

# Upotreba monoklonskih protutijela u liječenju Alzheimerove bolesti

---

**Pranjić, Marko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:546206>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET ZA BIOTEHNOLOGIJU I RAZVOJ LIJEKOVA  
Preddiplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Marko Pranjić

Upotreba monoklonskih protutijela u liječenju Alzheimerove bolesti

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET ZA BIOTEHNOLOGIJU I RAZVOJ LIJEKOVA  
Preddiplomski sveučilišni studij

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET ZA BIOTEHNOLOGIJU I RAZVOJ LIJEKOVA  
Preddiplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Marko Pranjić

Upotreba monoklonskih protutijela u liječenju Alzheimerove bolesti  
Završni rad

Rijeka, 2024.

Mentor: prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Undergraduate University Program

"Biotechnology and drug research"

Marko Pranjić

Use of monoclonal antibodies in the treatment of Alzheimer's disease

Bachelor thesis

Rijeka, 2024

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Undergraduate University Program

Mentor: prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović

Završni rad obranjen je dana 10.7.2024.

pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović - mentor
2. prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac - predsjednica povjerenstva
3. prof. dr. sc. Dean Marković - član

Rad ima 31 stranica, 13 slika, 1 tablicu i 29 literaturnih navoda.

Zahvaljujem se, iz svega srca, svojoj mentorici prof. dr. sc Mirandi Mladinić Pejatović na pomoći tijekom pisanja i izrade ovoga rada te na svakoj riječi podrške koju mi je dala.

Zahvaljujem se također svojoj obitelji, a posebice roditeljima koji su mi omogućili da sam danas tu gdje jesam.

Hvala svim mojim kolegama i prijateljima na podršci i pomoći.

## Sažetak:

Cilj ovog rada je pojasniti patologiju Alzheimerove bolesti (AZ), opisati mehanizme njenog nastanka, te opisati proteine povezane s patologijom bolesti. Rad se posebno fokusira na upotrebu monoklonskih protutijela u terapiji bolesti, s naglaskom na ADUCANUMAB. Rad detaljno opisuje načine proizvodnje protutijela, njihovu terapijsku osnovu, mehanizam djelovanja i učinkovitost u liječenju Alzheimerove bolesti. Alzheimerova bolest je teška neurodegenerativna bolest koja se manifestira kroz niz teško uočljivih simptoma, simptomi mogu biti raznovrsni kao što su na primjer gubitak kratkoročnog pamćenja pa sve do halucinacija i deluzija. Patogeneza uključuje primarno akumulaciju amiloid- $\beta$  peptida ( $A\beta$ ) u mozgu i promjene u citoskeletu uzrokovane hiperfosforilacijom Tau proteina. Istraživanja su usmjerena na razumijevanje mehanizama nastanka bolesti, uključujući genetičke čimbenike, kao što su *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* i *APOE-e4*, i okolišne utjecaje. Metode uključuju pregled literarnih izvora o patogenezi, simptomima i liječenju Alzheimerove bolesti, te laboratorijske tehnike za proizvodnju i testiranje učinkovitosti monoklonskih protutijela. Monoklonska protutijela, uključujući ADUCANUMAB, pokazala su smanjenje amiloidnih plakova u mozgu i poboljšanje kognitivnih funkcija u predkliničkim i kliničkim ispitivanjima. ADUCANUMAB se veže selektivno za agregirane oblike  $A\beta$ , aktivirajući makrofage koji razgrađuju plakove bez značajnih nuspojava. Klinička ispitivanja ovog lijeka pokazuju smanjenje  $A\beta$  plakova i usporavanje kognitivnog pada iako nisu riješeni svi klinički problemi. Monoklonska protutijela predstavljaju stoga perspektivnu opciju za razvoj liječenja AZ bolesti, ali zahtijevaju dodatna temeljna istraživanja i klinička ispitivanja.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, amiloid- $\beta$  peptid, monoklonska protutijela, ADUCANUMAB

## Summary:

The aim of this paper is to clarify the pathology of Alzheimer's disease (AD), describe the mechanisms of its onset, and outline the proteins associated with the disease's pathology. It particularly focuses on the use of monoclonal antibodies in therapy of the disease, with an emphasis on ADUCANUMAB. The paper provides a detailed description of the methods of antibody production, their therapeutic basis, mechanisms of action, and effectiveness in treating Alzheimer's disease. Alzheimer's disease is a severe neurodegenerative condition that manifests through a range of subtle symptoms. Symptoms can vary widely, from short-term memory loss to hallucinations and delusions. Pathogenesis involves the accumulation of amyloid- $\beta$  peptides ( $A\beta$ ) in the brain and cytoskeletal changes caused by hyperphosphorylation of Tau proteins. Research is focused on understanding the mechanisms of disease onset, including genetic factors such as *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, and *APOE-e4*, and environmental influences. Methods include a review of the literature on the pathogenesis, symptoms, and treatment of Alzheimer's disease, as well as laboratory techniques for the production and testing of the effectiveness of monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies, including ADUCANUMAB, have shown a reduction in amyloid plaques in the brain and improvement in cognitive functions in preclinical and clinical trials. ADUCANUMAB selectively binds to aggregated forms of  $A\beta$ , activating macrophages that degrade the plaques without significant side effects. Phase I, II, and III clinical trials demonstrate a reduction in  $A\beta$  plaques and slowing of cognitive decline, although not all clinically significant results have been achieved. Monoclonal antibodies represent a promising option for future treatment but require further research and clinical trials.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$  peptide, monoclonal antibodies, ADUCANUMAB



## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Patogeneza i incidencija Alzheimerove bolesti.....	1
1.2. Simptomi AZ bolesti.....	3
2. Svrha rada.....	5
3. Liječenje AZ bolesti .....	6
4. Monoklonska protutijela.....	7
4.1. Proizvodnja monoklonskih protutijela .....	7
4.2. Primjena monoklonskih protutijela u liječenju Alzheimerove bolesti.....	10
5. Amiloidni prekursorski protein .....	12
5.1. Genetika.....	12
5.2. Procesuiranje APP.....	13
5.3. APP sekretaze i proizvodnja A $\beta$ peptida .....	14
5.4. Membranski promet APP-a .....	15
5.5. Funkcija APP-a.....	16
5.6. Mehanizam toksičnosti A $\beta$ .....	17
6. ADUCANUMAB.....	18
6.1. ADUCANUMAB i ostala protutijela.....	18
6.2. Vežanje za A $\beta$ .....	19
6.3. Struktura ADUCANUMABA .....	20
6.4. Mehanizam djelovanja.....	21
7. Predkliničke i kliničke studije.....	22
7.1. Predklinička ispitivanja.....	22
7.2. Faza I kliničkih ispitivanja .....	24
7.3. Faza III kliničkih ispitivanja.....	26
8. Zaključak .....	30
9. Literatura .....	31

Lista skraćenica:

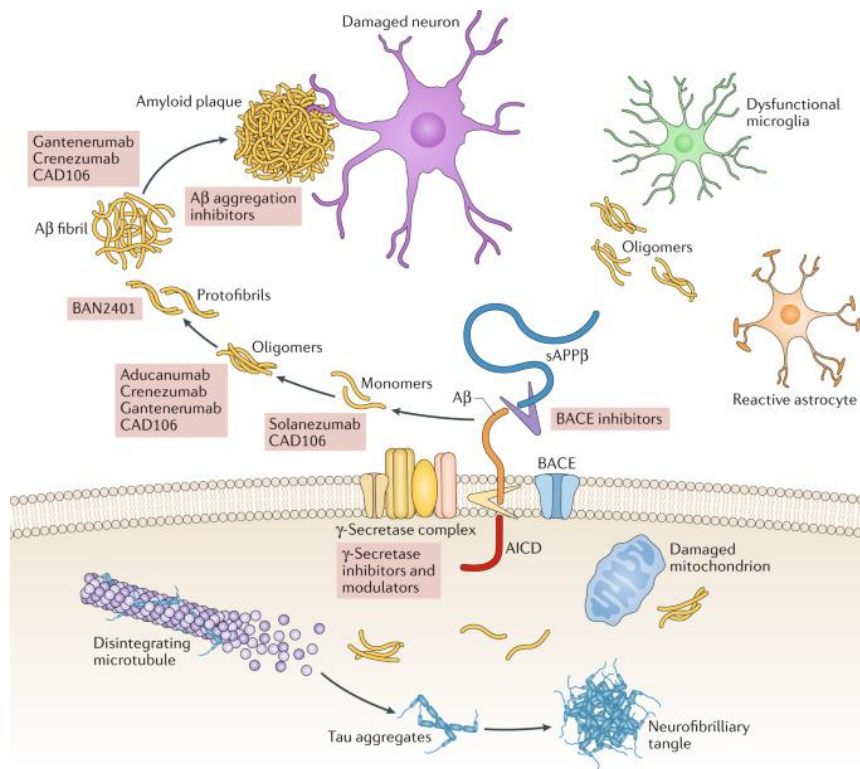
AZ bolest	Alzheimerova bolest
A $\beta$	Amiloid- $\beta$ peptid
APP	Prekusorski amiloidni protein
BACE-1	Beta-sekretaza
FAD	Familijarni oblik Alzheimerove bolesti
AChE	Acetilkolinesteraza
NMDA	N-metil-D-aspartat
AIRA	Amyloid-Related Imaging Abnormalities
HGPRT	Hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaza
HAT	Hipoksantin-aminopterin-timidin
ELISA	Enzimski-povezan imunosorbentni test
PEG	Polietilen glikol
mAb	Monoklonska protutijela
KO	Knock-out
IgG	Imunoglobulin G protutijelo
PET SUVR	PET standardni omjer volumena unosa
MMSE	Mini pregled mentalnog stanja ispitanika
MCI	Blagi kognitivni poremećaj
NPI	Neuropsihijatrijski inventar
CDR-SB	Klinički rejting demencije

# 1. UVOD

## 1.1. Patogeneza i incidencija Alzheimerove bolesti

Alzheimerovu bolest (AZ) klasificiramo kao neurodegenerativnu bolest koja je jedan od najčešćih uzroka demencije u svijetu. Prevalencija bolesti je u porastu svake godine zbog starenja i duljeg životnog vijeka svjetske populacije [1].

Jedna od karakteristika bolesti su neuritički plakovi i neurofibrilarni čvorovi koji su povezani sa akumulacijom amiloidnog- $\beta$  peptida ( $A\beta$ ) u moždanom tkivu te promjenama u citoskeletu koje nastaju zbog hiperfosforilacije mikrotubularno-povezanog Tau proteina u neuronima. Jedno od objašnjenja nastanka ili patogeneze Alzheimerove bolesti je vezano za metabolizam  $A\beta$  (amiloidna hipoteza). (Slika 1.). Prema ovoj hipotezi dolazi do prekomjerne produkcije  $A\beta$  peptida što dovodi do poremećaja u homeostatskom procesu koji regulira proteolitičko cijepanje prekursorskih amiloidnih proteina (APP).  $A\beta$  peptidi nastaju prekomjernim cijepanjem APP proteina pomoću enzima beta-sekretaza (BACE-1) i gama-sekretaza. Glavnu ulogu u patogenezi bolesti ima  $A\beta_{1-42}$ . Sam neurotoksični potencijal amiloid- $\beta$  peptida proizlazi iz njegovih biokemijskih osobina, naime dolazi do favorizacije agregacije u netopive oligomere i protofibrile. Danjom agregacijom dolazi do stvaranja fibrilarnih  $A\beta$  vrsta koje se akumuliraju u neuritičke plakove. Samim stvaranjem plakova te zadržavanjem  $A\beta$  vrsta u moždanom tkivu se aktivira neurotoksična kaskada koja na kraju dovodi do promjena u citoskeletu, neuronalne disfunkcije i stanične smrti [2].



Slika 1. Mehanizam nastanka AZ bolesti [3]

Genetika, životna dob i okolišni faktori pogoduju promjenama u metabolizmu koje mogu dovesti do poremećaja u homeostazi i stvaranju bolesti. Od navedenih faktora najvažniji je faktor životna dob, te zbog neznanih razloga simptomi bolesti su vidljivi uglavnom tek nakon 60. godine. Ova bolest pogađa 1 od 8 ljudi životne dobi od 65 do 74. Incidencija se povećava sa starenjem, te se nakon 65. godine života broj oboljelih udvostručuje svakih 5 godina. Alzheimerova bolest pogađa gotovo 50% svih ljudi koji su stariji od 85 [4].

Incidencija bolesti prije 60. godine života iznosi 5%. Raniji početak bolesti je moguć između 30. i 60. godine života te može biti potaknut genetičkim mutacijama ili varijantama koje su nasljedne, to rezultira familijarnim oblikom Alzheimerove bolesti (FAD). Istraživanja su pokazala da rana bolest može nastati zbog varijanta u *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* genima. Kad je bilo koji od tih gena promijenjen, dolazi do nakupljanja toksičnog Aβ u mozgu. Istraživanja su također indiciraju da osobe sa Downovim sindromom imaju povećan rizik od stvaranja bolesti. Downov sindrom se

pojavljuje u osobama koje su rođene sa dodatnom kopijom kromosoma 21, zbog toga imaju tri kopije gena u svakoj stanici uključujući i APP gena koji se inače pojavljuje samo u dvije kopije.

Genetički uzrok kasnog oblika bolesti nije potpuno jasan. Neki geni, nakon 60. godine života, mogu povećati mogućnost stvaranja bolesti ali sami nemaju mogućnost da neizbježno dovedu do stvaranja bolesti. Jedan od takvih gena koji može povećati mogućnost stvaranja bolesti je *APOE-e4*, ljudi koji imaju jednu ili dvije mutirane kopije ovoga gena imaju povećan rizik razvijanja Alzheimerove bolesti [5].

<b>Poznati geni za AZ bolest</b>
<i>APOE (aleli ε2, ε3, ε4)</i>
<i>APP</i> , kromosom 21
<i>PSEN1</i> , kromosom 14
<i>PSEN2</i> , kromosom 1

*Tablica 1. Popis poznatih gena vezanih uz AZ bolest [5]*

## 1.2. Simptomi AZ bolesti

Simptomi Alzheimerove bolesti se ponekad teško definiraju jer se ne moraju pojavljivati u točnom redoslijedu ili se mogu udružiti sa drugim simptomima same bolesti. Prihvaćeno je da se simptomi dijele u sedam faza. Prva faza je razdoblje u kojem nema simptoma bolesti no sama bolest je prisutna te napreduje. Ova faza se pojavljuje 10 do 15 godina prije prvih simptoma bolesti te ju nije moguće detektirati. U drugu fazu ubrajamo zaboravnost, u ranim razdobljima bolesti osoba počinje biti zaboravljiva ali ne prekomjerno. U treću fazu ubrajamo primjetne probleme u pamćenju kao što su zaboravljanje imena i gubljenje predmeta. U fazu četiri ubrajamo jak i očigledan gubitak pamćenja, ova faza može trajati godinama. Osoba u ovoj fazi ima problema sa snalaženjem u prostoru i vremenu, gubitak kratkoročnog pamćenja te

problemi sa spavanjem. U fazu pet ubrajamo emocionalne promjene kao što su halucinacije, deluzije i paranoje. Faza šest je okarakterizirana ozbiljnim simptomima kao što su potpuni gubitak pamćenja, gubitak mogućnosti komunikacije te potpuni gubitak samostalnosti i kontrole. Zadnja faza je faza sedam u koju ubrajamo gubitak fizičke kontrole. Osobe u ovoj fazi postepeno gube mogućnost hodanja, sjedenja, gutanja te ostalih motoričkih sposobnosti [6].

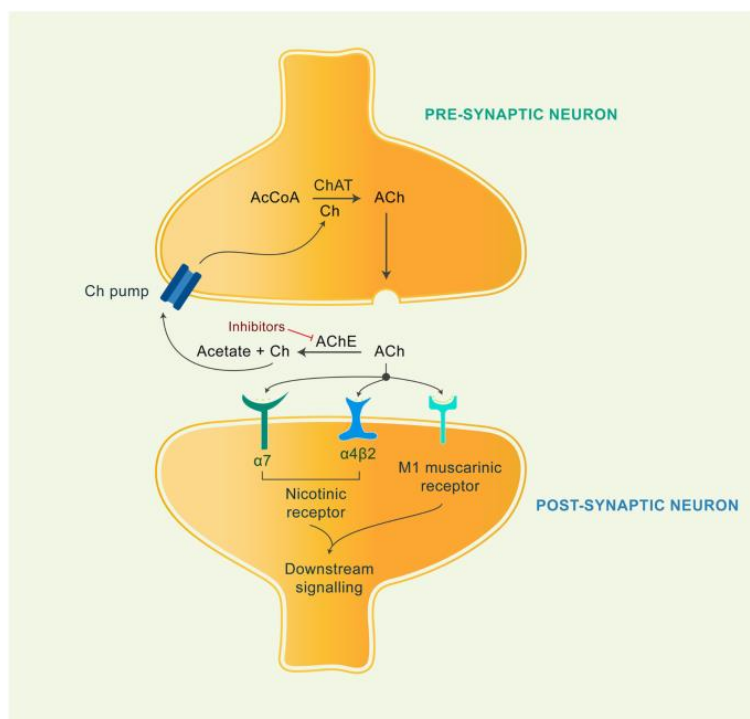
Alzheimerova bolest više zahvaća ženski spol nego muški, dvije trećine svih pacijenta sa Alzheimerom u SAD-u su žene. U prošlosti se je kao glavni razlog zašto je Alzheimer kod žene u većoj prisutnosti je bio taj da žene imaju duži životni vijek od muškaraca, ova je tvrdnja tek djelomično točna. Studija incidencije Alzheimerove bolesti u Europi je pokazala da je incidencija 13 od 1000 kod žena te 7 od 1000 kod muškaraca. Također je jedna nedavna studija dokazala da amiloidni plakovi u mozgu mogu nastati kao jedan od obrambenih sustava organizma protiv infekcija, to jest da je amiloid nusprodukt imunosnog sustava mozga koji se bori protiv infekcija. Pošto žene imaju određene razlike u imunosnom sustavu u odnosu na muškarce, pa postoji mogućnost da se kod njih zbog toga pojavljuje veća količina nusprodukta tj. amiloida u mozgu, što dovodi do toga da žene imaju veću količinu amiloidnih plakova od muškaraca. Zbog veće količine amiloidnih plakova dolazi do povećanja incidencije Alzheimerove bolesti kod žena [7].

## 2. Svrha rada

Cilj ovoga rada je pojasniti patologiju Alzheimerove bolesti, pobliže objasniti mehanizam nastanka bolesti te opisati proteine koji su vezani uz patologiju AZ bolesti. Detaljno su opisani proteini za koje se misli da su glavni odgovorni za stvaranje bolesti (njihova funkcija, nastanak, načini toksičnosti i transport) te koji su moguća meta za buduće liječenje AZ bolesti. Također, ovaj rad pruža uvid u upotrebi monoklonskih protutijela u terapiji i liječenju AZ bolesti, gdje je značaj stavljen na ADUCANUMAB-u. Detaljno su opisani načini proizvodnje protutijela, terapijska osnova protutijela, mehanizam djelovanja te sama učinkovitost monoklonskih protutijela u terapiji AZ bolesti. Korištena stručna i znanstvena literatura za ovaj završni rad je preuzeta iz baza podataka PubMed Central, Wiley Online Library, National Center for Biotechnology Information i ScienceDirect.

### 3. Liječenje AZ bolesti

Lijekovi za Alzheimerovu bolest se mogu podijeliti na one koje mijenjaju progresiju bolesti te na lijekove koji smanjuju simptome same bolesti. Kako bolest napreduje tako kognitivne sposobnosti oboljele osobe i sama kvaliteta života padaju. Kako bi se preostale kognitivne sposobnosti poboljšale ili pojačale se mogu koristiti razne terapije. Inhibitori kolinesteraze direktno poboljšavaju kolinergičnu transmisiju inhibirajući enzim acetilkolinesterazu (AChE) koji hidrolizira i razlaže acetikolin (Slika 2.). Samom inhibicijom enzima se povećava dostupnost acetikolina u sinapsama. Takvi lijekovi dostupni na tržištu a odobreni od strane FDA su donepezil, tacrine, rivastigmine, galantamine i drugi [8].



*Slika 2. Prikaz mehanizma djelovanja inhibitora AChE [9]*

Uz inhibitore kolinesteraze također na tržištu imamo dostupne N-metil-D-aspartat receptor antagoniste. Primjer takvog lijeka je memantine. Pri visokim koncentracijama ovaj lijek može inhibirati mehanizam sinaptičke



plastičnosti koji pomaže pri pamćenju i učenju, no pri niskim koncentracijama antagonisti NMDA receptora mogu pojačati sposobnost pamćenja. Uz blokadu NMDA receptora, memantine također može štititi kolinergične neurone od egzotoksičnosti, smanjivati toksičnost A $\beta$  te inhibirati produkciju A $\beta$  [10].

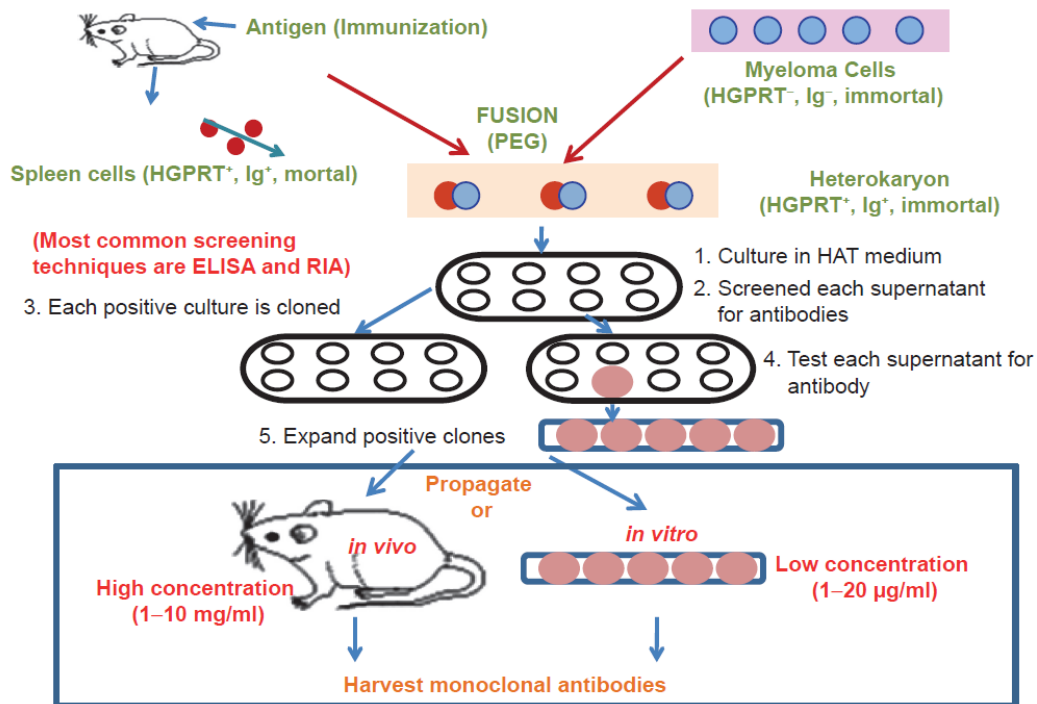
U lijekove koji mijenjaju progresiju i tijek bolesti možemo ubrajati terapije monoklonskim protutijelima koje ciljaju A $\beta$ . Ovaj pristup liječenju može potpuno promijeniti tijek bolesti kod oboljelih u ranim stadijima bolesti. Razvijaju se studije gdje se pokušava bolje razumjeti specifične amiloidne vrste koje su ciljane različitim protutijelima. Za ovu vrstu terapije potrebno je unaprjeđenje uvida u mehanizam kojim protutijela utječu na patologiju, implementacija sveobuhvatnijih repertoara biomarkera i identificiranje odgovarajućih doza za što bolju učinkovitost. Jedna od glavnih nuspojava ove terapije su otekline u području mozga (eng. *Amyloid-Related Imaging Abnormalities (AIRA)*) [11].

## 4. Monoklonska protutijela

Monoklonska protutijela se danas koriste u mnogim znanstvenim poljima kao što je imunologija, biotehnologija, biokemija, medicina i biologija. Danjim razvijanjem i proučavanjem ovoga imunološkog alata se proširuju polja i donose nove mogućnosti gdje bi se ona pokazala korisnim. Jednu trećinu svih novih terapija za leukemiju, artritis, astmu, psorijazu, rak dojke te mnogih drugih bolesti predstavljaju monoklonska protutijela [12].

### 4.1. Proizvodnja monoklonskih protutijela

Kod proizvodnje monoklonskih protutijela je glavni cilj dobiti homogenu populaciju protutijela protiv već utvrđenoga (eng. *Pre-fixed*) imunogena.



Slika 3. Prikaz proizvodnje monoklonskih protutijela tehnologijom hibridoma stanica [12]

Koraci u proizvodnji monoklonskih protutijela su (Slika 3.):

- 1) Purifikacija i karakterizacija odabranog antigena u prihvatljivim količinama
- 2) Imunizacija laboratorijskih miševa sa purificiranim antigenom
- 3) Dobivanje kulture stanice mijeloma koje nemaju mogućnost sinteze hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaze (HGPRT). HGPRT je enzim koji ima ključnu ulogu u spasonosnoj sintezi (*eng. Salvage pathway*) nukleinskih kiselina
- 4) Odstranjivanje stanica slezene miša i fuzija istih sa stanicama mijeloma, dobivanje hibridoma
- 5) Rast dobivenih hibridoma u hipoksantin-aminopterin-timidin mediju (HAT). Manjak HGPRT-a nema nikakav utjecaj na stanice koje su uspješno prošle kroz proces fuzije, osim u slučaju ako je njihov de-novo put sinteze nukleinskih kiselina van funkcije. U HAT mediju je omogućen rast samo fuzioniranih stanica. U prisutnosti aminoptera

kod stanica je onemogućen de-novo put sinteze nukleinskih kiselina, upravo zbog toga u HAT mediju, neuspješno fuzionirane ili nefuzionirane stanice, nemaju mogućnost rasta jer im nedostaje HGPRT za proizvodnju nukleinskih kiselina te samim time i samostalan rast. Nefuzionirane stanice slezene imaju kratak životni vijek dok hibridne stanice imaju visok kapacitet rasta u HAT mediju. Razlog tome je da su HGPRT pozitivne stanice slezene udružene tj. fuzionirane sa besmrtnom linijom stanica mijeloma

- 6) Klonovi hibridnih stanica se generiraju od jedne stanice matice
- 7) Korištenje enzimski-povezanog imunosorbentnog testa (ELISA) kako bi se protutijela, izlučena od strane različitih klonova, testirala na sposobnost vezanja antigena
- 8) Odabir odgovarajućeg klona

### **Imunizacija miševa**

Miševi se trebaju imunizirati sa željenim antigenom 6 do 10 tjedana prije početka procesa fuzije kako bi se razvio robustan i dovoljno jak imunološki odgovor prije nastanka hibridoma. Najčešće se za imunizaciju koristi pročišćen antigen kako bi se olakšao proces pronalaska odgovarajućeg hibridoma, no može se koristiti i smjesa antigena. Prije samog fuzioniranja se koristi ELISA test kako bi se provjerilo da li je u serumu miša prisutna dovoljna količina antigena, miš sa najvećom količinom antigena se zatim selektira za fuzioniranje.

### **Stanična kultura linije stanica mijeloma**

Hibridomi bi u staničnoj kulturi mijeloma trebali rasti kontinuirano i selektivno potiskujući rast roditeljske stanice mijeloma. Kao roditeljsku bi stanicu trebalo izabrati onu za koju je dokazano da stvara stabilne hibridome. Stanice mijeloma, koje nemaju sposobnost proizvodnje nukleotida putem spasonosnog puta, se selektiraju te kultiviraju u mediju sa 8-azagvaninom u kojem je onemogućeno stvaranje enzima HGPRT te samim time i spasonosni put stvaranja nukleotida. Roditeljske se stanice

kultiviraju na takvom mediju minimalno jedan tjedan prije samog procesa fuzioniranja kako bi se osiguralo da su stanice dobro prilagođene HGPRT negativnim uvjetima. Korištenjem aminopterina koji je dio HAT medija, nakon procesa fuzije sa stanicama slezene, dolazi do blokiranja de-novo puta stvaranja nukleotida. Time stanice mijeloma, kod kojih je spasonosni put sinteze nukleotida ranije blokiran, ne mogu proizvesti DNA ili RNA te umiru. Hibridne stanice, za razliku od stanica mijeloma, imaju funkcionalni spasonosni put sinteze nukleotida te u takvom selektivnom mediju mogu proizvoditi DNA i RNA.

### **Fuzija**

Roditeljske stanice mijeloma moraju odgovarati soju miša koji se imunizira, ne smiju lučiti vlastite imunoglobulinske lance, ne smiju imati mikroplazme te moraju omogućavati formaciju stabilnih hibridoma. Proces fuzije može se postići uz pomoć fizičkih agenta kao što je elektro-fuzija ili uz pomoć kemijskih agenta kao što je polietilen glikol (PEG) ili ionima kalcija. Stanice slezene moraju se prikupiti iz eutanaziranog imuniziranog miša te rasčlaniti na pojedinačne stanice u suspenziji pri sterilnim uvjetima. U isto se vrijeme moraju prikupiti stanice mijeloma koje se zatim dodaju u medij za fuziju zajedno sa stanicama slezene i PEG otopinom. Fuzionirane se stanice zatim nasađuju na ploče sa kulturom koje sadrže hranjivi sloj pripremljen od kontrolnih neimuniziranih miševa (Slika 3.) [12].

## **4.2. Primjena monoklonskih protutijela u liječenju Alzheimerove bolesti**

Većina potencijalnih terapija koje mijenjaju tijek Alzheimerove bolesti se temelje na aktivnim ciljanjem razgradnje i prevencijom nastanka amilod- $\beta$  peptida (A $\beta$ ). Danas se koriste terapije kao što su inhibitori enzima gama-sekretaze i beta-sekretaze te A $\beta$  inhibitori agregacije, no za sad se je kao najbolja vrsta terapije pokazala imunoterapija. U imunoterapiju spadaju

aktivna imunizacija, koja može stimulirati imunosni sustav i stvaranje protutijela, te pasivna imunizacija egzogenim monoklonskim protutijelima.

Aktivna imunizacija ima par prednosti nad pasivnom imunizacijom, jer se aktivnom imunoterapijom stimulira dugotrajna proizvodnja protutijela uz kratkoročno administriranje lijeka. Problem aktivne imunoterapije jest da ona nije uspješna kod pacijenata koji su stariji ili imaju lošiji imunosni sustav. Jedino cjepivo ovakve vrste koje je dospjelo do faze III kliničkih ispitivanja je CAD106 [13]. CAD106 cjepivo sadrži fragment A $\beta$  peptida popraćen sa tri amino kiseline (GGC) i konjugiran u *Escherichia coli* RNA virus sličnoj čestici (*eng. Virus-like particle*) bakteriofaga. Cjepivo promovira prezentaciju A $\beta$  peptida i stvaranje specifičnih protutijela. U kliničkoj je studiji bilo dobro tolerirano, došlo je do stvaranja imunosnog odgovora te je pokazalo smanjenje amilodnih plakova kod pacijenata [14].

Pasivna imunizacija također ima svoje prednosti. Pasivnom se imunizacijom može osigurati konstantna koncentracija protutijela te se u slučaju nepoželjne reakcije terapija može brzo zaustaviti. Velika mana ove vrste imunizacije je da su potrebne konstante administracije te sama cijena proizvodnje protutijela. Poznata monoklonska protutijela (mAb) danas su BAPINEZUMAB, GANTENERUMAB, ADUCANUMAB te mnoga druga.

BAPINEZUMAB je humaniziran imunoglobulin G1 koji se veže za pet N-terminalnih ostataka A $\beta$  te sklanja fibrilarne i topive amiloid- $\beta$  peptide. U predkliničkim je studijama na transgeničnim miševima ovo protutijelo pokazalo dobre rezultate, razložilo je plakove te je aktiviralo Fc receptorom posredovanu mikroglija fagocitozu A $\beta$ . Ovo je prvo mAb koje je ušlo u prvu fazu testiranja na ljudima, grupa se je sastojala od 30 ispitanika sa slabom ili umjerenom Alzheimerovom bolesti. Pri niskim je dozama bilo dobro tolerirano i bez nuspojava, pri visokim je dozama 3 od 10 ispitanika razvilo vazogene edeme koji su povezani sa abnormalnostima pri magnetskoj rezonanciji. Kasnije se je za ovu

nuspojavu terapije razvio i termin abnormalnosti slike povezane sa amiloidom (*eng. amyloid-related imaging abnormalities*) ili skraćeno ARIA.

GANTENERUMAB je prvo potpuno humanizirano IgG1 protu-A $\beta$  protutijelo. Ovo se mAb veže za konformacijski epitop koji je izražen na fibrilima A $\beta$ . Ovaj konformacijski epitop obuhvaća središnje i N-terminalne aminokiseline te stoga zahtjeva da peptid bude savijen tako da je središnja regija blizu N-kraja. U testiranju kod transgeničnih miševa ovo mAb učinkovito smanjuje plakove bez promjene razine A $\beta$  plazmi. U prvoj fazi kliničkih studija na pacijentima sa slabom ili umjerenom Alzheimerovom bolesti se je ovo protutijelo pokazalo relativno sigurnim no šest ispitanika je zadobilo ARIA kao nuspojavu. Druga faza testiranje je pokrenuta 2010. godine na 360 ispitanika sa progresivnom Alzheimerovom bolesti, 2012. je došlo do ekspanzije na 2/3 fazu sa 799 ispitanika no ispitivanje je ubrzo prekinuto. Glavni razlog zaustavljanja ispitivanja bio je da GANTENRUMAB nema učinkoviti terapijski učinak u smanjenju razine A $\beta$  u mozgu. Kasnije analize subgrupa su pokazale da ovo mAb ima terapijski učinak na pacijentima sa brzo napredujućom bolesti te se iz tog razloga ponovo pokreće 2/3 faza kliničkog ispitivanja ali u većim dozama [14].

## 5. Amiloidni prekursorski protein

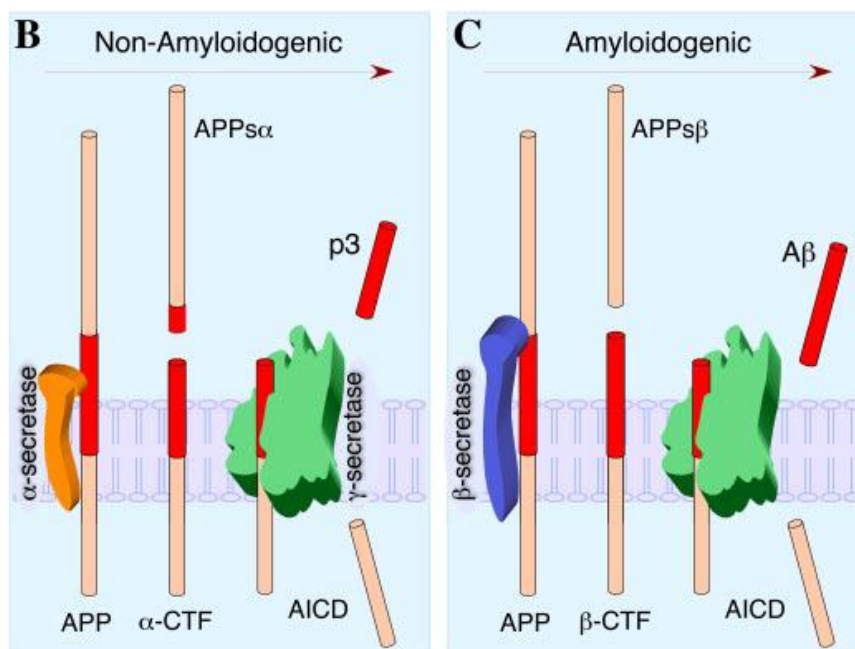
### 5.1. Genetika

Ljudski gen koji kodira za amiloidni prekursorski protein se nalazi na 21. kromosomu. Istraživanja su dokazala da više od 25 mutacija u *APP* genu mogu uzrokovati familijarni oblik Alzheimerove bolesti te da su povezani sa nasljednom cerebralnom amiloidnom angiopatijom. Mutacije u tome genu uzrokuju aminokiselinske supstitucije unutar A $\beta$  domene. Gen *APP* zajedno sa genima ljudskim genima *APLP1*, *APLP2* i genom vinske mušice *App1* čini jednu genetsku familiju. Svi ovi geni kodiraju tip I membranske proteine, imaju veliku vanstaničnu domenu i kratku unutarstaničnu

domenu, te svi prolaze kroz neki oblik procesuiranja. Samo *APP* gen sadrži sekvencu koja kodira za  $A\beta$  [15].

## 5.2. Procesuiranje APP

Potrebna su dva mjesta cijepanja proteina kako bi se  $A\beta$  fragment mogao osloboditi od prekursorske molekule. Prvo mjesto cijepanja se nalazi u vanstaničnoj domeni, a glavnu ulogu na ovome mjestu ima  $\beta$ -sekretaza. Drugo mjesto cijepanja se nalazi u unutarstaničnoj domeni, a cijepanje vrši enzim  $\gamma$ -sekretaza (Slika 4.).



Slika 4. Proteolitičko procesuiranje APP-a [15]

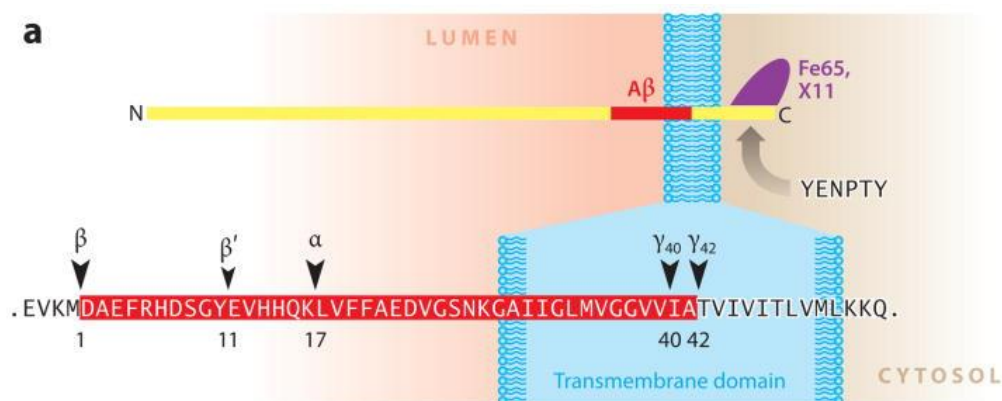
U lumenalnoj domeni prvo dolazi do cijepanja APP-a  $\beta$ - ili  $\alpha$ -sekretazom, cijepanjem nastaju membranski privezani  $\beta$ - ili  $\alpha$ -C-terminalni fragmenti. Nakon cijepanja i nastanka fragmenata  $\gamma$ -sekretaza dodatno cijepa C-terminalne fragmente kako bi se oslobodili  $A\beta$  i p3 peptidi u vanstaničnom prostoru. Uz  $A\beta$  i p3 peptidnim fragmentima u vanstaničnoj domeni također nastaje i AICD polipeptidni fragment u citoplazmi. Kod ne-amiloidogenog cijepanja nastaje p3 fragment jer dolazi do cijepanja

vanstanične domene  $\alpha$ -sekretazom dok kod amilidogenog cijepanja nastaje  $A\beta$  fragment jer dolazi do cijepanja vanstanične domene  $\beta$ -sekretazom (Slika 3.)<sup>[15]</sup>.

### 5.3. APP sekretaze i proizvodnja $A\beta$ peptida

Cinkove metaloproteinaze kao što su ADAM17, ADAM9, ADAM10 ili MDC-9 te BACE2 mogu cijepati APP na  $\alpha$ -sekretaznom mjestu koji se nalazi unutar  $A\beta$  domene, između aminokiselina Lys<sup>16</sup> i Leu<sup>17</sup>, te tako onemogućavaju stvaranje cjelovitog  $A\beta$  peptida. BACE1 je transmembranska  $\beta$ -sekretaza koja cijepanjem stvara N-terminus  $A\beta$ . BACE1 također može cijepati domenu između aminokiselina Tyr<sup>10</sup> i Glu<sup>11</sup>. Ovom sekretazom dolazi do cijepanja transmembranske domene APP-a na više mjesta, time se generiraju  $A\beta$  peptidi dužine od 38 do 43 ostatka.

Više od 90% izlučenog  $A\beta$  se nalazi u dužini od 40 ostataka dok se manje od 10% izlučenog  $A\beta$  nalazi u dužini od 42 ostatka (Slika 5.). U familijarnoj AD se pojavljuju mutacije APP-a, u blizini C terminusa  $A\beta$  domene, koje povećavaju proizvodnju  $A\beta_{42}$ . Mutacije povezane sa familijarnom AD u presenilinu-1 i -2 imaju utjecaj na cijepanje koje vrši  $\gamma$ -sekretaza, utječu na specifičnost mjesta cijepanja favorizirajući rascjep na poziciji 42 u odnosu na poziciju 40 čime povećavaju omjer  $A\beta_{42}/40$  <sup>[15]</sup>.



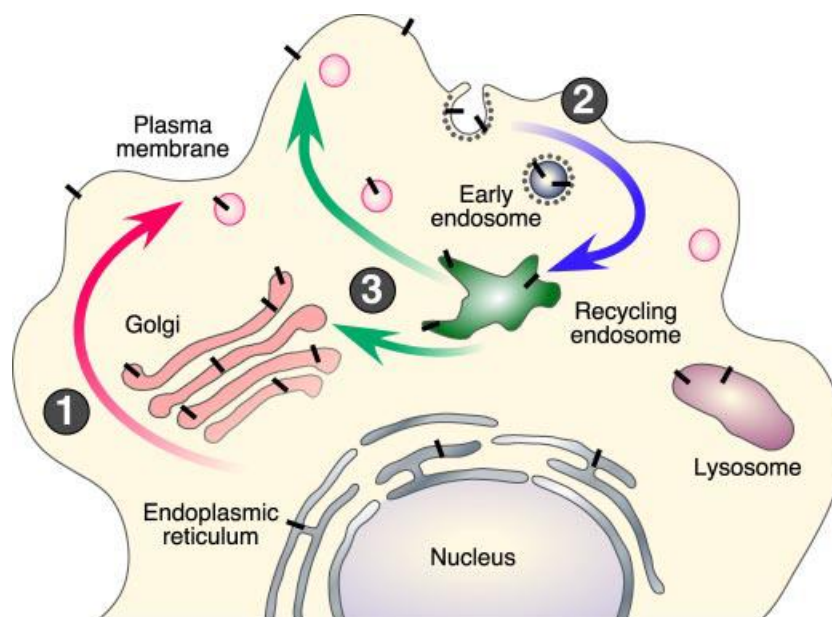
Slika 5. Prikaz aminokiselinskog slijeda peptida i mjesta cijepanja <sup>[16]</sup>



## Proizvodnja A $\beta$

Konvergencija BACE1 enzima i APP-a na istoj lokaciji je neophodna kako bi došlo do biosinteze A $\beta$  peptida. Obrada APP-a se može vršiti u unutarstaničnim odjeljcima duž endocitnih puteva, stoga se pretpostavlja da se proizvodnja A $\beta$  događa u odjeljcima Goldđijevog aparata i odjeljcima endosoma. Ovu pretpostavku potvrđuje činjenica da je optimalni pH za rad BACE1 enzima 4.5, isti pH nalazimo u kiselim endosomima i Goldđiju. Također dolazi do povećanja proizvodnje A $\beta$  ako dođe do dužeg zadržavanja BACE1 u endosomima. Istraživanja su zaključila da su unutarstanični promet i lokalizacija BACE1 i APP-A koordinirani događaji koji zajedno dovode do stvaranja A $\beta$  peptida [17].

### 5.4. Membranski promet APP-a



Slika 6. Unutarstanični promet APP-a [15]

Novonastale APP molekule prvo sazrijevaju preko konstitutivnog puta izlučivanja, ovaj se put izlučivanja koristi kako bi se novo sintetizirane APP molekule dostavile do stanične membrane. Tijekom tranzita, od

endoplazmatskog retikula do stanične membrane, dolazi do postranslacijskih modifikacija APP-a N- i O-glikolizacijom, fosforilacijom i tirozin sulfacija (Broj 1, Slika 6.).

Amiloidni prekursorski protein, jednom kad dođe na površinu stanice, bude rapidno internaliziran endocitozom. Nakon toga se APP dostavlja u endosome, dio endocitiranih molekula se reciklira i doprema nazad na površinu stanice dok dio prolazi kroz degradaciju u lizosomima (Broj 2 i 3, Slika 6.) [15].

## 5.5. Funkcija APP-a

Do danas se sa sigurnošću ne može reći koja je jasna funkcija APP-a, no postoji nekoliko hipoteza.

### **Trofičke funkcije**

Istraživanja su pokazala da APP ima utjecaj na proliferaciju, diferencijaciju, adheziju stanica i proces nastanka sinapsi to jest sinaptogenezu. Vanstanična domena APP-a, prema nekim istraživanjima, može stimulirati rast stanica te može utjecati na promjenu rasta fibroblasta, keratinocita, B106 stanica i neurona u in vitro uvjetima. Istraživanja sa genetički unosom sAPP $\alpha$  u APP/APLP2 duplo nokautirane (*eng. knock-out, KO*) miševa su pokazala da sAPP $\alpha$  spašava smrtonosni fenotip transgeničnih miševa. Ovo istraživanje podupire hipotezu da infuzija sAPP $\alpha$  nakon ozlijede mozga može poboljšati preživljenje i oporavak živčanih stanica.

### **Utjecaj na proliferaciju i diferencijaciju neuralnih matičnih stanica NSPC**

APP je procesuiran na slični način kao što je slučaj kod proteina Notch. Protein Notch regulira diferencijaciju neuralnih matičnih stanica te kontrolira njihovu proliferaciju. Iz toga je razloga moguće da APP može

imati sličnu funkciju kao Notch. Jedno je istraživanje potvrdilo ovu hipotezu, naime infuzijom sAPP $\alpha$  u vetrikule miša se sAPP $\alpha$  veže na receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) stimulirajući time ekspresiju neuralnih matičnih stanica. Infuzijom sAPP $\alpha$  se potiče lučenje EGF-a i proliferaciju EGFR-izražavajućih stanica koje su došle u kontakt s sAPP $\alpha$ . APP također može imati ulogu u regulaciji diferencijacije neuralnih matičnih stanica. U istraživanju na embrionalnim matičnim stanica se dokazalo da prekomjerno izražavanje APP-a može pojačati neuralnu diferencijaciju.

### **Utjecaj na sinaptogenezu**

APP ima potencijalnu ulogu u regulaciji nastajanja sinapsi. Tijekom razvoja je APP izražen u pre i postsinaptičkim mjestima, tijekom perioda sinaptogeneze se njegova razina dramatično povećava. U istraživanjima na APP/APLP2 KO miševima se dokazalo da KO miševi imaju oslabljenu formaciju neuromuskularnog spoja, smanjen broj sinaptičkih vezikula, netočnu apoziciju pre i postsinaptičkih proteina i oštećen sinaptički prijenos u odnosu na miševe bez nokauta [18].

## **5.6. Mehanizam toksičnosti A $\beta$**

Važnost APP-a u razvoju Alzheimerove bolesti proizlazi primarno iz toksičnosti A $\beta$  peptida. Toksičnost ovoga peptida također može objasniti neke patološke aspekte Alzheimerove bolesti kao što su nastanak neurofibrilarnih čvorova, upala moždanog tkiva i oksidativno oštećenje. U istraživanjima in vitro je dokazana A $\beta$  toksičnost, naime u kontaktu sa A $\beta$  fibrilima živčane stanice umiru u roku 24 sata. Mehanizam kojim je smrt stanica izazvana nije poznat, najvjerojatnije je to apoptoza tj. programirana stanična smrt koja je uzrokovana oksidativnim oštećenjem. Međutim, još uvijek ne postoje uvjerljivi dokazi o toksičnosti A $\beta$ 42 peptida.

Istraživanja *in vivo* na miševima podupiru hipotezu da su A $\beta$  peptidi toksični za neurone. U transgeničnim miševima, kod kojih je humani gen za APP prekomjerno ekspresiran, došlo je do nakupljanja A $\beta$  u roku od 4 do 6 mjeseca te do oštećenja živčanih stanica. Također je došlo do upale u području mozga, gubitka funkcije sinapsa te aktivacije kaspaza 3,6,7,8 i 9. Dokazano je da kaspaze u mozgu cijepaju aktin, fodrin te proteosome što direktno dovodi do oštećenja stanica. Na fosforilaciju i procesuiranje Tau proteina A $\beta$  također može imati utjecaj. Fosforilacija Tau proteina je regulirana uz pomoć nekoliko kinaza u koje uključujemo GSK3 $\beta$  i cdk5, te dvije kinaze aktivira A $\beta$ . Kod trostrukih transgeničnih miševi sa mutacijama Tau, APP i PS1 proteina se pojavljuje nakupljanje A $\beta$  peptida. Također miševi kod kojih je APP prekomjerno ekspresiran, križani sa miševima kod kojih fali Tau protein, ne razvijaju nikakve simptome bolesti i živčanog oštećenja [16].

## 6. ADUCANUMAB

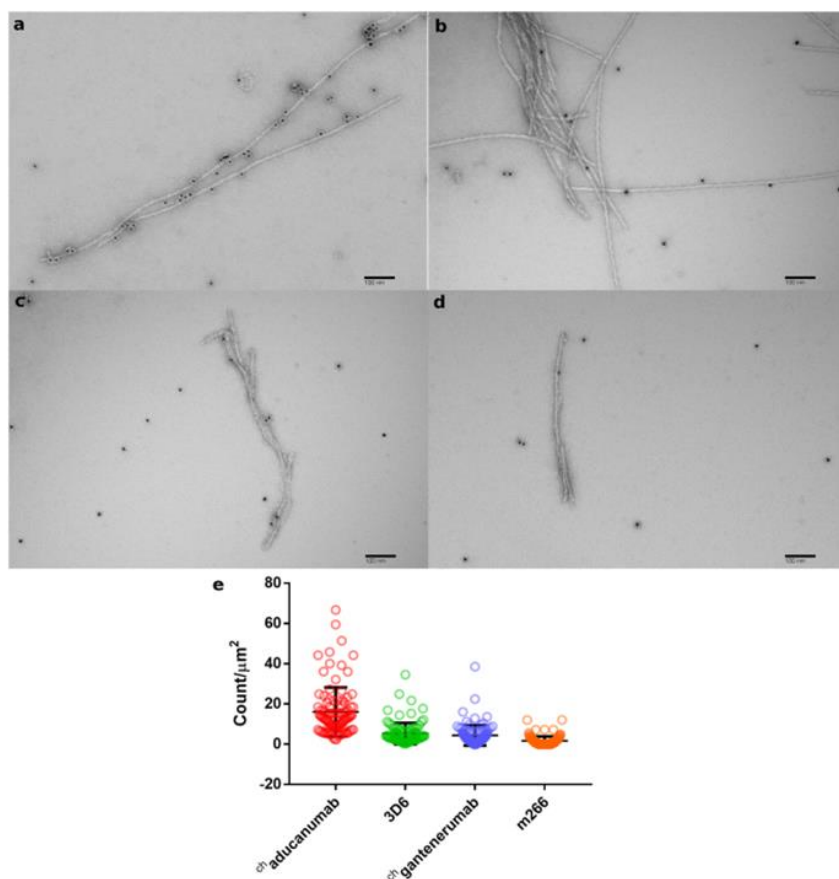
### 6.1. ADUCANUMAB i druga slična protutijela

Prema imunoterapeutskoj strategiji liječenja AZ bolesti su se razvila razna anti-amiloidna protutijela koja su pokazala afinitet za A $\beta$  koji varira od monomernih do agregirajućih forma. Monoklonska protutijela, kao što su BAPINEZUMAB i PONEZUMAB, pokazuju povišen afinitet prema monomernim formama za razliku od agregirajućih forma. Ciljanje i razgradnja monomernih forma A $\beta$  izaziva stvaranje neurotoksičnih specija oligomera i protofilamenata. A $\beta$  monomeri imaju važnu ulogu u održavanju krvno moždane barijere te protekcija neurona, protutijela koja su pokazala povišen afinitet za monomerne oblike A $\beta$  su diskontinuirana te nisu došla do kliničke faze. Za razliku od ostalih protutijela, ADUCANUMAB je protutijelo koje ima značajnu bolju selektivnost za agregirajuće forme za razliku od monomernih forma A $\beta$ , time predstavlja veliki potencijal u

budućem liječenju ove bolesti. Ovo je protutijelo izolirano iz limfocita starijih, zdravih pojedinca koji nemaju znakove kognitivnog pada ili bilo kakve znakove demencije [19].

## 6.2. Vezanje za A $\beta$

Kako bi se istražilo selektivno vezanje određenih protutijela za A $\beta$  fibrile u jednom se istraživanju koristila elektronska mikroskopija za prikaz interakcije A $\beta$ <sub>1-40</sub> fibrila koji su inkubirani sa ADUCANUMABOM, GANTENERUMABOM, 3D6 protutijelom i m266 protutijelom konjugirani sa 10-nm česticama zlata. Rezultati su pokazali da A $\beta$  fibrili inkubirani sa konjugatom zlato-ADUCANUMAB imaju veći broj zlatnih čestica prisutnih u blizini ili na samoj površini fibrila za razliku od ostalih protutijela (Slika 7., slovo a). Možemo na temelju toga zaključiti da najveći afinitet, te najbolju selektivnost, za vezanje A $\beta$  fibrila ima ADUCANUMAB. Kao kontrola u ovome istraživanju su se koristili tau fibrili gdje nije opservirano nikakvo specifično vezanje.



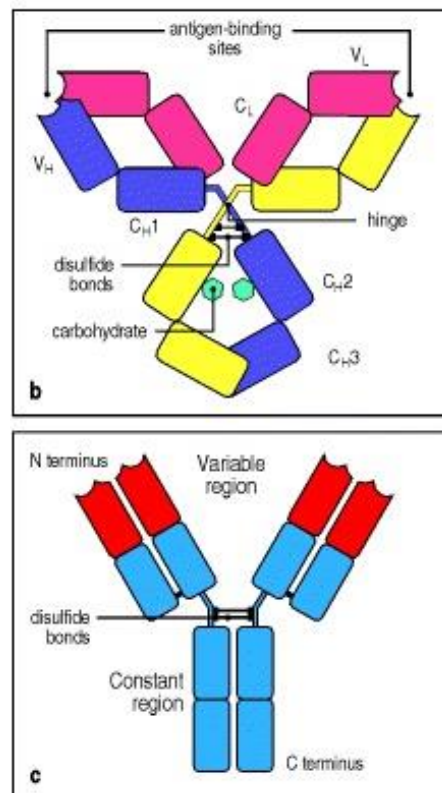
Slika 7. Prikaz vezanja konjugata zlato-protutijelo za  $A\beta 1-40$  fibrile. Slovo a (ADUCANUMAB-zlato), slovo b (3D6-zlato), slovo c (GANTENERUMAB-zlato), slovo d (m266-zlato) [20]

Danjim istraživanjima specifičnosti vezanja su se ispitivali aminokiselinski ostaci. Od 42 peptida jedino zadovoljavajuće vezanje je bilo kod peptida 7-13 koji sadrže ostatke Glu3 – Asp7. Kod drugih peptida na primjer 6 - 4, kod kojih nisu prisutni ostaci Glu3 – Asp7, je došlo do neravnomjernog i slabog vezanja [20].

### 6.3. Struktura ADUCANUMABA

ADUCANUMAB klasificiramo kao imunoglobulin G (IgG) protutijelo, najčešća klasa protutijela u krvi. IgG protutijelo se sastoji od 4 polipeptidna lanca, dva identična laka lanaca i dva identična teška lanaca, možemo reći da formiraju strukturu u obliku slova Y. Svaki od 4 lanca ima varijabilnu V regiju i konstantnu C regiju. Laki lanci vezani su za teške lance mnogim nekovalentnim interakcijama i disulfidnim vezama, a V regije teških i lakih lanaca spajaju se u svakom kraku Y kako bi se stvorila

dva identična mjesta za vezanje antigena. Posjedovanje dva mjesta vezanja antigena omogućuje molekulama antitijela da unakrsno povežu antigene i da ih vežu mnogo stabilnije. Protutijelo djelimo na Fab, antigen vezujuću domenu i Fc domenu, koja stupa u interakciju sa staničnom površinom. Baza forme Y, Fc fragment, sastoji se od karboksi - terminalnih domena teških lanaca (Slika 8.) [21].

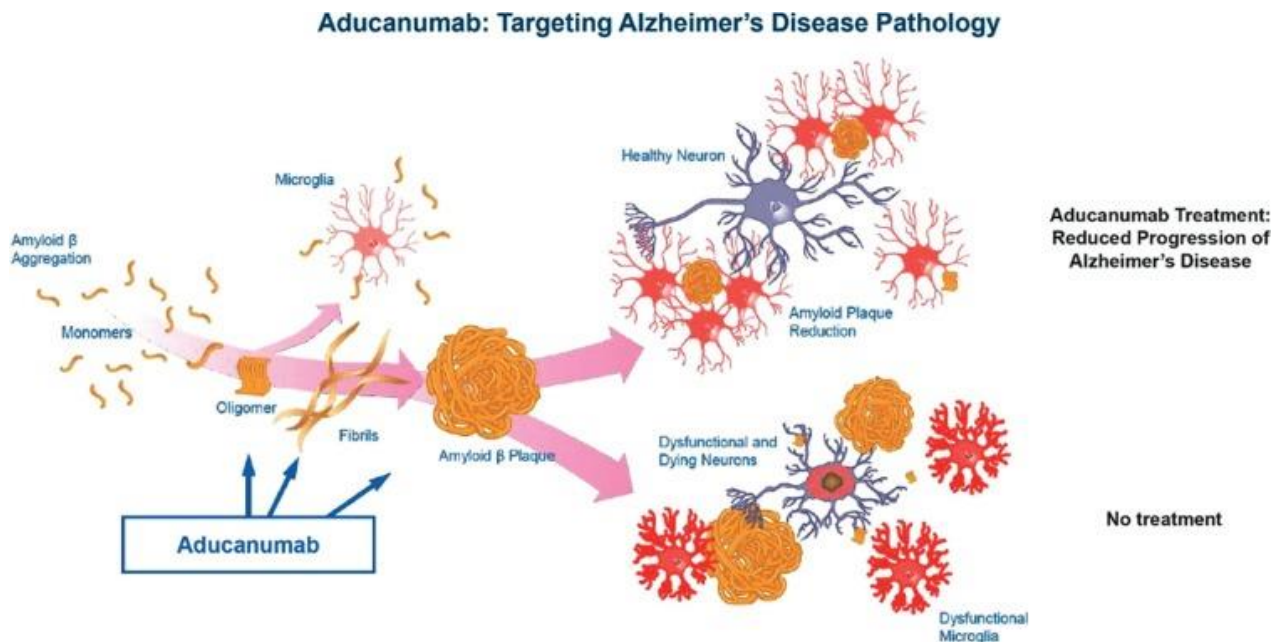


Slika 8. Prikaz strukture IgG protutijela [21]

#### 6.4. Mehanizam djelovanja

Kako je već rečeno, ADUCANUMAB je monoklonsko IgG humano protutijelo, koje se veže za aminokiseline 3-7 u A $\beta$ . Danjim je istraživanjima nađeno da su ostaci Glu3, Arg5, His6 i Phe4 glavni odgovorni za interakciju između antigen vezujuće Fab regije i A $\beta$ . U usporedbi s protutijelima koja su prethodno proučavana, ADUCANUMAB se veže na N-kraj  $\beta$ -amiloida u proširenoj konformaciji. Na temelju slabog monovalentnog vezanja, brze kinetike vezanja i jake avidnosti za agregate bogate epitopima, bez problema razlikuje agregate od monomera.

Vežanjem protutijela za epitop dolazi do velike akumulacije makrofaga na mjestu interakcije. Znači, vežanjem za specifični epitop dolazi do signalne kaskade koja signalizira makrofazima tj. mikroglia stanicama mozga da razgrađuju A $\beta$  fibrile bez ikakvih znakova mikrokrvarenja (Slika 9.)<sup>[22]</sup>.



Slika 9. Mehanizam djelovanja ADUCANUMAB-a <sup>[23]</sup>

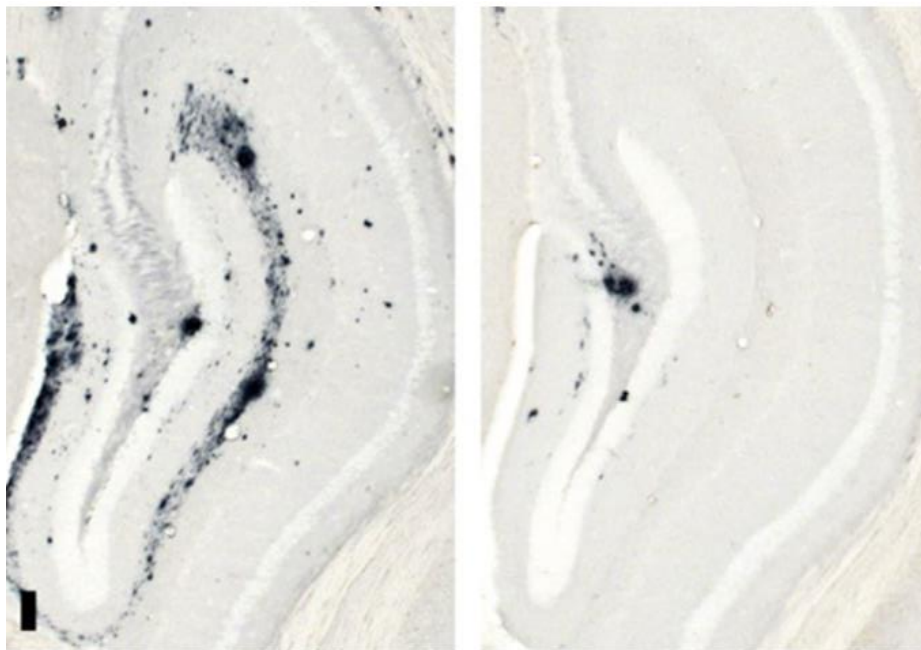
## 7. Predkliničke i kliničke studije

### 7.1. Predklinička ispitivanja

Predkliničke studije su vršene na transgeničnim laboratorijskim miševima kako bi se ispitala efikasnost ovoga lijeka. Miševi su gentski modificirani da imaju prekomjernu ekspresiju APP-a kako bi se pojačala formacija A $\beta$  plakova u mozgu. U ovoj se je studiji koristio kimerčki analog protutijela koji je prilagođen miševima. U ne-placebo miševima do administracije je došlo u akutnom ili u kroničnom obliku. Kod akutne imunoterapije je ADUCANUMAB direktno injektiran u mozak miša dok se kod kronične imunoterapije lijek administrira svakih tjedan dana 6 mjeseci. Mozgovi miševa su snimljeni flurescentnom mikroskopijom, za označavanje A $\beta$  plakova, prije početka i na kraju eksperimenta.



Liječenje analogom ADUCANUMABA je pokazalo mješovite rezultate o njegovoj sposobnosti smanjenja A $\beta$  plakova u miševa. Miševi koji su primili akutnu imunoterapiju su doživjeli veće smanjenje plakova nego oni miševi koji su primili placebo (Slika 10.). Akutnim je liječenjem došlo do odprilike oko 48% smanjenja broja A $\beta$  plakova, kontrolni su miševi pokazali smanjenje od 14%. Za razliku od akutnog liječenja, kronično liječenje nije pokazalo značajno smanjenje broja A $\beta$  plakova u odnosu na kontrolne miševe. Unatoč sposobnosti analoga ADUCANUMABA da razgradi postojeće plakove, akutno liječenje nije pokazalo značajni učinak na smanjenje stvaranja novih plakova u odnosu na kontrolu. Ovi nalazi sugeriraju da je ovaj lijek učinkovit u smanjenju prethodno formiranih A $\beta$  plakova, ali ne mora značajno spriječiti stvaranje novih.



*Slika 10. Prikaz mozga miša tretiranog sa placebo terapijom (lijevo) i miša tretiranog sa ADUCANUMAB terapijom. Plave oznake - nakupine A $\beta$  [24]*

Nalazi ove studije također pokazuju da ADUCANUMAB može koristiti pacijentima s AD-om kroz reguliranje razina cerebralnog intracelularnog kalcija. Poremećaj u regulaciji unutarstaničnog kalcija povezan je sa mnogim neurodegenerativnim bolestima uključujući AZ bolest. Kod miševa

koji su primali kronični tretman, utvrđeno je da analog ADUCANUMABA sprječava preopterećenje kalcijem i povećava propusnost NMDA receptora za kalcij u odnosu na kontrole. Također je utvrđeno da korišteni lijek obnavlja regulaciju pumpe kalcijeve ATPaze koja je ostala poremećena u kontrolnih miševa. Ovi rezultati pokazuju da ADUCANUMAB može pomoći u obnavljanju neurološke funkcije kod bolesnika s AZ bolesti smanjenjem A $\beta$  plakova i ponovnim uspostavljanjem neuronske propusnosti kalcija [25].

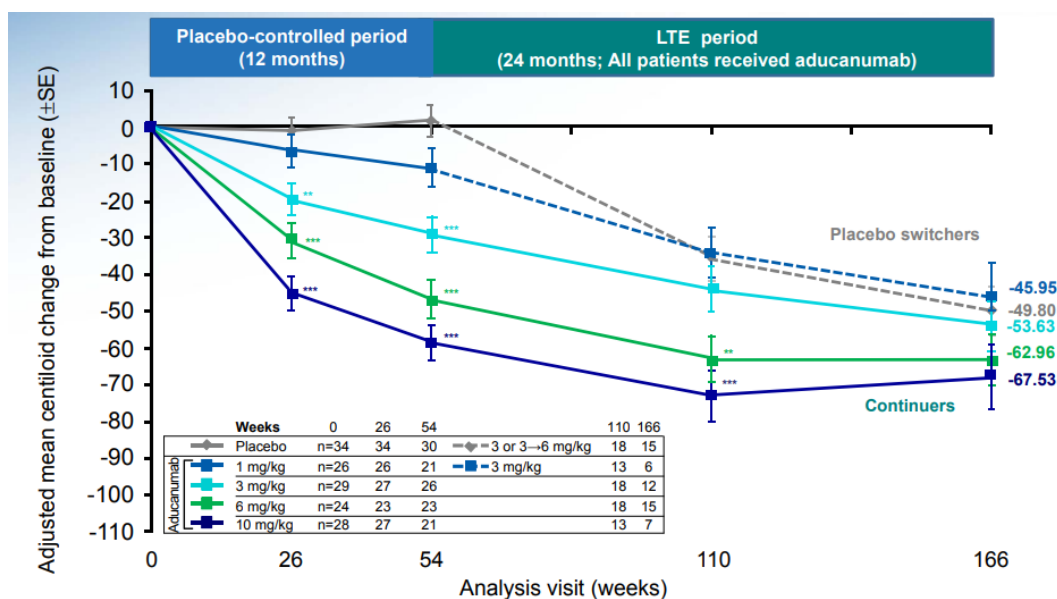
## 7.2. Faza I kliničkih ispitivanja

Prvo kliničko ispitivanje ADUCANUMABA na ljudima održano je 2011 godine od strane tvrtke Biogen. Bilo je to randomizirano, dvostruko slijepo, placebo kontrolirano ispitivanje sa postupnim povećanjem jedne doze. Studija je uključivanja 53 sudionika, 39 ih je primalo ADUCANUMAB te 14 placebo. Skupina koja je primala lijek je primala rastuće doze od 0.3, 10, 20, 30 ili 60 mg/kg. Cilj ovog ispitivanja je bilo proučiti farmakokinetiku i sigurnost lijeka. U ispitanika koji su primali doze od 30 mg/kg ili manje su tri najčešća simptoma bili glavobolja, proljev i infekcija gornjih dišnih puteva. U tri ispitanika koji su primili dozu od 60 mg/kg se kao nuspojava pojavile abnormalnosti slike povezane sa amiloidom (ARIA), to je bila najteža nuspojava koja je riješena bez danjih komplikacija. Povećanjem doze se povećava učestalost ovog simptoma. Farmakokinetičkim ispitivanjima je utvrđeno da povećanje doze nije promijenilo poluživot lijeka, brzinu klirensa ili distribuciju, stoga možemo zaključiti da se farmakokinetika ovoga lijeka ponaša linearno ovisno o dozi.

2012. godine ADUCANUMAB ulazi u drugu dvostruko slijepo, placebo-kontroliranu fazu pod nazivom Prime, također organiziranu od strane tvrtke Biogen. U ovom istraživanju je sudjelovalo 165 ispitanika sa blagom AZ bolesti ili sa blagim kognitivnim poremećajem (MCI). Jednom

mjesečno, 12 mjeseci, su im administrirane doze od 1, 3, 6 ili 10 mg/kg. Ovo je istraživanje mjerilo sposobnost ADUCANUMAB-a da smanji veličinu i broj A $\beta$  plakova te učinke na kognitivnu funkciju. Mjerenja učinka su vršena metodom PET standardnog omjera volumena unosa (SUVR) te mini pregledom mentalnog stanja ispitanika (MMSE). PET slike su snimljene prije početka liječenja, u 26. te u 54. tjednu nakon prvog tretmana.

ADUCANUMAB je pokazao značajnu korist u smanjenju A $\beta$  plakova u bolesnika s blagom AZ bolesti ili MCI-om u ovom ispitivanju. SUVR rezultati bili su niži u odnosu na početnu vrijednost kod sudionika koji su primali mjesečne doze lijeka (Slika 11.). Ovo smanjenje nakupljanja A $\beta$  plaka primijećeno je kod pacijenata bez obzira na to jesu li imali MCI, blagi AD te jesu li nositelji *APOE  $\epsilon$ 4* gena. Degradacija A $\beta$  plaka bila je vidljiva u cijelom mozgu isključujući dvije regije u kojima se nije očekivalo stvaranje A $\beta$  plaka, u sub-kortikalnoj bijeloj tvari i ponsu.



Slika 11. Utjecaj ADUCANUMABA na razinu A $\beta$  plakova u fazi Prime [26]

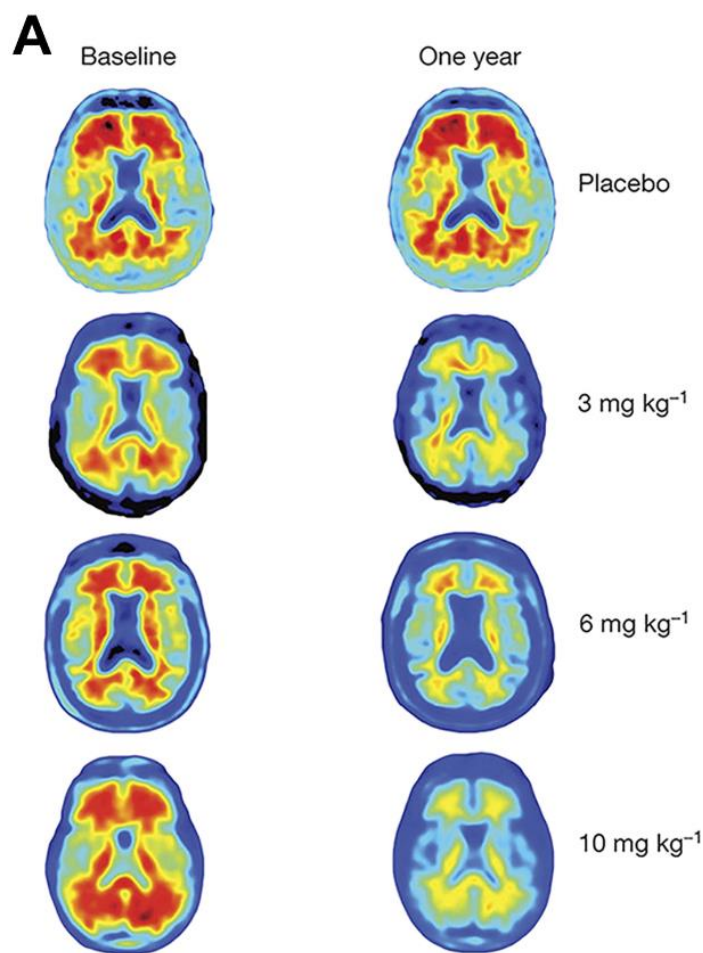
Rezultati ispitivanja Prime pokazuju da ADUCANUMAB može ublažiti kognitivni pad u bolesnika sa AZ bolesti ali i u onima sa MCI-om. Kod sudionika s PET SUVR rezultatima, kod kojih je rezultat smanjen za jednu standardnu devijaciju ispod placebo sudionika, primijećena je značajna korist u očuvanju mentalne funkcije. MMSE metodom je također

primijećeno da ADUCANUMAB smanjuje stopu progresije simptoma kognitivnog pada [25].

### 7.3. Faza III kliničkih ispitivanja

U rujnu 2015. godine su počela dva identična dvostruko slijepa, randomizirana, placebom kontrolirana ispitivanja faze III. Ispitivanja su nazvana Emerge i Engage. Svaka 4 tjedna, tijekom 18 mjeseci, je svakom ispitaniku s dijagnozom MCI ili s blagim oblikom AZ bolesti administrirana niska ili visoka doza lijeka, ovisno o tome nose li pacijenti alel *APOE ε4*. Niska doza bila je 3 mg/kg za nosioce alela *APOE ε4* i 6 mg/kg za one koji nisu bili nositelji. Visoka doza bila je 6 mg/kg za nosioce i 10 mg/kg za nenosioce. U konačnici, 1643 pacijenata je završilo ispitivanje Emerge, a 1647 je završilo ispitivanje Engage [25].

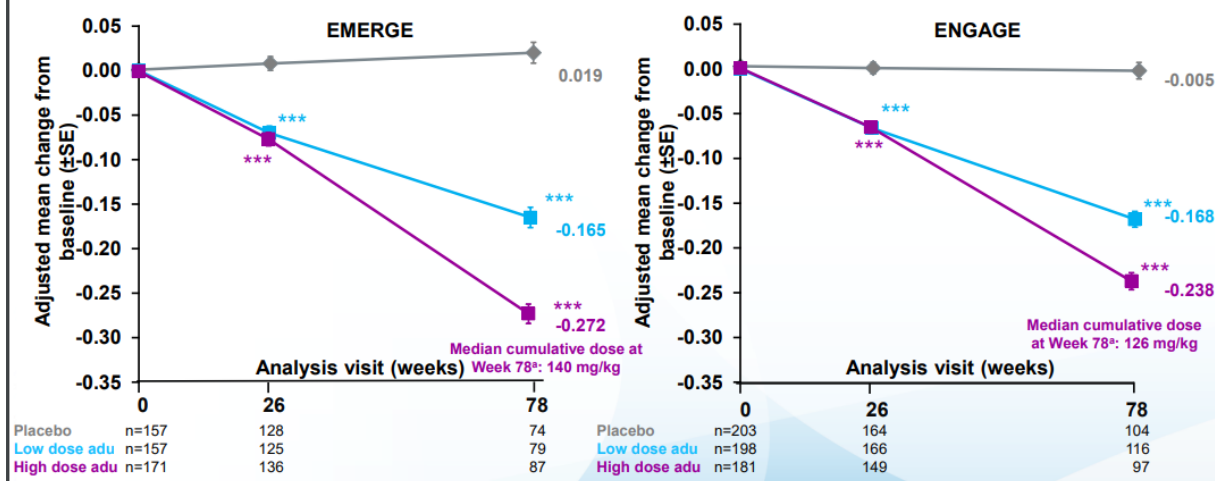
Ispitivanja su pokazala da visoke doze ADUCANUMABA smanjuju ukupni broj i veličini Aβ plakova u bolesnika u odnosu na placebo (Slika 12.).



*Slika 12. PET slika mozga prije početka istraživanja i jedne godine nakon istraživanja. Crvena polja – Aβ plakovi [27]*

Pacijenti koji su primali niske doze lijeka iskusili su smanjenje amiloidnog PET SUVR-a od 0,165 odnosno 0,168. Pacijenti koji su primili visoke doze ADUCANUMABA iskusili su smanjenje amiloidnog PET SUVR-a od 0,272 odnosno 0,238 (Slika 13.). U usporedbi s drugim monoklonskim protutijelima, ADUCANUMAB je jedino razvijeno monoklonsko anti-Aβ protutijelo za koje se pokazalo da značajno smanjuje Aβ PET SUVR u kliničkim ispitivanjima faze III [28].

## Longitudinal change from baseline in amyloid PET SUVR



Slika 13. Promjene PET SUVR-a u ispitanika tijekom Emerge i Engage ispitivanja [29]

Rezultati studije Emerge također pokazuju poboljšanje kognitivne i fizikalne funkcije oboljelih, uključujući neuropsihijatrijski inventar (*eng. neuropsychiatric inventory (NPI)*). Ova je studija pokazala prosječno smanjenje od 87% u odnosu na početnu vrijednost NPI-a, a njihovi njegovatelji prijavili su smanjenje stresa od 84%. ADUCANUMAB je ublažio gubitak sposobnosti za obavljanje obveza iz svakodnevnog života za 40 % za razliku od placebo. Zabilježene nuspojave u ovome ispitivanju su bile glavobolja, proljev, simptomi slični prehladi ali i ARIA.

Oba ispitivanja su prekinuta u ožujku 2019. zbog neuspjeha u značajnom poboljšanju simptoma AZ bolesti. Ni Engage ni Emerge ispitivanja nisu pokazala značajno poboljšanje u kliničkom rejtingu demencije (*eng. clinical dementia rating (CDR-SB)*). Studija iz 2019. je utvrdila da lijek za liječenje AZ bolesti mora pokazati prosječnu razliku od najmanje 1 boda u CDR-SB za pacijente s MCI i 2 boda za pacijente s blagim AD-om. Na temelju podataka koje je tvrtka Biogen objavila 22. listopada 2019. godine, rezultati skupina s visokim dozama u obe studije nisu postigli razliku od 1 boda. Ova poboljšanja ukazuju na to da bi ADUCANUMAB mogao poboljšati kogniciju i svakodnevni život u pacijenata s MCI ili

blagim oblikom AZ bolesti, međutim, veličina dobrobiti ovog lijeka može biti samo statistički značajna, a ne klinički značajna [25].

## 8. Zaključak

Alzheimerova bolest predstavlja zaista veliki problem u zdravstvenom sustavu, a starenjem svjetske populacije ona postaje sve učestalija. Najveći problem ove bolesti je njena detekcija, jer su u ranom stadiju bolesti, simptomi gotovo neuočljivi dok u kasnijim stadijima simptomi postaju jasniji i teži. Upravo u kasnijem stadiju, kad se bolest može lakše detektirati, liječenje postaje sve teže i neuspješnije. Progresiju ove bolesti bi doslovce slikovno prikazao kao eksponencionalnu funkciju gdje se na x osi nalazi vrijeme a na y osi nalazi jačina simptoma, u eksponencionalnom je rastu. Mislim da bi se, uz lijekove koji usporavaju progresiju bolesti, trebale razviti nove metode ranog otkrivanja ove bolesti kako bi budući i sadašnji lijekovi bili što učinkovitiji. Što se tiče liječenja, budućnost vidim u monoklonskim protutijelima tipa ADUCANUMAB, na kojemu sam bazirao ovaj rad. ADUCANUMAB je zaista inovativan i zanimljiv lijek ali nažalost nije ostvario veliki uspjeh. Pokazao je izvrsne rezultate u smanjivanju broja i veličine A $\beta$  plakova te u ponovnim uspostavljanjem neuronske propusnosti kalcija, no ovi su rezultati samo od statističke važnosti. Mislim da ovaj lijek nije u potpunosti promašaj jer je dao velik broj statistički značajnih podataka koji se mogu iskoristiti za daljnje razvijanje sličnih lijekova protiv AZ bolesti. Treba se nastaviti sa proučavanjem monoklonskih protutijela, ne samo kao terapije za AZ bolesti, nego i drugih neurodegenerativnih bolesti. Monoklonska protutijela pokazuju velik potencijal kao što su specifičnost vezanja i efikasan prolazak krvno moždane barijere, stoga mislim da ova vrsta liječenja predstavlja budućnost u terapiji neurodegenerativnih bolesti i njima sličih.



## 9. Literatura

- 1 Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*. 2018; **7**. doi:10.12688/f1000research.14506.1.
- 2 Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *www.thelancet.com*; **377**: 1019–1050.
- 3 Panza F, Lozupone M, Logroscino G, Imbimbo BP. A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 2018 **15**:2 2019; **15**: 73–88.
- 4 Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-Aspartate receptors, tau protein and other risk factors. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. 2017; **15**: 1–8.
- 5 Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America* 2019; **103**: 263–293.
- 6 Stages of Alzheimers - Penn Medicine. <https://www.pennmedicine.org/updates/blogs/neuroscience-blog/2019/november/stages-of-alzheimers> (accessed 11 Jun2024).
- 7 Why are women more likely to develop Alzheimer's disease? - Harvard Health. <https://www.health.harvard.edu/blog/why-are-women-more-likely-to-develop-alzheimers-disease-202201202672> (accessed 11 Jun2024).
- 8 Obaid RJ, Naeem N, Mughal EU, Al-Rooqi MM, Sadiq A, Jassas RS *et al*. Inhibitory potential of nitrogen, oxygen and sulfur containing heterocyclic scaffolds against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. 2022. doi:10.1039/d2ra03081k.
- 9 Sarkar B, Alam S, Rajib TK, Islam SS, Araf Y, Ullah MA. Identification of the most potent acetylcholinesterase inhibitors from plants for possible treatment of Alzheimer's disease: a computational approach. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2021; **22**: 1–20.
- 10 Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev*. 2003; **9**: 275–308.
- 11 Aisen P, Cummings J, Doody R, Kramer L, Salloway S, Selkoe D *et al*. CTAD Task Force Paper The Future of Anti-Amyloid Trials. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease-JPAD*; **7**: 2020.
- 12 Ansar W, Ghosh S. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. *Indian Journal of Clinical Medicine* 2013; **4**: IJCM.S11968.
- 13 Laccourreye O, Maisonneuve H. French scientific medical journals confronted by developments in medical writing and the transformation of the medical press. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2019; **136**: 475–480.
- 14 Mendive-Tapia L, Wang J, Vendrell M, Mcallister TE, Coleman OD, Roper G *et al*. Designing stapled peptides to inhibit protein-protein interactions: An analysis of successes in a rapidly changing field. *Peptide Science* 2021; **113**: e24191.
- 15 Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry* 2008; **283**: 29615–29619.

- 16 O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 2011; **34**: 185–204.
- 17 Tan JZA, Gleeson PA. The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2019; **1861**: 697–712.
- 18 Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2014; **129**: 756.
- 19 Frost C V., Zacharias M. From monomer to fibril: A $\beta$ -amyloid binding to Aducanumab antibody studied by molecular dynamics simulation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2020; **88**: 1592–1606.
- 20 Arndt JW, Qian F, Smith BA, Quan C, Kilambi KP, Bush MW *et al.* Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid- $\beta$ . *Sci Rep* 2018; **8**. doi:10.1038/S41598-018-24501-0.
- 21 Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The structure of a typical antibody molecule. 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/> (accessed 12 Jun2024).
- 22 Ali R, Gupta G Das, Chawla PA. Aducanumab: A new hope in Alzheimer's disease. *Health Sciences Review* 2022; **4**: 100039.
- 23 Chaurasiya A, Katke S, Panchal K, Nirmal J. Biologics for the management of dementia. *Nanomedicine-Based Approaches for the Treatment of Dementia* 2023; : 193–234.
- 24 In Mice, Aducanumab Neutralizes A $\beta$  Seeds | ALZFORUM. <https://www.alzforum.org/news/research-news/mice-aducanumab-neutralizes-av-seeds> (accessed 13 Jun2024).
- 25 Haddad HW, Malone GW, Comardelle NJ, Degueure AE, Kaye AM, Kaye AD. Aducanumab, a Novel Anti-Amyloid Monoclonal Antibody, for the Treatment of Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review. *Health Psychol Res* 2022; **10**: 2022.
- 26 Haeberlein SB, Gheuens S, Chen T, O'gorman J, Von Rosenstiel P, Chiao P *et al.* Aducanumab 36-Month Data From PRIME: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1b Study in Patients With Prodromal or Mild Alzheimer's Disease. .
- 27 van Dyck CH. Anti-Amyloid- $\beta$  Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry*. 2018; **83**: 311–319.
- 28 Budd Haeberlein S, Aisen PS, Barkhof F, Chalkias S, Chen T, Cohen S *et al.* Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 2022; **9**: 197–210.
- 29 Haeberlein SB, Von Hehn C, Tian Y, Chalkias S, Muralidharan KK, Chen T *et al.* EMERGE and ENGAGE Topline Results: Two Phase 3 Studies to Evaluate Aducanumab in Patients With Early Alzheimer's Disease. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02477800>.

# Životopis

## OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Marko Pranjić
Mobilni	+385 91 907 8903
Elektronička pošta	marko.pranjic@student.uniri.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	16.01.2003.

## PRAKTIČNO ISKUSTVO

Period	4.9.2023.-15.9.2023.
Mjesto	Rijeka
Ustanova zaposlenja	HALMED
Naziv radnog mjesta	Praktikant
Funkcija	Sudjelovanje na predavanjima i svakodnevnom radu u laboratoriju, upoznavanje sa svim odjelima institucije

## ŠKOLOVANJE

Period	2021.-2024.
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci (FABRI)
Zvanje	univ. bacc. biotechn. et pharm. inv.

Period	2017./2021.
Mjesto	Bjelovar
Ustanova	Gimnazija Bjelovar
Zvanje	Srednja stručna sprema

## Volontiranje

### **Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci (FABRI)**

#### **Projekt student mentor Odjela za Biotehnologiju 2022. –2023.**

**Dan otvorenih vrata 2022.-** izvođenje pokusa u radionici „šarenilo kemije“

**Dan otvorenih vrata 2023.-** izvođenje pokusa u radionici „šarenilo kemije“

### **OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE**

Materinji jezik 

Hrvatski
----------

#### Strani jezici

Jezik	Engleski
Govori	Izvrсно
Piše	Izvrсно
Čita	Izvrсно

Jezik	Njemački
Govori	Izvrсно
Piše	Izvrсно
Čita	Izvrсно

<b>TEHNIČKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI</b>	Poznavanje paketa Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) Poznavanje programa povezanih sa kemijom (Avogadro)
--------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI</b>	Fleksibilnost i komunikativnost
---------------------------------------------	---------------------------------

<b>ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE</b>	Iznimno dobre vještine organizacije te dobro iskustvo rada u timu
-------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------

<b>VOZAČKA DOZVOLA</b>	B Kategorija
------------------------	--------------