден коефициент на вариация  $17.62 \pm 5.60\%$ , между 51 и 60 г. –  $19.45 \pm 9.98\%$ , а над 61 г. –  $17.91 \pm 9.89\%$ . Едностранныят ANOVA тест не показва сигнификантна разлика в средните стойности за трите групи ( $p = 0.8111$ ), следователно хипотезата за връзка между индивидуалната вариабилност и възрастта се отхвърля.



Фигура 15. Оценка на връзката между плазмената концентрация на ТАФ и възрастта.

#### 4.2.2.3 Плазмена концентрация и продължителност на терапията

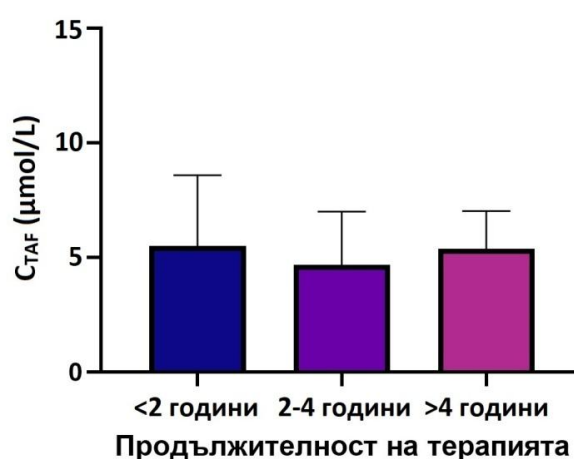
Относително дългият период на проведеното проучване осигури възможност и за оценка на връзката (зависимостта) между концентрационните нива на ТАФ в плазмата и терапевтичния период. За целта, включените пациенти са разделени в три групи. В група 1 попадат пациентите с терапевтичен курс до 2 г., в група 2 – пациентите с терапия между 2 и 4 г., а в група 3 – пациентите с терапия повече от 4 г. В анализа са включени пациенти с взети повече от 2 последователни проби.

Таблица 12 представя обобщените данни, събрани по време на анализите, за всяка група, с включена информация относно средната плазмена концентрация, стандартното отклонение, минималните и максималните отчетени стойности.

Таблица 12. Вариационен анализ на плазмената концентрация на TAF спрямо общата продължителност на терапията при болните с мутация Glu89Gln

Група	Брой	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	SD	Min	Max
< 2 г.	17	5.53	3.16	1.90	15.58
2 - 4 г.	18	4.71	2.47	1.57	9.33
> 4 г.	17	5.41	1.86	1.94	8.00
<b>Общо</b>	<b>52</b>	<b>5.22</b>	<b>2.50</b>	<b>1.57</b>	<b>15.58</b>

Наблюдава се минимално отклонение ( $< 10\%$ ) на плазмените концентрации във всички групи от определената средна стойност за българската кохорта пациенти (Фигура 16).



Фигура 16. Оценка на връзката между плазмената концентрация на TAF и продължителността на терапията

За изследване на хипотезата за връзка между стойностите на плазмената концентрация и продължителността на терапевтичния курс е приложен едностранен ANOVA тест. Резултатът от него не достигна предварително определено ниво на сигнификантност  $p < 0.05$  ( $p = 0.5941$ ), с което работната хипотеза се отхвърля.

Пациентите с продължителност на терапията с TAF под 2 г. показват среден коефициент на вариация  $14.64 \pm 6.36\%$ , между 2 и 4 г. –  $19.74 \pm 10.07\%$ , а над 4 г. –  $21.03 \pm 9.25\%$ . Едностранният ANOVA тест не показва сигнификантна разлика в средните стойности за трите групи ( $p = 0.0878$ ), следователно хипотезата за връзка

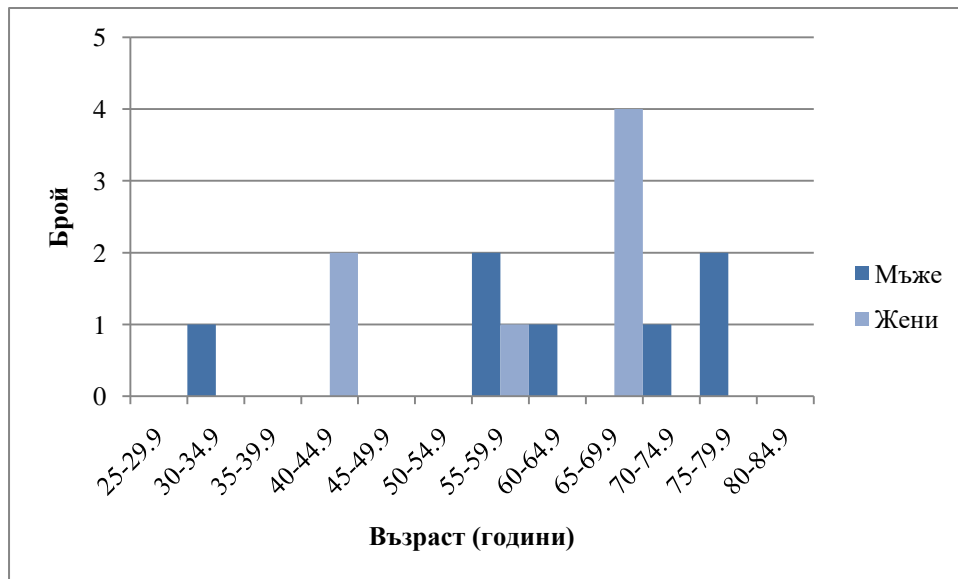
между индивидуалната вариабилност и продължителността на терапията трябва да бъде отхвърлена.

#### **4.2.2.4 Ограничения на проучването**

Както при всички проучвания, и тук са на лице някои съществени ограничения. Относително малкият брой пациенти включени в анализа може да повлияе върху възможността за откриване на статистически значими резултати, относно влиянието на различни фактори върху циркулиращите плазмени нива на ТАФ. Дизайнът на изследването, и провеждането на проследяване по време на редовните клинични посещения на пациентите, възпрепятства възможността за определяне на максималните концентрационни нива, както и за определяне на площта под кривата (AUC). По-мощни клинични проучвания, биха потвърдили или отrekli представените резултати относно мутацията Glu89Gln. Мониторингът на плазмената концентрация на ТАФ понастоящем не е често срещан в практиката, но в бъдеще би могъл да се използва като подход за индивидуализация на терапията с потенциал значимо да се забави хода на болестта и нейната прогресия.

#### **4.2.3 Проследяване и анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти носители на мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu**

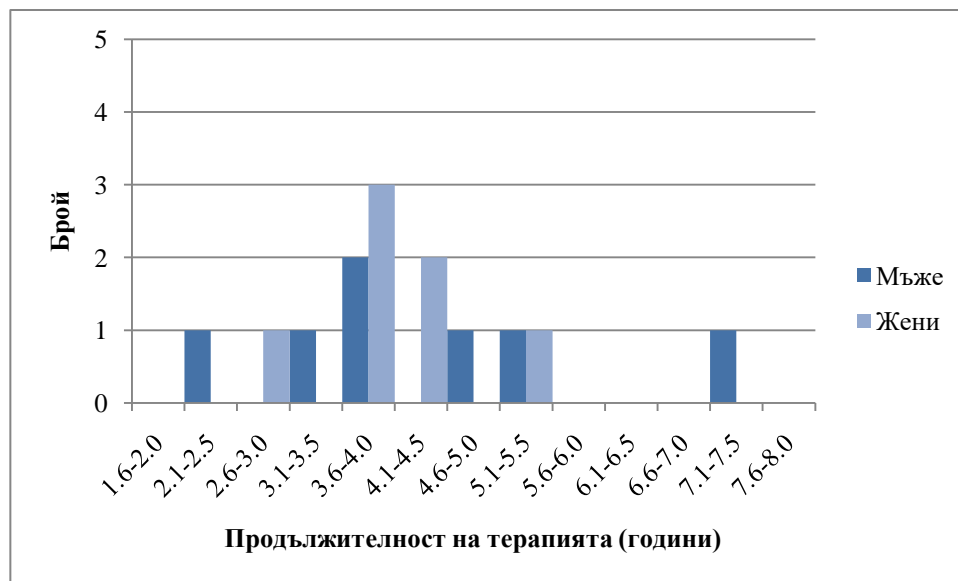
В периода на проучването са проследени плазмените концентрации на ТАФ при пациентите с транстиретинова амилоидоза, причинена от мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu – редки за България, но значително по-широкоразпространени в световен мащаб. Общият брой на включените болни е 14 – 7 мъже (50.0%) и 7 жени (50.0%) на възраст от 34 до 79 години. На Фигура 17 е представено подробно разпределение на участниците в изследването по групи. Средната възраст на пациентите е  $60 \pm 13.3$  години.



Фигура 17. Разпределение на пациентите с мутации Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu по пол и възраст

Ниският брой на участниците определя неравномерното разпределение на данните показани на Фигура 17. Тук тенденцията описана за мутацията Glu89Gln, свързана с по-късно проявяване и диагностициране на заболяването при жените, не се запазва. При пациентите носители на трите описани мутации, се наблюдава приблизително изравняване на възрастта при мъжете и жените.

Продължителността на провежданата терапия с TAF варира от 2.3 до 7.5 години. Подробното разпределение по групи е представено на Фигура 18. Средната продължителност на терапията отчетена при пациентите в началото на периода на проследяване е 4.3 години. Не се наблюдава значително различие в средната продължителност на терапията при мъжете и жените. За съжаление, малкият брой пациенти в групата чувствително ограничава статистическата значимост на получените данни. Необходимо е потвърждаването на изводите, чрез задълбочен анализ с включване на по-голяма група пациенти.



Фигура 18. Разпределение на пациентите с мутации Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu по продължителност на терапията с TAF

За периода на изследването са събрани общо 70 плазмени проби, съхранявани при подходящи условия до момента на анализирането им. Измерените плазмени концентрации варират от 1.16 до 9.75  $\mu\text{mol/L}$  със средна стойност 4.84  $\mu\text{mol/L}$ , SD  $\pm$  2.21  $\mu\text{mol/L}$  и CV% 45.73% (Таблица 13).

При мъжете отчетената концентрация е  $3.97 \pm 1.52 \mu\text{mol/L}$ , а при жените -  $5.51 \pm 2.07 \mu\text{mol/L}$ . Въпреки голямата разлика в стойностите получени относно средните концентрации, едностранният ANOVA тест не показва статистически значимо различие –  $p = 0.1393$ , вероятно поради недостатъчния обем на наблюдението. Индивидуалният коефициент на вариация в плазмените нива при всеки пациент по време на проследяването е средно  $23.86 \pm 11.65\%$  (от 7.14 до 42.13%), като отново не е установена статистически значима разлика в средните коефициенти на вариация в двете групи – мъже и жени. Получените средни стойности са съответно 19.90% и 27.82%, а  $p = 0.2162$ .

Таблица 13. Демографски характеристики и плазмени концентрации на пациентите включени в изследването

Пациент №	Пол	Мутация	Брой проби	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	CV%
1	М	Val30Met	6	5.34	7.14
2	Ж	Val30Met	6	5.63	30.16
3	М	Val30Met	5	4.74	32.25
4	М	Val30Met	5	5.51	42.13
5	Ж	Ser77Phe	6	6.73	30.79
6	М	Ser77Phe	6	2.64	9.83
7	Ж	Ser77Phe	6	7.68	14.11
8	М	Ser77Phe	5	3.43	15.51
9	Ж	Ser77Phe	5	3.99	39.01
10	М	Ser77Phe	4	4.69	15.49
11	Ж	Ser77Phe	4	7.94	27.03
12	М	Gly47Glu	4	1.42	16.95
13	Ж	Gly47Glu	4	2.45	38.15
14	Ж	Gly47Glu	4	4.12	15.48

При анализа на връзката между патогенния генетичен вариант причиняващ заболяването и възрастта на пациентите, продължителността на терапията, плазмените концентрации на TAF в българските пациенти се наблюдават няколко зависимости, типични за съответните мутации.

За носителите на Val30Met мутацията са характерни късно проявяване на заболяването (около 72 г.), средна продължителност на терапията 4.8 г. (показваща добър контрол на заболяването и поддържането на пациентите в стадий 1) и плазмена концентрация около 5.31  $\mu\text{mol/L}$ . Ser77Phe пациентите са на възраст около 62 г., с терапия провеждана за период от около 4.1 г. и установени плазмени нива около 5.30  $\mu\text{mol/L}$ . Мутацията Gly47Glu е значително по-агресивна в проявяването си в сравнение с предходните две. При нея налице е ранно начало на заболяването – около 39 г., средна продължителност на терапията с TAF около 3.6 г. и концентрационни нива на лекарственото вещество около 2.66  $\mu\text{mol/L}$  – два пъти по-ниски в сравнение с тези на носителите Val30Met. В съответствие с издигната от нас хипотеза за връзката между плазмените концентрации и хода на болестта (раздел 4.2.2.1.) е от съществено значение да се провери клинично дали агресивният ход при тези пациенти може да се забави с по-агресивна и индивидуализирана терапия постигаща равновесни плазмени нива над 5-6  $\mu\text{mol/L}$  от самото ѝ започване.

Данните получени от българската кохорта пациенти съответстват на публикуваните в литературата проучвания относно всяка отделна мутация - засегнатата група от населението, специфичности при проявяването на заболяването, възраст на пациентите, ефект от провежданата терапия с TAF и др. За съжаление, поради малкия брой на включените в изследването български пациенти, сравнителен анализ между отделните мутации не може да се направи, тъй като обособените групи нямат статистическа представителност. Въз основа на получените данни ще бъдат проследени наблюдаваните зависимости, но доказването им статистически е невъзможно.

За мутациите Val30Met и Ser77Phe е характерно късно начало на заболяването – след 65 г. и добро повлияване на пациентите от терапията със стабилизиране на състоянието и забавяне на прогресията в наблюдаваната симптоматика (дълъг терапевтичен курс с TAF), потвърдено и от изследването на българските пациенти, носители на тази мутация – средна възраст съответно 72 и 62 г. и продължителност на терапията около 4.5 г. Въпреки малкия брой болни с мутация Gly47Glu, разликата във възрастта е очевидна. В тази група средната начална възраст е с около 30 години по-ниска от тази в предходните две, а продължителността на терапията – около 1 г. по-малка. Описаните зависимости трябва да се свържат с агресивния ход на заболяването при Gly47Glu мутацията.

## 4.3 Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Diflunisal

### 4.3.1 Оптимизиране на метода за изследване

Процедурата за оптимизиране на HPLC метода за количествено определяне на DIF е извършена на база три основни параметъра – неподвижна фаза (хроматографска колона), подвижна фаза (MP) и UV детекция (дължина на вълната).

На база предварителното проучване относно физикохимичните свойства на анализираните вещества както и свойствата на биологичната матрица е направен изборът на няколко типа колони подходящи за анализа. По време на експерименталната работа са правени промени единствено в типа на пълнежа в колона и дължината ѝ, а всички останали параметри са запазени непроменени, за да се оцени единствено тяхното влияние върху хроматографското разделяне. Изпробвани са различни колони с обратни фази – ODS (C18) и OS (C8), като по-добра разделителна способност и чувствителност е установена при ODS в сравнение с OS. Две колони с различна дължина са използвани при разработването на анализа – 150 x 4.6 mm и 250 x 4.6 mm, но като по-подходяща за целите на разработвания метод е избрана колоната с дължина 150 mm във връзка с осигуряване на по-кратко общо време за анализ на всяка проба. Резултатите получени при използването на колони с размер на частиците на пълнежа 5  $\mu\text{m}$  са задоволителни, осигурявайки стабилни и надеждни условия за анализ без риск от запушване на хроматографската колона по време на елуирането на биологични проби. Подходяща за анализа се оказва колоната използвана при анализа на TAF в биологична среда - Purospher<sup>®</sup> RP-C18 (150 x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1).

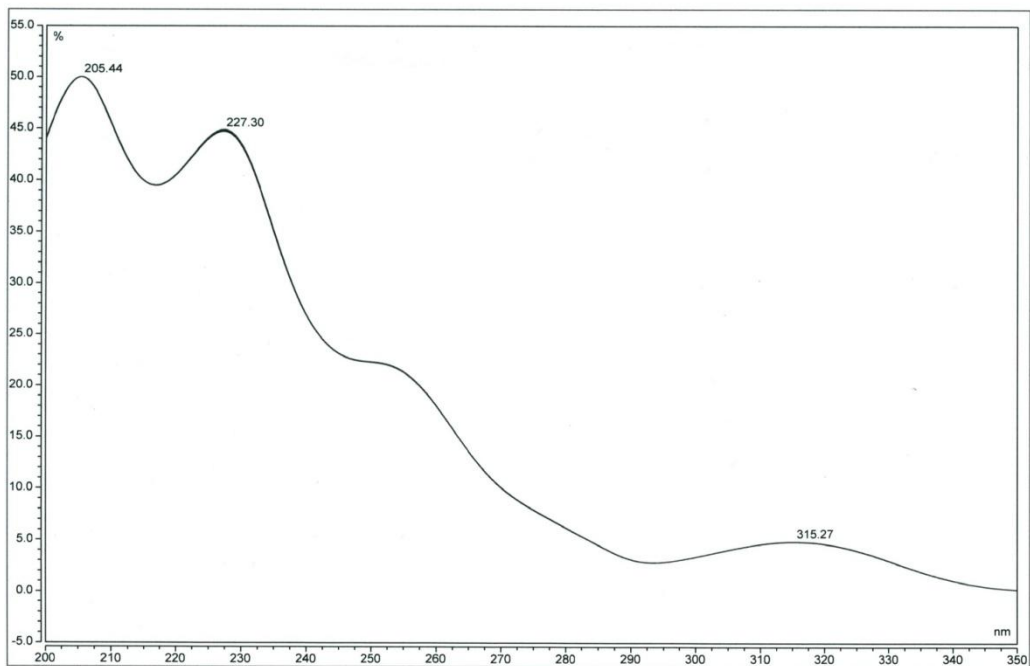
Съгласно предварително събраните литературни данни са тествани различни състави и съотношения на разтворителите в MP. Въпреки че в много от литературните източници, метанолът е предпочитан като органичен разтворител, резултатите получени вследствие на замяната му с ACN са също толкова добри по отношение на запазване на формата и площите на хроматографските пикове. Изследвани са MP със състав 0.01 mol/L  $\text{HCOONH}_4$  : ACN, фосфатен буфер pH = 3 : ACN и 0.1% TFA в смес вода : ACN. Фазите съдържащи амониев формиат и фосфатен буфер pH = 3 не показват задоволителни резултати, а получените хроматографски пикове са широки, асиметрични и с прекалено кратко време на елуиране, което прави метода неприложим в биологична среда, тъй като ще се наблюдава едновременно

елуиране на един от двата целеви анализа (DIF и неговият вътрешен стандарт – IS-D) и компонентите на матрицата. Най-добри резултати са получени при използването на третата МР - 0.1% TFA в смес вода : ACN (МР използвана при анализа на TAF). Селективността на метода е оптимизирана чрез вариация в процента на органичния разтворител (от 60 : 40 v/v до 40 : 60 v/v). И тук отново подходящо се оказва съотношението 42 : 58 v/v, тъй като при него се наблюдава достатъчно добро разделяне на вътрешния стандарт от компонентите на матрицата и се осигурява най-кратко аналитично време. Процедурата за анализ е разработена при изократично елуиране и скорост на потока 1.0 ml/min. Използването на по-ниски скорости на потока води до забавяне във времето за анализ и нарушаване на пиковата симетрия. Оценено е и влиянието на температурата върху аналитичната процедура, но не е установено значително подобряване на хроматографските условия при повишаване на температурата до 40°C. Като най-благоприятна и не криеща риск за стабилността на анализиранията вещества и матрицата, стайната температура (25°C) е предпочетена за провеждането на количествения анализ.

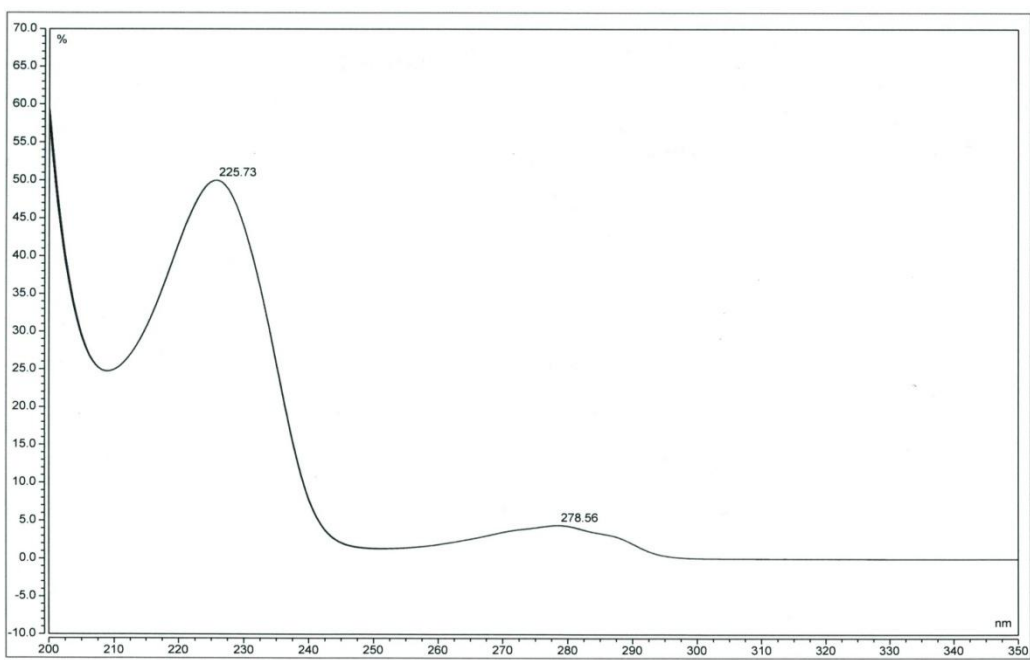
Изборът на оптимална дължина на вълната на UV детектора е базиран на получените спектри на анализите, снети от разтвори на веществата приготвени в метанол (Фигура 19). Като най-подходяща за анализа е определена дължина на вълната 230 nm с наблюдавана максимална абсорбция и при двете вещества и едновременно с това минимално поглъщане от страна на органичните разтворители. Проявените сходства във физичните и химичните отнасяния на TAF и DIF дават възможност за използване на еднакви хроматографски условия за количествения им анализ и възможност за едновременното им определяне при необходимост.

Оптимизираният метод за пробоподготовка използван при анализа на TAF е въведен за приложение и в количествения анализ на DIF. Процедурата се основава на протеинна преципитация с помощта на 1% разтвор на трихлороцетна киселина в ACN, допълнително хомогенизиране на пробата на вортекс и ултразвукова вана, разклащане за 20 min и използване на част от супернатанта, отделен след центрофугирането, за анализ.

**А.**



**Б.**



Фигура 19. UV спектри на А. DIF и Б. вътрешния стандарт (IS-D)

### **4.3.2 Валидиране на хроматографския метод**

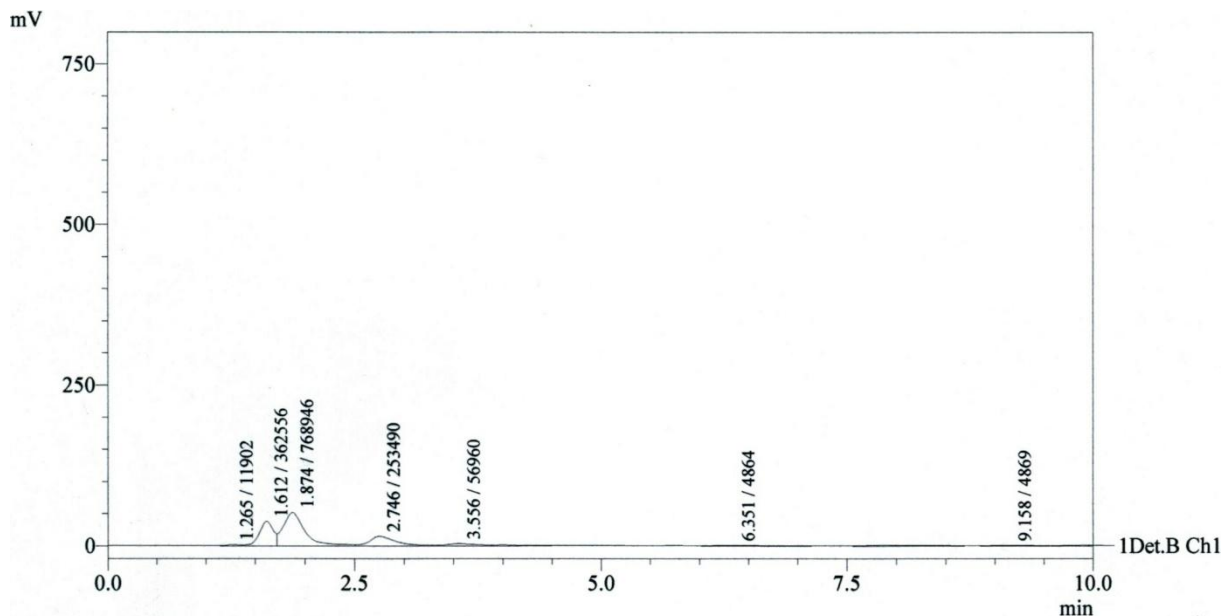
Валидирането на биоаналитичния метод за количествен анализ е осъществено съгласно ICH и ръководствата одобрени от ЕМА и FDA за периода 2018-2019г. [284,285] Включените за определяне референтни параметъри са: селективност, специфичност, линейност, точност, прецизност, граници на откриване и количествено определяне.

#### **4.3.2.1 Предварително зададени критерии за приемане**

- Селективност и специфичност - оценена с шест отделни матрици на човешка плазма; допустими стойности са - не повече от 20% от отговора на анализа при LLOQ и не повече от 5% от отговора на IS в пробата LLOQ за всяка матрица.
- Линейност – в рамките на  $\pm 20\%$  от номиналната концентрация при LLOQ и в рамките на  $\pm 15\%$  при всички останали концентрационни нива, при най-малко 75% от стандартите за калибриране; линейност в определения диапазон, с  $R^2 > 0.99$ .
- Точност, недостоверност и невъзпроизводимост - в рамките на  $\pm 15\%$  от обявената концентрация, с изключение на LLOQ, където тя може да бъде в рамките на  $\pm 20\%$ .
- Аналитична серия - най-малко 67% от QC пробите и 50% от всяко концентрационно ниво трябва да бъдат в рамките на  $\pm 15\%$  от номиналните стойности. Ако тези критерии не са изпълнени, серията се отхвърля.

#### **4.3.2.2 Селективност и специфичност**

Разработеният метод е доказан като селективен и специфичен. Не се наблюдава интерфериране от други компоненти (лекарствени вещества) или биологичната матрица във времената на задържане на DIF и IS-D, които при оптимизираните хроматографски условия са добре разделени. Шест различни празни плазмени проби са анализирани за доказване на специфичността на метода, а представителна хроматограма е показана на Фигура 20. От нея ясно се вижда, че във времеви интервал от 3.5 до 10 min не се наблюдават допълнителни интерфериращи пикове във времената на задържане на двата анализа.



Фигура 20. Представителна хроматограма получена при анализа на празна проба

#### 4.3.2.3 Линеиност

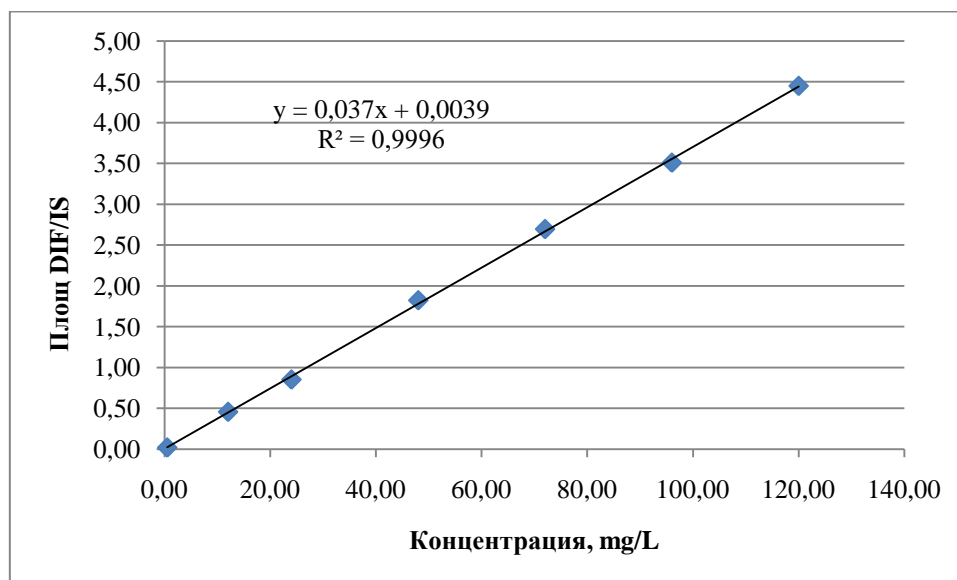
Линеиността на метода е доказана в концентрационния интервал 0.48 – 120.00 mg/L (7 концентрационни нива, трикратен анализ). Резултатите за точността при анализа на всяко концентрационно ниво попадат в интервала от 94.0 до 100.7%, което напълно покрива предварително зададените критерии за приемане (Таблица 14).

Таблица 14. Резултати за линеиност, точност и прецизност за калибрационната права на DIF (n=3)

Концентрация (C), mg/L	C <sub>DIF</sub> ± SD	Прецизност %	Точност %
0.48	0.50±0.00	0.63	100.13
12.0	12.57±0.03	0.26	100.58
24.0	23.51±0.06	0.27	94.02
48.0	50.33±0.62	1.24	100.65
72.0	74.42±0.74	0.99	99.23
96.0	96.91±1.83	1.89	96.91
120.0	122.88±1.76	1.43	98.30

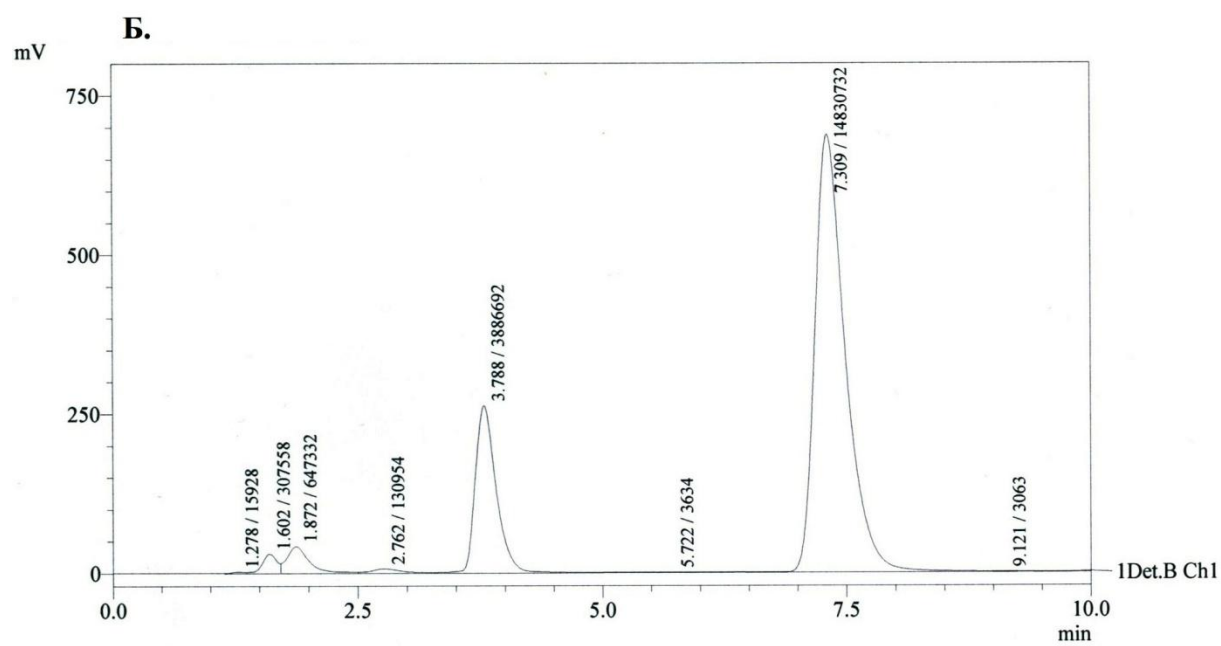
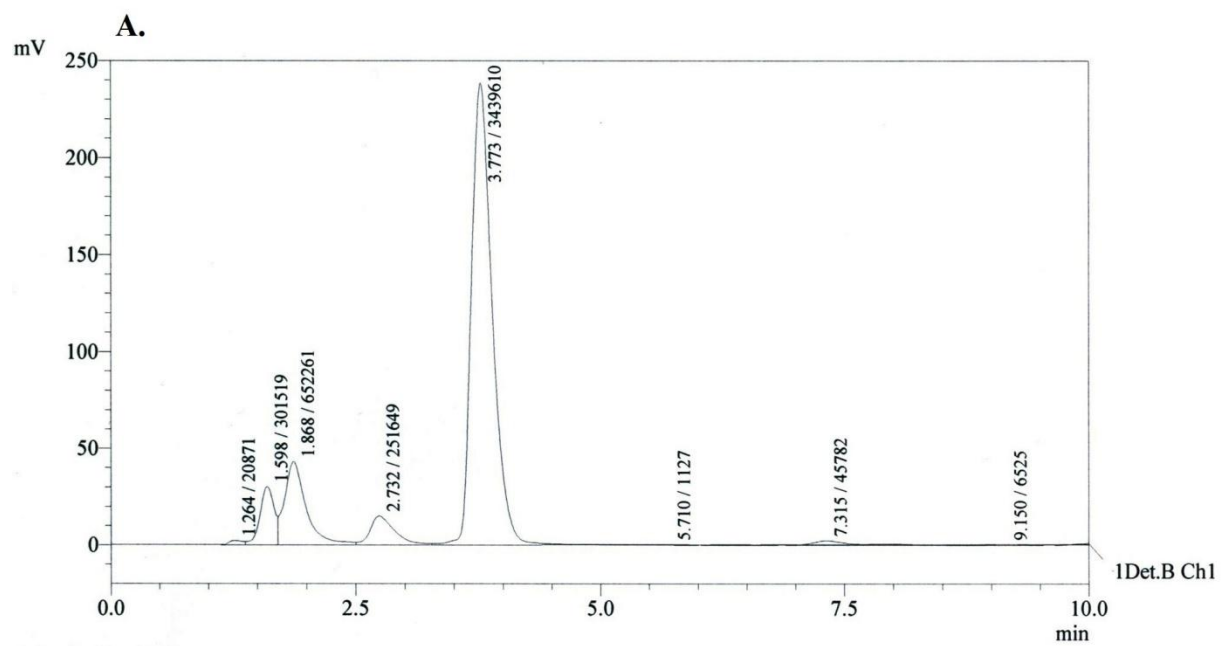
Калибрационната права е построена с помощта на линейна регресия в координати: отношение на площите на DIF и IS-D ( $S_{DIF}/S_{IS-D}$ ) и концентрацията на разтвора (Фигура 21). Полученият висок корелационен коефициент ( $R^2 = 0.9996$ ) е

показател за добра линейност на метода, а ниската стойност на стандартното отклонение (SD) и наклона ( $y = 0.037x - 0.0039$ ) са индикатори за значителната валидност на калибрационните точки, използвани за построяване на калибрационната права.



Фигура 21. Калибрационна права на DIF

Изследваните концентрационни нива са 0.48, 12.00, 24.00, 48.00, 72.00, 96.00 и 120.00 mg/L DIF получени след смесването на чиста плазма с работен разтвор на лекарственото вещество, инкубиране при температура 37°C и продължаваща обработка на аликвотна част от разтворите, за получаване на пречистена проба готова за хроматографски анализ. На Фигура 22 А и Б са показани представителни хроматограми получени при анализа на най-ниския (LLOQ) и най-високия калибрационен сандарт (ULOQ). Времената на задържане на DIF и IS-D са съответно 7.3 и 3.8 min.



Фигура 22. Представителни хроматограми на А. LLOQ и Б. ULOQ

#### 4.3.2.4 Точност, достоверност и възпроизводимост

За валидиране на параметрите точност, достоверност и възпроизводимост са изследвани приготвените QC проби при 4 концентрационни нива в рамките на диапазона на калибрационната права: LLOQ (0.48 mg/L), LQC (12.00 mg/L), MQC (48.00 mg/L) и HQC (96.00 mg/L). Валидирането в рамките на серия е проведено чрез анализ на 6 отделни проби от четирите концентрационни нива в един ден, а между сериите - чрез повторен анализ на тези проби в продължение на 3 дни. Данните за неточността и недостоверността и невъзпроизводимостта на метода са обобщени в Таблици 15 и 16.

Таблица 15. Точност, достоверност и възпроизводимост в серия (n=6)

		LLOQ = 0.48 mg/L		LQC = 12.00 mg/L	
Проба №	Концентрация, mg/L	d%	Проба №	Концентрация, mg/L	d%
1	0.48	-0.08%	1	12.18	1.53%
2	0.50	3.41%	2	12.03	0.29%
3	0.47	-1.39%	3	12.24	1.99%
4	0.51	5.34%	4	12.15	1.25%
5	0.49	2.62%	5	12.08	0.68%
6	0.48	-0.01%	6	11.95	-0.43%
<b>Average</b>	0.49		<b>Average</b>	12.11	
<b>d%</b>	1.65%		<b>d%</b>	0.88%	
<b>SD</b>	0.01		<b>SD</b>	0.11	
<b>CV%</b>	2.04%		<b>CV%</b>	0.91%	
		MQC = 48.00 mg/L		HQC = 96.00 mg/L	
Проба №	Концентрация, mg/L	d%	Проба №	Концентрация, mg/L	d%
1	48.42	0.87%	1	94.83	-1.21%
2	47.98	-0.04%	2	93.95	-2.13%
3	48.14	0.29%	3	95.94	-0.06%
4	47.92	-0.16%	4	95.22	-0.81%
5	47.95	-0.10%	5	96.30	0.32%
6	48.48	0.89%	6	97.40	1.46%
<b>Average</b>	48.14		<b>Average</b>	95.61	
<b>d%</b>	0.29%		<b>d%</b>	-0.41%	
<b>SD</b>	0.23		<b>SD</b>	1.21	
<b>CV%</b>	0.48%		<b>CV%</b>	1.27%	

Възпроизводимостта в серия е оценена чрез CV%, който е по-малък от 2.1 % за всички изследвани нива на концентрация, а точността в серия – чрез процентно

отклонение на средната получена концентрация спрямо претеглената (d%), варираща от -0.41 до 1.65%.

Междусерийният анализ също потвърди метода като точен и възпроизводим. Резултатите обобщени в Таблица 16 са групирани за всяка серия от анализи проведени в рамките на три последователни дни и показват CV% по-малък от 2.1% и d% от -1.57 до 1.46%.

Таблица 16. Точност, достоверност и възпроизводимост във време (n=6)

<b>LLOQ = 0.48 mg/L</b>			<b>LQC = 12.00 mg/L</b>		
<b>Серия №</b>	<b>Концентрация, mg/L</b>	<b>d%</b>	<b>Серия №</b>	<b>Концентрация, mg/L</b>	<b>d%</b>
<b>1</b>	0.47	-1.43%	<b>1</b>	12.43	3.57%
<b>2</b>	0.49	1.82%	<b>2</b>	12.10	0.82%
<b>3</b>	0.48	0.47%	<b>3</b>	12.00	-0.01%
<b>Average</b>	0.48		<b>Average</b>	12.18	
<b>d%</b>	0.29%		<b>d%</b>	1.46%	
<b>SD</b>	0.01		<b>SD</b>	0.23	
<b>CV%</b>	2.08%		<b>CV%</b>	1.89%	
<hr/>					
<b>MQC = 48.00 mg/L</b>			<b>HQC = 96.00 mg/L</b>		
<b>Серия №</b>	<b>Концентрация, mg/L</b>	<b>d%</b>	<b>Серия №</b>	<b>Концентрация, mg/L</b>	<b>d%</b>
<b>1</b>	47.82	-0.38%	<b>1</b>	96.22	0.23%
<b>2</b>	48.14	0.30%	<b>2</b>	92.60	-3.55%
<b>3</b>	47.95	-0.10%	<b>3</b>	94.65	-1.40%
<b>Average</b>	47.97		<b>Average</b>	94.49	
<b>d%</b>	-0.06%		<b>d%</b>	-1.57%	
<b>SD</b>	0.16		<b>SD</b>	1.82	
<b>CV%</b>	0.33%		<b>CV%</b>	1.93%	

В заключение може да се потвърди, че точността и прецизността, изчислени за пробите LLOQ и QC, отговарят напълно на предварително зададените критерии за приемане.

#### **4.3.2.5 Граница на откриване и граница на количествено определяне (LOD/ LOQ)**

За определяне на LOD се използват два подхода – експериментален и изчислителен. Експериментално LOD се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 2 или 3:1, а изчислително по формулата:  $LOD = (3.3 \cdot \sigma) / S$ , където  $\sigma$  е стандартното отклонение на измерените стойности, а  $S$  е наклона на

калибрационната права. Аналогично LOQ също може да бъде определена експериментално и изчислително. Експериментално LOQ се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 10:1, а изчислително по формулата:  $LOQ = (10 \cdot \sigma) / S$ . Определените стойности за LOD и LOQ са съответно 0.05 и 0.48 mg/L, доказващи възможността на разработения метод за определяне на следи от лекарственото вещество в кръвна плазма.

#### 4.3.2.6 Тестове за пригодност на системата

Подбраните хроматографски условия осигуряват бързо и ефективно разделяне на DIF и IS-D, доказано чрез извършените тестове за пригодност на системата. За целта е направен шесткратен анализ на калибрационния разтвор с концентрация 48.00 mg/L избран за MQC проба и са определени параметрите: време на задържане ( $t_R$ ), капацитетен фактор ( $k$ ), селективност ( $\alpha$ ), брой теоретични тарелки ( $N$ ), степен на разделяне ( $R_S$ ) и пикова асиметрия (tailing factor,  $T$ ). Обобщените резултати получени след серията анализи са представени в Таблица 17. Определените параметри на хроматографската система, характеризиращи задържането и ефективността на разделяне, отговарят напълно на изискванията на Европейската фармакопея с получени стойности за  $k \geq 2.0$ ,  $\alpha \geq 1.3$ ,  $N \geq 2500$ ,  $R_S \geq 2.2$  и  $T \leq 1.5$ .

Таблица 17. Резултати от теста за пригодност на системата

Параметър	Критерий за приемане	DIF	IS-D
Време на задържане ( $t_R$ )	-	7.31	3.78
Капацитетен фактор ( $k$ )	Ph.Eur. NLT 2.0	4.75	2.03
Селективност ( $\alpha$ )	Ph.Eur. NLT 1.0	1.35	1.69
Брой теоретични тарелки ( $N$ )	Ph.Eur. NLT 2000	2725	2517
Степен на разделяне ( $R_S$ )	Ph.Eur. NLT 2.0	2.87	2.29
Пикова асиметрия (tailing factor, $T$ )	Ph.Eur. NMT 2.0	1.45	1.39

Ph. Eur.: Европейска фармакопея; NLT: не по-малко от; NMT: не повече от;

#### **4.4 Ограничения свързани с прилагането на метода при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза**

До момента DIF има издадено разрешение за употреба от FDA, за приложение на територията на Съединените Американски Щати като НСПВС, но все още тече процедура за одобряването му от ЕМА като лекарство „сирак” при транстиретинова амилоидоза.

Във връзка с положително становище на ЕМА, изготвено на 12.05.2022 г. от Комитета по лекарствата сираци (COMP) и изпратено към Европейската комисия на 20.05.2022 г., на 24.06.2022 г. е издадено разрешение за вписването на DIF в регистъра на лекарствата сираци под № EU/3/22/2640. [286]

В България, към настоящия момент, DIF не се използва като част от терапевтичната схема при лечение на TTR амилоидоза. Поради тази причина възниква временна невъзможност за прилагане на разработения надежден, бърз и ефективен метод за количествено определяне на лекарственото вещество в биологична среда (кръвна плазма) и адаптирането му в рутинната клинична практика за анализа на пациентски проби. Методът е разработен авансово и ще бъде приложен за количествен анализ и проследяване на плазмените концентрации при българските пациенти с амилоидоза, веднага след завършване на процеса по одобрението му за EU и възможността му за използване в клиничната практика. Несъмнено получените данни по време на терапевтичния лекарствен мониторинг, биха били полезни в контрола на терапията и развитието на усложнения.

## 5. Заключение

Транстиретиновата амилоидоза е рядко заболяване, чиято терапия е непрекъснато проучвана, изследвана и подобрявана. Целта на настоящото проучване е чрез използването на налични лабораторни и инструментални изследвания да се осъществи клиничен анализ на една от отделните форми на заболяването, причинена от специфична мутация в TTR гена. Патогенният генетичен вариант Glu89Gln е характерен предимно за Балканския регион и област Сицилия в Италия, а сравнително ниския брой на носителите води до ограничения във възможностите за анализ на характерните ѝ проявления и клинични показатели.

Прилаганата терапевтична схема при диагностициран първи стадий на заболяването включва използването на лекарственото вещество Tafamidis с фиксирана доза 20 mg/ дневно при клиничните случаи с проявления на полиневропатия и 61 mg/ дневно - при кардиомиопатия. За определяне на реалните плазмени нива на лекарственото вещество в българската кохорта пациенти носители на Glu89Gln мутацията е разработен течнохроматографски метод за количествено определяне. Разработеният метод е валидиран съгласно изискванията на Международната конференция по хармонизация по параметрите селективност, линейност, точност, прецизност, граница на откриване и граница на определяне, а получените резултати, отговарят напълно на изискванията на Европейската фармакопея. Намерените оптимални хроматографски условия за анализ на Tafamidis са подходящи и за количествено определяне на НСПВС – Diflunisal, прилагано извън разрешението му за употреба при транстиретинова кардиомиопатия.

Лекарственото мониториране позволява поддържане на лекарственото вещество в терапевтични граници, а съпоставянето на установените концентрационни нива и специфични клинични показатели може да се използва за предсказване на бъдещото развитие на клиничните прояви при отделните пациенти, прогресията на заболяването във времето и индивидуализацията на дозовия режим с потенциал да се забави още по чувствително прогресията.

## **6. Изводи**

- 6.1** Разработен и валидиран е високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Tafamidis в кръвна плазма, отговарящ на всички индустриални и клинични изисквания за терапевтичен лекарствен мониторинг.
- 6.2** Разработен е и е валидиран високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Diflunisal в кръвна плазма, отговарящ на всички индустриални и клинични изисквания за терапевтичен лекарствен мониторинг.
- 6.3** Изследваната в продължение на три години връзка между плазмената концентрация на Tafamidis и някои клинични характеристики на пациентите с доминантната Glu89Gln мутация показва статистически и клинично значимо въздействие на пола и възрастта, с потенциал за индивидуализиране на терапията.
- 6.4** Проследените за период от три години концентрации на Tafamidis при българските пациенти с мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu показваха аналогична тенденция за възрастово и полово обусловени въздействия, които не достигнаха статистическа значимост поради малкия брой наблюдения.

## **7. Приноси**

- 7.1** Разработен и валидиран е надежден и бърз метод за количествен анализ на Tafamidis в биологична среда – кръвна плазма, позволяващ адаптирането му за системно проследяване на голям брой пациенти.
- 7.2** Разработен и валидиран е надежден и бърз метод за количествен анализ на Diflunisal в биологична среда – кръвна плазма, позволяващ приложението веднага след разрешението за употреба като транстиретинов инхибитор.
- 7.3** В продължение на 3 години са проследени концентрационно български пациенти, диагностицирани с транстиретинова амилоидоза - група от 52 болни с генетично потвърдено носителство на мутацията Glu89Gln, както и помалобройна кохорта с други три минорни мутации, всички лекувани с Tafamidis, при които се доказаха възможностите на фармакокинетичния мониторинг като подход за оптимизиране на терапията.
- 7.4** За първи път се установи връзка между равновесните плазмени концентрации, пола и възрастта на пациентите, показваща потенциал за забавяне на болестната прогресия чрез индивидуализация на дозовия режим.
- 7.5** Въз основа на проведените наблюдения и установените връзки се формулира хипотеза за зависимостта между плазмените концентрации и хода на болестта с предложение те да се поддържат в прицелния диапазон от 5-6  $\mu\text{mol/L}$ .

## 8. Литература

1. Veenhoff LM, Heuberger EHML, Poolman B. Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(5):242–9.
2. Omenn GS. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. By Johann Schaller, Simon Gerber, Urs Kämpfer, Sofia Lejon, and Christian Trachsel. Chichester (United Kingdom) and Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons. index. 978-0-470-01674-9. 2008. . Vol. 84, *The Quarterly Review of Biology.* 2009. 426–427 p.
3. Park GY, Jamerlan A, Shim KH, An SSA. Diagnostic and treatment approaches involving transthyretin in amyloidogenic diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2982):1-17.
4. Buxbaum JN. Evaluation of Tafamidis as first-line therapeutic agent for transthyretin familial amyloidotic polyneuropathy. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* 2012;2:165-73.
5. Sekijima Y, Kelly J, Ikeda S. Pathogenesis of and Therapeutic Strategies to Ameliorate the Transthyretin Amyloidoses. *Curr Pharm Des.* 2008;14(30):3219–30.
6. Cascella R, Conti S, Mannini B, Li X, Buxbaum JN, Tiribilli B, et al. Transthyretin suppresses the toxicity of oligomers formed by misfolded proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet].* 2013;1832(12):2302–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.011>
7. Blake CCF, Geisow MJ, Oatley SJ, Rérat B, Rérat C. Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol.* 1978;121(3):339–56.
8. Labaudiniere R. Discovery and Development of Tafamidis for the Treatment of TTR Familial Amyloid. In: Pryde DC, Palmer MJ, editors. *Orphan drugs and rare diseases.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2014. p. 202-29.
9. Sparkes RS, Sasaki H, Mohandas T, Yoshioka K, Klisak I, Sakaki Y, et al. Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1. *Hum Genet.* 1987;75(2):151–4.
10. Wallace MR, Naylor SL, Kluve-Beckerman B, Long GL, McDonald L, Shows TB, et al. Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;129(3):753–8.
11. Sasaki H, Yoshioka N, Takagi Y, Sasaki Y. Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene.* 1985;37:191-7.
12. Irace G, Edelhoch H. Thyroxine-Induced Conformational Changes in Prealbumin. *Biochemistry.* 1978;17(26):5729–33.
13. Monaco HL, Rizzi M, Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science.* 1995;268:1039-41.
14. Smith SH. Using albumin and prealbumin to assess nutritional status. *Nursing (Lond).* 2017;47(4):65–6.
15. Robinson LZ, Reixach N. Quantification of quaternary structure stability in aggregation-prone proteins under physiological conditions: The transthyretin case. *Biochemistry.* 2014;53(41):6496–510.

16. Foss TR, Wiseman RL, Kelly JW. The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates. *Biochemistry*. 2005;44(47):15525–33.
17. Kelly JW, Colon W, Lai Z, Lashuel HA, Mcculloch J, Mccutchen SL, et al. Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid. *Adv Protein Chem*. 1997;50:161–81.
18. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA, Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid*. 2003;10(3):160–84.
19. amyloidosismutations.com [Internet] Mutations in hereditary amyloidosis, Online registry for mutations in hereditary amyloidosis including nomenclature recommendations, EU [cited 2022 June 21] Available from: <http://amyloidosismutations.com/>
20. Schneider F, Hammarström P, Kelly JW. Transthyretin slowly exchanges subunits under physiological conditions: A convenient chromatographic method to study subunit exchange in oligomeric proteins. *Protein Sci*. 2001;10(8):1606–13.
21. Wiseman RL, Green NS, Kelly JW. Kinetic stabilization of an oligomeric protein under physiological conditions demonstrated by a lack of subunit exchange: Implications for transthyretin amyloidosis. *Biochemistry*. 2005;44(25):9265–74.
22. Foss TR, Kelker MS, Wiseman RL, Wilson IA, Kelly JW. Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: Implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis. *J Mol Biol*. 2005;347(4):841–54.
23. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda SI, et al. A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*. 2007;14(3):179–83.
24. Husby G. Classification of amyloidosis. *Bailliere's Clinical Rheumatology*. 1994;8(3):503-11.
25. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda SI, Merlini G, Saraiva MJM, et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*. 2012;19(4):167–70.
26. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda SI, Merlini G, Saraiva MJM, et al. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. 2014;21(4):221-4.
27. Cohen AS, Calkins E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*. 1959;183:1202-3.
28. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda SI, Merlini G, Saraiva MJM, et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* [Internet]. 2016;23(4):209–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986>
29. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* [Internet]. 2018;25(4):215–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1549825>
30. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, et al. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA)

- nomenclature committee. Amyloid [Internet]. 2020;27(4):217–22. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>
31. Girnus S. Overview of systematic and localized amyloidosis. *Rev Health Care*. 2013;4(4):231-47.
  32. Benson MD. Amyloidosis and Other Protein Deposition Diseases [Internet]. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier Inc.; 2014. 1–3 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05551-3>
  33. Real de Asua D, Costa R, Galvan JM, Filigheddu MT, Trujillo D, Cadinanos J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clin Epidemiol*. 2014;6:369-77.
  34. Сарафов С, Господинова М, Гергелчева В, Матева Л, Киров А, Тодоров Т, Тодорова А, Търнев И. Транстиретинова фамилна амилоидна полиневропатия (TTR FAP) – консенсус за диагностика, проследяване и лечение в България. *Медикарт*. 2013;5:1-21.
  35. Milanov I, Tournev I. National Consensus on the Diagnosis, Treatment, Monitoring and Prevention of Hereditary Transthyretin Amyloidosis, 2019. Sofia, Bulgarian Society of Neurology 2019.
  36. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*. 1952;75(3):408–27.
  37. Parman Y, Adams D, Obici L, Galan L, Guergueltcheva V, Suhr OB et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr. Opin. Neurol*. 2016;29: S3–11.
  38. Almeida M do R, Ferlini A, Forabosco A, Gawinowicz M, Costa PP, Salvi F, et al. Two transthyretin variants (TTR Ala-49 and TTR Gln-89) in two sicilian kindreds with hereditary amyloidosis. *Hum Mutat*. 1992;1(3):211–5.
  39. Dwulet FE, Benson MD. Polymorphism of human plasma thyroxine binding prealbumin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;114(2):657–62.
  40. Сарафов СИ. Клинико-генетични и епидемиологични проучвания при транстиретинова фамилна амилоидна полиневропатия и при наследствена и фамилна амиотрофична латерална склероза в България. [Дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор на науките”] Медицински университет София; 2020 [цитиран на 2022 Август 9].
  41. Schmidt HH, Waddington-Cruz M, Botteman MF, Carter JA, Chopra AS, Hopps M, et al. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle and Nerve*. 2018;57(5):829–37.
  42. Inês M, Coelho T, Conceição I, Duarte-Ramos F, De Carvalho M, Costa J. Epidemiology of Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy in Portugal: A Nationwide Study. *Neuroepidemiology*. 2018;51:177–82.
  43. Cruz MW, Pinto MV, Pinto LF, Gervais R, Dias M, Perez C, et al. Baseline disease characteristics in brazilian patients enrolled in transthyretin amyloidosis outcome survey (THAOS). *Arq Neuropsiquiatr*. 2019;77(2):96–100.
  44. Pinto MV, Pinto LF, Dias M, Rosa RS, Mundayat R, Pedrosa RC, et al. Late-onset hereditary ATTR V30M amyloidosis with polyneuropathy: Characterization of Brazilian subjects from the THAOS registry. *J Neurol Sci* [Internet]. 2019;403(February):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.030>

45. Buxbaum J, Anan I, Suhr O. Serum transthyretin levels in Swedish TTR V30M carriers. *Amyloid*. 2010;17(2):83–5.
46. Ikeda SI, Nakazato M, Ando Y, Sobue G. Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: Clinical and genetic heterogeneity. *Neurology*. 2002;58(7):1001–7.
47. Koike H, Sobue G. Late-onset familial amyloid polyneuropathy in Japan. *Amyloid*. 2012;19(S1):55–7.
48. Mariani L, Lozeron P, Mincheva Z, Signate A, Ducot B, Algalarrondo V, et al. Genotype – Phenotype Correlation and Course of Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathies in France. *Ann Neurol*. 2015;78:901-16.
49. Plante-Bordeneuve V, Lalu T, Misrahi M, Reilly MM, Adams D, Lacroix C, et al. Genotypic-phenotypic variations in a series of 65 patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*. 1998;51:708-14.
50. Adams D, Lozeron P, Theaudin M, Mincheva Z, Adam C, Signate A, et al. Amyloid Regional difference and similarity of familial amyloidosis with polyneuropathy in France. *Amyloid*. 2012;19(S1):61-4.
51. Dardiotis E, Koutsou P, Papanicolaou EZ, Vonta I, Kladi A, Vassilopoulos D. Epidemiological , clinical and genetic study of familial amyloidotic polyneuropathy in Cyprus. *Amyloid*. 2009;16(1):32–7.
52. Munar-Ques M, Saraiva MJM, Viader-Farre C, Zabay-Becerril JMZ, Mulet-Ferrer J. Genetic epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in the Balearic Islands ( Spain ). *Amyloid*. 2005;12(1):54–61.
53. Durmus H, Matur Z, Atmaca MM, Poda M, Cakar A, Ulas UH, et al. Genotypic and phenotypic presentation of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy ( TTR-FAP ) in Turkey. *Neuromuscul Dis*. 2016;26:441–6.
54. Ungerer MN, Hund E, Purruicker JC, Huber L, Hein S, Kristen A V, et al. Real-world outcomes in non-endemic hereditary transthyretin amyloidosis with polyneuropathy : a 20-year German single-referral centre experience. *Amyloid* [Internet]. 2021;28(2):91–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1855134>
55. Maurer MS, Hanna M, Grogan M, Dispenzieri A, Witteles R, Drachman B, et al. Genotype and phenotype of transthyretin cardiac amyloidosis in the United States: the transthyretin amyloid outcome survey (THAOS). *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(2):161–72.
56. Mazzeo A, Russo M, Di G, Minutoli F, Stancanelli C. Transthyretin-Related Familial Amyloid Polyneuropathy ( TTR-FAP ): A Single-Center Experience in Sicily , an Italian Endemic Area. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2:39–48.
57. Cappellari M, Cavallaro T, Ferrarini M, Cabrini I, Taioli F, Ferrari S, et al. Variable presentations of TTR-related familial amyloid polyneuropathy in seventeen patients. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;16:119–29.
58. Pozsonyi Z, Pesko G, Takacs H, Csuka D, Nagy V, Szilagyí Á, et al. Variant Transthyretin Amyloidosis ( ATTRv ) in Hungary : First Data on Epidemiology and Clinical Features. *Genes*. 2021;12(1152):1–12.

59. Sarafov S, Gospodinova M, Velina VG, Kirov A, Teodora C. Epidemiology of Familial Amyloid Polyneuropathy in Bulgaria. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10(S1):O2. Presented at: First European Congress on Hereditary ATTR amyloidosis; November 2-3, 2015; Paris, France. 2015;10(Suppl 1):2015.
60. Tournev I, Parman Y, Erdem-Ozdamar S, Lipowska M, Zidar J, Sadeh M, et al. TTR FAP in Central and Eastern Europe. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12(S1):O4. Presented at: First European Meeting for ATTR Amyloidosis for Doctors and Patients; November 2-3, 2017; Paris, France. 2017;12(Suppl 1):2017.
61. Bonaiti B, Olsson M, Hellman U, Shur O, Bonaiti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V. TTR familial amyloid polyneuropathy : does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance ? *Eur J Hum.* 2010;(18):948–52.
62. Plante-Bordeneuve V, Carayol J, Ferreira A, Adams D, Clerget-Darpoux FC, Misrahi M, et al. Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies : carrier risks among French and Portuguese families. *J Met Genet.* 2003;40(120):1–7.
63. Saporta MAC, Zaros C, Cruz MW, Andre C, Misrahi M, Bonaiti-Pellie C, et al. Penetrance estimation of TTR familial amyloid polyneuropathy ( type I ) in Brazilian families. *Eur J Neurol.* 2009;16:337–41.
64. Hellman U, Alarcon F, Lundgren H, Suhr OB, Bonaiti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy , ATTR Val30Met , in the Swedish population. *Amyloid.* 2008;15(3):181–6.
65. Kato-Motozaki Y, Ono K, Shima K, Morinaga A, Machiya T, Nozaki I, et al. Epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Japan : Identification of a novel endemic focus. *J Neurol Sci.* 2008;270:133–40.
66. Cisneros-Barroso E, González-Moreno J, Rodríguez A, Ripoll-vera T, Álvarez J, Usón M, et al. Anticipation on age at onset in kindreds with hereditary ATTRV30M amyloidosis from the Majorcan cluster. *Amyloid* [Internet]. 2020:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1789580>
67. Schmidt HHJ, Barroso F, Gonzalez-Duarte A, Conceicao I, Obici L, Keohane D, et al. Management of asymptomatic gene carriers of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2016;54:353-60.
68. Lemos C, Coelho T, Alves-ferreira M, Martins-da-silva A, Sequeiros J, Mendonça D, et al. Overcoming artefact : anticipation in 284 Portuguese kindreds with familial amyloid polyneuropathy (FAP). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014;85:326–30.
69. Pelo E, Prato L Da, Ciaccheri M, Castelli G, Pizzi A, Torricelli F, et al. Familial amyloid polyneuropathy with genetic anticipation associated to a gly47glu transthyretin variant in an Italian kindred. *Amyloid.* 2002;9(1):35-41.
70. Koike H, Misu K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Ando E, et al. Type I (Transthyretin Met30) Familial Amyloid Polyneuropathy in Japan. *Arch Neurol.* 2002;59:1771-6.

71. Conceicao I, De Carvalho M. Clinical Variability In Type I Familial Amyloid Polyneuropathy (Val30Met): Comparison Between Late- And Early-Onset Cases In Portugal. *Muscle Nerve* 2007;35:116–8.
72. Miyake Z, Nakamagoe K, Ezawa N, Yoshinaga T, Hashimoto R, Sato T, et al. Late-onset Transthyretin ( TTR ) -familial Amyloid Polyneuropathy ( FAP ) with a Long Disease Duration from Non-endemic Areas in Japan. *Intern Med Advance Publication*. 2018; DOI: 10.2169/internalmedicine.1457-18.
73. Koike H, Tanaka F, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, et al. Natural history of transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy : analysis of late-onset cases from non-endemic areas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:152-8.
74. Koike H, Misu K, Sugiura M, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, et al. Pathology of early- vs late-onset TTR Met30 familial amyloid polyneuropathy. *Neurol*. 2004;63:129-38.
75. Koike H, Ando Y, Ueda M, Kawagashira Y, Iijima M, Fujitake J, et al. Distinct characteristics of amyloid deposits in early- and late-onset transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol Sci* [Internet]. 2009;287(1–2):178–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2009.07.028>
76. Koike H, Kawagashira Y, Iijima M, Yamamoto M, Hattori N, Tanaka F, et al. Electrophysiological features of late-onset transthyretin Met30 familial amyloid polyneuropathy unrelated to endemic foci. *J Neurol*. 2008;255:1526–33.
77. Gentile L, Tournev I, Amass L, Chapman D, Mazzeo A. Phenotypic Differences of Glu89Gln Genotype in ATTR Amyloidosis From Endemic Loci: Update From THAOS. *Cardiol Ther*. 2021;10(2):481–90.
78. Gospodinova M, Sarafov S, Chamova T, Kirov A, Todorov T, Nakov R, et al. Cardiac involvement, morbidity and mortality in hereditary transthyretin amyloidosis because of p.Glu89Gln mutation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2020;21:688–695.
79. Gagliardi C, Gospodinova M, Longhi S, Milandri A, Cinelli M, Tournev I, et al. Glu89Gln transthyretin-related amyloidosis in Italy and Bulgaria: does geographic area influence phenotype beyond the shared mutation? *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10(S1):P23. Paper presented at: First European Congress on Hereditary ATTR amyloidosis; November 2-3, 2015; Paris, France.
80. Gospodinova M, Sarafov S, Guerguelcheva V, Kirov A, Chamova T, Todorova A, et al. Cardiomyopathy and peripheral polyneuropathy severity in patients with Glu89Gln mutation at the time of diagnosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10(S1):P59. Paper presented at: First European Congress on Hereditary ATTR amyloidosis; November 2-3, 2015; Paris, France.
81. Gospodinova M, Sarafov S, Guerguelcheva V, et al. Cardiac involvement and clinical follow up of patients with hereditary transthyretin related amyloidosis associated with Glu89Gln mutation. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10 (S1):P54. Paper presented at: First European Congress on Hereditary ATTR amyloidosis; November 2-3, 2015; Paris, France.
82. Yordanova I, Pavlova Z, Kirov A, Todorov T, Alexiev A, Sarafov S, et al. Monoallelic expression of the TTR gene as a contributor to the age at onset and penetrance of TTR-related amyloidosis. *Gene* [Internet]. 2019;705:16–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.030>

83. Nakov R, Sarafov S, Nakov V, Gospodinova M, Todorov T, Kirov A, et al. Gastrointestinal manifestations in hereditary transthyretin amyloidosis associated with Glu89Gln mutation. *J Gastrointest Liver Dis.* 2019;28(4):421–6.
84. Kirov A, Sarafov S, Pavlova Z, Todorov T, Gospodinova M, Tournev I, et al. Founder effect of the Glu89Gln TTR mutation in the Bulgarian population. *Amyloid.* 2019:1-5. Available from:<https://doi.org/10.1080/13506129.2019.1634539>
85. Coelho T, Maurer MS, Shur OB. THAOS – The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey : initial report on clinical manifestations in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloidosis. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(1):63–76.
86. Rapezzi C, Quarta CC, Obici L, Perfetto F, Longhi S, Salvi F, et al. Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: An Italian perspective. *Eur Heart J.* 2013;34(7):520-8.
87. Ueda M, Ando U. Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Transl Neurodegener.* 2014;3(19):1-10.
88. Waddington-Cruz M, Schmidt H, Botteman MF, Carter JA, Stewart M, Hopps M, et al. Epidemiological and clinical characteristics of symptomatic hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy : a global case series. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(34):1–7.
89. Benson MD, Kincaid JC. The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle Nerve.* 2007;36:411–23.
90. Hou X, Aguilar M, Small DH. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. *FEBS Journal.* 2007;274:1637–50.
91. Adams D, Cauquil C, Labeyrie C. Familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol.* 2017;30:1-9.
92. Planté-Bordeneuve V, Said G. Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol [Internet].* 2011;10(12):1086–97. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70246-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70246-0)
93. Maurer M, Hanna M, Grogan M, Dispenzieri A, Witteles R, Drachman B, et al. Genotype and Phenotype of Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(2):161-72.
94. Damy T, Kristen A V, Suhr OB, Maurer MS, Yu C, Ong M, et al. Transthyretin cardiac amyloidosis in continental Western Europe : an insight through the Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey ( THAOS ). *Eur Heart J.* 2019;1–10.
95. Rapezzi C, Quarta CC, Riva L, Longhi S, Gallelli I, Lorenzini M, et al. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:398–408.
96. Adams D, Théaudin M, Cauquil C, Algalarrondo V, Slama M. FAP Neuropathy and Emerging Treatments. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14(435):1-12.
97. Falk RH. Diagnosis and Management of the Cardiac Amyloidoses. *Circulation.* 2005;112:2047–60.
98. Tojo K, Tsuchiya-Suzuki A, Sekijima Y, Morita H, Samita N, Ikeda S. Upper limb neuropathy such as carpal tunnel syndrome as an initial manifestation of ATTR Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid.* 2010;17(1):32-5.

99. Plante-Bordeneuve V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update. *J Neurol*. 2017;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8708-4>
100. Sekijima Y, Uchiyama S, Tojo K, Sano K, Shimizu Y, Imaeda T, et al. High prevalence of wild-type transthyretin deposition in patients with idiopathic carpal tunnel syndrome: a common cause of carpal tunnel syndrome in the elderly. *Hum Pathol* [Internet]. 2011;42(11):1785–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.004>
101. Hund E, Linke RP, Willig F, Grau A. neuropathic amyloidosis. Pathogenesis and treatment. *Neurology*. 2001;56:431–5.
102. Fernandes A, Coelho T, Rodrigues A, Felgueiras H, Oliveira P, Guimaraes A, et al. Clinicopathological correlations of sural nerve biopsies in TTR Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Brain Communications*. 2019:1–13.
103. Lefaucheur JP, Tin SNW, Kerschen P, Damy T, Plante-Bordeneuve V. Neurophysiological markers of small fibre neuropathy in TTR-FAP mutation carriers. *J Neurol*. 2013;260:1497–503.
104. Dyck PJB, González-duarte A, Obici L, Polydefkis M, Wiesman JF, Antonino I, et al. Development of measures of polyneuropathy impairment in hATTR amyloidosis: From NIS to mNIS + 7. *J Neurol Sci* [Internet]. 2019;405:116424. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116424>
105. Adams D, Coelho T, Obici L, Bettencourt BR, Gollob JA, Gandhi PJ, et al. Rapid progression of familial amyloidotic polyneuropathy. A multinational natural history study. *Neurology*. 2015;85:675–82.
106. Zouari HG, Tin SNW, Wahab A, Damy T, Lefaucheur JP. Assessment of autonomic innervation of the foot in familial amyloid polyneuropathy. *Eur J Neurol*. 2019;26:94–9.
107. Vilas-Boas MC, Rocha AP, Cardoso MN, Fernandes JM, Coelho T, Cunha PS. Clinical 3-D Gait Assessment of Patients With Polyneuropathy Associated With Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Front Neurol*. 2020;11(605282):1–9.
108. He S, Tian Z, Guan H, Li J, Fang Q, Zhang S. Clinical characteristics and prognosis of Chinese patients with hereditary transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(251):1–9.
109. Jacobson D, Tagoe C, Schwartzbard A, Shah A, Koziol J, Buxbaum J. Relation of Clinical, Echocardiographic and Electrocardiographic Features of Cardiac Amyloidosis to the Presence of the Transthyretin V122I Allele in Older African-American Men. *Am J Cardiol* [Internet]. 2011;108:440–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.03.069>
110. Kristen A V, Ehlermann P, Helmke B, Hund E, Haberkorn UWE, Linke RP, et al. Transthyretin valine-94-alanine, a novel variant associated with late-onset systemic amyloidosis with cardiac involvement. *Amyloid*. 2007;14(4):283–7.
111. Господинова М, Сарафов С, Гергелчева В, Търнев И, Денчев С. Сърдечно засягане при наследствена транстиретин-свързана амилоидоза. *Българска кардиология*. 2014;20(1):33–39.
112. Rapezzi C, Perugini E, Salvi F, Grigioni F, Riva L, Cooke RMT, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in transthyretin-related cardiac amyloidosis: Towards tailoring of therapeutic strategies? *Amyloid*. 2006;13(3):143–53.

113. Nakagawa M, Sekijima Y, Tojo K, Ikeda S. High prevalence of ATTR amyloidosis in endomyocardial biopsy-proven cardiac amyloidosis patients. *Amyloid*. 2013;20(2):138–40.
114. Garcia-Pavia P, Rapezzi C, Adler Y, Arad M, Basso C, Brucato A, et al. Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis : a position statement of the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2021;42:1554–68.
115. Papingiotis G, Basmpa L, Farmakis D. Cardiac amyloidosis: epidemiology, diagnosis and therapy. *E-J Cardiol Practice*. 2021;19(19).
116. Dungu J, Sattianayagam PT, Hawkins PN, Anderson LJ. Determining The Electrocardiographic Features Specific To Transthyretin Cardiac Amyloid. 2010;55(10). Paper presented at: Cardiac Function and Heart Failure Poster Presentations, 9 March, Georgia, USA, 2010.
117. Rapezzi C, Longhi S, Milandri A, Lorenzini M, Gagliardi C, Gallelli I, et al. Cardiac involvement in hereditary-transthyretin related amyloidosis. *Amyloid*. 2012;19(S1):16–21.
118. Bonderman D, Pözl G, Ablasser K, Agis H, Aschauer S, Christina G, et al. Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis : an interdisciplinary consensus statement. *Wien Klin Wochenschr*. 2020;132:742–61.
119. Господинова М, Кинова Е, Симова Я, Йотов Й, Гарчева М, Кирова Г, и екип. Диагностичен алгоритъм при транстиретинова амилоидоза с кардиомиопатия. *Българска Кардиология*. 2020;26(2):5-20.
120. Bokhari S, Shahzad R, Castano A, Maurer MS. Nuclear imaging modalities for cardiac amyloidosis. *J Nucl Cardiol*. 2014;21(1):175-84.
121. Kyriakou P, Mouselimis D, Tsarouchas A, Rigopoulos A, Bakogiannis C, Noutsias M, et al. Diagnosis of cardiac amyloidosis : a systematic review on the role of imaging and biomarkers. *BMC Cardiovasc Dis*. 2018;18(221):1–11.
122. Hendren NS, Roth LR, Grodin JL. Disease-Specific Biomarkers in Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Curr Heart Fail Rep*. 2020;1-7. <https://doi.org/10.1007/s11897-020-00457-z>
123. Palladini G, Campana C, Klersy C, Balduini A, Vadacca G, Perfetti V, et al. Serum N-Terminal Pro – Brain Natriuretic Peptide Is a Sensitive Marker of Myocardial Dysfunction in AL Amyloidosis. *Circulation*. 2003;107:2440–5.
124. Klaassen SHC, Tromp J, Nienhuis HLA, Meer P Van Der, Berg MP Van Den, Blokzijl H. Frequency of and Prognostic Significance of Cardiac Involvement at Presentation in Hereditary Transthyretin-Derived Amyloidosis and the Value of N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide. *Am J Cardiol* [Internet]. 2018;121(1):107–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.09.029>
125. Gillmore JD, Damy T, Fontana M, Hutchinson M, Lachmann HJ, Martinez-Naharro A, et al. A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur Heart J*. 2018;39:2799–806.
126. Goran M, Scott CG, Kyle RA, Zeldenrust SR, Gertz MA, Lin G, et al. Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(10):1014-20.
127. Arbustini E, Merlini G. Early Identification of Transthyretin-Related Hereditary Cardiac Amyloidosis. *JACC: Cardiovasc Imaging*. 2014;7(5):511–4.

128. Kristen A V, Perz JB, Schonland SO, Hegenbart U, Schnabel PA, Kristen JH, et al. Non-invasive predictors of survival in cardiac amyloidosis. *Eur J Heart Fail.* 2007;9:617–24.
129. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, Lacy MQ, Burritt MF, Therneau TM, et al. Prognostication of survival using cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* [Internet]. 2004;104(6):1881–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-01-0390>
130. Maurer MS, Kristen A, Rapezzi C, Suhr O, Kolluri S, Damy T. Cardiac Biomarkers in Patients with Transthyretin Amyloidosis as Documented in THAOS: The Transthyretin Amyloidosis Survey. 2013;61(10):E1244. Paper presented at: 62<sup>nd</sup> Annual Scientific Session and Expo. USA. 2013. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(13\)61244-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(13)61244-9)
131. Palladini G, Foli A, Milani P, Russo P, Albertini R, Lavatelli F, et al. Best use of cardiac biomarkers in patients with AL amyloidosis and renal failure. *Am J Hematol.* 2012;(January):1–7.
132. Manolis AS, Manolis AA, Manolis TA, Melita H. Cardiac amyloidosis: An underdiagnosed / underappreciated disease. *Eur J Intern Med.* 2019;67:1–13.
133. Rozenbaum MH, Large S, Bhambri R, Stewart M, Young R, Van Doornewaard A, et al. Estimating the health benefits of timely diagnosis and treatment of transthyretin amyloid cardiomyopathy. *J Comp Eff Res.* 2021;10(11):927–38.
134. Wixner J, Mundayat R, Karayal ON, Anan I, Karling P, Suhr OB. THAOS: Gastrointestinal manifestations of transthyretin amyloidosis - common complications of a rare disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9(61):1–9.
135. Naderi ASA, Farsian FN, Igarashi P. Gastrointestinal Amyloidosis Associated With Transthyretin Phe64Ser Mutation. *Am J Med Sci* [Internet]. 2007;334(3):219–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318141f8eb>
136. Wetwittayakhlang P, Sripongpan P, Jandee S. Primary Gastrointestinal Amyloidosis: An Unusual Cause of Acute Intestinal Pseudo-Obstruction. *Case Rep Gastroenterol.* 2019;13:462–7.
137. Petre S, Shah IA, Gilani N. Review article: gastrointestinal amyloidosis – clinical features, diagnosis and therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;(27):1006–16.
138. Dahiya DS, Kichloo A, Singh J, Albosta M, Wani F. Gastrointestinal amyloidosis: A focused review. *World J Gastrointest Endosc.* 2021;13(1):1–12.
139. Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal Manifestations of Amyloidosis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:776-87.
140. Rowe K, Pankow J, Nehme F, Salyers W. Gastrointestinal Amyloidosis: Review of the Literature. *Cureus.* 2017;9(5):1-6.
141. Nakov R, Sarafov S, Nakov V, Gospodinova M, Ianiro G, Todorov T, et al. Fecal calprotectin levels are elevated in transthyretin amyloidosis patients with gastrointestinal manifestations. *Medicine.* 2020;99(11):1-5.
142. Haagsma EB, Hawkins PN, Benson MD, Lachmann HJ, Bybee A, Hazenberg BPC. Familial amyloidotic polyneuropathy with severe renal involvement in association with transthyretin Gly47Glu in Dutch, British and American-Finnish families. *Amyloid.* 2004;11:44-9.

143. Beirao I, Lobato L, Costa PMP, Fonseca I, Mendes P, Silva M, et al. Kidney and anemia in familial amyloidosis type I. *Kidney Int.* 2004;66:2004–9.
144. Beirao JM, Malheiro J, Lemos C, Beirao I, Costa P, Torres P. Ophthalmological manifestations in hereditary transthyretin (ATTR V30M) carriers : a review of 513 cases. *Amyloid.* 2015;22(2):117–22.
145. Ferreira N. Ophthalmologic changes in transthyretin familial amyloid polyneuropathy (ATTR-FAP). 2015;10(S1):I9. Paper presented at: First European Congress on Hereditary ATTR amyloidosis; November 2-3, 2015; Paris, France.
146. Beirao NM, Matos E, Beirao I, Costa PP, Torres P. Recurrence of Vitreous Amyloidosis and Need of Surgical Reintervention in Portuguese Patients with Familial Amyloidosis ATTR V30M. *Retina.* 2011;31:1373–7.
147. Hara R, Kawaji T, Ando E, Ohya Y, Ando Y, Tanihara H. Impact of Liver Transplantation on Transthyretin-Related Ocular Amyloidosis in Japanese Patients. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(2):206–10.
148. Liu T, Zhang B, Jin X, Wang W, Lee J, Li J, et al. Ophthalmic manifestations in a Chinese family with familial amyloid polyneuropathy due to a TTR Gly83Arg mutation. *Eye.* 2014;28:26–33.
149. Takanashi T, Matsuda M, Yazaki M, Yamazaki H, Nawata M, Katagiri Y, et al. Synovial deposition of wild-type transthyretin-derived amyloid in knee joint osteoarthritis patients. *Amyloid.* 2013;20(3):151–5.
150. Sueyoshi T, Ueda M, Jono H, Irie H, Sei A, Ide J, et al. Wild-type transthyretin-derived amyloidosis in various ligaments and tendons. *Hum Pathol [Internet].* 2011;42(9):1259–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.11.017>
151. Pıhtılı A, Bingöl Z, Durmus H, Parman Y, Kiyani E. Vocal Cord Paralysis and Hypercapnic Respiratory Failure in a Patient with Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Intern Med.* 2016;55:1783–6.
152. Yuan Z, Guo L, Liu X, Xiao X, Jiao B, Wang J, et al. Familial amyloid polyneuropathy with chronic paroxysmal dry cough in Mainland China : A Chinese family with a proven heterozygous missense mutation c . 349G > T in the transthyretin gene. *J Clin Neurosci [Internet].* 2019;60:164–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.040>
153. Lanoue J, Wei N, Gorevic P, Phelps RG. Cutaneous Manifestations of Familial Transthyretin Amyloid Polyneuropathy. *Am J Dermatopathol.* 2016;0:1–5.
154. Lobato L, Beirao I, Silva M, Bravo F, Silvestre F, Guimaraes S, et al. Familial ATTR amyloidosis : microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy. *Neurol Dial Transplant.* 2003;18:532–8.
155. Gonzalez-Duarte A, Barroso F, Mundayat R, Shapiro B. Blood pressure and orthostatic hypotension as measures of autonomic dysfunction in patients from the transthyretin amyloidosis outcomes survey. *Auton Neurosci Basic Clin [Internet].* 2019;222:102590. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2019.102590>

156. Adams D, Suhr OB, Hund E, Obici L, Tournev I, Campistol JM, et al. First european consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol*. 2016;29:S14–26.
157. Adams D. Optimizing the management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy in Europe : early diagnosis and effective care. *Curr Opin Neurol*. 2016;29:S1-S2.
158. Sekijima Y, Ueda M, Koike H, Misawa S, Ishii T, Ando Y. Diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy in Japan : red-flag symptom clusters and treatment algorithm. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(6)1–17.
159. Adams D, Ando Y, Beirao JM, Coelho T, Gertz MA, Gillmore JD, et al. Expert consensus recommendations to improve diagnosis of ATTR amyloidosis with polyneuropathy. *J Neurol* [Internet]. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09688-0>
160. Salvi F, Pastorelli F, Plasmati R, Bartolomei I, Osso DD, Rapezzi C. Genotypic and phenotypic correlation in an Italian population of hereditary amyloidosis TTR-related (HA-TTR): clinical and neurophysiological aids to diagnosis and some reflections on misdiagnosis. *Amyloid*. 2012;19(S1):58–60.
161. Plante-bordeneuve V. Update in the diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol*. 2014;261:1227–33.
162. Koike H, Sobue G. Diagnosis of familial amyloid polyneuropathy: wide-ranged clinicopathological features. *Expert Opin Med Diagn*. 2010;4(4):323-31.
163. Gertz MA. Hereditary ATTR Amyloidosis: Burden of Illness and Diagnostic Challenges. *Am J Manag Care*. 2017;23(7):107–12.
164. Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ, Grogan M, Coelho T, Cruz M, et al. Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(21)2451-66.
165. Escolano-Lozano F, Barreiros AP, Birklein F, Geber C. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP): Parameters for early diagnosis. *Brain and Behavior*. 2018;8:1–9.
166. Conceição I, Damy T, Romero M, Galán L, Luigetti M, Sadeh M, et al. Early diagnosis of ATTR amyloidosis through targeted follow-up of identified carriers of TTR gene mutations carriers of TTR gene mutations. *Amyloid* [Internet]. 2019;26(1):3–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1556156>
167. Obici L, Kuks JB, Buades J, Adams D, Suhr OB, Coelho T, et al. Recommendations for presymptomatic genetic testing and management of individuals at risk for hereditary transthyretin amyloidosis. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(S1):S27-35.
168. Connors LH, Ericsson T, Skare J, Jones LA, Lewis WD, Skinner M. A simple screening test for variant transthyretins associated with familial transthyretin amyloidosis using isoelectric focusing. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1407:185-92.
169. Luigetti M, Bisogni G, Romano A, Paolantonio A Di, Barbato F, Primicerio G, et al. Sudoscan in the evaluation and follow-up of patients and carriers with TTR mutations : experience from an Italian Centre. *Amyloid* [Internet]. 2019;0:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1545640>

170. Minutoli F, Mazzeo A, Bella GD, Vita G, Baldari S. Is <sup>99m</sup>Tc-diphosphonate uptake the earliest sign of cardiac amyloidosis development in asymptomatic Glu89Gln transthyretin gene mutation carriers? *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2015;10(S1):P62. Available from: <http://www.ojrd.com/content/10/S1/P62>. Paper presented at: First European Congress on Hereditary ATTR amyloidosis; November 2-3, 2015; Paris, France.
171. Kerschen P, Plante-Bordeneuve V. Current and Future Treatment Approaches in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy. *Curr Treat Options Neurol*. 2016;18(53):1-13.
172. Çakar A, Durmus-Tekce H, Parman Y. Familial Amyloid Polyneuropathy. *Arch Neuropsychiatry*. 2019;56:150–6.
173. Adams D. Recent advances in the treatment of familial amyloid polyneuropathy. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(2):129–39.
174. Luigetti M, Romano A, Paolantonio AD, Bisogni G, Sabatelli M. Diagnosis and Treatment of Hereditary Transthyretin Amyloidosis (hATTR) Polyneuropathy: Current Perspectives on Improving Patient Care. *Ther Clin Risk Manag*. 2020;16:109–23.
175. Guo X, Liu Z, Zheng Y, Li Y, Li L, Liu H, et al. Review on the Structures and Activities of Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors. 2020;14:1057–81.
176. Hund E. Familial amyloidotic polyneuropathy: current and emerging treatment options for transthyretin-mediated amyloidosis. *App Clin Genet*. 2012;5:37–41.
177. Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon BG, Ikeda SI, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(31):1–18.
178. Obici L, Merlini G. An overview of drugs currently under investigation for the treatment of transthyretin-related hereditary amyloidosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23(9):1239–51.
179. Adams D, Samuel D, Goulon-goeau C, Nakazato M, Costa PMP, Ichai P, et al. The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Brain*. 2000;123:1495–504.
180. Kavousanaki M, Tzagournissakis M, Zaganas I, Stylianou KG, Patrianakos AP, Tsilimbaris MK, et al. Liver Transplantation for Familial Amyloid Polyneuropathy (Val30Met): Long-Term Follow-up Prospective Study in a Nontransplant Center. *Transplant Proc* [Internet]. 2019;51(2):429–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.01.071>
181. Liepnieks JJ, Benson MD. Progression of cardiac amyloid deposition in hereditary transthyretin amyloidosis patients after liver transplantation. *Amyloid*. 2007;14(4):277–82.
182. Okamoto S, Zhao Y, Lindqvist P, Backman C, Ericzon B, Wijayatunga P, et al. Development of cardiomyopathy after liver transplantation in Swedish hereditary transthyretin amyloidosis (ATTR) patients. *Amyloid*. 2011;18(4):200–5.
183. Nardo B, Beltempo P, Bertelli R, Montalti R, Vivarelli M, Cescon M, et al. Combined Heart and Liver Transplantation in Four Adults with Familial Amyloidosis: Experience of a Single Center. *Transplant Proc*. 2004;36:645–7.
184. Müller ML, Butler J, Heidecker B. Emerging therapies in transthyretin amyloidosis – a new wave of hope after years of stagnancy? *Eur J Heart Fail*. 2020;22(1):39–53.

185. Sekijima Y. Recent progress in the understanding and treatment of transthyretin amyloidosis. *J Clin Pharm Therapeut.* 2014;39:225–33.
186. Park JH, Cei LF, Shah KB. Disease-Modifying Pharmacological Therapies for Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *SN Compr Clin Med.* 2020;2:1607-13.
187. Kurosawa T, Igarashi S, Nishizawa M, Onodera O. Selective silencing of a mutant transthyretin allele by small interfering RNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337:1012–8.
188. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and Efficacy of RNAi Therapy for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013;369(9):819–29.
189. Gentile L, Russo M, Luigetti M, Bisogni G, Paolantonio AD, Romano A, et al. Patisiran in hATTR Amyloidosis: Six-Month Latency Period before Efficacy. *Brain Sci.* 2021;11(515):1-11.
190. Lin H, Merkel M, Hale C, Marantz JL. Experience of patisiran with transthyretin stabilizers in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag.* 2020;10(5):289–300.
191. Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET, Kelly JW. The Transthyretin Amyloidoses : From Delineating the Molecular Mechanism of Aggregation Linked to Pathology to a Regulatory-Agency-Approved Drug. *J Mol Biol* [Internet]. 2012;421(2–3):185–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.060>
192. Purkey HE, Dorrell MI, Kelly JW. Evaluating the binding selectivity of transthyretin amyloid fibril inhibitors in blood plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(10):5566-71.
193. Sinha A, Chang JC, Xu P, Gindinova K, Cho Y, Sun W, et al. Brain Permeable Tafamidis Amide Analogs for Stabilizing TTR and Reducing APP Cleavage. *ACS Med Chem Lett.* 2020; 1-7.
194. Bulawa CE, Connelly S, DeVit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(24):9629–34.
195. Burton A, Castaño A, Bruno M, Riley S, Schumacher J, Sultan MB, et al. Drug discovery and development in rare diseases: Taking a closer look at the tafamidis story. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:1225–43.
196. Gundapaneni BK, Sultan MB, Keohane DJ, Schwartz JH. Tafamidis delays neurological progression comparably across Val30Met and non-Val30Met genotypes in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Eur J Neurol.* 2018;25(3):464–8.
197. Ines M, Costa J. Survival in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy : A Review. *J Neurol Neuromed.* 2019;4(1):22–5.
198. Cruz MW, Amass L, Keohane D, Schwartz J, Li H, Gundapaneni B. Early intervention with tafamidis provides long-term (5.5-year) delay of neurologic progression in transthyretin hereditary amyloid polyneuropathy. *Amyloid.* 2016;23(3):178–83.
199. Coelho T, Maia LF, Da Silva AM, Cruz MW, Plante-Bordeneuve V, Lozeron P, et al. Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology.* 2012;79:785-92.
200. Coelho T, Maia LF, Da Silva AM, Cruz MW, Plante-Bordeneuve V, Suhr OB, et al. Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol.* 2013;260:2802–14.

201. Lozeron P, Théaudin M, Mincheva Z, Ducot B, Lacroix C, Adams D. Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Eur J Neurol.* 2013;20(12):1539–45.
202. Merlini G, Planté-Bordeneuve V, Judge DP, Schmidt H, Obici L, Perlini S, et al. Effects of Tafamidis on Transthyretin Stabilization and Clinical Outcomes in Patients with Non-Val30Met Transthyretin Amyloidosis. *J of Cardiovasc Trans Res.* 2013;6:1011–20.
203. Barroso FA, Judge DP, Ebede B, Li H, Stewart M, Amass L, et al. Long-term safety and efficacy of tafamidis for the treatment of hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy : results up to 6 years. *Amyloid.* 2017;24(3):194-204.
204. Cortese A, Vita G, Luigetti M, Russo M, Bisogni G, Sabatelli M, et al. Monitoring effectiveness and safety of Tafamidis in transthyretin amyloidosis in Italy: a longitudinal multicenter study in a non-endemic area. *J Neurol.* 2016;263(5):916–24.
205. Planté-Bordeneuve V, Gorram F, Salhi H, Nordine T, Ayache SS, Corvoisier PL, et al. Long-term treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy with tafamidis : a clinical and neurophysiological study. *J Neurol.* 2016; 1-9. DOI 10.1007/s00415-016-8337-3
206. Ishii T, Hirano Y, Matsumoto N, Takata A, Sekijima Y, Ueda M, et al. Characteristics of Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis and an Evaluation of the Safety of Tafamidis Meglumine in Japan : An Interim Analysis of an All-case Postmarketing Surveillance. *Clin Ther [Internet].* 2020;42(9):1728-1737.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.001>
207. Huber P, Flynn A, Sultan MB, Li H, Rill D, Ebede B, et al. A comprehensive safety profile of tafamidis in patients with transthyretin amyloid polyneuropathy. *Amyloid [Internet].* 2019;0:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2019.1643714>
208. Shur OB, Conceicao IM, Karayal ON, Mande FS, Huertas PE, Ericzon BG. Post Hoc Analysis of Nutritional Status in Patients with Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy : Impact of Tafamidis. *Neurol Ther.* 2014;3:101–12.
209. Amass L, Li H, Gundapaneni BK, Schwartz JH, Keohane DJ. Influence of baseline neurologic severity on disease progression and the associated disease-modifying effects of tafamidis in patients with transthyretin amyloid polyneuropathy. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(225):1–7.
210. Merlini G, Coelho T, Cruz MW, Li H, Stewart M, Ebede B. Evaluation of Mortality During Long-Term Treatment with Tafamidis for Transthyretin Amyloidosis with Polyneuropathy : Clinical Trial Results up to 8.5 Years. *Neurol Ther.* 2020;1-11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00180-w>.
211. Keohane D, Schwartz J, Gundapaneni B, Stewart M, Amass L. Tafamidis delays disease progression in patients with early stage transthyretin familial amyloid polyneuropathy : additional supportive analyses from the pivotal trial. *Amyloid.* 2017;24(1):30-6.
212. Russo M, Gentile L, Stefano V Di, Bella G Di, Minutoli F, Toscano A, et al. Use of Drugs for ATTRv Amyloidosis in the Real World : How Therapy Is Changing Survival in a Non-Endemic Area. *Brain Sci.* 2021;11(545):1-11.

213. Maurer MS, Grogan DR, Judge DP, Mundayat R, Packman J, Lombardo I, et al. Tafamidis in Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. Effects on Transthyretin Stabilization and Clinical Outcomes. *Circ. Heart Fail.* 2015;8:519–26.
214. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, Elliott PM, Merlini G, Cruz MW, et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2018;379:1007-16.
215. Damy T, Judge DP, Kristen A V, Berthet K, Li H, Aarts J. Cardiac Findings and Events Observed in an Open-Label Clinical Trial of Tafamidis in Patients with non-Val30Met and non-Val122Ile Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *J of Cardiovasc Trans Res.* 2015;8:117–27.
216. Rapezzi C, Elliott P, Damy T, Nativi-Nicolau J, Berk JL, Velazquez EJ, et al. Efficacy of Tafamidis in Patients With Hereditary and Wild-Type Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy: Further Analyses From ATTR-ACT. *JACC Hear Fail.* 2021;9(2):115–23.
217. Sultan MB, Gundapaneni B, Schumacher J, Schwartz JH. Treatment With Tafamidis Slows Disease Progression in Early-Stage Transthyretin Cardiomyopathy. *Clin Med Insights: Cardiol.* 2017;11:1–4.
218. Damy T, Garcia-Pavia P, Hanna M, Judge DP, Merlini G, Gundapaneni B, et al. Efficacy and safety of tafamidis doses in the Tafamidis in Transthyretin Cardiomyopathy Clinical Trial (ATTR-ACT) and long-term extension study. *Eur J Heart Fail.* 2020;1–9. DOI:10.1002/ejhf.2027
219. Hanna M, Damy T, Grogan M, Stewart M, Gundapaneni B, Patterson TA, et al. Impact of Tafamidis on Health-Related Quality of Life in Patients With Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy ( from the Tafamidis in Transthyretin Cardiomyopathy Clinical Trial ). *Am J Cardiol [Internet].* 2021;141(216):98–105. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.10.066>
220. Li B, Alvir J, Stewart M. Extrapolation of Survival Benefits in Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy Receiving Tafamidis: Analysis of the Tafamidis in Transthyretin Cardiomyopathy Clinical Trial. *Cardiol Ther [Internet].* 2020;9(2):535–40. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40119-020-00179-2>
221. Rozenbaum MH, Garcia A, Grima D, Tran D, Bhambri R, Stewart M, et al. Health impact of tafamidis in transthyretin amyloid cardiomyopathy patients: an analysis from the Tafamidis in Transthyretin Cardiomyopathy Clinical Trial ( ATTR-ACT ) and the open-label long-term extension studies. *Eur Heart J.* 2021;1–10. DOI:10.1093/ehjqcco/qcab031
222. Nakamura M, Imamura T, Hori M, Ushijima R, Joho S, Kinugawa K. Initial Experience With Tafamidis Treatment for Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Circ Rep.* 2020;2:420–4.
223. Vong C, Boucher M, Riley S, Harnisch LO. Modeling of Survival and Frequency of Cardiovascular - Related Hospitalization in Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy Treated with Tafamidis. *Am J Cardiovasc Drugs [Internet].* 2021;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s40256-021-00464-y>
224. Klamerus KJ, Watsky E, Moller R, Wang R, Riley S. The effect of tafamidis on the QT c interval in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;79(6):918-25.
225. McKeage K, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Tafamidis in transthyretin amyloidosis: a guide to its use in delaying peripheral neurological impairment in patients with stage 1 polyneuropathy. *Drugs Ther Perspect.* 2017;33(2):47–53.

226. Coelho T, Merlini G, Bulawa CE, Fleming JA, Judge DP, Kelly JW, et al. Mechanism of Action and Clinical Application of Tafamidis in Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol Ther.* 2016;5(1):1–25.
227. Snetkov P, Morozkina S, Olekhnovich R, Uspenskaya M. Diflunisal Targeted Delivery Systems: A Review. *Materials.* 2021;14,6687:1-22.
228. Berk JL, Suhr OB, Obici L, Sekijima Y, Zeldenrust SR, Yamashita T, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;310(24):2658–67.
229. Sekijima Y, Tojo K, Morita H, Koyama J, Ikeda SI. Safety and efficacy of long-term diflunisal administration in hereditary transthyretin (ATTR) amyloidosis. *Amyloid.* 2015;22(2):79–83.
230. Berk JL, Dyck PJ, Obici L, Zeldenrust SR, Sekijima Y, Yamashita T et al. The diflunisal trial: update on study drug tolerance and disease progression. *Amyloid.* 2011;18(sup1):196–7.
231. Takahashi R, Ono K, Shibata S, Nakamura K, Komatsu J, Ikeda Y et al. Efficacy of Diflunisal on Autonomic Dysfunction of Late-onset Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR Val30Met) in a Japanese Endemic Area. *J Neurol Sci.* 2014;345(1–2):231–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.07.017>
232. Wixner J, Westermark P, Ihse E, Pilebro B, Lundgren HE, Anan I. The Swedish Open-label Diflunisal Trial (DFNS01) on Hereditary Transthyretin Amyloidosis and the Impact of Amyloid Fibril Composition. *Amyloid.* 2019;26(sup1):39–40. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2019.1593133>
233. Rosenblum H, Castano A, Alvarez J, Goldsmith J, Helmke S, Maurer MS. TTR (Transthyretin) Stabilizers Are Associated with Improved Survival in Patients with TTR Cardiac Amyloidosis. *Circ Hear Fail.* 2018;11(4):1–9.
234. Castaño A, Helmke S, Alvarez J, Delisle S, Maurer MS. Diflunisal for ATTR Cardiac Amyloidosis. *Congest Hear Fail.* 2012;18(6):315–9.
235. Lohrmann G, Pipilas A, Mussinelli R, Gopal DM, Berk JL, Connors LH et al. Stabilization of Cardiac Function With Diflunisal in Transthyretin (ATTR) Cardiac Amyloidosis. *J Card Fail.* 2020;26(9):753-759.
236. Ikram A, Donnelly JP, Sperry BW, Samaras C, Valent J, Hanna M. Diflunisal Tolerability in Transthyretin Cardiac Amyloidosis: a Single Center’s Experience. *Amyloid.* 2018;25(3):197–202.
237. Quarta CC, Ozer S, Whelan CJ, Fontana M, Rowczenio DM, Gilbertson JA, et al. Diflunisal Therapy for Cardiac ATTR Amyloidosis: a longitudinal, prospective, single centre study. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10(Suppl 1):1–2.
238. Koyama J, Minamisawa M, Sekijima Y, Ikeda Shu-ichi, Kozuka A, Ebisawa S, et al. Left Ventricular Deformation and Torsion Assessed by Speckle-tracking Echocardiography in Patients with Mutated Transthyretin-associated Cardiac Amyloidosis and the Effect of Diflunisal on myocardial Function. *IJC Hear Vasc.* 2015;9:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.07.010>
239. Cristóbal Gutiérrez H, Pelayo-Negro AL, Gómez Gómez D, Martín Vega MÁ, Valero Domínguez M. Overview of Treatments Used in Transthyretin-related Hereditary Amyloidosis: A Systematic Review. *Eur J Hosp Pharm.* 2020;27:194–201.

240. Gertz MA, Mauermann ML, Grogan M, Coelho T. Advances in the Treatment of Hereditary Transthyretin Amyloidosis: A Review. *Brain Behav.* 2019;9(9):1–12.
241. Miller SR, Sekijima Y, Kelly JW. Native State Stabilization by NSAIDs Inhibits Transthyretin Amyloidogenesis from the Most Common Familial Disease Variants. *Lab Invest.* 2004;84(5):545–52.
242. Tojo K, Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda Shu-ichi. Diflunisal Stabilizes Familial Amyloid Polyneuropathy-associated Transthyretin Variant Tetramers in Serum Against Dissociation Required for Amyloidogenesis. *Neurosci Res.* 2006;56(4):441–9.
243. Tempero KF, Cirillo VJ, Steelman SL. Diflunisal: a Review of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties, Drug Interactions, and Special Tolerability Studies in Humans. *Br J Clin Pharmacol.* 1977;4(1 S):31S-36S.
244. Almeida MR, Macedo B, Cardoso I, Alves I, Valencia G, Arsequell G, et al. Selective Binding to Transthyretin and Tetramer Stabilization in Serum from Patients with Familial Amyloidotic Polyneuropathy by an Iodinated Diflunisal Derivative. *Biochem J.* 2004;381(2):351–6.
245. Greene MJ, Klimtchuk ES, Seldin DC, Berk JL, Connors LH. Cooperative Stabilization of Transthyretin by Clusterin and Diflunisal. *Biochemistry.* 2015;54(2):268–78.
246. Torres-Arancivia C, Connors LH. Effect of Diflunisal on Clusterin Levels in ATTRwt Amyloidosis. *Amyloid.* 2019;26(sup1):49–50. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2019.1582515>
247. Koike H, Katsuno M. Transthyretin Amyloidosis: Update on the Clinical Spectrum, Pathogenesis, and Disease-Modifying Therapies. *Neurol Ther [Internet].* 2020;9(2):317–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00210-7>
248. Rappley I, Monteiro C, Novais M, Baranczak A, Solis G, Wiseman RL, et al. Quantification of Transthyretin Kinetic Stability in Human Plasma Using Subunit Exchange. *Biochemistry.* 2014;53:1993-2006.
249. Monteiro C, Mesgazardeh JS, Anselmo J, Fernandes J, Novais M, Rodrigues C, et al. Predictive model of response to tafamidis in hereditary ATTR polyneuropathy. *JCI Insight.* 2019;4(12):1-17.
250. Nelson LT, Paxman RJ, Xu J, Webb B, Powers ET, Kelly W, et al. Blinded potency comparison of transthyretin kinetic stabilisers by subunit exchange in human plasma. *Amyloid [Internet].* 2020;0:1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1808783>
251. Lockwood PA, Le VH, O’Gorman MT, Patterson TA, Sultan MB, Tankisheva E, et al. The Bioequivalence of Tafamidis 61-mg Free Acid Capsules and Tafamidis Meglumine 4 × 20-mg Capsules in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2020;9(7):849–54.
252. Shintani Y, Okada A, Morita Y, Hamatani Y, Amano M, Yasuda S, et al. Monitoring treatment response to tafamidis by serial native T1 and extracellular volume in transthyretin amyloid cardiomyopathy. *ESC Heart Fail.* 2018;10–4. DOI: 10.1002/ehf2.12382
253. Cho Y, Baranczak A, Helmke S, Teruya S, Horn EM, Maurer MS, et al. Personalized Medicine Approach for Optimizing the Dose of Tafamidis to Potentially Ameliorate Wild-type Transthyretin Amyloidosis (Cardiomyopathy). *Amyloid.* 2015;22(3):175-80.
254. Hyun H, Jeong J, Kim H, Oh J, Lee J, Choi S, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Development and validation of a liquid chromatography – tandem mass spectrometry

- method for the assay of tafamidis in rat plasma : Application to a pharmacokinetic study in rats. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2017;137:90–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.020>
- 255.Lee KR, Jeong JW, Hyun HC, Jang E, Ahn S, Choi S, et al. Pharmacokinetics of tafamidis, a transthyretin amyloidosis drug, in rats. *Xenobiotica* [Internet]. 2018;48(8):831–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00498254.2017.1366575>
  - 256.Monteiro C, Da Silva AM, Ferreira N, Mesgarzadah J, Novais M, Coelho T, et al. Cerebrospinal Fluid and Vitreous Body Exposure to Orally Administered Tafamidis in Hereditary ATTRV30M (p.TTRV50M) Amyloidosis Patients. *Amyloid*. 2018;25(2):120-128.
  - 257.Gao L, Xing J, Liu W. Determination of Diflunisal in Plasma by RP-HPLC after solid-liquid extraction. *Yao xue xue bao*. 1998;33(4):286-9.
  - 258.Van Loenhout JWA, Ketelaars HCJ, Gribnau FWJ, Van Ginneken CAM, Tan Y. Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Quantitative Determination of Diflunisal in Plasma. 1980;182:487–91.
  - 259.Magdy G, Abdel Hakiem AF, Belal F, Abdel-Megied AM. A Novel Quality by Design Approach for Development and Validation of a Green Reversed-Phase HPLC Method with Fluorescence Detection for the Simultaneous Determination of Lesinurad, Febuxostat, and Diflunisal: Application to Human Plasma. *J Sep Sci*. 2021;44(11):2177-88.
  - 260.Schwartz M, Chiou R, Stubbs RJ, Bayne WF. Determination of Diflunisal in Human Plasma and Urine by Fast High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1986;380(C):420–4.
  - 261.Ray JE, Day RO. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Diflunisal in Plasma and Urine: Application to Pharmacokinetic Studies in Two Normal Volunteers. *J Pharm Sci*. 1983;72(12):1403–5.
  - 262.Patel DS, Sharma N, Patel MC, Patel BN, Shrivastav PS, Sanyal M. Sensitive and Selective Determination of Diflunisal in Human Plasma by LC-MS. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(9):872–82.
  - 263.Hansen-Moller J, Dalgaard L, Hansen SH. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of diflunisal and its glucuronides serum and urine. *J Chromatogr*. 1987;420:99–109.
  - 264.Ioannou PC, Lianidou ES, Konstantianos DG. Simple, rapid and sensitive spectrofluorimetric determination of diflunisal in serum and urine based on its ternary complex with terbium and EDTA. *Anal Chim Acta*. 1995;300:237–41.
  - 265.Wahlin-Boll E, Brantmark B, Hanson A, Melander A, Nilsson C. High-pressure liquid chromatographic determination of acetylsalicylic acid, salicylic acid, diflunisal, indomethacin, indoprofen and indobufen. *Eur J Clin Pharmacol*. 1981;20(5):375–8.
  - 266.Perez-Ruiz T, Lozano CM, Tomas V, Carpena J. Sensitive synchronous spectrofluorimetric methods for the determination of naproxen and diflunisal in serum. *Fresenius J Anal Chem*. 1998;361:492–5.
  - 267.Maher HM. Simultaneous determination of naproxen and diflunisal using synchronous luminescence spectrometry. *J Fluoresc*. 2008;18(5):909–17.

268. Farid NF, Naguib IA, Moatamed RS, El Ghobashy MR. Separation and Determination of Diflunisal and its Impurity by Two Chromatographic Methods: TLC-Densitometry and HPLC. *J AOAC Int.* 2021;104(6):1719-25.
269. Shaalan RA, Belal TS. Validated stability-indicating HPLC-DAD method for the simultaneous determination of diclofenac sodium and diflunisal in their combined dosage form. *Sci Pharm.* 2013;81(3):713–31.
270. Maher HM. Development and validation of a stability-indicating HPLC-DAD method with ANN optimization for the determination of Diflunisal and Naproxen in pharmaceutical tablets. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2014;37(5):634-52.
271. Abdel-Hamid ME, Najib NM, Suleirnan MS, El-Sayed YM. Differential spectrophotometric, fluorimetric and high-performance liquid chromatographic determination of diflunisal and its tablets. *Analyst.* 1987;112(11):1527–30.
272. Beltagi AM. Utilization of a montmorillonite-Ca-modified carbon paste electrode for the stripping voltammetric determination of diflunisal in its pharmaceutical formulations and human blood. *J Appl Electrochem.* 2009;39(12):2375–84.
273. Shaikh T, Uddin S, Talpur FN, Khaskeli AR, Agheem MH, Shah MR, et al. Ultrasensitive determination of piroxicam at diflunisal-derived gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode. *J Electron Mater.* 2017;46(10):5957–66
274. Nuernberg B, Koehler G, Brune K. Pharmacokinetics of Diflunisal in Patients. *Clin Pharmacokinet.* 1991;20(1):81–9.
275. Li W, Jian W, Fu Y, editors; Lee MS, series editor. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis.* Hoboken, USA: John Wiley & Sons; 2019. 354 p.
276. Hansen SH, Pedersen-Bjergaard S. *Bioanalysis of Pharmaceuticals Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry.* West Sussex, UK: John Wiley & Sons; 2015. 318 p.
277. Moldoveanu S, David V. *Modern sample preparation for chromatography.* 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, UK: Elsevier. 2021. 679 p.
278. Tomov D, Bocheva G, Divarova V, Kasabova L, Svinarov D. Phase separation liquid-liquid extraction for the quantification of 8-iso-prostaglandin F2 alpha in human plasma by LC-MS/MS. *J Med Biochem.* 2021;40(1):10-16.
279. Ettre LS. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure&Appl Chem.* 1993;65(4):819-72.
280. Цветкова Т, Данев С. Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Апарати за измерване, анализатори. 1<sup>во</sup> издание. София, България; ИК-ВАП. 2001. 653 стр.
281. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.* 3<sup>rd</sup> ed. Glasgow, UK: Elsevier. 2012. 427 p.
282. Swartz M. HPLC detectors: a brief review. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2010;33:1130-50.
283. Lundanes E, Reubsaet L, Greibrokk T. *Chromatography Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; 2014. 207 p.
284. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Bioanalytical Method

Validation: Text and Methodology M10, Current Step 2b version, June 2022. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf)

285. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. May 2018. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration [cited: August 2022]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
286. [www.ema.europa.eu](https://www.ema.europa.eu) [Internet] European medicines agency, Science medicine health, EU [cited 2022 September 21] Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-22-2640>