

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**



**UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Farmacia**  
**EVOLUZIONE NELLA TERAPIA DELLA MALATTIA**  
**DI ALZHEIMER: DAGLI INIBITORI**  
**DELL'ACETILCOLINESTERASI AGLI ANTICORPI**  
**MONOCLONALI**

Relatore: **Prof.ssa Mariagrazia Grilli**

Correlatore: **Dott.ssa Emanuela Pessolano**

Candidato: **Chiara Zanchetta**

Matricola: **20031586**

**Sessione autunnale Anno Accademico 2023-24**



*“Scegliete la strada più difficile, più faticosa, possibilmente in salita.*

*Perché è dall’alto che si gode il panorama migliore.”*

*E. Brignano*

*A Nonna Pinuccia, Mamma e Papà*



# Indice

<b>Lista delle abbreviazioni</b>	<b>vii</b>
<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1 La malattia di Alzheimer</b>	<b>3</b>
1.1 Introduzione . . . . .	3
1.2 Storia ed epidemiologia . . . . .	3
1.3 Diagnosi della patologia e manifestazioni cliniche . . . . .	4
1.4 Caratteristiche neuropatologiche e patogenesi . . . . .	9
1.4.1 Alterazione del sistema colinergico . . . . .	9
1.4.2 Sovrastimolazione dei recettori NMDA . . . . .	11
1.4.3 Aggregazione del peptide $\beta$ -amiloide . . . . .	12
1.4.4 Grovigli neurofibrillari . . . . .	14
1.4.5 Stress ossidativo . . . . .	16
1.4.6 Alta concentrazione di metalli pesanti . . . . .	18
1.4.7 Fattori genetici e forme familiari . . . . .	18
1.4.8 Neuroinfiammazione . . . . .	19
<b>2 Terapie convenzionali</b>	<b>23</b>
2.1 Inibitori dell'acetilcolinesterasi . . . . .	23
2.1.1 Tacrina . . . . .	24
2.1.2 Donepezil . . . . .	26
2.1.3 Rivastigmina . . . . .	28
2.1.4 Galantamina . . . . .	30
2.1.5 Memogain . . . . .	33

2.2	Antagonisti del recettore NMDA . . . . .	33
2.2.1	Memantina . . . . .	34
<b>3</b>	<b>DMTs (disease modifying therapies) e insuccessi</b>	<b>37</b>
3.1	Molecole che inibiscono la formazione del peptide $A\beta$ . . . . .	37
3.1.1	Modulatori della $\alpha$ -secretasi . . . . .	38
3.1.1.1	Etazolato . . . . .	38
3.1.1.2	PRX-03140 . . . . .	39
3.1.1.3	APH-1105 e ID1201 – in fase di studio . . . . .	39
3.1.2	Modulatori della $\beta$ secretasi . . . . .	39
3.1.2.1	Curcumina . . . . .	40
3.1.2.2	Asiaticoside . . . . .	40
3.1.2.3	Triptolide . . . . .	41
3.1.2.4	Inibitori BACE-1 . . . . .	41
3.1.3	Inibitori delle $\gamma$ -secretasi . . . . .	43
3.1.3.1	Inibitori di prima generazione . . . . .	44
3.1.3.2	Semagacestat . . . . .	44
3.1.3.3	BMS-299897 . . . . .	45
3.1.3.4	Pinitolo . . . . .	45
3.1.4	Antiaggreganti della proteina $A\beta$ . . . . .	46
3.1.4.1	ELND005 . . . . .	46
3.1.4.2	KLVFF . . . . .	46
3.1.4.3	$\gamma$ -AA26 . . . . .	46
3.1.4.4	Tramiprosato . . . . .	47
3.1.4.5	Resveratrolo . . . . .	47
3.1.5	Chelanti metallici . . . . .	47
3.1.5.1	Deferiprone . . . . .	47
3.1.5.2	PBT2 . . . . .	48
3.2	Farmaci bloccanti la fosforilazione e aggregazione della proteina Tau . . . . .	49
3.2.1	Inibitori delle chinasi . . . . .	49
3.2.1.1	Tideglusib . . . . .	50
3.2.1.2	Saracatinib . . . . .	51

3.2.2	Inibitori dell'aggregazione di Tau . . . . .	52
3.2.2.1	Blu di Metilene . . . . .	52
3.2.2.2	Idrometiltionina (LMTX) . . . . .	52
3.2.3	Stabilizzatori dei microtubuli . . . . .	53
3.2.3.1	Davunetide . . . . .	53
3.2.3.2	TPI-287 . . . . .	53
3.2.3.3	BIIB080 . . . . .	54
3.3	L'immunoterapia . . . . .	54
3.3.1	Immunoterapia attiva . . . . .	55
3.3.1.1	Vaccini anti- $A\beta$ . . . . .	55
3.3.1.2	Vaccini anti-Tau: AADvac1 . . . . .	56
3.3.2	Immunoterapia passiva . . . . .	57
<b>4</b>	<b>Gli anticorpi monoclonali nella terapia di Alzheimer</b>	<b>59</b>
4.1	Introduzione . . . . .	59
4.1.1	Struttura . . . . .	59
4.1.2	Produzione . . . . .	61
4.1.3	Perché si usano i mAbs? . . . . .	62
4.1.4	Meccanismo di azione . . . . .	63
4.1.5	Effetti tossici . . . . .	64
4.1.6	Classificazione . . . . .	64
4.2	mAbs anti- $A\beta$ e anti-Tau . . . . .	66
4.2.1	mAbs anti- $A\beta$ . . . . .	66
4.2.1.1	Aducanumab . . . . .	66
4.2.1.2	Lecanemab . . . . .	68
4.2.1.3	Donanemab . . . . .	71
4.2.1.4	Limiti del trattamento con mAbs anti- $A\beta$ . . . . .	73
4.2.1.5	Come rendere più efficienti gli studi del trattamento con mAbs anti- $A\beta$ ? . . . . .	74
4.2.2	mAbs anti-Tau . . . . .	74
4.2.2.1	Gosuranemab . . . . .	74
4.2.2.2	Semoranemab . . . . .	75

4.2.2.3	Bepranemab . . . . .	76
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>79</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>81</b>
	<b>Ringraziamenti</b>	<b>101</b>

# Lista delle abbreviazioni

ACh	Acetylcholine (Acetilcolina)
AChE	Acetylcholinesterase (Enzima acetilcolinesterasi)
AD	Alzheimer's Dementia (Malattia di Alzheimer)
ADA	Anti-drug antibodies (Anticorpo anti-farmaco)
ADCC	Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente)
AMPK	AMP-activated protein Kinase (Chinasi AMP-attivata)
APOE	Apolipoproteina E
APP	Amyloid Precursor Protein (Proteina precursore della beta amiloide)
ARIA	Amyloid-related imaging abnormalities (Anomalie da imaging correlate all'amiloide)
$A\beta$	Beta amyloid (Beta amiloide)
BACE-1	Beta site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (Beta-secretasi 1)
BEE	Blood brain barrier (Barriera ematoencefalica)
BuChE	Butyrylcholinesterase enzyme (Enzima butirrilcolinesterasi)
CDC	Complement-dependent cytotoxicity (Citotossicità complemento dipendente)
Cdk-5	Cyclin-dependent kinase 5 (Chinasi ciclina dipendente 5)
CDR	Complementarity Determining Regions (Regioni determinanti la complementarità)
ChAT	Choline acetyltransferase (Enzima colina acetiltransferasi)
CSF	Cerebral Spinal Fluid (Liquido cefalorachidiano)
DHCR24	3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta$ 24 reductase (3-beta-idrossisterolo delta 24-reduttasi)
DMTs	Disease modifying therapies (Terapie modificanti la malattia)
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Gamma-aminobutyric acid (Acido gamma-amminobutirrico)

GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ (Chinasi glicogenosintasi 3 $\beta$ )
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (Ipoxantina-amminopterin-timidina)
HC	Heavy chains (Catene pesanti)
KLH	Keyhole limpet hemocyanin (Emocianina della Megathura Crenula)
LC	Light chains (Catene leggere)
LDL	Low density lipoprotein (Lipoproteine a bassa densità)
mAbs	Monoclonal antibody (Anticorpi monoclonali)
MAD	Multiple ascending dose (Dosi multiple ascendenti)
MCI	Mild cognitive impairment (Disturbo cognitivo lieve)
MRI	Magnetic Resonance Imaging (Risonanza magnetica)
NHS	National Health Service (Sistema sanitario nazionale del Regno Unito)
NMDA	N-methyl-D-aspartate (N-metil-D-aspartato)
NO	Nitric oxide (Ossido nitrico)
PEG	Polyethylene glycol (Polietilenglicole)
PET	Positron Emission Tomography (Tomografia a emissioni di positroni)
PS1	Preseniline 1
PS2	Preseniline 2
RNS	Reactive nitrogen species (Specie reattive dell'azoto)
ROS	Reactive oxygen species (Specie reattive dell'ossigeno)
SAD	Single ascending dose (Dose singola ascendente)
SPECT	Single-photon emission computed tomography (Tomografia a emissione di fotone singolo)
TAIs	Tau aggregation inhibitors (Inibitori dell'aggregazione di Tau)
TC	Computed Tomography (Tomografia computerizzata)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fattore di necrosi tumorale)

# Introduzione

Il morbo di Alzheimer (AD) rappresenta una delle sfide più complesse per la medicina moderna, essendo la forma più comune di demenza e colpendo milioni di persone in tutto il mondo. La progressiva perdita delle funzioni cognitive, l'insorgenza di deficit di memoria e il deterioramento delle capacità funzionali sono tra i sintomi distintivi di questa malattia, la cui prevalenza è in costante crescita con l'invecchiamento della popolazione globale.

Il **Capitolo 1** di questa tesi fornirà un'introduzione alla malattia di Alzheimer, con una panoramica storica ed epidemiologica, per poi approfondire le manifestazioni cliniche e le caratteristiche neuropatologiche che sottendono la demenza associata alla patologia.

Nel **Capitolo 2**, si affronteranno le terapie convenzionali utilizzate in clinica, con particolare attenzione agli inibitori dell'acetilcolinesterasi (tacrina, donepezil, rivastigmina galantamina e Memogain) e agli antagonisti dei recettori NMDA, come la memantina. Questi farmaci saranno analizzati dal punto di vista farmacodinamico e farmacocinetico, evidenziando i benefici e i loro limiti.

Il **Capitolo 3** approfondirà le Disease Modifying Therapies, ovvero terapie innovative mirate a modificare il decorso della malattia. Verranno esaminate molecole in grado di interferire con la formazione della proteina  $\beta$ -amiloide, di bloccare la fosforilazione della proteina Tau, e vaccini, offrendo un potenziale approccio per alterare l'evoluzione della malattia.

Infine, un'attenzione particolare sarà dedicata agli anticorpi monoclonali (**Capitolo 4**), una frontiera terapeutica emergente per la malattia di Alzheimer. Verranno prima introdotti brevemente, descrivendo la loro struttura e la loro produzione e successivamente verranno descritti in modo analitico anticorpi contro il  $\beta$ -amiloide: aducanumab, lecanemab e donanemab, e anticorpi contro la proteina Tau: gosuranemab, semorinemab e

bepranemab, mettendo in luce i loro trials clinici e i rispettivi risultati.

L'obiettivo di questa tesi è fornire una visione d'insieme dell'evoluzione delle terapie per la malattia di Alzheimer, con particolare attenzione ai progressi più recenti, per contribuire alla comprensione di una malattia complessa che promette nuove speranze grazie alle frontiere della ricerca biotecnologica.

# Capitolo 1

## La malattia di Alzheimer

### 1.1 Introduzione

La malattia di Alzheimer (Alzheimer's Dementia, AD) è una patologia neurodegenerativa del sistema nervoso centrale, responsabile del 60-70% di tutte le forme di demenza (Fratiglioni et al., 2007).

L'AD può essere sia di natura genetica che sporadica, caratterizzata da un esordio insidioso e da un progressivo deterioramento delle funzioni comportamentali e cognitive, tra cui disturbi della memoria, afasia (difficoltà nel linguaggio), aprassia (difficoltà nell'eseguire movimenti) e agnosia (incapacità di riconoscere oggetti, persone, luoghi, suoni) (Vakkila and Jehkonen, 2023). Oltre che a rappresentare un problema medico, questa malattia costituisce anche un'importante questione sociale, poiché causa disagi notevoli sia a pazienti che ai loro *caregiver*, e innalza i costi sanitari (Fratiglioni et al., 2007).

### 1.2 Storia ed epidemiologia

La malattia di Alzheimer prende il nome da uno psichiatra, Alois Alzheimer, al quale, nel 1906, fu affidata una paziente di nome Auguste, di 51 anni. La donna manifestava allucinazioni uditive e convinzioni paranoiche e Alzheimer decise di presentare il suo caso alla Convenzione psichiatrica di Tubinga, ma la malattia ricevette un nome solo quattro anni dopo, grazie alla pubblicazione di uno psichiatra tedesco, Emil Kraepelin, del trattato

“Psichiatria”. All’interno Kraepelin definì la malattia di Auguste “morbo di Alzheimer”. (Scaccabarozzi, “KOS. Storia della medicina”, 2022).

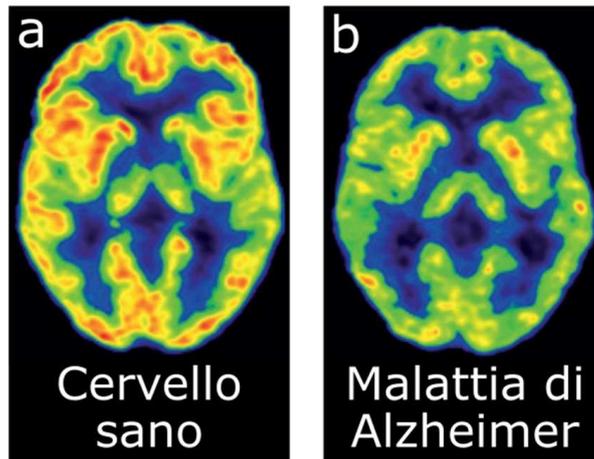
Un contributo significativo alla caratterizzazione della patologia venne da un giovane ricercatore italiano, Gaetano Perusini (1879-1915), che insieme ad altri colleghi, si dedicò allo studio anatomico della malattia. Questo approccio si opponeva alle in contrasto alle teorie prevalenti dell’epoca, che attribuivano tali disturbi a cause psicoanalitiche piuttosto che a cause organiche (Montenero and Milani, 2019).

In Europa il morbo di Alzheimer rappresenta circa il 54% di tutte le demenze e colpisce il 4,4% della popolazione sopra i 65 anni di età. La frequenza della malattia aumenta progressivamente con l’età, con un’incidenza maggiore tra le donne. Tra loro, infatti, la prevalenza varia dallo 0,7% per la fascia di età 65-69 anni fino al 23,6% tra le ultranovantenni; invece, negli uomini i tassi sono più bassi (da 0,6% al 17,1% nella stessa fascia d’età avanzata). I tassi di incidenza del morbo di Alzheimer in Europa evidenziano una crescita marcata con l’età. Negli uomini l’incidenza parte da 0,9 casi per 1.000 persone/anno tra i 65-69 anni a 20 casi per 1.000 persone/anno per quelli con età superiore ai 90 anni. Nelle donne, l’incidenza è più alta: varia da 2,2 casi per 1.000 persone/anno nella fascia d’età 65-69 anni a 69,7 casi per 1.000 persone/anno per le ultranovantenni. Nella demenza da AD concorrono diversi fattori di rischio, che includono componenti genetiche e biologiche (Zhang et al., 2021).

### **1.3 Diagnosi della patologia e manifestazioni cliniche**

Esaminando il cervello di Auguste, la paziente sopra citata, furono riscontrate delle caratteristiche istologiche che oggi sono usate nella diagnosi definitiva della malattia: perdita neuronale, la presenza di placche amiloidi e di grovigli neurofibrillari (Huang, 2023). È stata proprio la scoperta dell’AD a segnare l’inizio del pensiero secondo il quale le difficoltà di apprendimento e deficit della memoria non sono parte del normale processo di invecchiamento ma sono dovuti a un processo patologico specifico. I neuroni colpiti da alterazioni funzionali si trovano in varie aree del cervello come:

- la corteccia cerebrale, area coinvolta nella formazione del pensiero e del linguaggio;
- i gangli della base;



**Figura 1.1:** Scansione PET di un cervello a) sano e b) affetto da malattia di Alzheimer. Questa scansione è stata effettuata tramite SV2A-PET che ha come mezzo di contrasto la glicoproteina sinaptica SV2A, presente nelle vescicole secretorie delle cellule endocrine e presinaptiche. Un calo della concentrazione di questa glicoproteina è indicazione di degenerazione neurologica. La figura a) mostra un cervello con un'attività cerebrale normale, con un consumo uniforme di glucosio in tutte le aree; i colori sono distribuiti in modo omogeneo (giallo-rosso indicano aree di alta attività, mentre blu-verde aree di bassa attività). La figura b) presenta dei colori meno intensi, con una prevalenza di toni blu-verdi, che indicano una ridotta attività cerebrale. Adattata da (Chételat et al., 2020)

- l'ippocampo.

L'AD può essere classificata in varie forme in base al periodo di insorgenza. Sono state suddivise in: (Huang, 2023)

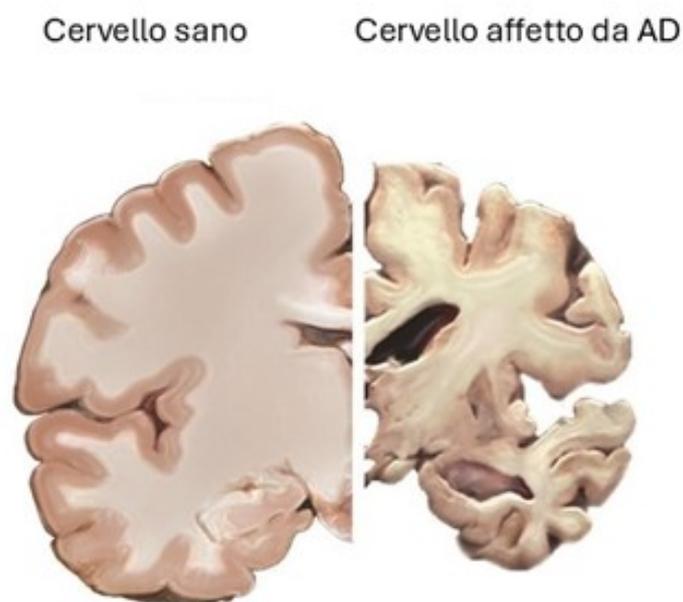
- **Forme sporadiche ad insorgenza tardiva:** sono le più comuni e comprendono circa il 90% dei casi, e non hanno cause ben definite. La durata media dall'insorgenza dei sintomi alla morte è compresa tra i 7 e i 10 anni. Tra i fattori eziologici per queste forme ci sono i virus, insufficienze circolatorie croniche, traumi cranici e l'invecchiamento che è considerato come il fattore di rischio più rilevante.
- **Forme familiari, caratterizzate da mutazioni genetiche:** a insorgenza precoce e a insorgenza tardiva;
- **Forma associata alla sindrome di Down.**

L'evoluzione della malattia si può riassumere in quattro fasi: (Balducci, 2022)

1. **Fase di pre-demenza.** È stata denominata “mild cognitive impairment”, abbreviato come MCI: è una fase di transizione tra l'invecchiamento normale e la demenza. Se la perdita di memoria è predominante, viene chiamata “MCI amnesica”. Uno dei primi sintomi è la difficoltà nel ricordare fatti recenti e l'incapacità di acquisire nuove informazioni. Altri sintomi frequenti includono lievi deficit nell'attenzione e difficoltà con la memoria semantica. Il sintomo neuropsichiatrico che rimane per tutto il decorso della malattia è l'apatia, accompagnata a stati depressivi e irritabilità.
2. **Fase iniziale.** Durante questa fase si assiste alla diminuzione della capacità di coordinazione muscolare dei piccoli movimenti e anche a una crescente compromissione nell'apprendimento e nella memoria. I pazienti possono avere una certa difficoltà nello scrivere, nel disegnare e persino nel vestirsi. Dal punto di vista linguistico, si nota un impoverimento del vocabolario e una diminuzione della fluidità del parlato.
3. **Fase intermedia.** Con l'avanzare della malattia, l'indipendenza dei soggetti viene seriamente compromessa, rendendo difficile lo svolgimento delle attività quotidiane. I pazienti di frequente usano parafrasi, cioè, sostituiscono parole con termini errati; mentre a livello motorio, si verifica una perdita di coordinazione e un aumento delle cadute. Anche la memoria lungo termine, che era inizialmente preservata, comincia a deteriorarsi. Comportamenti come irritabilità, rabbia e crisi di pianto diventano comuni.
4. **Fase finale.** Il linguaggio è ridotto a semplici frasi o parole, fino alla completa perdita della parola. La massa muscolare e la mobilità si deteriorano al punto in cui i pazienti sono costretti a letto e incapaci di nutrirsi. L'evoluzione della patologia varia da persona a persona, sia per quanto riguarda l'insorgenza dei sintomi sia per la velocità della progressione della malattia.

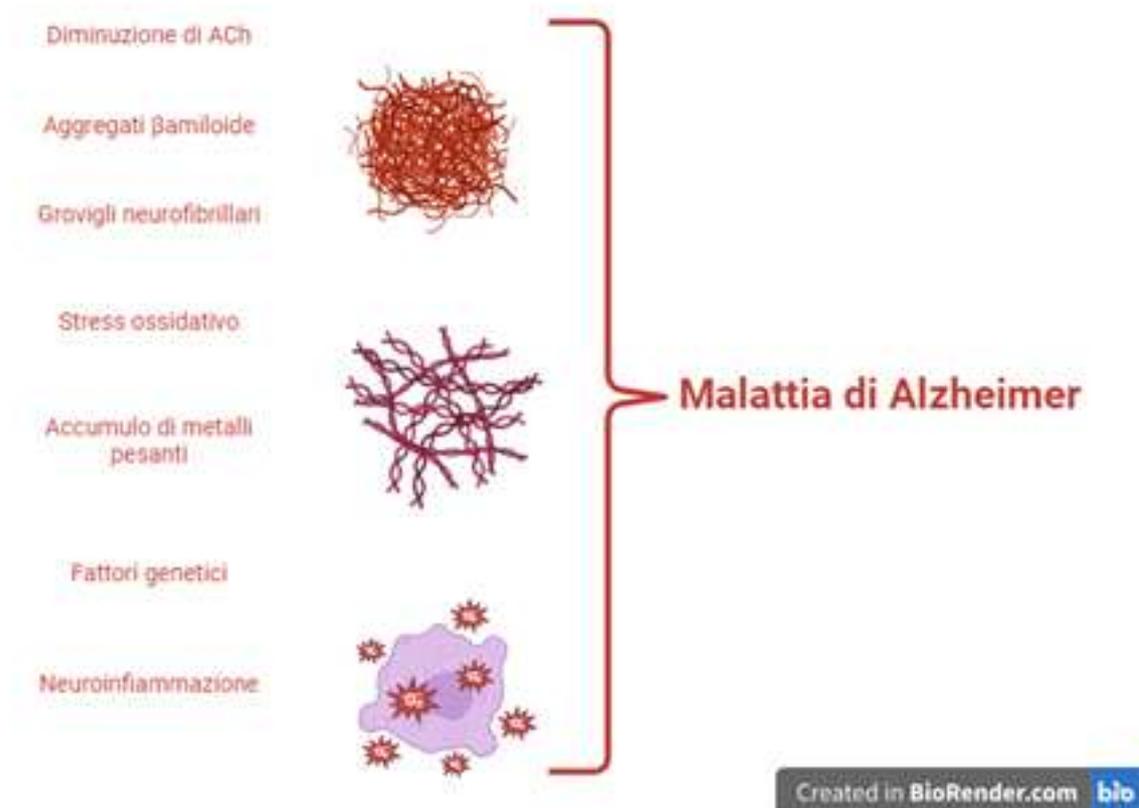
Diagnosticare il morbo di Alzheimer è complesso e richiede un esame medico approfondito che comprende l'anamnesi familiare, esami neurologici, *imaging* del cervello, esami del sangue e test cognitivi per la valutazione della memoria. La tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica (MRI), la tomografia a emissione di fotone singolo (SPECT) e la tomografia a emissione di positroni (PET) (Fig.1) sono

delle tecniche avanzate di *imaging* usate per escludere altre patologie cerebrali o altre forme di demenza. Tuttavia, la conferma istopatologica della diagnosi di AD è possibile ottenerla solo *post-mortem*, attraverso un'analisi istopatologica del tessuto cerebrale (Fig. 1.1).



**Figura 1.2:** Confronto tra un cervello sano e uno affetto da Alzheimer. Nel cervello affetto da AD si può notare una riduzione del volume cerebrale, e il cervello appare più piccolo rispetto a quello sano; inoltre, i solchi diventano più profondi a causa della riduzione del volume e i ventricoli si dilatano perché la massa cerebrale si riduce. Adattata da Alzheimer's Association, 2024.

A livello morfologico la caratteristica macroscopica più evidente nel cervello di un paziente affetto da Alzheimer è la marcata atrofia che determina un aumento dell'ampiezza dei solchi cerebrali e l'incremento del volume ventricolare (Fig. 1.2). L'atrofia appare diffusa, e interessa, oltre al lobo temporale, anche l'ippocampo e le aree associative corticali (Kon et al., 2024).



**Figura 1.3:** Rappresentazione grafica della patogenesi della malattia di Alzheimer. In figura sono descritte le caratteristiche neuropatologiche della malattia e sono raffigurati in particolare aggregati  $\beta$ -amiloide, grovigli neurofibrillari e stress ossidativo. Creata con BioRender.com.

## 1.4 Caratteristiche neuropatologiche e patogenesi

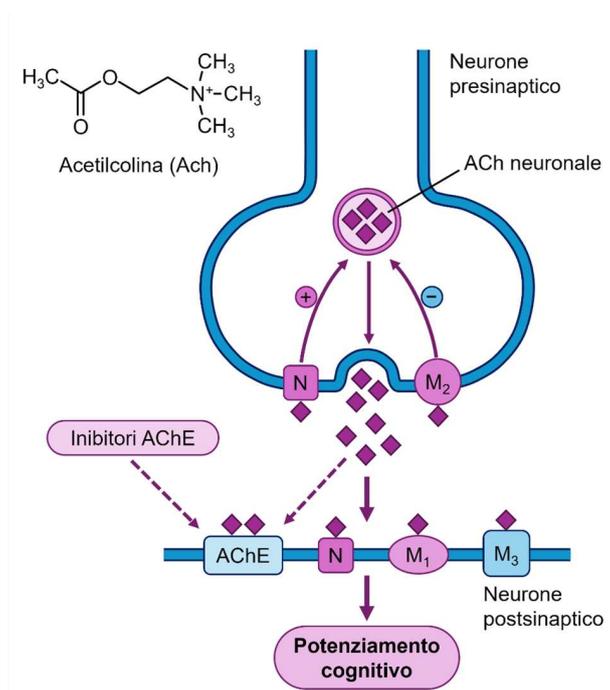
Le caratteristiche neuropatologiche che stanno alla base della malattia di Alzheimer sono (Fig. 1.3):

- alterazione del sistema colinergico con riduzione dei livelli di acetilcolina;
- sovrastimolazione dei recettori NMDA;
- formazione di aggregati di  $\beta$ -amiloide;
- formazione di grovigli neurofibrillari intracellulari;
- stress ossidativo;
- alta concentrazione di metalli pesanti;
- fattori genetici e forme familiari.

### 1.4.1 Alterazione del sistema colinergico

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che svolge un ruolo chiave nel sistema nervoso centrale e periferico. La sua sintesi avviene grazie all'enzima colinacetiltransferasi, che catalizza la reazione tra colina e acetil-CoA. Una volta prodotta, l'ACh viene immagazzinata in due forme: vescicolare, pronta per essere rilasciata nello spazio sinaptico, e citoplasmatica. Il rilascio di ACh nella fessura sinaptica permette l'interazione con due tipi di recettori colinergici: muscarinici e nicotinici. Questi recettori sono presenti sia a livello pre-sinaptico che post-sinaptico e possono mediare effetti sia eccitatori che inibitori, in base al contesto fisiologico e al tipo di recettore attivato. La degradazione dell'ACh è rapida e avviene grazie a AChE, che scinde l'ACh in colina e acetato. La colina viene poi ricaptata dal terminale presinaptico e usata nuovamente per la sintesi del neurotrasmettitore (Brunton et al., 2019) (Fig. 1.4).

La malattia di Alzheimer si distingue per una significativa diminuzione della concentrazione e della funzionalità dell'acetilcolina. Questo deficit, insieme anche alla perdita di neuroni colinergici e alla riduzione dell'attività dell'acetilcolinesterasi, evidenzia l'importanza dell'ipotesi colinergica nell'insorgenza della patologia.



**Figura 1.4:** Meccanismi d'azione del neurotrasmettitore acetilcolina (ACh) nelle sinapsi colinergiche. L'acetilcolina prodotta viene rilasciata nello spazio sinaptico e può agire sui recettori muscarinici ( $M_1$  e  $M_3$ ) e sui recettori nicotinici (N) che si trovano sia a livello pre-sinaptico che post-sinaptico. L'acetilcolina poi viene scissa ad opera di AChE, in colina ed acetato.

## 1.4.2 Sovrastimolazione dei recettori NMDA

I recettori NMDA appartengono alla classe dei recettori ionotropici del glutammato. Sono chiamati così in base al ligando selettivo: l'N-metil-D aspartato. Hanno una cinetica molto più lenta (nell'ordine di centinaia di millisecondi) dei recettori AMPA e KA (che sono due classi di recettori ionotropici del glutammato).

I recettori NMDA sono eteromeri costituiti dalla combinazione di numerose subunità; hanno una permeabilità elevata al  $\text{Ca}^{2+}$  e sono bloccati dal  $\text{Mg}^{2+}$  con un meccanismo voltaggio-dipendente.

Sono state clonate le subunità: NR1, NR2A-D e NR3A-B. La subunità NR1 è sempre presente in tutti i recettori NMDA. Questa subunità è caratterizzata dalla sequenza di aminoacidi che delimita la parete del canale dove sono presenti i siti di asparagina che lo rendono altamente permeabile al calcio e gli conferiscono la capacità di legare gli ioni magnesio. Questo è importante perché, affinché avvenga una depolarizzazione, è necessario che il calcio entri e che vengano spiazzati gli ioni magnesio dal canale occupato dal calcio (Brunton et al., 2019).

Per essere attivato è necessario:

- il legame al recettore NMDA del ligando.
- il legame della glicina al sito allosterico (e quindi ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$ , e conseguente depolarizzazione).
- la rimozione degli ioni  $\text{Mg}^{2+}$ , grazie alla presenza dei recettori AMPA a cinetica rapida, che favoriscono un ingresso rapido di  $\text{Na}^+$  e di  $\text{Ca}^{2+}$  che induce una depolarizzazione rapida della membrana, che a sua volta permette la rimozione degli ioni magnesio.

È presente anche un quarto sito di legame per gli antagonisti non competitivi (che bloccano il poro del canale), e un quinto sito che lega lo zinco e un sesto sito che lega le poliamine (come la spermina e la putrescina) (Mony and Paoletti, 2023).

Anche il sistema NMDA ha un ruolo importante nella fisiopatologia dell'Alzheimer. Infatti, il deficit cognitivo nei soggetti affetti da AD è strettamente legato al danno neuronale causato dalla tossicità eccitatoria dopo una sovra stimolazione dei recettori NMDA da

parte del glutammato (principale aminoacido eccitatorio). La stimolazione dei recettori NMDA provoca l'afflusso di calcio nel neurone, che è importante per la segnalazione sinaptica e la neuroplasticità nell'apprendimento e nella memoria.

Numerosi studi affermano che l'eccitotossicità da glutammato gioca un ruolo nella neurodegenerazione (Chifor et al., 2022). L'eccitotossicità provoca morte neuronale e quindi declino delle funzioni cognitive. Sia i peptidi  $A\beta$  che la sovraespressione delle proteine Tau sembrano essere provocati da una eccessiva attivazione di questi recettori (Siddiqui et al., 2023).

### 1.4.3 Aggregazione del peptide $\beta$ -amiloide

Le placche senili sono dei nuclei densi proteici che contengono in modo preponderante il peptide  $\beta$ -amiloide e sono circondati da neuroni danneggiati o morti. Inoltre contengono anche altre componenti proteiche, come l'apolipoproteina E ed un frammento di alfa-sinucleina, che è un componente non  $\beta$ -amiloide (NAC).

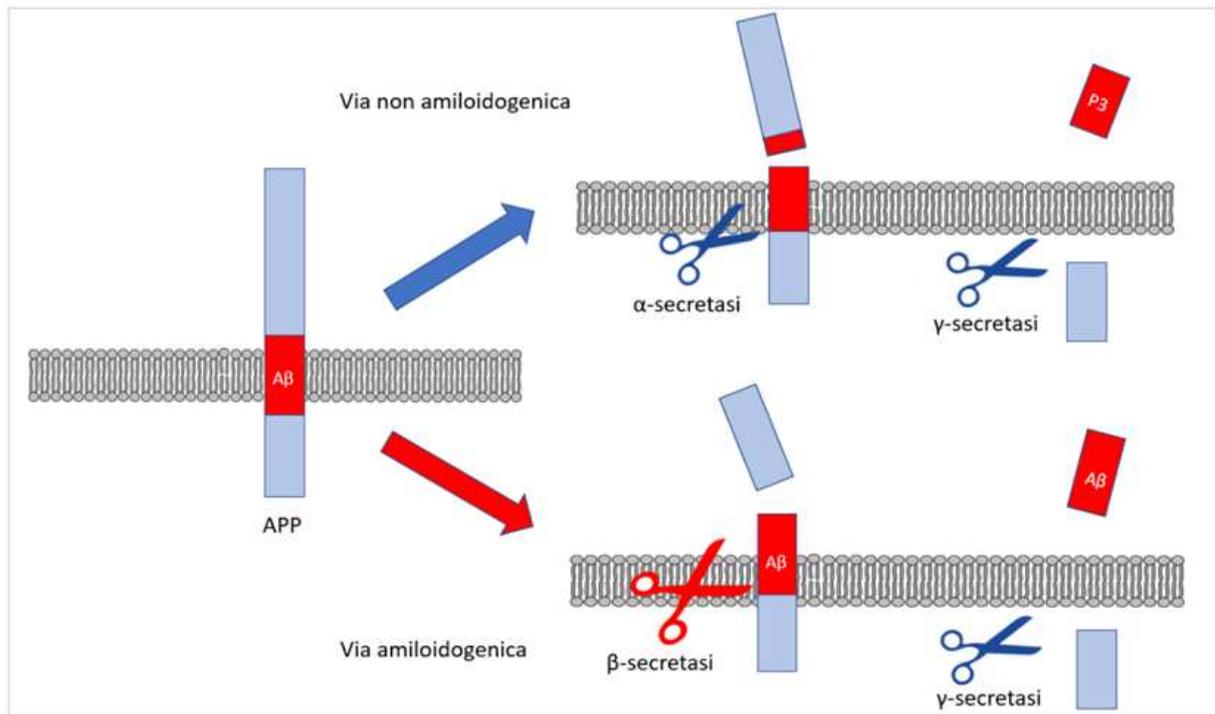
La formazione delle placche amiloidi è legata ad un'anomala espressione della proteina APP (precursore della proteina  $\beta$ -amiloide) e a modificazioni della solubilità del  $\beta$ -amiloide, che portano alla formazione di aggregati insolubili con effetti neurotossici. L'accumulo di  $\beta$ -amiloide scatena una serie di processi patologici, tra cui l'infiammazione, la formazione di grovigli neurofibrillari e la riduzione dei neurotrasmettitori.

La proteina APP è presente in diversi tipi cellulari e ha un ruolo fondamentale nella crescita dei neuriti, nella formazione delle sinapsi, nel trasporto assonale delle proteine neuronali e nella trasduzione del segnale attraverso la membrana. Parte di questa proteina viene degradata nei lisosomi, mentre un'altra parte raggiunge la membrana plasmatica, dove subisce un taglio proteolitico da parte delle secretasi ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (Behl et al., 2020).

In condizioni fisiologiche, l' $\alpha$  secretasi è responsabile della scissione della APP, generando un frammento solubile noto come APPs $\alpha$ , che viene rilasciato attraverso la membrana.

A questo punto, la gamma secretasi entra in gioco, producendo il peptide p3, che non è dannoso per le cellule. Questo meccanismo prende il nome di **via non amiloidogenica** (Fig.1.5).

Nei pazienti affetti da Alzheimer, il processo dominante è la **via amiloidogenica** (Fig.1.5), caratterizzato dalla scissione della proteina APP a livello del suo estremo C-terminale ad



**Figura 1.5:** Rappresentazione grafica della via non amiloidogena e della via amiloidogena. Entrambi i percorsi iniziano dalla proteina APP che è soggetta al taglio da parte dell' $\alpha$ -secretasi e dalla  $\beta$ -secretasi e successivamente viene clivata da un terzo enzima, la  $\gamma$ -secretasi. Nel primo caso si ha la formazione di un frammento (p3) neuroprotettivo, mentre la seconda via porta alla formazione di un frammento neurotossico, chiamato A $\beta$  (Pozzi, 2023).

opera della  $\beta$ -secretasi. Il frammento generato viene successivamente idrolizzato dalla  $\gamma$ -secretasi, producendo due peptidi della lunghezza di 40 e 42 aminoacidi. Questi peptidi tendono ad assumere una conformazione a foglietto  $\beta$  e possono aggregarsi formando fibrille. Tra i due, il peptide  $\beta$ -amiloide 1-42 risulta essere particolarmente neurotossico rispetto al peptide 1-40 (Mullane and Williams, 2020).

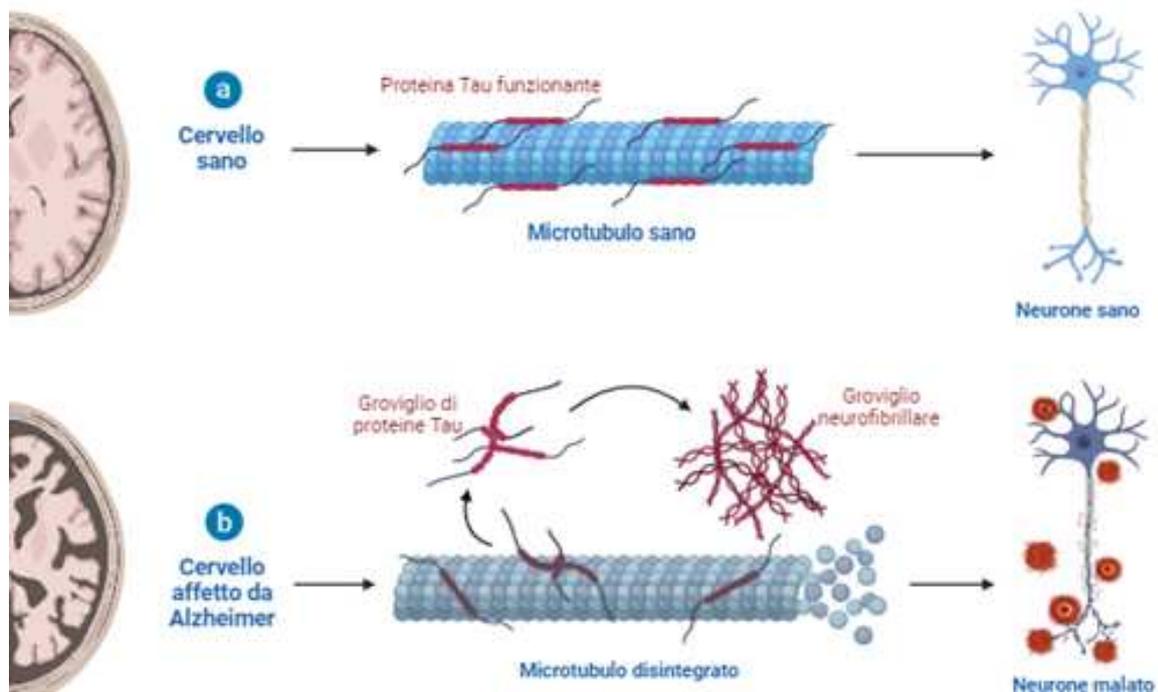
Gli aggregati di  $\beta$ -amiloide hanno un effetto tossico sui neuroni, dovuto alla capacità di questi peptidi di auto-aggregarsi, formando oligomeri. Questi oligomeri possono successivamente combinarsi in filamenti intermedi, promuovendo l'iperfosforilazione della proteina Tau, alterando l'omeostasi del calcio e compromettendo la trasmissione sinaptica (Mohandas et al., 2009).

I frammenti di  $\beta$ -amiloide rilasciati nello spazio extracellulare si accumulano in aggregati fibrillari insolubili, noti come placche amiloidi. Queste placche attivano risposte infiammatorie e immunitarie che danneggiano irreversibilmente i neuroni (Mullane and Williams, 2020).

#### 1.4.4 Grovigli neurofibrillari

I grovigli neurofibrillari rappresentano un'altra delle caratteristiche distintive della malattia in esame. Sono degli aggregati intracellulari insolubili costituiti da una proteina filamentosa a doppia elica che è iperfosforilata, chiamata *proteina Tau*, appartenente alla classe delle MAP, ovvero delle proteine associate ai microtubuli. Infatti, ogni neurone ha un citoscheletro, che è costituito per la maggior parte da strutture chiamate microtubuli, che determinano la normale morfologia e forniscono un supporto di tipo strutturale ai neuroni. La proteina Tau permette l'assemblaggio della tubulina in microtubuli, e anche la formazione di legami con altre componenti del citoscheletro (Fig. 1.6).

La funzionalità della proteina Tau è influenzata da un meccanismo di fosforilazione e defosforilazione che avviene in diversi siti, sotto l'azione di chinasi come GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) e Cdk-5 (cyclin-dependent kinase-5), nonché di fosfatasi. Quando la proteina Tau è modificata da questi enzimi, subisce cambiamenti nella sua conformazione che compromettono la stabilità dei microtubuli, poiché perde la capacità di legarsi alla tubulina e di facilitare l'assemblaggio dei microtubuli stessi. Di conseguenza, la proteina tende ad aggregarsi con altri frammenti, dando origine a grovigli neurofibrillari, i quali



**Figura 1.6:** Rappresentazione della proteina Tau e stabilizzazione dei microtubuli. Questa immagine mette a confronto la proteina Tau in un cervello sano (a) e in un cervello affetto da Alzheimer (b). In a) la proteina Tau è funzionante e permette il corretto assemblaggio della tubulina in microtubuli sani. In b) la proteina Tau subisce dei cambiamenti conformazionali che non permettono la stabilizzazione corretta dei microtubuli. Si aggrega con altri frammenti fino a originare i grovigli neurofibrillari. (Adattata con Biorender.com da Barron et al., 2017).

danneggiano il sistema di trasporto neuronale. Questi grovigli avvolgono il nucleo del neurone, causando tossicità e conducendo alla morte cellulare.

Inoltre, è stato osservato che la proteina Tau può avere effetti dannosi anche al di fuori delle cellule neuronali. Dopo la morte dei neuroni e il rilascio della Tau, si instaurano legami stabili tra questa proteina e i recettori muscarinici (M1 e M3), i quali stimolano un incremento della concentrazione di calcio intracellulare, risultando tossici per i neuroni (Muralidar et al., 2020).

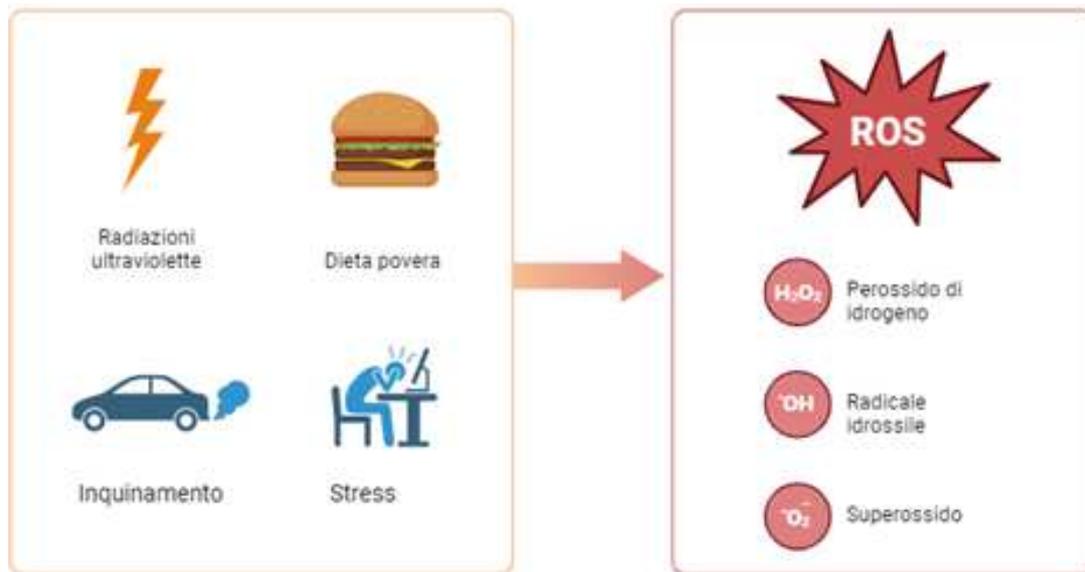
### 1.4.5 Stress ossidativo

Il termine stress ossidativo indica l'insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche a causa della loro esposizione a un eccesso di agenti ossidanti. Tra gli effetti si possono riscontrare alterazioni metaboliche, danno e morte cellulare. Questo processo è mediato dai radicali liberi, che sono molecole con uno o più elettroni spaiati, molto instabili e caratterizzati da un'alta reattività. Per stabilizzarsi, catturano elettroni da altre molecole, innescando reazioni a catena che vanno a danneggiare proteine e DNA. Una classe importante sono i derivati dell'ossigeno, tra cui l'anione superossido (Uttara et al., 2009).

Alla formazione dei radicali liberi possono contribuire sia fattori esterni come fumo, raggi UV, stress, inquinamento, che fattori interni come le reazioni del citocromo p450 o il processo di trasporto di elettroni nei mitocondri (Fig. 1.7).

In condizioni non patologiche, la formazione di queste specie reattive è neutralizzata dagli antiossidanti naturali, come l'enzima glutatione perossidasi. Quando si ha uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la disponibilità di antiossidanti si verifica il danno ossidativo, che è presente in diverse malattie neurologiche, neurodegenerative, demielinizzanti e cerebrovascolari (Linseman et al., 2009). Infatti, il tessuto neuronale è molto suscettibile allo stress ossidativo, a causa della presenza limitata di enzimi antiossidanti ed un elevato contenuto di substrati ossidabili. Inoltre, ha un alto contenuto di ioni ferro e ascorbato, che possono formare potenti composti pro-ossidanti.

Nei pazienti affetti da Alzheimer si può osservare una sovrapproduzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) prodotte da metalli pesanti e da mitocondri. Si trovano inoltre



**Figura 1.7:** Rappresentazione grafica dei vari fattori che favoriscono la produzione di ROS. Nell'immagine vengono raffigurati alcune delle cause che possono portare alla formazione di ROS come radiazioni, una dieta povera, l'inquinamento e lo stress. (Creato con Biorender.com)

anche elevate concentrazioni di ossido nitrico (NO), che può combinarsi con il superossido e formare perossinitriti, specie molto tossiche.

A $\beta$ -amiloide promuove l'accumulo di radicali liberi nei neuroni e nella glia delle regioni cerebrali vulnerabili di pazienti malati di Alzheimer.

Uno studio molto recente (Dhapola et al., 2024) mette in evidenza, inoltre, la presenza dei granuli di stress, generati dallo stress ossidativo. Questi sono ammassi proteici condensati e di mRNA non tradotti presenti nel citosol in condizioni di stress: si possono convertire in aggregati persistenti in patologie come l'AD. Sebbene nello stato di stress acuto questi granuli fungano da fattori protettivi diminuendo l'apoptosi, nell'AD alterano la funzione dei neuroni, inglobando proteine vitali come ribonucleoproteine e contribuendo alla progressione della malattia.

Inoltre, nel cervello dei pazienti con AD si è riscontrata una diminuzione dei livelli di glutazione (antiossidante) che è causa di danno alle cellule neuronali (Dhapola et al., 2024).

### 1.4.6 Alta concentrazione di metalli pesanti

E' stato ipotizzato un legame tra la distribuzione delle placche senili e l'aumento di  $Fe^{3+}$  non eme, perché si è osservato un incremento dei livelli di questo metallo in aree cerebrali specifiche di pazienti con AD (Jomova et al., 2010).

Altri metalli come il rame, il cadmio e lo zinco rivestono un ruolo importante nella progressione della malattia.

Il rame, sottoforma di  $Cu^{2+}$ , rilasciato dopo l'attivazione del recettore NMDA, è stato trovato all'interno delle placche di  $\beta$ -amiloide e ne favorisce l'aggregazione contribuendo alla morte neuronale (Jomova et al., 2010).

Anche un aumento di cadmio porta ad aggregazione di peptide  $A\beta$  amiloide e a sviluppo di grovigli neurofibrillari (Venkatesan et al., 2024).

Lo zinco, come  $Zn^{2+}$  o in forma libera, può interagire con canali ionici o recettori, dopo che viene rilasciato nello spazio sinaptico. Esercita un'azione inibitoria sul recettore NMDA, contrastando l'effetto del glutammato. Uno studio (Jomova et al., 2010), inoltre, sostiene che lo zinco facilita la formazione delle placche di  $\beta$ -amiloide perché, legandosi ad APP, blocca il sito di legame dell' $\alpha$ -secretasi.

Nei pazienti affetti da Alzheimer si ha una alterazione dell'omeostasi di questi ioni e può essere una conseguenza di eventi patologici (Jomova et al., 2010).

Uno studio molto recente sostiene però che non è ancora stato chiarito se l'alterazione dell'omeostasi di questi ioni sia un fattore eziologico proprio dell'Alzheimer o una conseguenza diretta dei processi patologici dell'AD (Venkatesan et al., 2024). Infine, secondo lo stesso studio (Venkatesan et al., 2024), i metalli pesanti possono influenzare le alterazioni epigenetiche nel cervello e svolgere un ruolo importante come approccio terapeutico nell'AD: sono state scoperte in aree cerebrali colpite da Alzheimer delle variazioni di metilazione del DNA. Da questo studio è emersa la necessità di approfondire le ricerche riguardanti il ruolo dei metalli pesanti nei confronti delle alterazioni epigenetiche, in modo da poter sviluppare marcatori diagnostici nell'AD.

### 1.4.7 Fattori genetici e forme familiari

La malattia di Alzheimer può manifestarsi in due forme: una forma ad insorgenza tardiva (late-onset) ed una forma familiare (early-onset). La prima ricopre oltre il 90% dei casi,

è la più comune ed è causata probabilmente sia da fattori genetici che ambientali. Il gene più importante associato a questo tipo di forma è APOE (apolipoproteina E) che codifica per la proteina trasportatrice dei lipidi APOE, e in particolare l'allele APOE- $\epsilon$ 4. Esistono infatti quattro polimorfismi del gene APOE, e i soggetti che ereditano l'allele APOE- $\epsilon$ 4 hanno un rischio tre volte più elevato di sviluppare l'AD; l'allele APOE- $\epsilon$ 2 è invece considerato protettivo. Non è stato ancora chiarito il motivo per cui APOE- $\epsilon$ 4 sia più dannoso rispetto agli altri, ma si è a conoscenza che ciò che lo differenzia da APOE- $\epsilon$ 3 è un aminoacido (nel caso di APOE- $\epsilon$ 3 Cys112, in APOE- $\epsilon$ 4 Arg112), e questo provoca un cambiamento conformazionale nella proteina, che va a influenzare il legame con i recettori delle apolipoproteine e dei peptidi A $\beta$  (Panza et al., 2019).

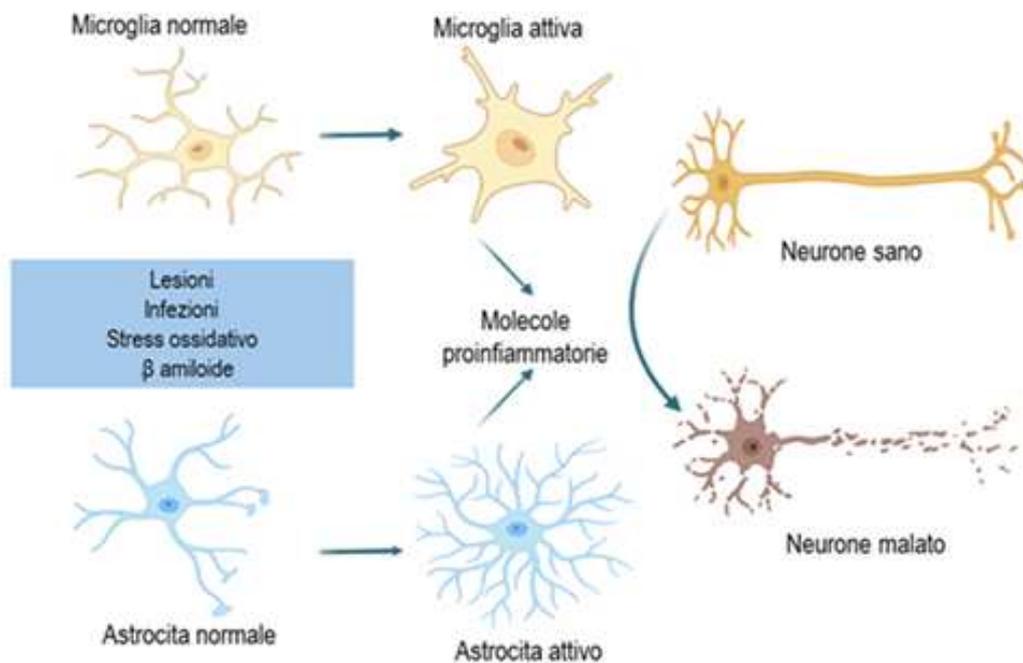
Le forme familiari della malattia di Alzheimer sono autosomiche dominanti e si manifestano precocemente. Tuttavia, la malattia avanza con le stesse caratteristiche patologiche delle forme sporadiche a insorgenza tardiva. In questa forma sono state identificate mutazioni in 3 geni responsabili delle forme di AD a esordio precoce: APP, che codifica per la proteina precursore di A $\beta$ , PSNE1 e PSNE2, che codificano per le preseniline 1 (PS1) e 2 (PS2) (Panza et al., 2019).

Le preseniline sono proteine di membrana appartenenti alla classe delle aspartatoproteasi e regolano la funzione della  $\gamma$ -secretasi, che è l'enzima responsabile della degradazione dell'APP (Lin et al., 2018). La presenilina 1 è responsabile dell'attività della  $\gamma$ -secretasi, che è associata a un complesso di proteine ad alto peso molecolare dove è proprio la PS1 a fungere da sito attivo; le mutazioni del gene della PS1 aumentano la sintesi di A $\beta$  e possono indurre l'apoptosi mediata da proteine G, alterando la regolazione del calcio. La malattia insorge tra i 28 e i 50 anni (Lin et al., 2018).

La presenilina 2 possiede attività  $\gamma$ -secretasica e agisce in modo sinergico con PS1. Le mutazioni sul suo gene hanno degli effetti simili a quelli su PS1, anche se l'esordio della malattia è più tardivo (tra i 40 e i 55 anni) (Lin et al., 2018).

### 1.4.8 Neuroinfiammazione

La neuroinfiammazione gioca un ruolo significativo nella progressione della malattia di Alzheimer (Griciuc and Tanzi, 2021). Il termine “neuroinfiammazione” si riferisce a una risposta infiammatoria che avviene all'interno del SNC, caratterizzata dall'accumulo di



**Figura 1.8:** Ruolo della neuroinfiammazione nella patogenesi dell'AD. Nell'AD, microglia e astrociti diventano reattivi attraverso diversi meccanismi che portano al rilascio di citochine proinfiammatorie che causano ulteriori danni neuronali. Adattata da (Al-Ghraiabah et al., 2022)

cellule gliali, in particolare astrociti e microglia, in risposta a una lesione. Durante le fasi iniziali della malattia di Alzheimer, la microglia, principale difesa immunitaria attiva nel sistema nervoso centrale, svolge un ruolo neuroprotettivo, ma con il progredire della patologia aumenta la produzione di citochine pro-infiammatorie legate allo stress ossidativo, fino alla neurotossicità, che va ad aggravare la patologia stessa (Fig. 1.8) (Griciuc and Tanzi, 2021).

Un modulatore del processo neuroinfiammatorio è il TNF (fattore di necrosi tumorale), prodotto soprattutto dalle cellule della linea monocitaria, tra cui i macrofagi derivanti dalla microglia. L'infiammazione mediata dal TNF può contribuire alla formazione di placche amiloidee e alla fosforilazione della proteina Tau: infatti si è riscontrato un elevato

livello di TNF nel liquido cerebrospinale dei pazienti con Alzheimer (Plantone et al., 2023). Secondo un altro studio (Al-Ghraiyyah et al., 2022) l'insorgenza della neuroinfiammazione nell'AD è influenzata da molteplici fattori, che si possono classificare in interni ed esterni. Tra quelli interni troviamo il sesso, l'età e fattori genetici.

Per quanto riguarda il sesso, la comparsa della neuroinfiammazione è legata alle variazioni degli ormoni steroidei e dei recettori degli estrogeni. Alcune ricerche hanno dimostrato che gli estrogeni possono regolare la formazione e la degradazione dell' $A\beta$  (Al-Ghraiyyah et al., 2022). Lo stesso studio sostiene che gli agonisti degli estrogeni esercitano un effetto neuroprotettivo diminuendo la neuroinfiammazione tramite la riduzione del rilascio di citochine proinfiammatorie (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, interferone- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), e dell'attivazione microgliale, attraverso la modulazione dei recettori ER $\alpha$  e ER $\beta$ : l'attivazione di questi recettori induce l'espressione di molteplici geni neuroprotettivi, come la 3-beta-idrossisterolo delta 24-reduttasi (DHCR24). Per quanto riguarda i fattori esterni, lo stress è correlato alla progressione dell'AD attraverso l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e l'aumento dei livelli di cortisolo (Al-Ghraiyyah et al., 2022). Uno studio molto recente (Thakur et al., 2022) ha inoltre messo in evidenza il legame della neuroinfiammazione con il ruolo del microbiota intestinale che contribuisce alla progressione della malattia di Alzheimer: il microbiota intestinale può indurre neuroinfiammazione veicolando nel cervello sostanze tossiche, come metaboliti microbici, attraverso la circolazione sistemica causando danni alle cellule neuronali. Le funzionalità cognitive del cervello sono fortemente influenzate dai cambiamenti del microbiota, tanto che una alterazione dell'asse intestino-cervello può causare neurodegenerazione e neuroinfiammazione.



# Capitolo 2

## Terapie convenzionali

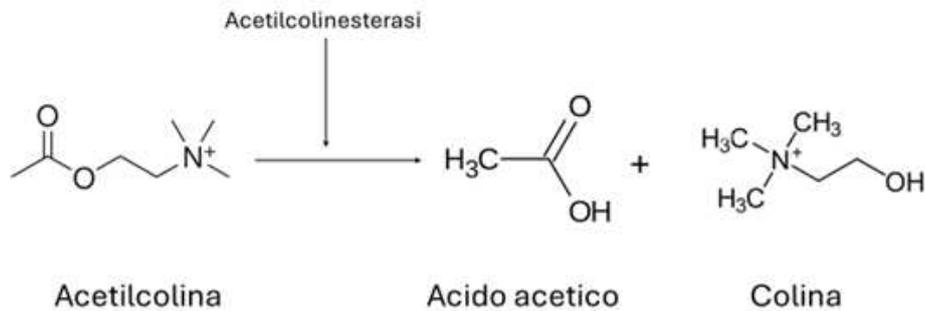
In commercio si trovano farmaci “sintomatici”, che sono in grado di migliorare le condizioni del paziente ma controllando solo i sintomi. Bisogna specificare che questi devono essere usati nella prima fase della malattia (lieve-moderata), anche se non sempre risultano efficaci. Infatti, ci sono pazienti che rispondono bene al trattamento (“*responders*”), e altri che non hanno alcun beneficio (“*non responders*”); inoltre è difficile prevedere la risposta dei soggetti affetti da AD. Infine, questi farmaci possono avere degli effetti collaterali importanti, per questo motivo la loro somministrazione prevede la supervisione di un medico specialista. (Wang et al., 2023). Di seguito verranno trattate due categorie di farmaci ampiamente usate come terapia convenzionale nell’AD: inibitori dell’acetilcolinesterasi e antagonisti del recettore NMDA.

### 2.1 Inibitori dell’acetilcolinesterasi

Nonostante il sistema colinergico non sia l’unico responsabile del deterioramento cognitivo nell’adulto, un suo deficit è responsabile di disturbi dell’apprendimento e della memoria, che caratterizzano le demenze nell’adulto, tra cui la malattia di Alzheimer.

La formulazione dell’ipotesi colinergica è supportata anche da studi neurochimici che hanno evidenziato una riduzione dell’enzima colina acetiltransferasi (ChAT), nelle regioni cerebrali associate alla cognizione, come la corteccia cerebrale e l’ippocampo. (Amenta et al., 2001)

I farmaci appartenenti a questa classe hanno l’obiettivo di mantenere in equilibrio il livello di ACh, inibendo la sua idrolisi. Purtroppo, però, migliorano solo alcuni sintomi cognitivi



**Figura 2.1:** Reazione di degradazione dell'acetilcolina. L'ACh viene scissa ad opera dell'acetilcolinesterasi in acido acetico e colina.

e la loro capacità di azione diminuisce man mano che la patologia progredisce.

La degradazione dell'ACh (Fig.2.1) nel cervello avviene attraverso due enzimi principali: acetilcolinesterasi (AChE) e butirrilcolinesterasi (BuChE). L'AChE è localizzata principalmente nel SNC, a differenza della BuChE che è distribuita in modo ubiquitario. Nel tessuto cerebrale dei pazienti con AD, l'AChE è generalmente più abbondante della BuChE, anche se quest'ultima contribuisce in modo più significativo alla degradazione dell'ACh nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale.

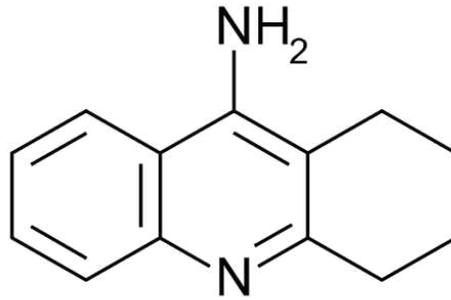
In questa sezione vengono descritti gli inibitori delle colinesterasi attualmente in uso per il trattamento dell'AD.

### 2.1.1 Tacrina

Nel 1993, l'FDA ha approvato l'uso della tacrina (Fig. 2.2) nelle forme lievi e moderate dell'AD sotto il nome commerciale di Cognex<sup>®</sup> in capsule di diversi dosaggi (10, 20, 30 e 40 mg). È stata sintetizzata la prima volta da Adrien Albert all'Università di Sidney nel 1949.

#### Aspetti farmacodinamici

La tacrina funge da inibitore reversibile dell'AChE; il meccanismo di azione non è del

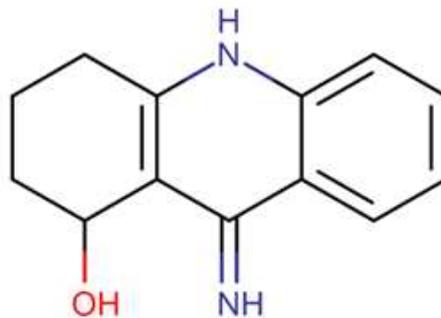


**Figura 2.2:** Struttura chimica della tacrina

tutto noto, ma si ipotizza che si leghi in prossimità del sito per la colina dell'enzima nelle vicinanze del Trp86 e del Glu202 e la inattivi, determinando così un accumulo di acetilcolina nelle sinapsi colinergiche.

#### Aspetti farmacocinetici (ADME)

La tacrina è assorbita rapidamente, e la sua biodisponibilità è scarsa ed è di circa il 17%; il legame alle proteine plasmatiche è di circa il 55%. Subisce metabolismo epatico da parte del citocromo CYP450 1A2 e il metabolita principale che si forma mediante una reazione di idrossilazione è la 1-idrossitacrina. L'escrezione è renale (Drugbank, 2024) (Fig.2.3).



**Figura 2.3:** Il metabolita 1-idrossitacrina, ottenuto tramite idrossilazione da parte del CYP450.

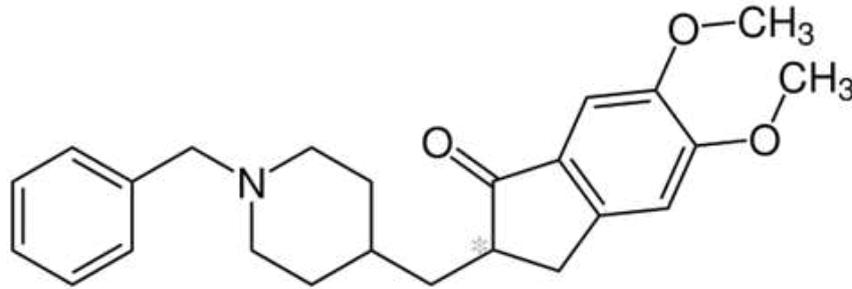
#### Effetti collaterali

Gli eventi avversi più riportati durante il trattamento sono a carico del sistema nervoso (come cefalea, confusione mentale, insonnia) e dell'apparato gastrointestinale (nausea, perdita di appetito, vomito) (Sivaraman et al., 2022).

#### Tossicità e uso in gravidanza

In gravidanza viene classificato come un farmaco di classe C, ovvero da usare con cautela solo se i benefici superano i rischi, perché non sono stati condotti studi su questo farmaco in donne in gravidanza (Medscape).

### 2.1.2 Donepezil



**Figura 2.4:** Struttura chimica del donepezil.

Successivamente, è stato approvato nel 1996 dalla FDA l'uso clinico di donepezil, (Fig.2.4) (nome commerciale Aricept®) messo in commercio da Pfizer e in molti Paesi è diventato il farmaco principale per il trattamento di AD da lieve a moderato.

#### Aspetti farmacodinamici

È un derivato dell'indanone-benzilpiperidina, ed è un inibitore reversibile di seconda generazione. La sua affinità verso AchE è maggiore rispetto a quella per BuchE (Brunton et al., 2019).

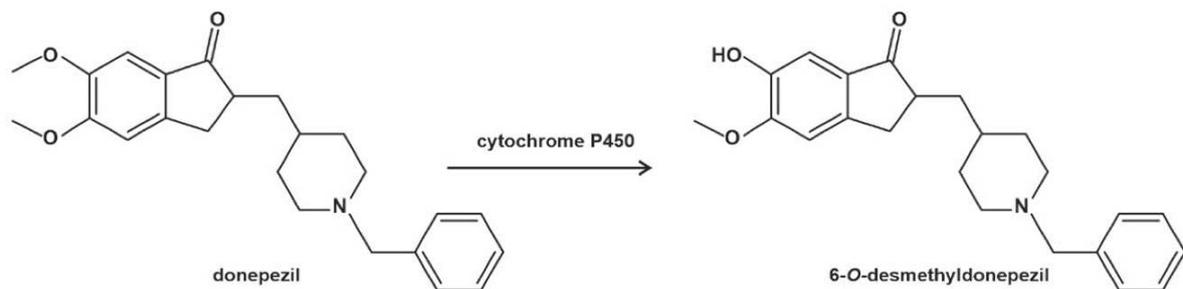
È disponibile in compresse da 5 e da 10 mg e a rilascio prolungato con una dose più elevata (23 mg). Inizialmente vengono somministrate dosi pari a 5 mg al giorno, successivamente, se queste sono ben tollerate, viene aumentato il dosaggio a 10 mg nelle forme lievi e moderate (Tsao, 2024).

Nei pazienti affetti da AD da entità moderata a grave si sono riscontrati benefici nell'uso della formulazione a rilascio prolungato (Larkin, 2022).

È stato approvato dall'FDA anche sottoforma di cerotto transdermico, con il nome commerciale di Adlarity® nelle dosi di 5 e 10 mg/die. È stato pensato per consentire in modo continuo il passaggio del farmaco attraverso la pelle, mantenendo un livello costante efficace per il trattamento. Questa somministrazione riduce anche il rischio di effetti gastrointestinali avversi associati al donepezil orale (Larkin, 2022).

### Aspetti farmacocinetici (ADME)

Possiede una biodisponibilità del 100%, ha una buona capacità di penetrare la BEE ed è legato al 96% a proteine plasmatiche. Viene metabolizzato dal fegato, principalmente dal CYP3A4 e poi dal CYP2D6 e viene eliminato lentamente per la maggior parte nelle urine (Drugbank, 2024) (Fig.2.5).



**Figura 2.5:** Reazione del metabolismo del donepezil mediato dal CYP450.

### Effetti collaterali

Gli effetti avversi osservati sono associati a un'eccessiva stimolazione colinergica periferica, come rinofaringite, nausea, diarrea e vomito. Ci sono stati casi anche di rabdomiolisi che hanno causato l'interruzione del trattamento (Tsao, 2024)

### Interazioni farmacologiche

E' bene evitare la co-somministrazione con inibitori del CYP3A4 come ketoconazolo, itraconazolo, eritromicina e con inibitori del CYP2D6 come chinidina e fluoxetina. Infine, induttori enzimatici come la fenitoina, la carbamazepina, la rifampicina e anche l'alcol possono ridurre i livelli plasmatici di donepezil (Tsao, 2024).

### Tossicità e uso in gravidanza

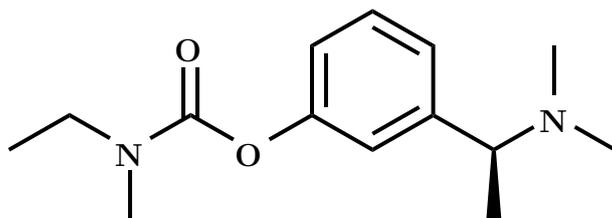
Non si sono osservati effetti teratogeni sulla base di studi condotti su animali, ma è stata evidenziata tossicità sia nel periodo perinatale che postnatale. Il potenziale rischio per l'uomo non è stato ancora ben definito.

Il donepezil è classificato come farmaco di categoria C, (non ci sono sufficienti studi sull'uso del donepezil in gravidanza) e le donne in trattamento con donepezil devono evitare di allattare, poichè non è stato ancora chiarito se il donepezil venga escreto nel latte materno, data l'assenza di studi clinici su donne durante l'allattamento (Tsao, 2024).

### Associazioni

Nel 2014 l'FDA ha approvato la co-somministrazione di donepezil e memantina, (un farmaco antagonista NMDA che verrà trattato più avanti), per la demenza moderata-grave associata alla malattia di Alzheimer (Tsao, 2024).

### 2.1.3 Rivastigmina



**Figura 2.6:** Struttura chimica della rivastigmina.

La rivastigmina (Fig.2.6) (Exelon<sup>®</sup>) è stata sviluppata da Marta Weinstock-Rosin all'Università Hebrew di Gerusalemme ed è entrata in clinica nel 1997 negli Stati Uniti e in Europa come formulazione orale (comprese di 1,5 mg, 3 mg, 4,5 mg, e 6 mg e soluzione orale di 2 mg /ml) e cerotto transdermico (commercializzata da Novartis) (Parth H. Patel 1, 2024).

La dose massima tollerata per via orale è di 12 mg al giorno (si assumono in media dai 3 ai 6 mg/die divisi in due somministrazioni) (Parth H. Patel 1, 2024)

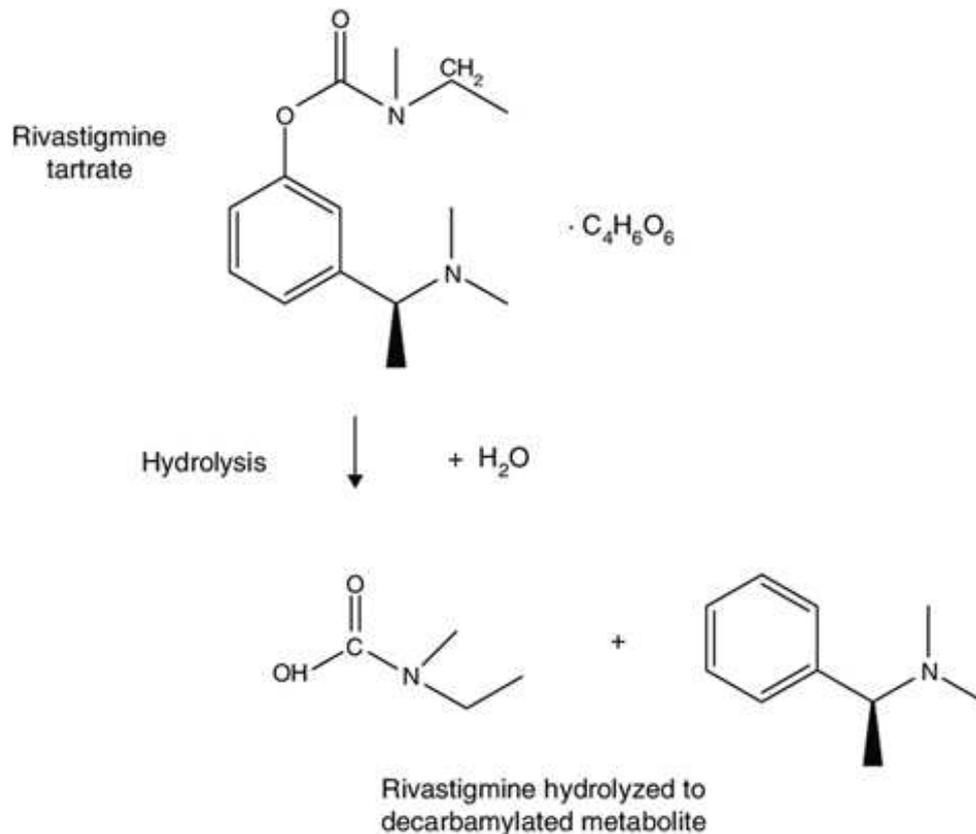
Il cerotto permette di mantenere stabili i livelli ematici del farmaco, migliorando tollerabilità e quindi l'aderenza alla terapia. Riduce notevolmente l'incidenza degli effetti collaterali gastrointestinali. È preferita come formulazione rispetto alle compresse, in quanto essendo usata in pazienti con Alzheimer, la perdita di memoria influenza negativamente la compliance nei confronti di farmaci ad uso orale (Chang et al., 2021).

### Aspetti farmacodinamici

È un derivato carbammato strutturalmente simile alla fisostigmina (alcaloide tossico, inibitore dell'acetilcolinesterasi). Il meccanismo di azione non è stato chiarito ancora completamente ma si ipotizza che si leghi reversibilmente alle colinesterasi (sia AChE che BuChE, a differenza del donepezil che inibisce selettivamente l'acetilcolinesterasi) e la inattivi, impedendo così l'idrolisi di acetilcolina e provocando un aumento dei suoi livelli nelle sinapsi colinergiche (Drugbank, 2024).

### Aspetti farmacocinetici (ADME)

Quando somministrata oralmente, è ben assorbita con una biodisponibilità del 40% (per 3 mg di dose). È legata al 40% alle proteine plasmatiche ed è metabolizzata rapidamente dalle colinesterasi attraverso idrolisi a dare un metabolita decarbamilato NAP 226-90 (Fig.2.7). L'eliminazione è prettamente renale, solo una piccola parte è eliminata tramite feci (Drugbank, 2024).



**Figura 2.7:** Reazione di idrolisi metabolica della rivastigmina.

### Effetti collaterali

I principali effetti collaterali molto frequenti che osserviamo dall'uso della rivastigmina sono: nausea, vomito, diarrea, capogiri, e dolore addominale (Drugbank, 2024).

Nonostante i vantaggi che presenta il cerotto transdermico, la rivastigmina ha presentato anche un caso raro di angioedema legato al suo uso (Naharci and Tasci, 2018).

Sono state osservate frequentemente anche dermatiti da contatto e reazioni allergiche come vesciche correlate all'uso del cerotto (Parth H. Patel 1, 2024).

L'uso a lungo termine della rivastigmina è stato associato a una maggior incidenza di mortalità rispetto ai pazienti trattati con donepezil. (non è ancora chiaro se sia collegato a un uso scorretto del cerotto transdermico) (Kazmierski et al., 2018).

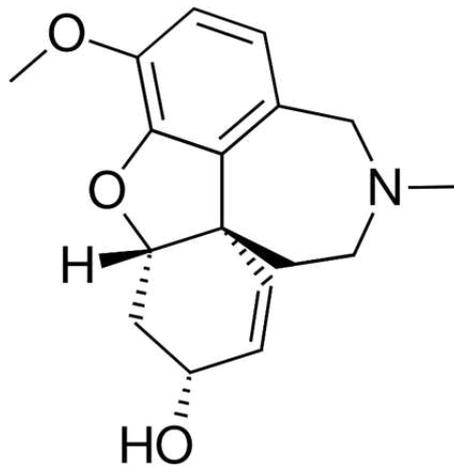
#### Uso in gravidanza

Se non strettamente necessario, non va usata in gravidanza (Parth H. Patel 1, 2024).

#### Interazioni farmacologiche

Può aumentare i livelli dei farmaci miorellassanti succinilcolinici (per es. durante l'anestesia), in quanto la rivastigmina è un inibitore delle colinesterasi (Parth H. Patel 1, 2024)

### 2.1.4 Galantamina



**Figura 2.8:** Struttura chimica della galantamina.

La galantamina [Reminyl<sup>®</sup> (Fig. 2.8)] (Reminyl<sup>®</sup>) è un farmaco usato per la terapia delle forme di Alzheimer leggere o moderate (Drugbank, 2024).

#### Aspetti farmacodinamici

È un alcaloide terziario ed è un inibitore reversibile e competitivo dell'AChE. È stata estratta in natura, dal *Galanthus nivalis*, il bucaneve, una pianta erbacea perenne della famiglia delle Amaryllidaceae. Fu studiata inizialmente per le miopatie e le condizioni paralitiche postpoliomelite. Dopo che venne scoperta la sua azione inibitoria nei confronti dell'AChE, gli effetti della galantamina sono stati studiati in un'ampia gamma di disturbi

psichiatrici, come il disturbo bipolare e l'autismo. Lo sviluppo di questo farmaco per la malattia di Alzheimer è iniziato tardivamente a causa delle difficoltà di estrazione e di sintesi (inizio anni '90) dalla Janssen Pharmaceutica (Urvashi K. Kalola, 2024).

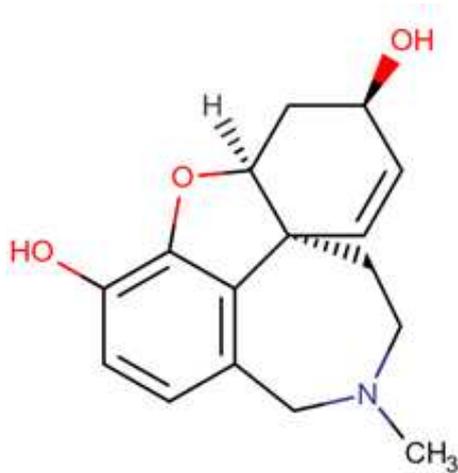
Si trova in compresse da 8 e 12 mg, in soluzione da 4 mg/mL e in capsule a rilascio prolungato da 4, 8 e 12 mg. Nel 2000 ha ricevuto la prima approvazione dall'Unione Europea. Nel 2001 l'FDA lo approva per il trattamento della malattia di Alzheimer da lieve a moderata (Drugbank, 2024).

Il meccanismo di azione della galantamina rimane ancora sconosciuto, ma si ipotizza che potenzi la funzione colinergica attraverso una inibizione competitiva e reversibile della colinesterasi, aumentando così la disponibilità di acetilcolina nell'area sinaptica (Urvashi K. Kalola, 2024).

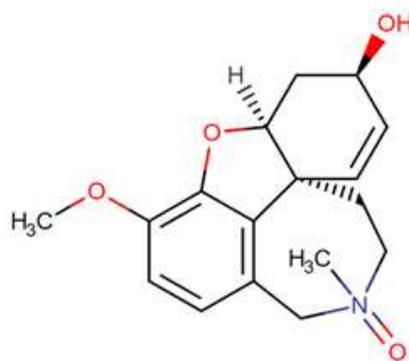
Questo farmaco si può legare anche allostericamente alla subunità  $\alpha$  dei recettori nicotinici, provocando una modifica conformazionale nel recettore, facilitando il rilascio di acetilcolina dai neuroni presinaptici. I recettori nicotinici dell'acetilcolina sono espressi soprattutto a livello della membrana neuronale presinaptica per controllare il rilascio di numerosi neurotrasmettitori, come ACh, glutammato, GABA, dopamina, serotonina e noradrenalina. Gli agonisti dei recettori nicotinici migliorano le prestazioni in ambito cognitivo, mentre, al contrario, gli antagonisti compromettono questi processi. In alcuni studi si è osservata una diminuzione dell'espressione e dell'attività dei recettori nicotinici nei pazienti affetti da Alzheimer, e questo può spiegare la riduzione della neurotrasmissione colinergica centrale nei malati di Alzheimer (Urvashi K. Kalola, 2024)

#### Aspetti farmacocinetici (ADME)

Ha una farmacocinetica lineare, e la biodisponibilità orale oscilla dal 90-100%, con una somministrazione orale, la  $T_{max}$  è di circa un'ora. La galantamina attraversa la BEE e si lega al 18% alle proteine plasmatiche. È metabolizzata per il 75% dal CYP2D6 e dal CYP3A4. Il CYP2D6 promuove una o-demetilazione dando come metabolita O-desmetilgalantamina (Fig.2.9) e il CYP3A4 media la formazione della galantamina-N-ossido. Sono entrambi metaboliti inattivi (Fig.2.10). La clearance renale rappresenta circa il 20% della clearance plasmatica totale del farmaco: è stato osservato che l'eliminazione della galantamina è ridotta in soggetti con insufficienza renale. Circa il 20% della dose viene escreta immutata nelle urine entro le 24 ore (Drugbank, 2024).



**Figura 2.9:** Il metabolita O-desmetil-galantamina.



**Figura 2.10:** Il metabolita galantamina N-ossido.

### Effetti collaterali

Tra gli effetti collaterali comuni si osservano vomito e nausea, meno comuni allucinazioni, extrasistole, ipotensione, parestesia.

### Tossicità

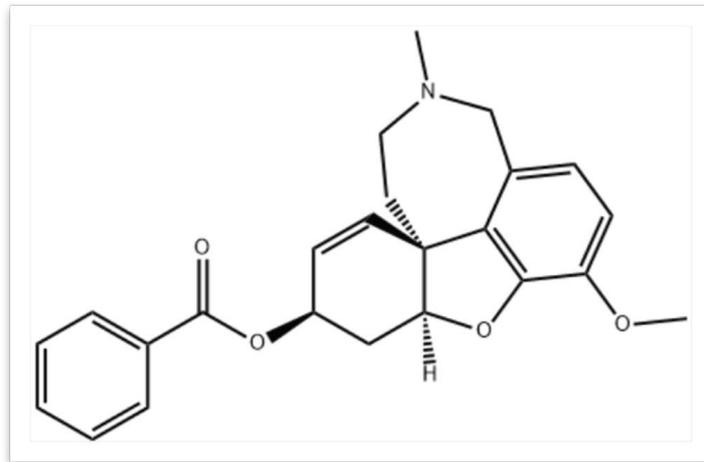
Studi *in vivo* hanno dimostrato effetti teratogeni della galantamina sul feto, ma non ci sono dati riguardanti la secrezione della galantamina nel latte umano e sugli effetti sui neonati allattati al seno da donne che assumono il farmaco: è il medico che deve valutare il rapporto rischio/beneficio prima di prescriberla (Urvashi K. Kalola, 2024).

### Interazioni farmacologiche

La galantamina interagisce con colinomimetici, con farmaci che riducono in modo significativo la frequenza cardiaca (come digossina o  $\beta$ bloccanti), rilassanti succinilcolinici e, sia inibitori del CYP2D6 (come fluoxetina, chinidina, paroxetina), sia inibitori del CYP3A4

(come ketoconazolo, eritromicina e ritonavir) (Drugbank, 2024).

### 2.1.5 Memogain



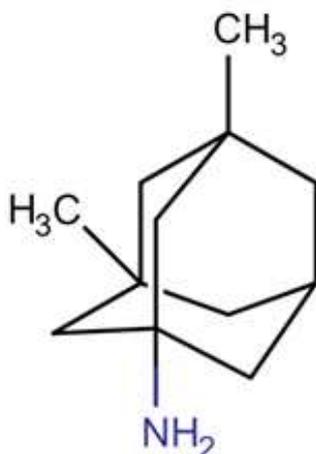
**Figura 2.11:** Struttura chimica del Memogain.

Diversi gruppi di ricerca sono riusciti a sintetizzare analoghi strutturali della galantamina per migliorare il suo profilo farmacocinetico. È stato sviluppato Memogain<sup>®</sup> (Fig.2.11) (GIn-1062), un pro-farmaco della galantamina: la sua biodisponibilità è 15 volte superiore, nel cervello, alla stessa dose di galantamina. Il pro-drug viene scisso enzimaticamente in galantamina, e produce un miglioramento a livello cognitivo superiore rispetto agli stessi dosaggi di galantamina, senza presentare pronunciati effetti collaterali gastrointestinali. Viene somministrato per via intranasale per evitare la scissione in galantamina nel tratto gastrointestinale (Bakker et al., 2020).

## 2.2 Antagonisti del recettore NMDA

In condizioni normali, il recettore NMDA permette l'ingresso di ioni calcio fondamentali per la neurotrasmissione. Ma nel caso dell'AD, il recettore è sovrastimolato e porta un accumulo di  $\text{Ca}^{2+}$  che causa eccitotossicità e morte cellulare. L'elevata attività del recettore può essere controllata con un farmaco presente in commercio, la memantina (Athar et al., 2021).

## 2.2.1 Memantina



**Figura 2.12:** Struttura chimica della memantina

La memantina (Fig. 2.12) è un farmaco che funge da antagonista non competitivo dei recettori NMDA, inibisce il legame del glutammato al recettore NMDA legandosi a un co-canale cationico (che si sovrappone al sito del magnesio) del recettore (Tang et al., 2023).

È stata sintetizzata e brevettata per la prima volta da Eli Lilly and Co. nel 1968 come farmaco antidiabetico, ma è risultata inefficace nell'abbassare la glicemia. Solo dopo si è scoperto che avesse una attività sul SNC e fu sviluppata da Merz, un'azienda farmaceutica tedesca.

### Aspetti farmacodinamici

La memantina (Namenda®) è stata approvata dal FDA nel 2013 per il trattamento dell'AD nella forma da moderata a severa e blocca gli effetti del glutammato (Tang et al., 2023).

Studi condotti su animali hanno dimostrato che il farmaco ha proprietà neuroprotettive contro i danni neuronali causati dai neurotrasmettitori eccitatori a dosaggi che oscillano da 5 mg/kg a 50 mg/kg (Kafi et al., 2014).

### Aspetti farmacocinetici (ADME)

La memantina è ben assorbita dopo somministrazione orale, e mostra una farmacocinetica lineare. È irrilevante se l'assunzione avvenga a stomaco pieno o a stomaco vuoto, in quanto

non vi è alcun effetto del cibo sull'assorbimento della memantina. Il legame alle proteine plasmatiche è di circa il 45%.

Il metabolismo è parzialmente epatico, perché il CYP450 non contribuisce in modo significativo. La memantina è escreta principalmente con le urine: il 48% viene escreta in forma invariata, la restante parte del farmaco è metabolizzato in: n-glucuronide coniugato, 6-idrossi memantina e 1-nitroso deamina- memantina, che mostrano però una minima attività da antagonista del recettore NMDA. Essendo escreto per via renale, il dosaggio dovrebbe essere ridotto nei pazienti con grave compromissione renale (es. insufficienza renale) (Drugbank, 2024).

### Effetti collaterali

Gli effetti collaterali della memantina comprendono capogiri e cefalee (Tang et al., 2023).

### Tossicità

Non sono state osservate evidenze di cancerogenicità in modelli di topo e ratto ai quali è stata somministrata una dose di memantina equivalente a quella umana. Non sono stati riscontrati effetti sulla fertilità nei ratti a cui sono state somministrate dosi di 9 volte maggiori la dose massima raccomandata per l'uomo per via orale, partendo da 14 giorni prima dell'accoppiamento fino alla gestazione e all'allattamento nel caso delle femmine, o 60 giorni prima l'attività di accoppiamento nei maschi (Drugbank, 2024).

### Uso in gravidanza

La memantina viene classificata come un farmaco di categoria B per quanto riguarda la gravidanza, questo significa che non sono stati condotti studi sufficientemente controllati in donne in gravidanza. L'indicazione è quella di assumerlo in gravidanza solo se il beneficio giustifica il possibile rischio al feto. Non ci sono evidenze che accertano se la memantina venga escreta nel latte umano, quindi è necessario prestare attenzione quando viene assunta durante l'allattamento (Drugbank, 2024).

Nel 2018 la memantina è diventata il farmaco più usato al mondo per il trattamento della demenza. Purtroppo, però, è in grado di alleviare solo i sintomi dell'AD (per esempio la compromissione della memoria), ma non di curarla.

### Associazioni

Dallo studio di Tang e colleghi (Tang et al., 2023) si evince la possibilità di co-somministrare

la memantina con gli inibitori della colinesterasi per ricevere ulteriori benefici sui sintomi della demenza e comportamentali.

Secondo uno studio, (Athar et al., 2021) dimostra come l'associazione di memantina e donepezil (rispettivamente 28 mg e 10 mg una volta al giorno) ha portato risultati efficaci nel miglioramento di problemi comportamentali e sintomi cognitivi in pazienti con AD da moderata a grave, rispetto alla combinazione della memantina e placebo.

# Capitolo 3

## DMTs (disease modifying therapies) e insuccessi

Negli ultimi quarant'anni ci sono stati diversi progressi scientifici riguardanti la ricerca di farmaci che andassero a modificare la malattia, le cosiddette “*Disease Modifying Therapies*” (DMTs). Sono state sviluppate terapie che inibiscono la formazione del peptide amiloide (come l'approvazione dell'anticorpo anti-A $\beta$  che lega l'aggregato -aducanumab-, alla proteina Tau) e riguardanti l'immunità innata. Sebbene per alcuni sia considerata una svolta, altri studiosi rimangono poco convinti dei dati alla base degli studi effettuati (Pardo-Moreno et al., 2022)

### 3.1 Molecole che inibiscono la formazione del peptide

#### A $\beta$

L'ipotesi amiloidogenica sostiene che l'accumulo extracellulare di placche amiloidi, costituite da peptidi A $\beta$ , sia una delle caratteristiche principali della patogenesi della malattia di Alzheimer.

Come descritto in precedenza, la formazione dei peptidi A $\beta$  avviene dopo un processo proteolitico sequenziale (Gouras et al., 2015)

È importante sottolineare che il taglio che effettua la  $\gamma$ -secretasi non è del tutto preciso, e questo può avere come conseguenza la formazione di diverse isoforme del peptide con

lunghezze diverse nella parte C-terminale, e le isoforme più lunghe tendono ad aggregarsi più frequentemente e sono considerate le principali responsabili della malattia.

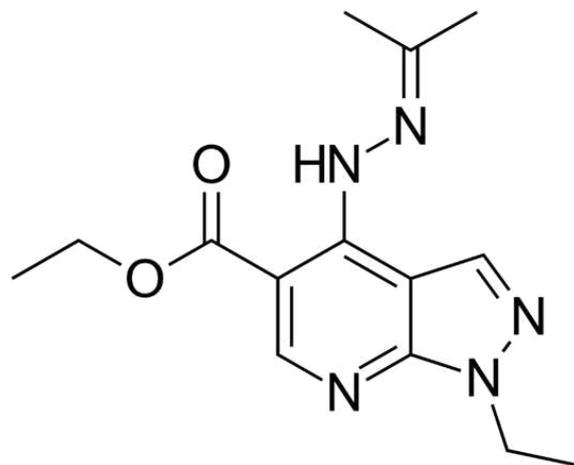
Quindi, siccome il ruolo della  $\beta$  e  $\gamma$  secretasi sembrerebbe indispensabile per la formazione dei peptidi  $\beta$  amiloidi, si è pensato che una loro inibizione o modulazione a livello cerebrale potrebbe dare come risultato una diminuzione dei livelli di  $A\beta$ , dando dei benefici sulla malattia (Pardo-Moreno et al., 2022).

La ricerca si è focalizzata su molecole abbastanza piccole (con un peso molecolare minore di 400 Dalton) in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) utilizzando una diffusione sia passiva che attiva e con un buon bilancio idro-lipofilo.

### 3.1.1 Modulatore della $\alpha$ -secretasi

Un bersaglio farmacologico importante potrebbe riguardare la modulazione dell' $\alpha$  secretasi, in quanto questo enzima è responsabile del clivaggio dell'APP, che innesca la via non amiloidogena. L'attivazione dell' $\alpha$  secretasi è mediata dalla via della PI3K/Akt (via della fosfatidilinositolo 3-chinasi), attraverso la segnalazione del GABA: quindi composti la cui azione è simile ai modulatori selettivi dei recettori GABA o attivatori di questa via possono costituire una nuova frontiera per le terapie contro l'Alzheimer.

#### 3.1.1.1 Etazolato



**Figura 3.1:** Struttura chimica dell'etazolato.

L'etazolato [EHT0202, (Fig.3.1)], un modulatore dei recettori GABA, ha dimostrato sicurezza in pazienti con AD da lieve a moderato, come evidenziato da uno studio clinico di fase II (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020). Questo composto induce l'attività della secretasi inibendo la morte neuronale indotta da  $A\beta$  ma non si è riscontrato alcun beneficio cognitivo. Per questo motivo, l'attività di questo composto non è stata approfondita in studi di fase III (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020).

### 3.1.1.2 PRX-03140

Nel 2008 è stato osservato che PRX-03140, un parziale agonista del recettore 5-HT<sub>4</sub>, induceva l'attivazione dell' $\alpha$  secretasi e si è osservato negli studi di fase II un miglioramento delle funzioni cognitive, ma non ci sono stati ulteriori studi a riguardo (Johnson et al., 2012).

### 3.1.1.3 APH-1105 e ID1201 – in fase di studio

Inoltre, anche APH-1105 e ID1201 sono molecole che attivano la via PI3K/Akt e attualmente sono oggetto di studi clinici di fase II (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020).

La somministrazione del primo è intranasale e si stanno valutando tollerabilità, sicurezza ed efficacia in soggetti con AD lieve-moderata.

ID1201 invece è stato estratto dal frutto di *Melia toosendan* ed è stato valutato in soggetti con lieve- moderata malattia di Alzheimer (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020).

In uno studio (Cho et al., 2014) effettuato *in vivo* si sono osservati migliori prestazioni cognitive in topi trattati con ID1201 rispetto ai topi di controllo con una riduzione dei livelli di  $A\beta_{42}$  nell'ippocampo.

## 3.1.2 Modulatori della $\beta$ secretasi

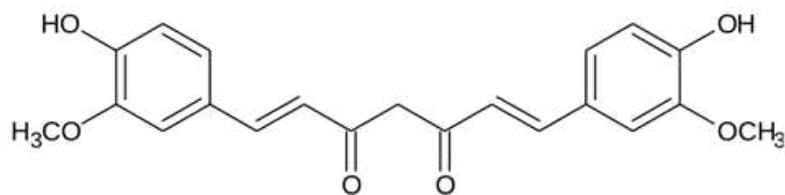
La  $\beta$  secretasi, chiamata anche BACE-1, è una proteasi aspartica simile alla pepsina; possiede un sito attivo stretto e profondo che lega due residui amminoacidici di acido aspartico. Questo enzima genera il peptide  $\beta$  amiloide, tagliando APP a livello del dominio extracellulare nella parte N-terminale (Das et al., 2021).

Per questo motivo, si possono sfruttare inibitori di BACE-1 al fine di prevenire la formazione di oligomeri  $A\beta$ . Sono stati riscontrati però dei problemi usando questo approccio,

perché BACE-1 influenza la neurogenesi, la formazione del fuso neuromuscolare e la mielinizzazione, e una sua inibizione può portare a una riduzione anche di queste funzioni, oltre che a una inibizione della scissione dell'APP (Panza et al., 2019).

Per questo motivo attualmente ci sono pochi inibitori in fase clinica III, a causa della tossicità nell'uomo. I primi composti naturali con questa azione sono la curcumina, asiaticoside e triptolide.

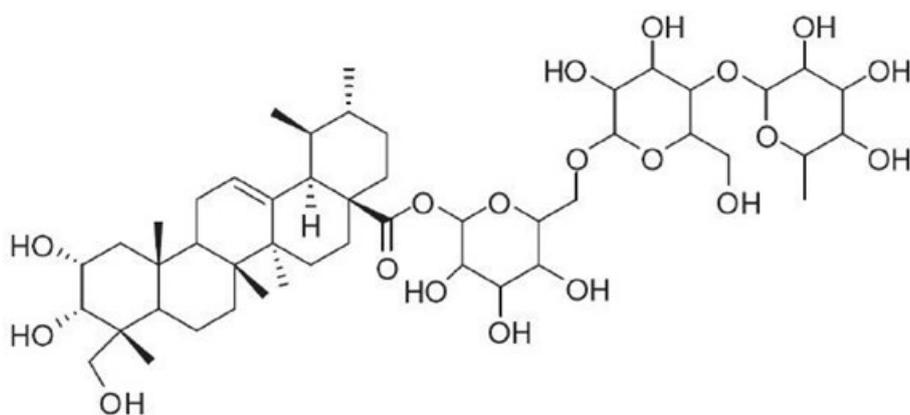
### 3.1.2.1 Curcumina



**Figura 3.2:** Struttura chimica curcumina.

Sono stati effettuati diversi studi *in vitro* e *in vivo* sulla curcumina (Fig.3.2) dove si è osservata una riduzione dei livelli di  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  nei topi, la prevenzione dell'aggregazione  $A\beta$  e delle fibrille, inibizione di BACE e infine induzione dell' $\alpha$  secretasi (Huang et al., 2019).

### 3.1.2.2 Asiaticoside



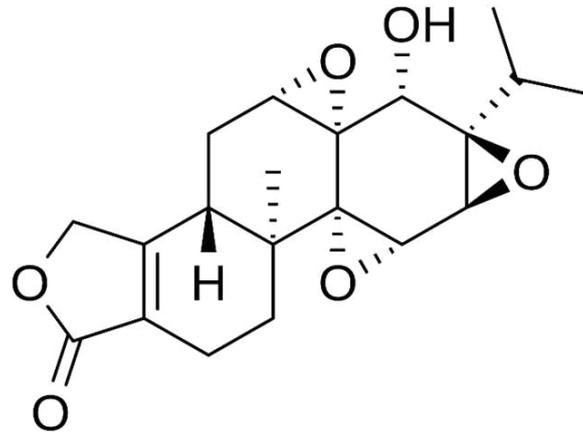
**Figura 3.3:** Struttura chimica asiaticoside.

L'asiaticoside (Fig.3.3) è un composto polifenolico estratto dalla Centella Asiatica, noto per le sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Oltre a questi benefici, l'asiaticoside

ha dimostrato un potenziale neuroprotettivo, poiché riduce i livelli di  $A\beta_{42}$ , una delle forme tossiche di  $\beta$  amiloide, nei neuroni di pazienti affetti da Alzheimer, prevenendo così l'amiloidogenesi (Zhang et al., 2016).

In uno studio recente (Liu et al., 2023) è emerso che la somministrazione *in vivo* di questo composto (40 mg/kg), attenua la neuroinfiammazione andando a inibire l'attivazione della microglia nei topi con AD.

### 3.1.2.3 Triptolide



**Figura 3.4:** Struttura chimica triptolide.

Il triptolide (Fig. 3.6) è un diterpenoide epossidico isolato dalla *Tripterygium wilfordii*, che si lega ai siti catalitici Asp32 e Asp28 dell'enzima BACE-1, inibendo così il taglio della proteina precursore dell'amiloide (Mao et al., 2023).

Da uno studio recente si è osservato che il triptolide, somministrato *in vivo* a un gruppo di topi maschi sani C57BL/6J, ne ha migliorato la memoria e l'apprendimento e ha ridotto l' $A\beta$  nel cervello (Mao et al., 2023).

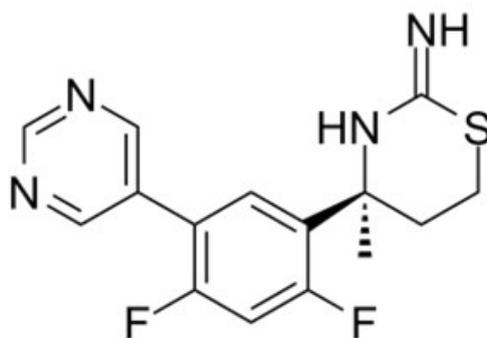
### 3.1.2.4 Inibitori BACE-1

#### Inibitori BACE-1 di prima generazione

Gli inibitori BACE-1 di prima generazione (come ad esempio BI 1181181) sono degli analoghi peptidici dello stato di transizione, ma *in vivo* mostrano una bassa biodisponibilità orale e una bassa capacità di penetrare la BEE in quanto, essendo molecole peptidiche, hanno grandi dimensioni (Uddin et al., 2020).

### Inibitori BACE-1 di seconda generazione

LY2811376 (Fig. 3.6) e LY2886721 (Fig. 3.5), sono composti appartenenti alla seconda generazione.



**Figura 3.5:** Struttura chimica LY2811376.

Il primo è stato sottoposto a studi *in vitro* per valutare le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche durante la fase clinica I, e successivamente a studi tossicologici a lungo termine nel topo sono stati osservati effetti tossici sul cervello e sulla retina. Nonostante questi non fossero riconducibili all'uso del farmaco, si è deciso di interrompere gli studi. (May et al., 2011)

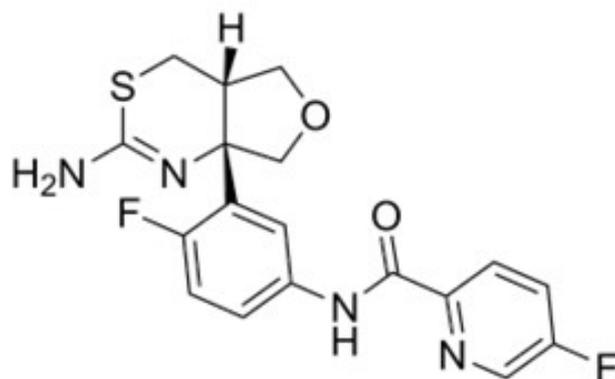
Da questo composto è stato prodotto LY2886721, sul quale sono stati effettuati studi di fase I e II, nei quali sono stati arruolati 47 pazienti sani ed è stato somministrato oralmente il farmaco per 14 giorni e il placebo. Da questi studi si è osservata un'emivita del farmaco di 12h, compatibile a una singola somministrazione giornaliera (Martenyi et al., 2012).

### Inibitori BACE-1 di terza generazione

Tra i composti di terza generazione invece si trovano atabecestat, lanabecestat, verubecestat, umibecestat, e elenbecestat.

Gli studi su atabecestat sono stati interrotti a causa del peggioramento delle prestazioni cognitive rispetto al placebo e per motivi di sicurezza (Uddin et al., 2020).

Gli studi di fase III su lanabecestat (Burki, 2018) sono stati interrotti a causa della mancanza di efficacia, e anche quelle su verubecestat (Egan et al., 2019) per motivi di sicurezza (come tossicità epatica e rush).



**Figura 3.6:** Struttura chimica LY2886721

Attualmente, solo due di questi sono ancora in fase di studio: elenbecestat (E2609) in fase II e umibecestat, in fase III (CNP520) (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020).

I soggetti inclusi negli studi clinici citati, sono individui ad alto rischio di AD, con età compresa tra 60-75 anni, con genotipo APOE4 e alti livelli di amiloide nel cervello (rilevati dai biomarcatori del liquido cerebrospinale o dalla PET) (Lopez Lopez et al., 2017).

Gli studi su umibecestat hanno evidenziato che questo diminuisce il deposito di placche  $A\beta$  nel cervello e nel liquor cerebrospinale di cani, ratti e adulti sani con età uguale o maggiore di 60 anni (Breijyeh and Karaman, 2020).

Nonostante questi composti abbiano dimostrato un risultato importante e dose-dipendente nel ridurre  $A\beta_{42}$  nel liquor, non sono stati evidenziati benefici cognitivi. Questo può supportare l'ipotesi che bloccare la formazione del peptide  $\beta$ -amiloide può non essere in grado di arrestare la progressione della malattia Panza et al. (2019).

### 3.1.3 Inibitori delle $\gamma$ -secretasi

Le  $\gamma$ -secretasi appartengono alla classe delle proteasi e sono coinvolte in diversi processi fisiologici associati all'Alzheimer. Sono formate da quattro proteine: presenilina 1, presenilina 2, nicastrina e APH1, e insieme formano un complesso enzimatico stabile. Sono presenti 180 mutazioni autosomiche dominanti delle preseniline, responsabili dell'insor-

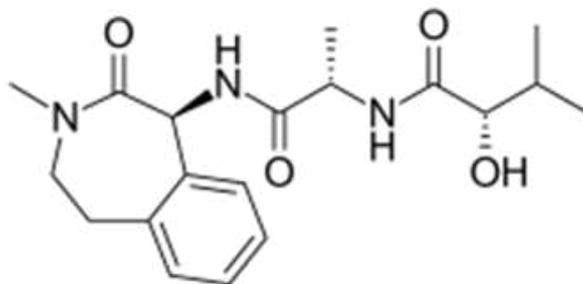
genza precoce dell'AD, portando ad un aumento della produzione di  $A\beta_{1-42}$ , isoforma del peptide  $\beta$  amiloide che tende ad autoaggregarsi. Inibendo questo enzima si può ridurre la produzione di peptidi  $A\beta$ , favorendo la via non amiloidogena (Pardo-Moreno et al., 2022).

Alcuni inibitori delle  $\gamma$ -secretasi sono stati oggetto di studi clinici per il trattamento dell'AD.

### 3.1.3.1 Inibitori di prima generazione

Gli inibitori  $\gamma$ -secretasi prima generazione hanno causato diversi effetti collaterali, come tossicità gastrointestinale e una maggiore suscettibilità alle infezioni (Pardo-Moreno et al., 2022). Successivamente, sono state identificate altre molecole in grado di ridurre la produzione di  $\beta$ -amiloide sia nel cervello di topo che nel cervello umano con una buona biodisponibilità orale e alcune di esse, sono in fase di studio clinico.

### 3.1.3.2 Semagacestat



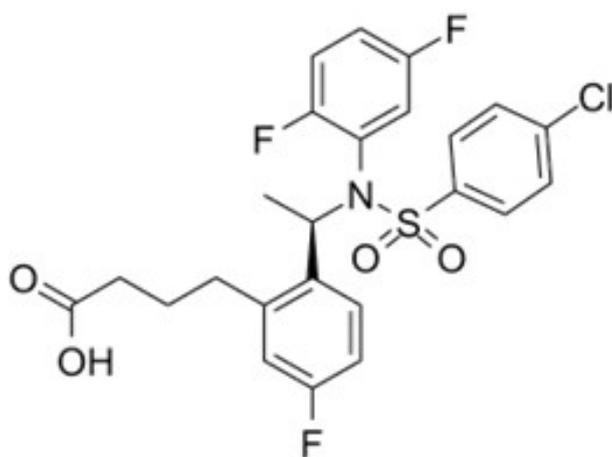
**Figura 3.7:** Struttura chimica semagacestat.

Tra queste molecole si ricorda il semagacestat (LY-450139, Fig. 3.9), che ha raggiunto la fase III. Esso ha dimostrato di ridurre in modo dose-dipendente i livelli di  $A\beta$  nel cervello, nel liquido cefalorachidiano e nel plasma; tuttavia, ha una finestra terapeutica molto ristretta. L'azienda produttrice Eli Lilly ha sospeso i trials di questo farmaco perché causava un importante declino cognitivo nei soggetti trattati rispetto al placebo. La spiegazione di questi effetti non promettenti risiede in un *effetto rebound*, che causa una produzione anomala di  $\beta$ -amiloide, o nell'inibizione della  $\gamma$ -secretasi, che, oltre a compromettere la proteolisi dell'APP, interagisce anche su altri substrati coinvolti nei

processi cognitivi. È questo il motivo principale per cui studi clinici su molti inibitori delle  $\gamma$ -secretasi sono falliti (Pardo-Moreno et al., 2022).

Per ovviare a queste problematiche sono stati sviluppati inibitori più recenti, i quali sono più selettivi verso l'APP rispetto ad altri substrati.

### 3.1.3.3 BMS-299897

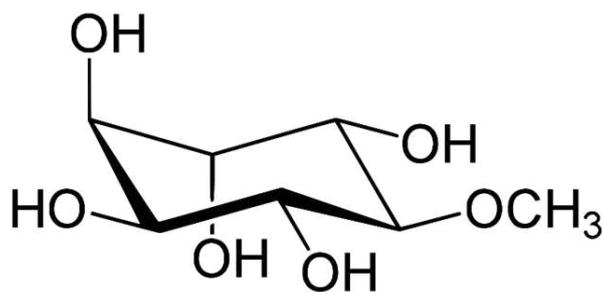


**Figura 3.8:** Struttura chimica BMS-299897.

BMS-299897 (Fig. 3.8), sviluppato dall'azienda Bristol-Myers Squibb, ha la capacità di ridurre in modo tempo e dose dipendente i livelli di  $A\beta$  nel liquido cefalorachidiano, nel plasma e nel cervello di topi Tg2576 giovani. Inoltre, ha una selettività 15 volte maggiore per APP rispetto ad altri substrati, ma il suo profilo farmacologico, come il suo meccanismo di azione, non sono ancora del tutto chiari (MedChem).

### 3.1.3.4 Pinitolo

Un altro da ricordare è il Pinitolo (NIC5-15, Fig. 3.9), uno zucchero presente in natura, che attualmente si trova in fase II di sperimentazione clinica e ha dimostrato buona tolleranza e sicurezza (Mohamed et al., 2023).



**Figura 3.9:** Struttura chimica Pinitolo.

### 3.1.4 Antiaggreganti della proteina $A\beta$

Gli inibitori dell'aggregazione  $A\beta$  sono delle potenziali terapie per l'AD in quanto interagiscono in modo diretto con il peptide  $A\beta$ , inibendo la formazione di filamenti di  $A\beta_{42}$ .

#### 3.1.4.1 ELND005

Un antiaggregante  $A\beta_{42}$  studiato sull'uomo è ELND005, scillo-inositolo, anche se durante la fase clinica II non ha fornito benefici in pazienti affetti da AD e si è interrotto lo studio perché causava infezioni (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020).

#### 3.1.4.2 KLVFF

Sono stati testati anche mediante TEM (microscopio elettronico a trasmissione) composti peptidomimetici inibitori l'aggregazione di  $A\beta_{42}$ , come per esempio KLVFF.

Questo composto è una sequenza peptidica simile alla parte centrale idrofobica dell' $A\beta$  e impedisce principalmente l'aggregazione dell' $A\beta_{42}$  dissolvendo gli oligomeri fino a formare un composto di KLVFF finale, resistente alla proteolisi (Stark et al., 2017).

#### 3.1.4.3 $\gamma$ -AA26

Un'altra classe di peptidomimetici sono i  $\gamma$ -AApeptidi, tra cui il composto  $\gamma$ -AA26, il quale è parso essere fino a 100 volte più efficiente del composto 18 del KLVFF nell'inibire l'aggregazione dell' $A\beta_{42}$  (Nimmagadda et al., 2019).

#### 3.1.4.4 Tramiprosato

Un altro composto antiaggregante è il tramiprosato, composto organico solforato somministrato oralmente. Questo è in grado di ridurre l'aggregazione oligomerica dell'amiloide, stabilizzando il monomero  $A\beta_{42}$  (Uddin et al., 2020).

#### 3.1.4.5 Resveratrolo

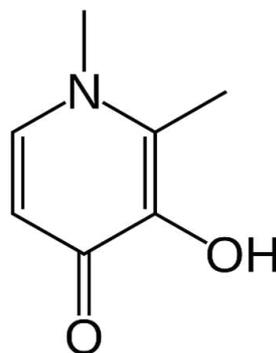
È stato osservato in diversi studi che il resveratrolo, polifenolo non flavonoide presente nel vino rosso, è implicato nella riduzione della  $A\beta$  secreta attraverso l'inibizione di BACE-1 e anche nella degradazione di  $A\beta$  intracellulare mediata dal proteosoma; diminuisce l'accumulo di  $A\beta$  extracellulare aumentando l'attività della chinasi AMPK (AMP-activated protein kinase) che induce degradazione lisosomiale e autofagia dello stesso peptide (Sawda et al., 2017).

### 3.1.5 Chelanti metallici

La disomeostasi di ioni metallici o l'accumulo anomalo di metalli quali ferro, rame e zinco è correlato alla fisiopatologia dell'AD (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2020).

L'aumento della concentrazione di ioni metallici con potenziale ossidoriduttivo può portare a danni al DNA, disfunzioni mitocondriali e formazione di ROS e specie reattive dell'azoto (RNS) come l'ossido nitrico, ossidrilico e il radicale superossido.

#### 3.1.5.1 Deferiprone

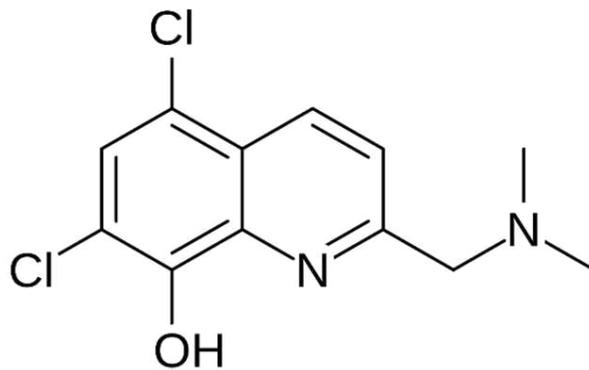


**Figura 3.10:** Struttura chimica deferiprone.

Il deferiprone (Fig. 3.10), agente chelante del ferro, è stato oggetto di studi di fase II in soggetti con AD lieve e prodromica (Cummings et al., 2024).

In studi randomizzati il deferiprone, somministrato per via orale e permeabile al cervello, ha dimostrato di migliorare i sintomi neurologici legati al ferro (Klopstock et al., 2019).

### 3.1.5.2 PBT2



**Figura 3.11:** Struttura chimica PBT2.

Il composto PBT2 (Fig. 3.11), noto per la sua capacità di inibire le metallo proteine, è stato oggetto di studi per il trattamento dell'Alzheimer. (Krishnan et al., 2018).

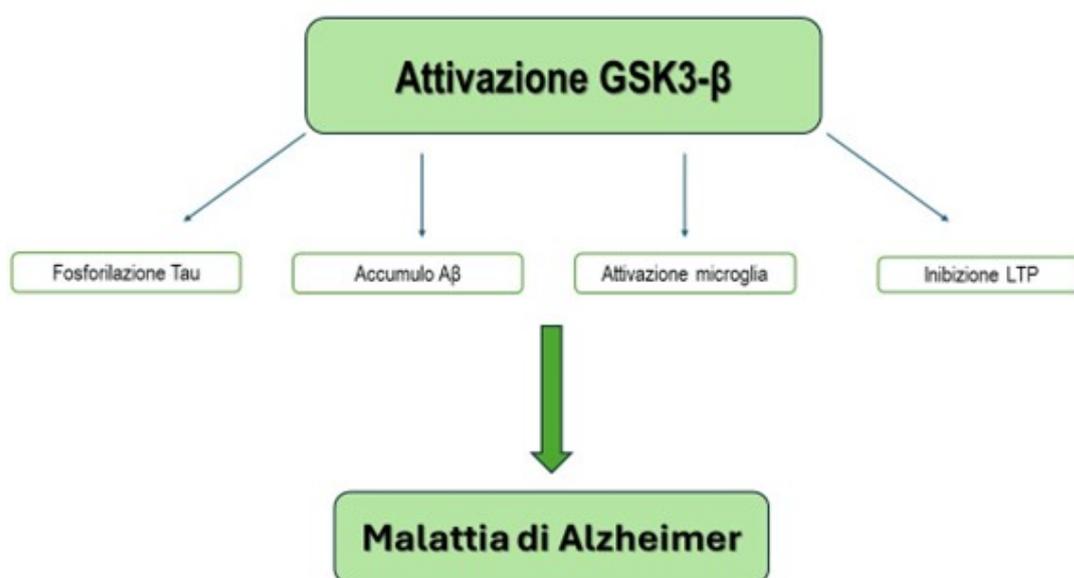
PBT2 è uno ionoforo rame-zinco ed è un analogo dell'8-idrossichinolina di seconda generazione, destinato a costituire un potenziale trattamento del morbo di Alzheimer.

È stato eseguito uno studio di fase II, in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo, della durata di 12 settimane che valutava sicurezza, tollerabilità ed efficacia di due livelli di dose di PBT2 al fine di rallentare la progressione dell'AD in 78 pazienti. Si è evidenziato che la dose di 250 mg di PBT2 è ben tollerata ed è stata in grado di ridurre del 13% i livelli di  $\beta$  amiloide-42 nel CSF (liquido cefalorachidiano). I risultati ottenuti sono promettenti e incoraggiano ulteriormente la sperimentazione del PBT2 per l'AD (Villemagne et al., 2017).

## 3.2 Farmaci bloccanti la fosforilazione e aggregazione della proteina Tau

### 3.2.1 Inibitori delle chinasi

Questo approccio prevede l'inibizione di chinasi specifiche, come la glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3), al fine di ridurre la deposizione e l'iperfosforilazione della proteina Tau. La glicogeno sintasi chinasi 3 è una serina-treonina chinasi espressa in modo ubiquitario e costitutivamente attiva, è coinvolta nella regolazione di molte vie chiave della biologia cellulare, tra cui la neurodegenerazione. Ci sono due isoforme di GSK3: GSK3- $\alpha$  e GSK3- $\beta$ , codificate da geni diversi (Lauretti et al., 2020).

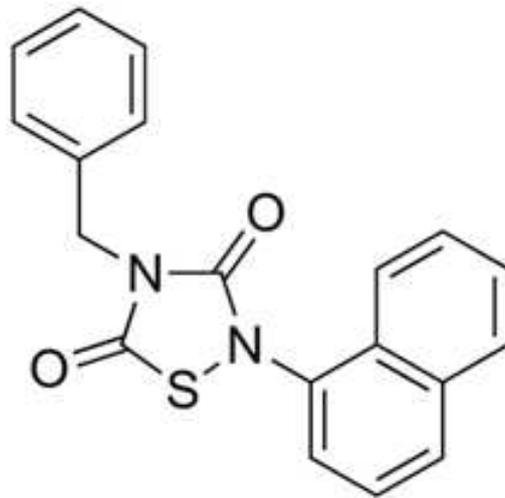


**Figura 3.12:** Ruolo di GSK3- $\beta$  nella patologia dell'Alzheimer. GSK3- $\beta$  contribuisce alla neurodegenerazione promuovendo l'iperfosforilazione della proteina Tau. Inoltre, favorisce la produzione e l'accumulo di amiloide, che induce apoptosi e danno neuronale nell'AD. GSK3- $\beta$  è dotata di attività pro-infiammatoria, regola la risposta della microglia, le cellule immunitarie del SNC e promuove la produzione di molecole infiammatorie. Oltre a ciò, svolge un ruolo cruciale nella regolazione della neurogenesi ippocampale, essenziale per l'apprendimento e la memoria, entrambi compromessi nella malattia di Alzheimer. Infatti la sua iperattivazione è collegata all'inibizione del potenziamento a lungo termine dell'ippocampo (LTP), essenziale per la formazione della memoria.

L'isoforma GSK3- $\beta$  è la più abbondante nel SNC e i suoi livelli di espressione aumentano con l'età (Fig. 3.12). Si ritrova anche nel cervello di pazienti affetti da AD e molti studi sostengono che ha un ruolo chiave nella patologia dell'AD. La disregolazione di questa chinasi influisce sulla tossicità di A $\beta$  e Tau *in vitro* e in modelli di AD *in vivo* ed è implicata nella neurogenesi, nella plasticità sinaptica e nella memoria (Llorens-MarÃtin et al., 2014).

Dato il ruolo significativo di GSK3- $\beta$  nella fisiopatologia dell'AD, si è ipotizzato che una sua inibizione possa costituire un possibile approccio terapeutico. In uno studio è stato osservato che GSK3- $\beta$  riduce la neurogenesi dell'ippocampo dell'adulto e induce la morte neuronale nella nicchia neurogenica del giro dentato (Sirerol-Piquer et al., 2011).

### 3.2.1.1 Tideglusib



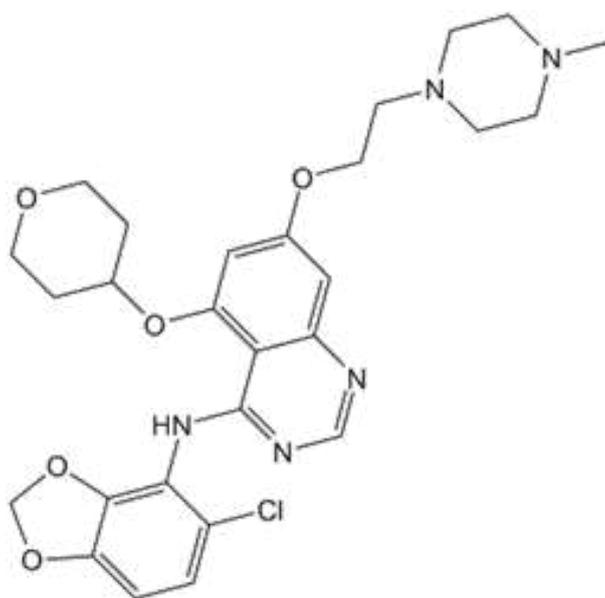
**Figura 3.13:** Struttura chimica Tideglusib

Un esempio di inibitore è il Tideglusib (NP-12, NP-031112, Fig. 3.13)], che ha promosso la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali neurali del giro dentato dell'ippocampo in ratti adulti (Morales-Garcia et al., 2012)

È un inibitore GSK-3 $\beta$  non competitivo con l'ATP, in grado di abbassare i livelli di fosforilazione della Tau e diminuire la deposizione di A $\beta$  (Wang et al., 2016).

Tideglusib è stato testato in due studi clinici di fase II in pazienti con AD da lieve a moderata mostrando una buona tollerabilità, ma purtroppo senza nessun miglioramento clinico significativo (Lauretti et al., 2020).

### 3.2.1.2 Saracatinib



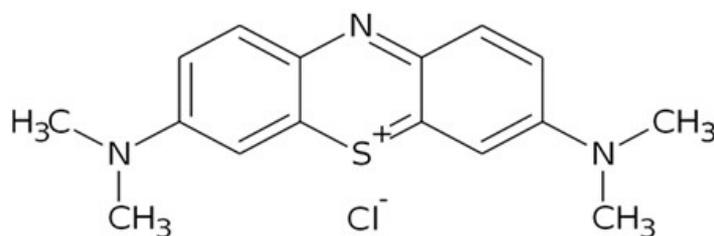
**Figura 3.14:** Struttura chimica saracatinib.

Saracatinib (AZD0530, Fig. 3.14), è un doppio inibitore della tirosina chinasi Src-Abl, inizialmente sviluppato da AstraZeneca per trattare il cancro. I dati clinici di fase II hanno dimostrato una scarsa azione terapeutica contro diversi tipi di cancro e un elevato tasso di effetti avversi. È stato quindi riproposto per il trattamento della malattia di Alzheimer, mostrando ottimi risultati clinici con una dose giornaliera inferiore a quella per il trattamento del cancro, ovvero di 125 mg (rispetto a 175 mg). Inoltre, è stato studiato anche in relazione ad altre patologie, come la fibrosi epatica e polmonare e anche come analgesico e antiallergico. Nonostante saracatinib non abbia ancora ricevuto l'approvazione dall'FDA, il suo ampio uso alternativo e la vasta mole di studi preclinici e clinici evidenziano l'enorme potenziale di questo composto per il trattamento di diversi tipi di malattie (Ramos and Vale, 2024).

### 3.2.2 Inibitori dell'aggregazione di Tau

Questa classe di molecole è capace di ridurre i grovigli neurofibrillari attraverso un meccanismo che coinvolge il malfunzionamento dei complessi endosoma-lisosoma, responsabili dell'auto-legame della proteina Tau (Anand and Sabbagh, 2015).

#### 3.2.2.1 Blu di Metilene



**Figura 3.15:** Struttura chimica Blu di Metilene

Ci sono piccole molecole in grado di inibire la fase iniziale dell'aggregazione della proteina Tau, e di conseguenza il suo accumulo, come il Blu di Metilene (MB, Fig. 3.15)] che, nonostante colori le urine di blu, è in fase clinica II per il trattamento dell'AD da lieve a moderato (Breijyeh and Karaman, 2020).

Uno studio in monoterapia con MB sull'AD lieve e moderato (NCT00515333) ha dimostrato un discreto beneficio clinico nell'AD moderato, ma non in quello lieve (Wischik et al., 2014). La metodologia di questo studio è stata molto criticata in quanto è stato impossibile svolgerlo del tutto in cieco (Medina, 2018).

#### 3.2.2.2 Idrometiltionina (LMTX)

L'attività del derivato del blu di metilene idrometiltionina (LMTX<sup>®</sup>) è stata approfondita in fase III, ma purtroppo non ha mostrato efficacia, e sulla base dei risultati, è stato avviato un nuovo studio di fase II-III chiamato LUCIDITY nel quale sono arruolati soggetti con AD lieve e ai quali è stato somministrato LMTX in un dosaggio inferiore (Wilcock et al., 2017). LUCIDITY è uno studio randomizzato, controllato con placebo, in due fasi, che valuta la sicurezza e l'efficacia dell'idrometiltionina in pazienti con malattia di Alzheimer da lieve a moderata. La prima fase è svolta in doppio cieco per 12 mesi e la seconda fase in

aperto sempre per 12 mesi. L'obiettivo di questo studio è quello di dimostrare attraverso valutazioni cognitive e funzionali standard che, rispetto al placebo, la terapia con LMTX da sola è efficace nel ritardare la progressione clinica della malattia. Al momento, è stato completato anche un ultimo studio clinico di fase III (TauRx), rivolto a pazienti con un decadimento cognitivo lieve e lieve-moderato, che ha usato valutazioni cognitive, PET e risonanza magnetica per valutare l'efficacia.

Per concludere, i TAIs, gli inibitori dell'aggregazione di Tau, agiscono sulla causa alla base della malattia, piuttosto che sul trattamento dei sintomi prevenendo la formazione di grovigli neurofibrillari che causano la demenza.

### **3.2.3 Stabilizzatori dei microtubuli**

La fosforilazione della proteina Tau riduce la sua affinità per i microtubuli, causandone il distacco e portando ad instabilità neuronale. Di seguito sono riportati esempi di agenti stabilizzanti dei microtubuli per la terapia di Alzheimer.

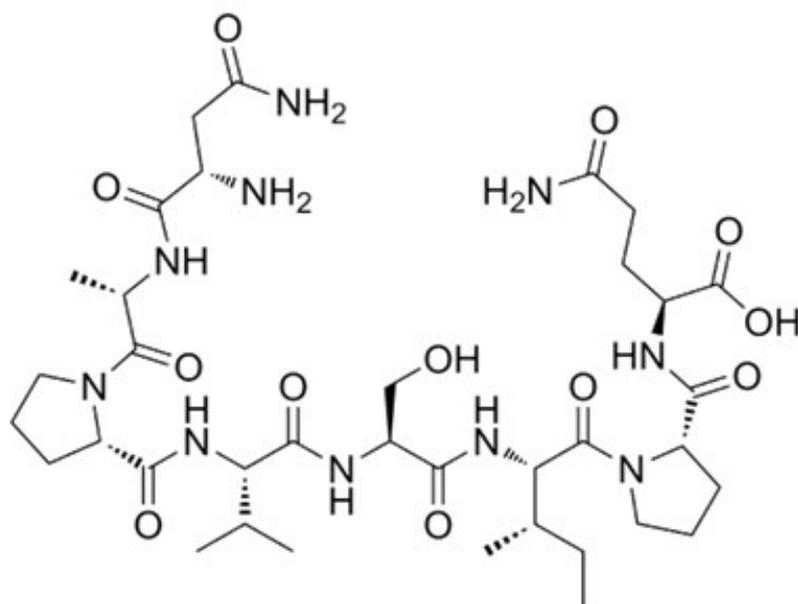
#### **3.2.3.1 Davunetide**

Davunetide (Fig. 3.16), è stato oggetto di studio di fase II, ma senza raggiungere gli endpoint clinici (Morimoto et al., 2013).

La davunetide è in grado di colpire non solo l'aggregazione Tau ma è anche coinvolta nella regolazione genica della proteina stessa; inoltre, interagisce con complessi proteici come le proteine EB1 ed EB3, coinvolte nella neuroprotezione e nella plasticità neuronale (Anand and Sabbagh, 2015).

#### **3.2.3.2 TPI-287**

TPI-287 (abeotaxane, Fig. 3.17) è una piccola molecola derivata dal tassolo, ed è un modulatore delle proteine dei microtubuli. È stata oggetto di uno studio di fase I e II (NCT01966666) nei quali è stata somministrata per via endovenosa in pazienti con AD da lieve a moderata. I primi risultati hanno evidenziato che l'agente non è stato ben tollerato dai partecipanti allo studio (Wilcock et al., 2017).



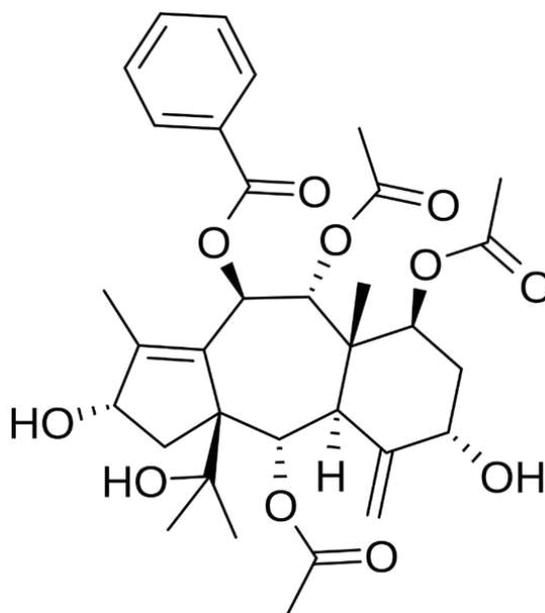
**Figura 3.16:** Struttura chimica davunetide.

### 3.2.3.3 BIIB080

BIIB080, un inibitore dell'RNA della proteina tau associata ai microtubuli, è un oligonucleotide antisense, su cui è in corso uno studio di fase II ancora in fase di reclutamento di pazienti con AD lieve (Lane et al., 2017).

## 3.3 L'immunoterapia

L'approccio immunoterapico si focalizza soprattutto sulla riduzione della  $A\beta$  e della proteina Tau. Con l'immunoterapia attiva si è pensato di usare anticorpi contro il peptide  $A\beta$  al fine di ridurre la quantità tramite induzione della loro produzione; per immunoterapia passiva invece si intende la somministrazione di anticorpi monoclonali (mAbs) (Wisniewski and Goñi, 2015).



**Figura 3.17:** Struttura chimica TPI-287

### 3.3.1 Immunoterapia attiva

L'immunoterapia attiva si pone l'obiettivo di stimolare il sistema immunitario a riconoscere un antigene come una proteina esterna, in modo da generare una risposta immunitaria contro di essa. Nel caso del peptide  $A\beta$ , si usa un peptide sintetico o un suo frammento al fine di attivare i linfociti B e indurli a produrre anticorpi specifici che sequestrano l'amiloide nel cervello, riducendone il deposito e distruggendo le placche (Wisniewski and Goñi, 2015).

Questo approccio è vantaggioso in quanto permette di indurre una produzione di anticorpi a lungo termine, richiede poche visite mediche ed è conveniente.

Ma dall'altro lato, la risposta immunitaria è variabile e la specificità degli anticorpi può essere difficile da prevedere, con reazioni avverse difficili da gestire. Negli anziani il sistema immunitario può essere meno efficace e questo influisce negativamente sulla terapia.

#### 3.3.1.1 Vaccini anti- $A\beta$

##### AN-1792

Il primo vaccino AN-1792 agiva attivando i linfociti T specifici per  $A\beta$ , e per questo risultava dannoso. Quelli di seconda generazione inducono una risposta umorale, in modo

da produrre anticorpi anti- $A\beta$  senza l'attivazione dei linfociti T (Wisniewski and Goñi, 2015).

### **Vanutide cridificar (ACC-001)**

Vanutide cridificar è un frammento N-terminale della  $A\beta$ , testato in diversi studi di fase II. Ha dimostrato sicurezza e tollerabilità, ma non si sono osservate differenze nei livelli di biomarcatori del liquor, tra il gruppo di trattamento e quello di controllo. Lo sviluppo clinico di vanutide cridificar è stato quindi interrotto (Vaz and Silvestre, 2020).

### **CAD106**

in fase clinica III si trova un vaccino anti- $A\beta$ , CAD106, che è un antigene di  $A\beta$  formato da copie multiple del frammento  $A\beta_{1-6}$ , coniugato a un vettore adiuvante che contiene 180 copie della proteina di rivestimento del batteriofago Q $\beta$ . CAD106 è una immunoterapia di seconda generazione, progettata per stimolare una risposta delle cellule B ma senza l'attivazione di cellule T  $A\beta$ -specifiche, che causavano gravi effetti avversi. Dagli studi in vitro, si è evinto che gli anticorpi generati da CAD106 reagiscono con monomeri e oligomeri di  $A\beta$ . In modelli di topi transgenici CAD106 ha dimostrato di ridurre l'accumulo di amiloide nel cervello senza causare reazioni infiammatorie (Panza et al., 2019).

In uno studio di fase II randomizzato, realizzato in doppio cieco e controllato con placebo della durata di 90 settimane, condotto su soggetti affetti da AD lieve, questo vaccino ha dimostrato sicurezza e tollerabilità accettabile, evidenziando una correlazione tra la risposta anticorpale e la variazione dell'amiloide cerebrale misurata mediante PET nei pazienti trattati (Vandenberghe et al., 2016).

Alla luce del suo meccanismo di azione, il trattamento con questo farmaco è ottimale se iniziato nella fase preclinica della malattia, prima dello sviluppo dei sintomi, nella fase iniziale dell'accumulo di  $A\beta$  nel SNC e anche prima della comparsa di placche  $A\beta$  poiché il lento accumulo di  $A\beta$  nel cervello inizia un decennio o più prima della comparsa dei sintomi (Panza et al., 2019).

#### **3.3.1.2 Vaccini anti-Tau: AADvac1**

Sono in fase di studio anche vaccini anti-Tau, come per esempio AADvac1. Questo vaccino, è composto da un peptide N-terminale coinvolto nell'interazione Tau-Tau, ed è coniugato

con una metalloproteina KLH (keyhole limpet hemocyanin). Dai risultati ottenuti si è osservata una riduzione della proteina Tau patologica iperfosforilata. Nell'uomo, il trattamento con AADvac1 ha portato ad alti tassi di risposta IgG anche in pazienti anziani affetti da AD. Inoltre, gli anticorpi indotti risultano più affini alla tau patologica rispetto a quella sana e sono reattivi con tutte le patologie Tau correlate, comprese le lesioni neurofibrillari nell'AD umano. Gli studi di fase I hanno dimostrato che AADvac1 è sicuro (Novak et al., 2018). AADvac1 è stato quindi portato in fase II di sviluppo, in modo da testare la sicurezza e l'immunogenicità in una coorte più ampia di pazienti nello studio ADAMANT (Alzheimer's Disease Active immunization and disease Modification by AXON Neuroscience directed against Tau).

Ai pazienti con AD lieve sono state somministrate undici dosi di AADvac1 a 40 microgrammi per dose nel corso dello studio. Eventi avversi gravi sono stati osservati nel 17,1% dei soggetti trattati con il vaccino e nel 24,1% dei soggetti trattati con placebo. Nonostante i risultati di questo studio abbiano mostrato che AADvac1 è sicuro e immunogeno, sono comunque necessari più studi per valutare la sua efficacia clinica e l'impatto sui biomarcatori della malattia (Novak et al., 2021).

### **3.3.2 Immunoterapia passiva**

Come detto in precedenza, il principale svantaggio dell'immunoterapia attiva è la variabilità nella specificità di anticorpi prodotti da ogni paziente. Per ovviare a questo problema, sono stati presi in considerazione gli anticorpi monoclonali (mAbs). L'immunoterapia passiva ha il vantaggio di colpire un epitopo specifico e consente di interrompere il trattamento in caso di effetti collaterali. Può essere una strategia promettente per il trattamento dell'Alzheimer, in quanto permette lo sviluppo di anticorpi mirati contro  $A\beta$  e gli oligomeri Tau (Güell-Bosch et al., 2016).

Tuttavia, presenta anche degli svantaggi, come l'alto costo di produzione dei mAbs e la necessità di somministrazioni a lungo termine. Dai risultati degli studi è emerso che la somministrazione dei mAbs deve avvenire durante la fase prodromica, perché nei pazienti con deterioramento cognitivo anche lieve i mAbs risultano poco efficaci nel bloccare la progressione della malattia (Güell-Bosch et al., 2016).

All'inizio i trattamenti si sono concentrati sui monomeri e le fibre insolubili, ma dai primi

studi clinici è emersa una mancata efficacia, quindi ci si è concentrati sugli oligomeri, che sono le specie più tossiche di  $A\beta$ .

Sono stati sviluppati anche mAbs anti-Tau, progettati in modo da evitare di attaccare la proteina Tau monomerica nativa, che stabilizza i microtubuli del neurone. Scegliere l'epitopo giusto è necessario per garantire che l'anticorpo elimini solo la specie tossica di Tau. Non ci sono molti dati di efficacia disponibili e la maggior parte degli studi clinici su mAbs anti-Tau sono nella fase I o all'inizio della fase II, come per esempio nel caso di LY330356, JNJ-63733657 o UBC1070 (Vander Zanden and Chi, 2020).

# Capitolo 4

## Gli anticorpi monoclonali nella terapia di Alzheimer

### 4.1 Introduzione

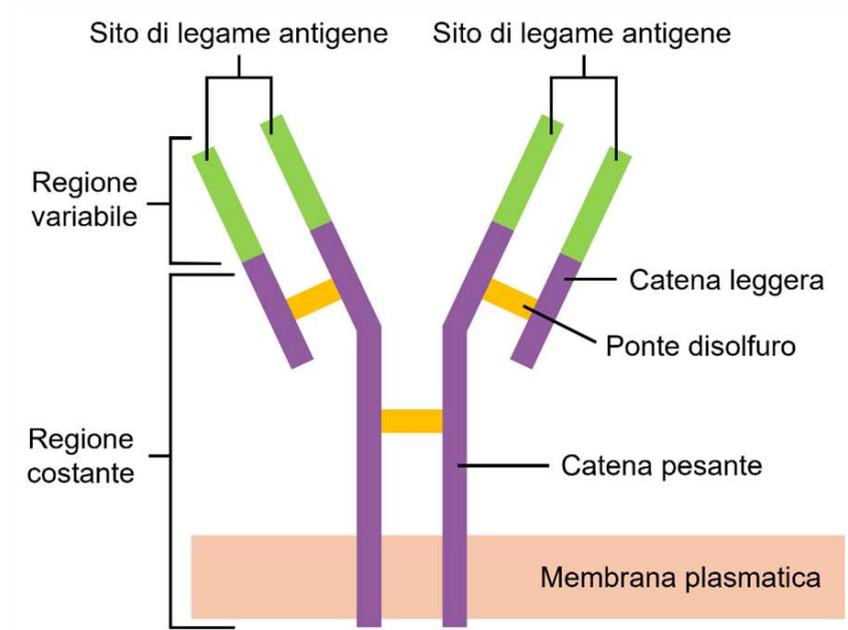
Gli anticorpi monoclonali (mAbs) stanno acquisendo sempre più importanza nella terapia di Alzheimer, aprendo nuove possibilità terapeutiche. A seguire, verranno analizzati la loro struttura, la produzione, le ragioni del loro impiego, il meccanismo d'azione, i possibili effetti tossici e la loro classificazione.

#### 4.1.1 Struttura

I mAbs sono proteine prodotte artificialmente in laboratorio la cui struttura, comune a tutti gli anticorpi, ha una forma di “Y” che è composta da quattro catene polipeptidiche: 2 catene leggere (LC, Light Chains) e due catene pesanti (HC, Heavy Chains) legate tra loro tramite ponti disolfuro.

Le catene pesanti presentano una regione a cerniera e una regione carbossi terminale (C-terminale) caratterizzata da un'elevata conservazione genetica che serve al riconoscimento dell'anticorpo da parte degli effettori dell'immunità innata (come fagociti, monociti e macrofagi) grazie ai recettori delle immunoglobuline.

La porzione C-terminale serve anche ad attivare la cascata del complemento che contribuisce alle risposte contro gli antigeni (*non self*) ed è soggetta a una serie di modifiche post trasduzionali, come glicosilazioni, che rendono l'anticorpo selettivo per la specie da



**Figura 4.1:** Struttura di un anticorpo. Una molecola di anticorpo è composta da quattro polipeptidi: ci sono due catene pesanti e due catene leggere, rispettivamente identiche tra loro e collegate da un ponte disolfuro. All'estremità sono presenti due siti di legame dell'antigene; la base dell'anticorpo è composta da domini costanti che si trovano all'estremità C-terminale.

cui è prodotto. Le regioni costanti determinano la classe dell'anticorpo (es. IgG, IgA, IgM etc.). Nel caso degli anticorpi monoclonali queste regioni possono essere umanizzate per ridurre le reazioni immunitarie nei pazienti (Parray et al., 2020).

Ogni catena ha all'estremità amminoterminale (N-terminale) una regione variabile dove sono presenti delle regioni di complementarità con l'antigene (CDR, regioni determinanti la complementarità); queste regioni sono ripetute più volte sull'estremità terminale fino a creare una sorta di struttura a "serratura" che l'antigene occupa come se fosse una chiave. Le regioni variabili delle catene pesanti e leggere sono responsabili del riconoscimento specifico dell'antigene (Fab, sito di legame per l'antigene). La porzione N-terminale, a differenza di quella C-terminale, presenta una maggior varietà per quanto riguarda la composizione amminoacidica, grazie a processi di ricombinazione, con lo scopo di produrre un numero infinito di codici formali per il riconoscimento di un numero svariato di antigeni (Fig. 4.1).

Gli anticorpi monoclonali sono creati per legarsi specificamente a un unico epitopo di antigene, rendendoli utili per diagnosi e terapie, per questo negli ultimi anni la loro

produzione è aumentata notevolmente (Parray et al., 2020).

### 4.1.2 Produzione

Negli anni '70 è stato prodotto il primo anticorpo monoclonale per uso umano e nel 1984 Jerne, Kohler e Milstein vinsero il premio Nobel per la medicina grazie alla produzione di grandi quantità di mAbs con la messa a punto di una procedura per la formazione dell'ibridoma (Posner et al., 2019).

La produzione degli anticorpi monoclonali segue diverse fasi: (Mitra and Tomar, 2021)

1. Immunizzazione e isolamento delle cellule B;
2. Fusione cellulare;
3. Selezione dell'ibridoma e clonazione.

#### 1. Immunizzazione e isolamento delle cellule B

Si inietta nell'animale di laboratorio (di solito un topo) un antigene contro il quale è necessaria la produzione dell'anticorpo di interesse.

A seguito del trattamento con l'antigene specifico, si procede all'isolamento delle cellule B attivate tramite centrifugazione a gradiente di densità e si valuta la presenza su di esse degli anticorpi di interesse con saggi ELISA e citometria a flusso.

2. Fusione cellulare I linfociti B attivati vengono fusi con le cellule di mieloma sensibili ad HAT (un mezzo di coltura composto da ipoxantina, amminopterina e timidina) in PEG, polietilenglicole, che promuove la fusione della membrana plasmatica delle cellule B con la membrana delle cellule di mieloma. In alternativa il processo di fusione può avvenire tramite elettro-fusione, quindi sotto l'azione di un campo elettrico, ed è un processo più efficiente rispetto al precedente descritto.

#### 3. Selezione dell'ibridoma e clonazione

Dal processo di fusione cellulare si ottiene solo l'1% di cellule vitali di ibridoma. Si incuba la miscela di cellule con un mezzo di selezione per 14 giorni: le cellule B non fuse moriranno entro pochi giorni mentre rimarranno vitali le cellule di ibridoma, e riusciranno a dividersi nel terreno HAT grazie al gene per ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi dei linfociti B. Successivamente, le cellule di ibridoma vengono trasferite in piastre ELISA (tramite il

metodo della diluizione limitante) caratterizzate dalla presenza di un substrato composto dagli epitopi verso cui è diretto l'anticorpo di interesse (anticorpo monoclonale). Con questa metodica è possibile isolare solo gli ibridomi composti dalle cellule B capaci di produrre l'anticorpo per gli epitopi desiderati.

Una volta effettuato lo screening, le linee cellulari di ibridoma vengono clonate e vengono coltivate *in vitro* o *in vivo*. Il metodo *in vivo* prevede l'iniezione intraperitoneale nel topo di circa cento cellule vitali di ibridoma, e dopo aver raccolto il liquido dalla cavità addominale, si procede alla purificazione di esso (in quanto è in parte contaminato dalle immunoglobuline del topo).

Il processo *in vitro*, che limita la possibile contaminazione di altri antigeni, prevede la crescita delle cellule di ibridoma in laboratorio in un mezzo di coltura, da cui verranno successivamente isolati gli anticorpi monoclonali (Mitra and Tomar, 2021).

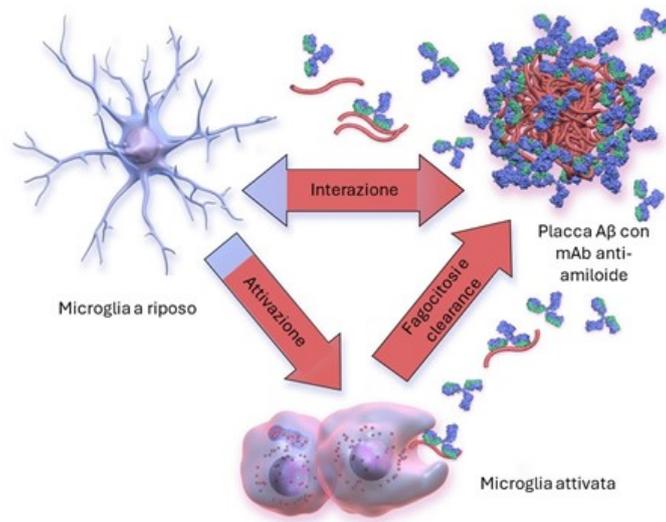
### 4.1.3 Perché si usano i mAbs?

In terapia i mAbs si possono usare per diversi scopi:

- per indurre una risposta immunitaria nell'organismo nei confronti di una cellula mediante la presenza di un antigene di membrana. Una forma di immunità che si può innescare è la ADCC, ovvero la citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente, durante la quale si ha il riconoscimento dell'antigene (per esempio sulla cellula tumorale) da parte dell'anticorpo sull'estremità N-terminali, mentre i recettori anticorpali sulle cellule effettrici del sistema immunitario innato riconoscono le estremità C terminali. Gli anticorpi possono indurre anche un effetto citotossico sul bersaglio grazie all'attivazione del sistema del complemento, che porta alla lisi delle membrane (CDC, citotossicità complemento dipendente) (Gklinos et al., 2021).
- per veicolare molecole citotossiche, legando l'anticorpo a molecole sintetiche tossiche in modo aspecifico, ma che con questa metodica vengono direzionate dall'anticorpo in modo selettivo solo verso la cellula bersaglio (es. cellula neoplastica) (Gklinos et al., 2021).

- per modulare la risposta immunologica del paziente, soprattutto nel caso di tumori, usando gli anticorpi per interferire con i meccanismi di immunomimetismo che il tumore usa per sfuggire all'attacco del sistema immunitario (Gklinos et al., 2021)

#### 4.1.4 Meccanismo di azione



**Figura 4.2:** Meccanismo di azione dei mAbs. È rappresentata l'attivazione della microglia mediata dall'anticorpo monoclonale. Nell'immagine viene schematizzata l'interazione tra la microglia e la placca amiloidea su cui è legato l'anticorpo monoclonale (mAb anti-amiloide); dopo l'attivazione, la microglia intraprende un processo di fagocitosi e avviene la clearance della placca  $A\beta$ . Adattata da: (Cummings et al., 2024)

Come terapia per la malattia di Alzheimer sono stati sintetizzati diversi anticorpi monoclonali, i quali agiscono legandosi a un epitopo antigenico specifico sul peptide tossico di  $\beta$  amiloide: questo legame attiva il sistema del complemento e la successiva fagocitosi di  $A\beta$  (Gklinos et al., 2021).

Riguardo al meccanismo di azione dei mAbs anti- $A\beta$  sono state formulate diverse ipotesi: (Gklinos et al., 2021) (Fig. 4.2)

- agiscono attraverso il legame al peptide nelle placche senili, nelle fibrille o oligomeri causando la successiva destabilizzazione e disgregazione degli aggregati;

- agiscono attraverso il legame alle placche di  $\beta$  amiloide, e l'innescò della fagocitosi mediata dai recettori Fc e dalle cellule microgliali;
- agiscono attraverso il legame alle proteine plasmatiche e la formazione di un gradiente di concentrazione che agevola l'eliminazione di  $A\beta$  verso il plasma, senza l'attraversamento dei mAbs dalla barriera ematoencefalica.

Lo stesso studio di Gklinos e colleghi (2021) sostiene l'ipotesi che i mAbs anti-amiloide possano alterare il trasporto dell' $A\beta$  coinvolgendo il recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL), che media l'efflusso dell' $A\beta$  dal SNC, e il recettore RAGE (recettore per i prodotti della glicosilazione avanzata) che invece media l'afflusso dell' $A\beta$  nel SNC. Alcuni anticorpi inoltre potrebbero fungere da "molecole segnale", grazie al legame con i recettori Fc sulle cellule immunitarie.

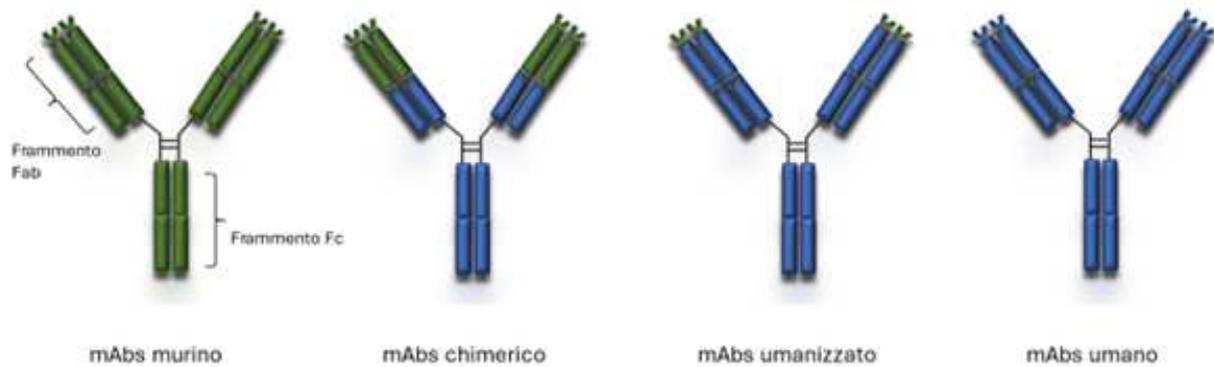
#### 4.1.5 Effetti tossici

Nonostante l'uso degli anticorpi monoclonali avesse dimostrato una bassa probabilità di interazioni farmacologiche, i mAbs non possono essere considerati privi di effetti tossici e più sicuri di altri farmaci tradizionali usati già in terapia. Purtroppo, la loro tossicità è causata dalla loro immunogenicità. Soprattutto i primi mAbs prodotti, essendo di origine murina, causavano anafilassi, malattia da siero, e reazioni di ipersensibilità. Per questo motivo, successivamente, (grazie all'ingegneria genetica e alle biotecnologie), si sono prodotti mAbs impiegando per intero sequenze nucleotidiche del gene umano, limitando così le possibili reazioni nell'organismo (Parray et al., 2020).

#### 4.1.6 Classificazione

Come spiegato nel paragrafo precedente, i mAbs non sono privi di tossicità a causa della loro origine prevalentemente murina. Con il tempo si sono prodotti mAbs di diversa natura, fino a renderli umani e quindi meglio tollerati. Si classificano in:

- **Murini:** sono i primi mAbs prodotti, dalla fusione dei linfociti B con una linea cellulare di mieloma. Hanno breve emivita nell'uomo (a causa del debole legame con il recettore neonatale umano FcRn). Causano reazioni allergiche e la formazione di anticorpo anti-farmaco (ADA anti-drug antibodies) che si lega al farmaco e portando



**Figura 4.3:** Classificazione dei mAbs. In verde sono evidenziate le parti di origine murina, in blu di origine umana. A sinistra una rappresentazione di un mAbs completamente murino. Nell'anticorpo accanto, sono rappresentate in verde le regioni murine variabili specifiche per l'antigene, e nel successivo le parti di origine murina sono le regioni iper variabili della catene leggere e pesanti. A destra, un anticorpo monoclonale completamente di origine umana. (Adattata da Gklinos et al., 2021)

alla diminuzione della sua disponibilità. Sono usati prevalentemente nella terapia antitumorale. Possiedono tutti il suffisso *-omab* (Wang et al., 2008).

- **Chimerici:** ottenuti grazie all'impiego dell'ingegneria genetica, sono per il 65% umani e per il restante 35% murini. La regione variabile specifica per l'antigene è di origine murina, mentre le catene pesanti e leggere di natura umana. Hanno un'emivita lunga, si ha una riduzione dell'immunogenicità ma la produzione di anticorpi anti-farmaco è ancora significativa. Possiedono il suffisso *-ximab*.
- **Umanizzati:** sono al 95% umani, impiantando regioni iper-variabili delle catene leggere e pesanti di origine murina in una struttura di anticorpo umano. È un processo complicato e sono meno immunogenici. Possiedono il suffisso *-zumab*.
- **Umani:** grazie alle nuove tecnologie e ad animali transgenici si ha la produzione di mAbs completamente umani. Hanno un'emivita lunga e sono tollerati. Possiedono il suffisso *-umab* (Wang et al., 2008); Fig.4.3).

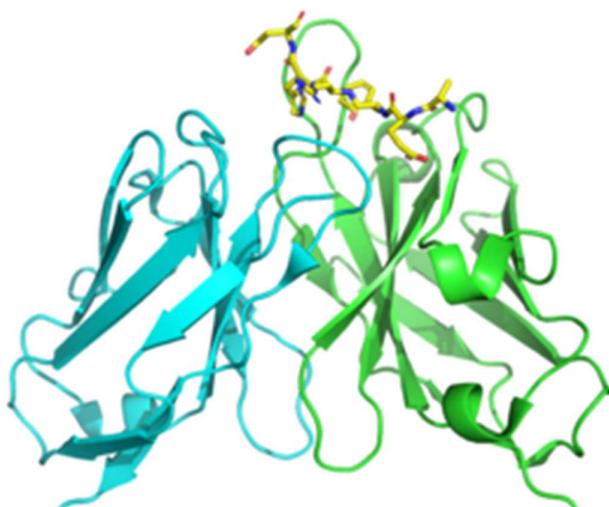
## 4.2 mAbs anti-A $\beta$ e anti-Tau

In questa sezione verranno descritti gli anticorpi monoclonali anti-amiloide (o anti-A $\beta$ ) e gli anticorpi monoclonali anti-Tau, i quali rappresentano un nuovo approccio terapeutico promettente per la malattia di Alzheimer.

### 4.2.1 mAbs anti-A $\beta$

I mAbs anti-A $\beta$  hanno come bersaglio il peptide  $\beta$ -amiloide. Di seguito verranno analizzati l'aducanumab e il lecanemab, approvati recentemente, e il donanemab, ancora in fase di revisione per l'approvazione standard.

#### 4.2.1.1 Aducanumab



**Figura 4.4:** Struttura del dominio Fab dell'aducanumab legato a un frammento del peptide  $\beta$ -amiloide (<https://it.wikipedia.org/wiki/Aducanumab>).

Aducanumab [Aduhelm<sup>®</sup> (Fig.4.4)], è stato prodotto da Biogen, ed è un anticorpo monoclonale umano appartenente alla classe dell'immunoglobulina IgG1. È il primo mAb anti-A $\beta$  ad essere stato approvato tramite un percorso accelerato dall'FDA nel 2021 per rallentare la fase iniziale della malattia di AD (FDA Office of the Commissioner, 2023).

Aspetti farmacodinamici

Questo anticorpo si lega in modo specifico ad un epitopo N-terminale del peptide  $A\beta_{42}$  e ha una maggiore affinità per gli aggregati fibrillari di amiloide rispetto ai monomeri. La dose target somministrata è di 10 mg/kg tramite infusione endovenosa una volta ogni quattro settimane (Budd Haeberlein et al., 2022).

### Trials clinici

Studi preclinici: sono stati eseguiti studi preclinici su topi Tg2576, un modello transgenico per la malattia di AD, e si è potuto constatare che questo farmaco attraversa la barriera ematoencefalica, colpisce in modo selettivo l' $A\beta$  fibrillare ed è affine sia agli oligomeri solubili e alle fibrille insolubili di beta-amiloide (Cummings et al., 2024).

Studi di fase I: lo studio di fase I (NCT01397539) è uno studio randomizzato, realizzato in doppio cieco e controllato da placebo. È stato svolto al fine di valutare la sicurezza, la farmacocinetica e la tollerabilità del farmaco usando diversi dosaggi in pazienti con l'AD lieve-moderato (Ferrero et al., 2016).

Secondo lo stesso studio (Ferrero et al., 2016), la dose pari o minore di 30 mg/kg è ben tollerata senza la comparsa di effetti avversi gravi.

È stato effettuato anche uno studio di fase Ib, randomizzato, nel quale è stato somministrato placebo o farmaco a dosi multiple ogni quattro settimane per infusione endovenosa per un anno.

Studio di fase II: lo studio EVOLVE ha incluso 52 partecipanti con demenza lieve ed è stato somministrato aducanumab per infusione endovenosa fino a 54 settimane. (Biogen. A phase 2, ClinicalTrials.gov, 2021)

L'obiettivo primario dello studio era valutare la sicurezza della terapia di aducanumab in partecipanti con decadimento cognitivo lieve dovuto alla malattia di Alzheimer o con demenza AD lieve; l'obiettivo secondario era quello di caratterizzare la tollerabilità e la farmacocinetica. (Biogen. A phase 2, ClinicalTrials.gov, 2021).

Studi di fase III: sono stati eseguiti due studi: ENGAGE e EMERGE. Il primo coinvolgeva 1653 partecipanti, mentre il secondo 1638 pazienti con AD lieve o demenza lieve. Sono stati effettuati in doppio cieco, randomizzati e controllati con placebo. I partecipanti sono stati divisi in 3 gruppi randomizzati per ricevere il farmaco a basso dosaggio (6 mg/kg), alto dosaggio (10 mg/kg) o il placebo ogni 4 settimane per 76 settimane (Cummings et al., 2024).

Successivamente sono stati interrotti a causa di analisi di futilità, che sono analisi *ad interim* che attestano che lo studio effettuato non è stato capace di raggiungere i suoi obiettivi. Infatti, ENGAGE non ha raggiunto l'endpoint, mentre EMERGE ha raggiunto l'endpoint primario e secondario nel braccio ad alte dosi.

#### Risultati degli studi

Gli studi hanno dimostrato una riduzione dell' $A\beta$  tempo e dose dipendente, come evidenziato dalla PET. Inoltre, aducanumab agisce anche sui biomarcatori a valle, per esempio si è osservata una riduzione dei livelli della proteina Tau nel liquor e nel plasma, e a monte dell'AD, ovvero sulla placca  $A\beta$  (Budd Haeberlein et al., 2022).

#### Effetti avversi

Un effetto avverso di aducanumab è comune a tutti i mAbs è *myloid-related imaging abnormalities* (ARIA), che causa generalmente gonfiore temporale nelle aree del cervello accompagnato da macchie di sangue e può presentarsi anche come edema cerebrale grave associato a convulsioni. Le ARIA comprendono due classi di anomalie del segnale di risonanza magnetica: ARIA-E, che si riferisce allo stravasamento di liquido con conseguente edema, e ARIA-H che invece si riferisce a microemorragie o macroemorragie osservate come depositi di emosiderina (Hampel et al., 2023).

Nello studio di fase I è stata osservata ARIA, ma si è risolta dopo 4-12 settimane (Ferrero et al., 2016).

In conclusione, l'uso di aducanumab è stato approvato dall'FDA ma rimangono incertezze sui benefici clinici del farmaco e nella pratica clinica reale il suo uso è stato nel complesso scarso (Kon et al., 2024).

#### **4.2.1.2 Lecanemab**

Lecanemab (BAN2401, Leqembi®) è un anticorpo IgG1 umanizzato derivato da mAb158. È stato messo in commercio da Biogen ed Eisai, ricevendo l'approvazione accelerata in base a uno studio di fase II poi, seguita da un'approvazione standard completa nel luglio 2023 basata sui dati clinici e sui biomarcatori di fase III per l'uso nella demenza lieve o MCI (*Mild cognitive impairment*, deterioramento cognitivo lieve). Inoltre, ne è stato approvato l'uso anche in Giappone ed è in fase di revisione nell'UE, UK, Canada e Corea del Sud (Swanson et al., 2021; van Dyck et al., 2023).

### Aspetti farmacodinamici

Questo anticorpo si lega specificamente alle protofibrille  $A\beta$  e viene somministrato per via endovenosa a una dose di circa 10 mg/kg a cadenza bisettimanale (Cummings et al., 2024).

### Trials clinici

Studi preclinici: sono stati eseguiti su topi che esprimono le mutazioni APP artica e svedese (“ArcSwe”), una nuova mutazione APP che accelera la formazione di protofibrille  $A\beta$  e causa sintomi di AD ad insorgenza precoce nei portatori della mutazione. Si è osservato una riduzione di protofibrille  $1\beta$ , che sono specie ad alto peso molecolare di amiloide solubile che si legano preferibilmente a lecanemab (Lord et al., 2009).

Secondo un altro studio effettuato *post mortem* su cervelli umani è stato osservato come mAb158 si leghi ad  $A\beta$  solubile, e partendo da questo composto è iniziato lo sviluppo di BAN2401 umanizzato. (Sehlin et al., 2012).

Studio di fase I: hanno preso parte allo studio 80 partecipanti con AD da lieve a moderata, lo studio era randomizzato in bracci a dose singola e multipla al fine di valutare sicurezza, farmacocinetica ed effetti sui biomarcatori plasmatici e nel liquor. Nelle due coorti, SAD (single ascending dose) e MAD (multiple ascending dose), si sono somministrate rispettivamente le dosi di 0.1, 0.3, 1,10 e 15 mg/kg e di 0.3, 1 e 3 mg/kg ogni 4 settimane e 10 mg/kg bisettimanalmente. Il farmaco è stato ben tollerato, con una emivita di 7 giorni con dosi maggiori o pari a 10 mg/kg (Logovinsky et al., 2016).

Studio di fase II: questo studio randomizzato è durato 18 mesi, e sono stati arruolati 856 soggetti, e prevedeva la somministrazione del farmaco e del placebo al fine di valutarne dose ed efficacia (Swanson et al., 2021).

Purtroppo, dopo 12 mesi lo studio non ha raggiunto l’endpoint primario con una dose di 10 mg/kg bisettimanalmente anche se tramite PET si è osservata una rimozione delle placche  $A\beta$  nell’81% dei partecipanti al di sotto della soglia di rilevazione (Cummings et al., 2024).

Inoltre, è stato eseguito inoltre un sottostudio sui biomarcatori e si è osservata una riduzione della proteina tau a 18 mesi rispetto al placebo. I portatori di APOE  $\epsilon$  4 non sono stati inclusi nello studio perché è stato rilevato un maggior rischio di ARIA (Cummings et al., 2024).

Studio di fase III: lo studio CLARITY AD includeva 1795 partecipanti tra i 50 e 90 anni con AD lieve, randomizzato, nel quale un gruppo assumeva 10 mg/kg bisettimanalmente di farmaco, mentre l'altro gruppo il placebo. Da questo studio si è osservata una diminuzione dei livelli di placca amiloide di 55,48 centiloidi rispetto al placebo; inoltre è stata riscontrata una riduzione dei livelli di biomarcatori rispetto al placebo (Cummings et al., 2024).

#### Effetti avversi

Nello studio di fase I non si è verificata ARIA-E, ma si è osservata come effetto collaterale ARIA-H nelle coorti SAD e MAD (Logovinsky et al., 2016).

Tra gli effetti avversi più comuni che riguardano l'uso del lecanemab vi sono reazioni all'infusione lievi o moderate (Swanson et al., 2021), ARIA-H e ARIA-E, tra cui sono inclusi vertigini, cefalea e disturbi visivi (Cummings et al., 2024).

#### Risultati degli studi

Nonostante gli effetti positivi riscontrati dall'uso di questo farmaco alcuni esperti del settore sostengono che questi risultati non erano abbastanza per avere dei benefici significativi sui pazienti (Kon et al., 2024).

Nello stesso articolo viene citato Walsh, un ricercatore di Cambridge, che sostiene che l'esito dei risultati dipende dalla prospettiva in cui si guardano i dati e la differenza assoluta è più piccola rispetto a quella relativa: per questo motivo si dovrebbe studiare l'effetto del farmaco a lungo termine. A fronte di ciò, Eisai e Biogen hanno pubblicato i risultati di un periodo di estensione in aperto, che ha monitorato i partecipanti dopo il completamento dello studio di fase III e si è osservato come dopo 3 anni di trattamento più della metà dei pazienti abbia avuto un miglioramento cognitivo. Nei primi 6 mesi si è riscontrato come effetto collaterale ARIA e il tasso di declino cognitivo è rientrato ai livelli del placebo interrompendo l'assunzione (Kon et al., 2024).

#### Limiti

Nello studio di fase III CLARITY AD, la positività all'amiloide veniva dimostrata tramite PET o tramite misurazione dei biomarcatori nel liquor. La misurazione mediante PET richiede uno scanner speciale, delle competenze neuroradiologiche e infine non è coperta da assicurazione. Parallelamente, la misurazione dei biomarcatori è più accessibile ma

è necessaria una puntura lombare (poco confortevole per il paziente), l'uso di provette speciali e la spedizione di queste a un laboratorio qualificato (Ramanan et al., 2023)

La misurazione dei biomarcatori sul sangue è sicuramente più confortevole e accessibile al paziente, ma è ancora in fase di studio per chiarire se abbia una sensibilità e specificità tale da essere utilizzata come criterio di inclusione nel trattamento (Hansson et al., 2022). Inoltre, non sono disponibili dati sull'uso di lecanemab in pazienti al di fuori del range 50-90 anni di età, pazienti con disturbi immunologici o in terapia con immunoglobuline (sono stati esclusi dallo studio di fase III), donne in gravidanza e in allattamento e infine pazienti con crisi epilettiche negli ultimi 12 mesi (Cummings et al., 2024).

I pazienti con un'anamnesi di microemorraggia cerebrale o con un ictus ischemico sono stati esclusi dallo studio CLARITY per un rischio di aumento di effetti collaterali. Anche per i pazienti che sono già in terapia con anticoagulanti è stato controindicato l'assunzione del lecanemab per rischio di emorragie (Ramanan et al., 2023).

Per concludere, lecanemab è stato approvato dall'FDA sulla base dei risultati di CLARITY AD (Cummings et al., 2024).

L'ente regolatorio della sanità britannica NICE, che stabilisce quali farmaci siano offerti dal NHS (Servizio sanitario nazionale), ha deciso di non rendere disponibile lecanemab sul NHS perché i benefici erano troppo bassi e non giustificavano il costo elevato del farmaco (Ramanan et al., 2023).

#### **4.2.1.3 Donanemab**

Donanemab un anticorpo monoclonale sviluppato da Ely Lilly and Co., e ha attualmente concluso gli studi di fase III, ed è in fase di revisione dalla FDA per ricevere l'approvazione standard negli USA. È anche in fase di valutazione in UE al fine di ottenere approvazioni internazionali per l'uso clinico.

##### Aspetti farmacodinamici

Donanemab è un anticorpo monoclonale IgG1 umanizzato che si lega alle placche amiloidogeniche riconoscendo un epitopo di  $A\beta$  specifico il cui residuo amminoacidico 3 corrisponde al piroglutammato. Inoltre, una volta legato alle placche, l'anticorpo attiva la clearance mediata dalla microglia.

##### Trials clinici

Studi preclinici: sono stati eseguiti su una linea di topi PDAPP geneticamente modificata per lo sviluppo di placche  $A\beta$ . In seguito all'iniezione dell'anticorpo si è osservata una riduzione di  $A\beta$  in modo dose-dipendente e non si sono riscontrate microemorragie (DeMattos et al., 2012).

Studio di fase I: lo studio di fase I è stato effettuato in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo al fine di valutarne sicurezza, efficacia e tollerabilità in 100 pazienti di età maggiore o pari a 50 anni con demenza causata da AD da lieve a moderata (Lowe et al., 2021).

Alla coorte 1 è stato somministrato la dose di farmaco di 0,1 mg/kg per infusione endovenosa ed è stata tenuta in osservazione, per valutarne la sicurezza. Successivamente sono stati valutati sei dosaggi, da 0.3 a 10 mg/kg per infusione endovenosa e a un gruppo per iniezione sottocutanea. Nei pazienti che hanno assunto l'anticorpo per infusione una volta al mese è stata riscontrata una diminuzione del 50% di placche  $A\beta$  e l'emivita è di 10 giorni alla dose più alta somministrata Cummings et al. (2024).

È stato eseguito anche uno studio di fase Ib nel quale sono state somministrate dosi da 10 a 40 mg/kg per infusione endovenosa e si è osservata una riduzione di  $A\beta$  (Cummings et al., 2024).

Studio di fase II: nello studio TRAILBLAZER-ALZ2 sono stati arruolati 1800 pazienti, includendo individui con livelli alti di proteina Tau. Un altro studio di fase III è stato eseguito a due bracci mettendo a confronto i diversi effetti di donanemab e aducanumab in 200 partecipanti con AD precoce. Un altro ancora includeva 1500 partecipanti provenienti da 148 paesi in tutto il mondo con AD precoce, randomizzato e controllato con placebo per valutarne l'efficacia e la sicurezza (Cummings et al., 2024).

Lo studio più recente che è attualmente in corso sta reclutando 800 partecipanti per valutare il dosaggio multiplo dell'anticorpo e la frequenza di ARIA-E. L'*outcome* primario dello studio era la valutazione della % di ARIA-E nelle prime 24 settimane, mentre l'*outcome* secondario prevedeva la valutazione della gravità di ARIA-E e ARIA-H, la farmacocinetica dell'anticorpo e la rimozione della placca  $A\beta$  (Cummings et al., 2024).

### Effetti avversi

Tra gli effetti avversi osservati nei vari studi clinici dell'anticorpo si ha ARIA-E nel 26% dei partecipanti allo studio di fase Ib (Lowe SL et al., 2021) Nello studio di fase II si è

osservato come effetto avverso ARIA-E nel 6,1% dei partecipanti e nello studio di fase III TRAILBLAZER-ALZ2 il 24% di ARIA-E e il 31% di ARIA-H, mentre con l'uso del placebo il 13% di ARIA-H (Pontecorvo et al., 2022).

#### Risultati degli studi

Nello studio di fase I si è osservata una riduzione delle placche  $A\beta$  del 50% nei pazienti che avevano assunto l'anticorpo per infusione endovenosa al dosaggio di 10 mg/kg (Cummings et al., 2024).

Durante lo studio di fase II invece si è riscontrata una riduzione di 85,06 centiloidi delle placche di  $A\beta$  a 76 settimane e una diminuzione del 23% della proteina tau (Pontecorvo et al., 2022).

Infine, dallo studio di fase III TRAILBLAZER-ALZ2 si è osservato un rallentamento del declino cognitivo del 35% (Sims et al., 2023).

#### Limiti

La FDA ha respinto l'approvazione accelerata di questo anticorpo per mancanza di dati (meno di 100 partecipanti in terapia per un anno). (Eli Lilly and Co., 2023)

Inoltre, il campione di studio è ricco di individui con un livello intermedio di proteina Tau, il quale si è ipotizzato fosse in uno stadio più precoce della malattia e quindi con una probabilità maggiore di risposta al trattamento (Ramanan et al., 2023).

Nonostante questi limiti, donanemab ha ottenuto risultati positivi e promettenti dallo studio di fase III e per questo motivo Eli Lilly and Co. ha richiesto un'approvazione standard sia negli USA che in UE (Eli Lilly and Co., 2023; Sims et al., 2023).

#### **4.2.1.4 Limiti del trattamento con mAbs anti- $A\beta$**

Un recente articolo scientifico ha messo in luce alcuni limiti del trattamento con mAbs anti- $A\beta$ : per esempio i costi finanziari elevati del trattamento per il paziente, come le spese per i centri di infusione, le risonanze magnetiche e di altri esami diagnostici eseguiti a cadenza regolare (di solito bisettimanalmente) possono risultare impegnativi e influenzare negativamente la qualità della vita del paziente.

Inoltre, è stato dimostrato come l'uso di questi anticorpi all'inizio della malattia possa avere dei vantaggi sul trattamento ma le tempistiche lunghe per l'inclusione del partecipante nello studio disincentivano il paziente a partecipare (Ramanan et al., 2023).

#### 4.2.1.5 Come rendere più efficienti gli studi del trattamento con mAbs anti-A $\beta$ ?

Alcuni suggerimenti per rendere più efficienti gli studi possono essere (Ramanan et al., 2023):

- la realizzazione di screening cognitivi attraverso un servizio rimborsabile;
- la valutazione iniziale del paziente per l'inclusione nello studio effettuata da medici non specializzati;
- lo sviluppo di un sito web dedicato all'educazione dei pazienti e dei loro caregiver.

### 4.2.2 mAbs anti-Tau

Un altro target d'interesse è la proteina Tau fosforilata. Per questo motivo sono stati sviluppati dei mAbs che hanno come bersaglio questa proteina (Hoskin et al., 2019).

Di seguito saranno descritti: gosuranemab, semorinemab e bepranemab, che sono in fase di sperimentazione clinica per la malattia di Alzheimer e anche per la paralisi sopranucleare progressiva (PSP) (Hoskin et al., 2019).

#### 4.2.2.1 Gosuranemab

Gosuranemab (BIIB092) è un anticorpo monoclonale IgG4, ed è la versione umanizzata dell'anticorpo murino IPN002 (Plotkin and Cashman, 2020).

##### Aspetti farmacodinamici

Gosuranemab riconosce l'epitopo lineare non fosforilato della regione N terminale della proteina Tau, rilasciata dai neuroni e presente a livello extracellulare nel liquido interstiziale e nel liquido cefalorachidiano (Dam et al., 2021).

##### Trials clinici

Studi preclinici: sono stati eseguiti su topi transgenici del ceppo rTg451 ai quali è stata somministrata settimanalmente IPN002 per 8 settimane e si è osservata una riduzione della proteina Tau non legata nel liquor a 57 giorni. La somministrazione è avvenuta anche in scimmie cynomolgus e si è riscontrata una riduzione della proteina Tau N terminale non legata (Dam et al., 2021).

Studi di fase I: è stato somministrato l'anticorpo in dosi singole a partecipanti sani di entrambi i sessi di un'età compresa tra 21 e 65 anni, e si è osservata una diminuzione della Tau N terminale non legata nel liquor fino al 97% al giorno 29 (Qureshi et al., 2018). Inoltre, è stato riscontrato che dosi maggiori o pari a 2,10 mg hanno provocato una soppressione persistente della Tau N terminale non legata in 12 settimane. È risultato sicuro e ben tollerato dagli studi di fase I.

Studi di fase II: sono stati effettuati due trials clinici di fase II nel 2017 per AD e per la paralisi sopranucleare. TANGO (studio di fase II in pazienti con AD) è in corso e si dovrebbe concludere quest'anno (Plotkin and Cashman, 2020).

#### Effetti avversi

Da questi studi non sono stati osservati decessi o effetti avversi importanti come microemorragie cerebrali; negli studi di fase I non ci sono stati decessi e l'anticorpo è stato ben tollerato. Nei bracci di dosaggio basso non sono stati evidenziati eventi avversi gravi, mentre nei bracci di dosaggio più alto si sono osservati effetti avversi nell'8% dei casi, ma successivamente si è affermato che non fossero correlati all'uso di gosuranemab (Plotkin and Cashman, 2020).

#### Limiti

Nonostante l'uso di questo anticorpo abbia diminuito di circa il 90% la proteina Tau non legata nel liquido cefalorachidiano, biomarcatori come la Tau totale o la Tau fosforilata non sono stati ridotti, e si è ipotizzato fosse causato dal troncamento N terminale, quindi è iniziata la produzione mAbs che legassero la regione centrale della Tau (Plotkin and Cashman, 2020).

#### **4.2.2.2 Semorinemab**

Semorinemab (R07105705) è un anticorpo IgG4 umanizzato sviluppato da AC Immune e Genentech (Plotkin and Cashman, 2020).

#### Aspetti farmacodinamici

Questo anticorpo attiva solo debolmente i recettori Fc  $\gamma$  della microglia, andando a ridurre l'infiammazione.

È un anticorpo “pan-Tau”, in quanto si sostiene che quasi tutta la Tau accessibile dagli anticorpi sia extracellulare e qualsiasi Tau extracellulare può essere legata alla patologia (Plotkin and Cashman, 2020).

Questo genere di anticorpi è stato ottenuto mediante vaccinazione di topi con Tau umana ricombinante, sono stati successivamente selezionati gli anticorpi testando il legame con la Tau intera, poi con la sua forma fosforilata e oligomerizzata, con l’obiettivo di trovare anticorpi che legassero bene la Tau e la Tau post traduzionale modificata.

Semorinemab reagisce con tutte e sei le isoforme della Tau umana e dei primati, ma non con la Tau murina e l’epitopo si trova nella parte C-terminale (Plotkin and Cashman, 2020).

#### Trials clinici

Da studi su cellule è emerso che semorinemab protegge i neuroni dalla tossicità mediata dalla Tau.

Studi preclinici: sono stati effettuati su topi transgenici P301L che esprimono la proteina Tau umana mutata, per 13 settimane di trattamento con dosaggi di 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg e si è riscontrata una diminuzione della proteina Tau nel cervello in modo dose dipendente e un rallentamento del declino cognitivo (Plotkin and Cashman, 2020).

Studi di fase I: dagli studi di fase I l’anticorpo è risultato sicuro e tollerabile nei volontari sani anche in dosi singole elevate (16,8 mg) (ClinicalTrials.gov)

Nel 2024 è iniziato uno studio di fase I in pazienti con AD in USA, e a febbraio 2024 in Giappone. (semorinemab - AC Immune/Genentech, 2022)

Studi di fase II: sono stati eseguiti due studi di fase II, uno con partecipanti con AD prodromico (TAURIEL) e l’altro in pazienti con AD moderato. Nel 2024 è iniziato uno studio di fase II in pazienti con malattia di Alzheimer in diversi paesi, tra cui l’Italia, USA, Francia e nel Regno Unito. (semorinemab - AC Immune/Genentech, 2022)

#### **4.2.2.3 Bepranemab**

Bepranemab (UCB0107) è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato sviluppato da UCB Biopharma; probabilmente è un IgG4 ma non si conosce il suo isotipo a causa della copertura brevettuale (Plotkin and Cashman, 2020).

#### Aspetti farmacodinamici

Bepranemab si lega all'epitopo centrale della Tau, ed è più efficiente nel bloccare la Tau, a differenza di anticorpi specifici per la regione N terminale che lo fanno solo debolmente, come per esempio nel caso di gosuranemab, con il quale biomarcatori come la Tau totale o fosforilata non vengono ridotti (Barton et al., 2021).

### *Trials clinici*

Studi di fase I: sono stati svolti due studi di fase I: NCT03464227, completato a dicembre 2018 e NCT3605082, completato a marzo 2019 ma non sono stati pubblicati ancora i risultati (Bepranemab - UCB Biopharma et al., 2021).

Studio di fase II: a giugno 2021 è stato effettuato uno studio denominato TOGETHER, controllato con placebo e in cieco per il paziente con l'obiettivo di valutare sicurezza, tollerabilità e farmacocinetica. L'anticorpo è stato somministrato per endovena ogni 4 settimane in 450 pazienti tra 50 e 80 anni con AD prodromica e lieve per 80 settimane. I pazienti erano suddivisi in 3 gruppi, ai quali veniva somministrato un dosaggio predefinito (denominato Livello 1), un dosaggio diverso (chiamato Livello 2) e un gruppo placebo. Successivamente è avvenuta un'estensione dello studio di 48 settimane in aperto (OLE) al fine di valutare sicurezza e tollerabilità a lungo termine del bepranemab. Questo anticorpo è l'unico testato in clinica anche per la paralisi sopranucleare progressiva (PSP) (Barton et al., 2021).



# Capitolo 5

## Conclusioni

L'Alzheimer è una malattia neurodegenerativa progressiva del cervello ed è la forma più comune di demenza che si manifesta con un declino cognitivo graduale, compromettendo la capacità di svolgere le attività quotidiane.

Lo scopo di questa Tesi è stato quello di presentare lo sviluppo di vari approcci terapeutici per l'AD, dai più convenzionali e usati da tempo in clinica a quelli più innovativi e in via di sviluppo come gli anticorpi monoclonali.

Per migliorare l'efficacia delle terapie è importante ottenere una diagnosi il più precoce possibile, prima dei sintomi iniziali, (per esempio esaminando i biomarkers della patologia) in quanto si ha generalmente una prognosi migliore rispetto a trattamenti in fasi più avanzate della malattia.

In conclusione, gli attuali approcci terapeutici per l'AD si concentrano sul rallentamento della progressione della malattia, migliorandone anche i sintomi. Tra le terapie più innovative descritte ci sono gli anticorpi monoclonali, in particolare il lecanemab che ha dimostrato risultati incoraggianti.

È fondamentale ampliare gli studi e, dato l'alto costo di queste terapie, è necessario che il sistema sanitario preveda il loro rimborso, in modo da renderle accessibili a un maggior numero di pazienti.

Queste terapie rappresentano una possibile svolta per il trattamento della malattia di Alzheimer, dando nuove speranze ai pazienti e alle loro famiglie.



# Bibliografia

N. F. Al-Ghraiya, J. Wang, A. E. Alkhalifa, A. B. Roberts, R. Raj, E. Yang, and A. Kaddoumi. Glial cell-mediated neuroinflammation in alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18):10572, Sept. 2022. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms231810572. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231810572>.

F. Amenta, L. Parnetti, V. Gallai, and A. Wallin. Treatment of cognitive dysfunction associated with alzheimer's disease with cholinergic precursors. ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(16): 2025–2040, Nov. 2001. ISSN 0047-6374. doi: 10.1016/S0047-6374(01)00310-4. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00310-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00310-4).

K. Anand and M. Sabbagh. Early investigational drugs targeting tau protein for the treatment of alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(10): 1355–1360, Aug. 2015. ISSN 1744-7658. doi: 10.1517/13543784.2015.1075002. URL <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2015.1075002>.

T. Athar, K. Al Balushi, and S. A. Khan. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, 48 (7):5629–5645, June 2021. ISSN 1573-4978. doi: 10.1007/s11033-021-06512-9. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06512-9>.

C. Bakker, J. van der Aart, E. P. Hart, E. S. Klaassen, K. R. Bergmann, M. J. van Esdonk, D. G. Kay, and G. J. Groeneveld. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of gln-1062, a prodrug of galantamine. *Alzheimer's amp; Dementia: Translational Research amp; Clinical Interventions*, 6(1), Jan. 2020. ISSN 2352-8737. doi: 10.1002/trc2.12093. URL <http://dx.doi.org/10.1002/trc2.12093>.

- C. Balducci. Malattia di alzheimer: cos'è, cause e sintomi, 2022. <https://www.marionegri.it/magazine/alzheimer>.
- M. E. Barton, W. Byrnes, I. R. Mesa, J. Bloemers, R. P. Maguire, R. Bouw, I. Tesseur, C. Ewen, and P. Scheltens. Design of a patient- and investigator-blind, randomized, placebo-controlled study to evaluate efficacy, safety, and tolerability of bepranemab, ucb0107, in prodromal to mild alzheimer's disease: The together study, ah0003. *Alzheimer's amp; Dementia*, 17(S9), Dec. 2021. ISSN 1552-5279. doi: 10.1002/alz.057586. URL <http://dx.doi.org/10.1002/alz.057586>.
- T. Behl, I. Kaur, O. Fratila, R. Brata, and S. Bungau. Exploring the potential of therapeutic agents targeted towards mitigating the events associated with amyloid- $\beta$  cascade in alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20):7443, Oct. 2020. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms21207443. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21207443>.
- Z. Breijyeh and R. Karaman. Comprehensive review on alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules*, 25(24):5789, Dec. 2020. ISSN 1420-3049. doi: 10.3390/molecules25245789. URL <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25245789>.
- L. Brunton, R. Hilal-Dandan, and B. C. Knollmann. *Goodman & Gilman - Le basi farmacologiche della terapia*. Zanichelli, 2019. ISBN 9788808820563.
- S. Budd Haeberlein, P. Aisen, F. Barkhof, S. Chalkias, T. Chen, S. Cohen, G. Dent, O. Hansson, K. Harrison, C. von Hehn, T. Iwatsubo, C. Mallinckrodt, C. Mummery, K. Muralidharan, I. Nestorov, L. Nisenbaum, R. Rajagovindan, L. Skordos, Y. Tian, C. van Dyck, B. Vellas, S. Wu, Y. Zhu, and A. Sandrock. Two randomized phase 3 studies of aducanumab in early alzheimer's disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 2022. ISSN 2274-5807. doi: 10.14283/jpad.2022.30. URL <http://dx.doi.org/10.14283/jpad.2022.30>.
- T. Burki. Alzheimer's disease research: the future of bace inhibitors. *The Lancet*, 391(10139):2486, June 2018. ISSN 0140-6736. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31425-9. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31425-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31425-9).

- C.-C. Chang, L. Chan, H.-H. Chou, Y.-W. Yang, T.-F. Chen, T.-B. Chen, C.-I. Chen, A. Yang, and C.-J. Hu. Effectiveness of the 10 cm<sup>2</sup> rivastigmine patch in taiwanese patients with mild-to-moderate alzheimer’s dementia: A 48-week real-world observational study. *Advances in Therapy*, 38(10):5286–5301, Sept. 2021. ISSN 1865-8652. doi: 10.1007/s12325-021-01893-6. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-021-01893-6>.
- A. Chifor, J. Choi, and J. Park. Nmda receptor-targeted enrichment of camkii $\alpha$  improves fear memory. *iScience*, 25(8):104864, Aug. 2022. ISSN 2589-0042. doi: 10.1016/j.isci.2022.104864. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.104864>.
- W.-H. Cho, J.-C. Park, D.-H. Kim, M.-S. Kim, S.-Y. Lee, H. Park, J.-H. Kang, S.-W. Yeon, and J.-S. Han. Id1201, the ethanolic extract of the fruit of melia toosendan ameliorates impairments in spatial learning and reduces levels of amyloid beta in 5xfad mice. *Neuroscience Letters*, 583:170–175, Nov. 2014. ISSN 0304-3940. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.036. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.036>.
- G. Chételat, J. Arbizu, H. Barthel, V. Garibotto, I. Law, S. Morbelli, E. van de Giesen, F. Agosta, F. Barkhof, D. J. Brooks, M. C. Carrillo, B. Dubois, A. M. Fjell, G. B. Frisoni, O. Hansson, K. Herholz, B. F. Hutton, C. R. Jack, A. A. Lammertsma, S. M. Landau, S. Minoshima, F. Nobili, A. Nordberg, R. Ossenkoppele, W. J. G. Oyen, D. Perani, G. D. Rabinovici, P. Scheltens, V. L. Villemagne, H. Zetterberg, and A. Drzezga. Amyloid-pet and 18f-fdg-pet in the diagnostic investigation of alzheimer’s disease and other dementias. *The Lancet Neurology*, 19(11):951–962, Nov. 2020. ISSN 1474-4422. doi: 10.1016/s1474-4422(20)30314-8. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30314-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30314-8).
- J. Cummings, Y. Zhou, G. Lee, K. Zhong, J. Fonseca, and F. Cheng. Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2024. *Alzheimer’s amp; Dementia: Translational Research amp; Clinical Interventions*, 10(2), Apr. 2024. ISSN 2352-8737. doi: 10.1002/trc2.12465. URL <http://dx.doi.org/10.1002/trc2.12465>.
- T. Dam, A. L. Boxer, L. I. Golbe, G. U. Höglinger, H. R. Morris, I. Litvan, A. E. Lang, J.-C. Corvol, I. Aiba, M. Grundman, L. Yang, B. Tidemann-Miller, J. Kupferman, K. Harper, K. Kamisoglu, M. J. Wald, D. L. Graham, L. Gedney, J. O’Gorman, and S. B. Haerberlein. Safety and efficacy of anti-tau monoclonal antibody gosuranemab in progressive

- supranuclear palsy: a phase 2, randomized, placebo-controlled trial. *Nature Medicine*, 27(8):1451–1457, Aug. 2021. ISSN 1546-170X. doi: 10.1038/s41591-021-01455-x. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-021-01455-x>.
- B. Das, N. Singh, A. Y. Yao, J. Zhou, W. He, X. Hu, and R. Yan. Bace1 controls synaptic function through modulating release of synaptic vesicles. *Molecular Psychiatry*, 26(11):6394–6410, June 2021. ISSN 1476-5578. doi: 10.1038/s41380-021-01166-2. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-021-01166-2>.
- R. DeMattos, J. Lu, Y. Tang, M. Racke, C. DeLong, J. Tzaferis, J. Hole, B. Forster, P. McDonnell, F. Liu, R. Kinley, W. Jordan, and M. Hutton. A plaque-specific antibody clears existing  $\beta$ -amyloid plaques in alzheimer’s disease mice. *Neuron*, 76(5):908–920, Dec. 2012. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.029. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.029>.
- R. Dhapola, S. K. Beura, P. Sharma, S. K. Singh, and D. HariKrishnaReddy. Oxidative stress in alzheimer’s disease: current knowledge of signaling pathways and therapeutics. *Molecular Biology Reports*, 51(1), Jan. 2024. ISSN 1573-4978. doi: 10.1007/s11033-023-09021-z. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-023-09021-z>.
- Drugbank. Drugbank online — database for drug and drug target info (v5.1.12), 2024. <https://go.drugbank.com/>.
- M. F. Egan, J. Kost, T. Voss, Y. Mukai, P. S. Aisen, J. L. Cummings, P. N. Tariot, B. Vellas, C. H. van Dyck, M. Boada, Y. Zhang, W. Li, C. Furtek, E. Mahoney, L. Harper Mozley, Y. Mo, C. Sur, and D. Michelson. Randomized trial of verubecestat for prodromal alzheimer’s disease. *New England Journal of Medicine*, 380(15):1408–1420, Apr. 2019. ISSN 1533-4406. doi: 10.1056/nejmoa1812840. URL <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1812840>.
- J. Ferrero, L. Williams, H. Stella, K. Leitermann, A. Mikulskis, J. O’Gorman, and J. Sevigny. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (biib037) in mild-to-moderate alzheimer’s disease. *Alzheimer’s amp; Dementia: Translational Research amp; Clinical Interventions*, 2(3):169–176, June 2016.

ISSN 2352-8737. doi: 10.1016/j.trci.2016.06.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.trci.2016.06.002>.

- L. Fratiglioni, B. Winblad, and E. von Strauss. Prevention of alzheimer's disease and dementia. major findings from the kungsholmen project. *Physiology amp; Behavior*, 92(1–2):98–104, Sept. 2007. ISSN 0031-9384. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.05.059. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.059>.
- P. Gklinos, M. Papadopoulou, V. Stanulovic, D. D. Mitsikostas, and D. Papadopoulos. Monoclonal antibodies as neurological therapeutics. *Pharmaceuticals*, 14(2):92, Jan. 2021. ISSN 1424-8247. doi: 10.3390/ph14020092. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ph14020092>.
- G. K. Gouras, T. T. Olsson, and O. Hansson. -amyloid peptides and amyloid plaques in alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 12(1):3–11, Jan. 2015. ISSN 1878-7479. doi: 10.1007/s13311-014-0313-y. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-014-0313-y>.
- A. Griciuc and R. E. Tanzi. The role of innate immune genes in alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurology*, 34(2):228–236, Feb. 2021. ISSN 1473-6551. doi: 10.1097/wco.0000000000000911. URL <http://dx.doi.org/10.1097/wco.0000000000000911>.
- J. Güell-Bosch, L. Montoliu-Gaya, G. Esquerda-Canals, and S. Villegas. A immunotherapy for alzheimer's disease: Where are we? *Neurodegenerative Disease Management*, 6(3):179–181, May 2016. ISSN 1758-2032. doi: 10.2217/nmt-2016-0006. URL <http://dx.doi.org/10.2217/nmt-2016-0006>.
- H. Hampel, A. Elhage, M. Cho, L. G. Apostolova, J. A. R. Nicoll, and A. Atri. Amyloid-related imaging abnormalities (aria): radiological, biological and clinical characteristics. *Brain*, 146(11):4414–4424, June 2023. ISSN 1460-2156. doi: 10.1093/brain/awad188. URL <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awad188>.
- O. Hansson, R. M. Edelmayer, A. L. Boxer, M. C. Carrillo, M. M. Mielke, G. D. Rabinovici, S. Salloway, R. Sperling, H. Zetterberg, and C. E. Teunissen. The alzheimer's association appropriate use recommendations for blood biomarkers in alzheimer's disease. *Alzheimer's amp; Dementia*, 18(12):2669–2686, July 2022. ISSN 1552-5279. doi: 10.1002/alz.12756. URL <http://dx.doi.org/10.1002/alz.12756>.

- J. L. Hoskin, M. N. Sabbagh, Y. Al-Hasan, and B. Decourt. Tau immunotherapies for alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(6):545–554, May 2019. ISSN 1744-7658. doi: 10.1080/13543784.2019.1619694. URL <http://dx.doi.org/10.1080/13543784.2019.1619694>.
- J. Huang. *Malattia di Alzheimer*. Manuale MSD, 2023. <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-neurologiche/delirium-e-demenza/malattia-di-alzheimer>.
- P. Huang, N. Zheng, H.-b. Zhou, and J. Huang. Curcumin inhibits bace1 expression through the interaction between  $er\beta$  and  $nf\kappa\beta$  signaling pathway in sh-sy5y cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 463(1–2):161–173, Oct. 2019. ISSN 1573-4919. doi: 10.1007/s11010-019-03638-0. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-019-03638-0>.
- D. E. Johnson, E. Drummond, S. Grimwood, A. Sawant-Basak, E. Miller, E. Tseng, L. L. McDowell, M. A. Vanase-Frawley, K. E. Fisher, D. M. Rubitski, K. J. Stutzman-Engwall, R. T. Nelson, W. E. Horner, R. R. Gorczyca, M. Hajos, and C. J. Siok. The 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptor agonists prucalopride and prx-03140 increase acetylcholine and histamine levels in the rat prefrontal cortex and the power of stimulated hippocampal oscillations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(3):681–691, Mar. 2012. ISSN 1521-0103. doi: 10.1124/jpet.112.192351. URL <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.112.192351>.
- K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, and M. Valko. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1–2):91–104, Aug. 2010. ISSN 1573-4919. doi: 10.1007/s11010-010-0563-x. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0563-x>.
- H. Kafi, J. Salamzadeh, N. Beladimoghadam, M. Sistanizad, and M. Kouчек. Study of the neuroprotective effects of memantine in patients with mild to moderate ischemic stroke. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), June 2014. doi: 10.22037/ijpr.2014.1511. URL <https://doi.org/10.22037/ijpr.2014.1511>.
- J. Kazmierski, C. Messini-Zachou, M. Gkioka, and M. Tsolaki. The impact of a long-term rivastigmine and donepezil treatment on all-cause mortality in patients with alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease amp; Other Dementiasr*,

33(6):385–393, May 2018. ISSN 1938-2731. doi: 10.1177/1533317518775044. URL <http://dx.doi.org/10.1177/1533317518775044>.

T. Klopstock, F. Tricta, L. Neumayr, I. Karin, G. Zorzi, C. Fradette, T. Kmiec, B. Büchner, H. E. Steele, R. Horvath, P. F. Chinnery, A. Basu, C. Küpper, C. Neuhofer, B. Kálmán, P. Dušek, Z. Yapici, I. Wilson, F. Zhao, F. Zibordi, N. Nardocci, C. Aguilar, S. J. Hayflick, M. Spino, A. M. Blamire, P. Hogarth, and E. Vichinsky. Safety and efficacy of deferiprone for pantothenate kinase-associated neurodegeneration: a randomised, double-blind, controlled trial and an open-label extension study. *The Lancet Neurology*, 18(7):631–642, July 2019. ISSN 1474-4422. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30142-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30142-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30142-5).

T. Kon, S. Ichimata, D. G. Di Luca, I. Martinez-Valbuena, A. Kim, K. Yoshida, A. A. Alruwaita, G. Kleiner, A. P. Strafella, S. L. Forrest, C. Sato, E. Rogaeva, S. H. Fox, A. E. Lang, and G. G. Kovacs. Multiple system atrophy with amyloid--predominant alzheimer's disease neuropathologic change. *Brain Communications*, 6(3), 2024. ISSN 2632-1297. doi: 10.1093/braincomms/fcae141. URL <http://dx.doi.org/10.1093/braincomms/fcae141>.

H. Krishnan, V. Bernard-Gauthier, M. Placzek, K. Dahl, T. Collier, C. Ran, J. Hooper, S. Liang, and N. Vasdev. Radiosynthesis and preclinical evaluation of pbt2 for probing the metal hypothesis of alzheimer's disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 59 (supplement 1):1025–1025, 2018. ISSN 0161-5505. URL [https://jnm.snmjournals.org/content/59/supplement\\_1/1025](https://jnm.snmjournals.org/content/59/supplement_1/1025).

R. Lane, H. Kordasiewicz, A. Smith, L. Mignon, T. Miller, P. Narayanan, E. Swayze, D. Norris, B. Fitzsimmons, and C. Bennett. *Rationale for and Development of IONIS-MAPTRx, the First Tau-lowering Antisense Oligonucleotide, in Patients with Mild AD*. 1 Ionis Pharmaceuticals, 2017.

H. D. Larkin. First donepezil transdermal patch approved for alzheimer disease. *JAMA*, 327(17):1642, May 2022. ISSN 0098-7484. doi: 10.1001/jama.2022.6662. URL <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2022.6662>.

- E. Lauretti, O. Dincer, and D. Praticò. Glycogen synthase kinase-3 signaling in alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(5): 118664, May 2020. ISSN 0167-4889. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118664. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118664>.
- Y.-T. Lin, J. Seo, F. Gao, H. M. Feldman, H.-L. Wen, J. Penney, H. P. Cam, E. Gjoneska, W. K. Raja, J. Cheng, R. Rueda, O. Kritskiy, F. Abdurrob, Z. Peng, B. Milo, C. J. Yu, S. Elmsaouri, D. Dey, T. Ko, B. A. Yankner, and L.-H. Tsai. Apoe4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with alzheimer's disease phenotypes in human ipsc-derived brain cell types. *Neuron*, 98(6):1141–1154.e7, June 2018. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.008>.
- S. Liu, L. Chen, J. Li, Y. Sun, Y. Xu, Z. Li, Z. Zhu, and X. Li. Asiaticoside mitigates alzheimer's disease pathology by attenuating inflammation and enhancing synaptic function. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15):11976, July 2023. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms241511976. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241511976>.
- M. Llorens-MarÀtin, J. Jurado, F. HernÃ¡ndez, and J. Àvila. Gsk-3Î², a pivotal kinase in alzheimer disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, May 2014. ISSN 1662-5099. doi: 10.3389/fnmol.2014.00046. URL <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2014.00046>.
- V. Logovinsky, A. Satlin, R. Lai, C. Swanson, J. Kaplow, G. Osswald, H. Basun, and L. Lannfelt. Safety and tolerability of ban2401 - a clinical study in alzheimer's disease with a protofibril selective a antibody. *Alzheimer's Research amp; Therapy*, 8(1), Apr. 2016. ISSN 1758-9193. doi: 10.1186/s13195-016-0181-2. URL <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-016-0181-2>.
- C. Lopez Lopez, A. Caputo, F. Liu, M. Riviere, M.-L. Rouzade-Dominguez, R. Thomas, J. Langbaum, R. Lenz, E. Reiman, A. Graf, and P. Tariot. The alzheimer's prevention initiative generation program: Evaluating cnp520 efficacy in the prevention of alzheimer's disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, page 1–5, 2017. ISSN

2274-5807. doi: 10.14283/jpad.2017.37. URL <http://dx.doi.org/10.14283/jpad.2017.37>.

- A. Lord, A. Gumucio, H. Englund, D. Sehlin, V. S. Sundquist, L. Söderberg, C. Möller, P. Gellerfors, L. Lannfelt, F. E. Pettersson, and L. N. Nilsson. An amyloid- protofibril-selective antibody prevents amyloid formation in a mouse model of alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 36(3):425–434, Dec. 2009. ISSN 0969-9961. doi: 10.1016/j.nbd.2009.08.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.08.007>.
- S. Lowe, C. Duggan Evans, S. Shcherbinin, Y.-J. Cheng, B. Willis, I. Gueorguieva, A. Lo, A. Fleisher, J. Dage, P. Ardayfio, G. Aguiar, M. Ishibai, G. Takaichi, L. Chua, G. Mullins, and J. Sims. Donanemab (ly3002813) phase 1b study in alzheimer's disease: Rapid and sustained reduction of brain amyloid measured by florbetapir f18 imaging. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, page 1–11, 2021. ISSN 2274-5807. doi: 10.14283/jpad.2021.56. URL <http://dx.doi.org/10.14283/jpad.2021.56>.
- R. Mao, S. Xu, G. Sun, Y. Yu, Z. Zuo, Y. Wang, K. Yang, Z. Zhang, and W. Yang. Triptolide injection reduces alzheimer's disease-like pathology in mice. *Synapse*, 77(3), Feb. 2023. ISSN 1098-2396. doi: 10.1002/syn.22261. URL <http://dx.doi.org/10.1002/syn.22261>.
- F. Martenyi, R. A. Dean, S. Lowe, M. Nakano, S. Monk, B. A. Willis, C. Gonzales, D. Mergott, D. Leslie, P. May, A. James, H. Gevorkyan, S. Jhee, L. Ereshefsky, and M. Citron. P3-363: Bace inhibitor ly2886721 safety and central and peripheral pk and pd in healthy subjects (hss). *Alzheimer's amp; Dementia*, 8(4S), July 2012. ISSN 1552-5279. doi: 10.1016/j.jalz.2012.05.1588. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.1588>.
- P. C. May, R. A. Dean, S. L. Lowe, F. Martenyi, S. M. Sheehan, L. N. Boggs, S. A. Monk, B. M. Mathes, D. J. Mergott, B. M. Watson, S. L. Stout, D. E. Timm, E. Smith LaBell, C. R. Gonzales, M. Nakano, S. S. Jhee, M. Yen, L. Ereshefsky, T. D. Lindstrom, D. O. Calligaro, P. J. Cocke, D. Greg Hall, S. Friedrich, M. Citron, and J. E. Audia. Robust central reduction of amyloid- in humans with an orally available, non-peptidic -secretase inhibitor. *The Journal of Neuroscience*, 31(46):16507–16516, Nov. 2011. ISSN

- 1529-2401. doi: 10.1523/jneurosci.3647-11.2011. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3647-11.2011>.
- M. Medina. An overview on the clinical development of tau-based therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4):1160, Apr. 2018. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms19041160. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041160>.
- S. Mitra and P. C. Tomar. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1):159, Dec. 2021. ISSN 1687-157X. doi: 10.1186/s43141-021-00264-6. URL <http://dx.doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>.
- E. M. Mohamed, A. H. Elmaidomy, R. Alaaeldin, F. Alsenani, F. H. Altemani, N. A. Algehainy, M. A. Alanazi, A. Bagalagel, A. Althagafi, M. A. Elrehany, and U. R. Abdelmohsen. Anti-alzheimer potential of a new (+)-pinitol glycoside isolated from tamarindus indica pulp: In vivo and in silico evaluations. *Metabolites*, 13(6):732, June 2023. ISSN 2218-1989. doi: 10.3390/metabo13060732. URL <http://dx.doi.org/10.3390/metabo13060732>.
- E. Mohandas, V. Rajmohan, and B. Raghunath. Neurobiology of alzheimers disease. *Indian Journal of Psychiatry*, 51(1):55, 2009. ISSN 0019-5545. doi: 10.4103/0019-5545.44908. URL <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5545.44908>.
- P. Montenero and L. Milani. La malattia di alois alzheimer e gaetano perusini. *LA medicina biologica*, 4:3–16, 2019.
- L. Mony and P. Paoletti. Mechanisms of nmda receptor regulation. *Current Opinion in Neurobiology*, 83:102815, Dec. 2023. ISSN 0959-4388. doi: 10.1016/j.conb.2023.102815. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2023.102815>.
- J. A. Morales-Garcia, R. Luna-Medina, S. Alonso-Gil, M. Sanz-SanCristobal, V. Palomo, C. Gil, A. Santos, A. Martinez, and A. Perez-Castillo. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(11):963–971, Oct. 2012. ISSN 1948-7193. doi: 10.1021/cn300110c. URL <http://dx.doi.org/10.1021/cn300110c>.

- B. H. Morimoto, A. W. Fox, A. J. Stewart, and M. Gold. Davunetide: a review of safety and efficacy data with a focus on neurodegenerative diseases. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 6(5):483–502, Sept. 2013. ISSN 1751-2441. doi: 10.1586/17512433.2013.827403. URL <http://dx.doi.org/10.1586/17512433.2013.827403>.
- K. Mullane and M. Williams. Alzheimer’s disease beyond amyloid: Can the repetitive failures of amyloid-targeted therapeutics inform future approaches to dementia drug discovery? *Biochemical Pharmacology*, 177:113945, July 2020. ISSN 0006-2952. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113945. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113945>.
- S. Muralidar, S. V. Ambi, S. Sekaran, D. Thirumalai, and B. Palaniappan. Role of tau protein in alzheimer’s disease: The prime pathological player. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163:1599–1617, Nov. 2020. ISSN 0141-8130. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.327. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.327>.
- M. I. Naharci and I. Tasci. Angioedema caused by rivastigmine patch: A rare case. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 38(3):281–282, June 2018. ISSN 0271-0749. doi: 10.1097/jcp.0000000000000875. URL <http://dx.doi.org/10.1097/JCP.0000000000000875>.
- A. Nimmagadda, Y. Shi, and J. Cai. -aapeptides as a new strategy for therapeutic development. *Current Medicinal Chemistry*, 26(13):2313–2329, July 2019. ISSN 0929-8673. doi: 10.2174/0929867324666171107095913. URL <http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666171107095913>.
- P. Novak, R. Schmidt, E. Kontsekova, B. Kovacech, T. Smolek, S. Katina, L. Fialova, M. Prcina, V. Parrak, P. Dal-Bianco, M. Brunner, W. Staffen, M. Rainer, M. Ondrus, S. Ropele, M. Smisek, R. Sivak, N. Zilka, B. Winblad, and M. Novak. Fundamant: an interventional 72-week phase 1 follow-up study of aadvac1, an active immunotherapy against tau protein pathology in alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Research and Therapy*, 10(1), Oct. 2018. ISSN 1758-9193. doi: 10.1186/s13195-018-0436-1. URL <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-018-0436-1>.
- P. Novak, B. Kovacech, S. Katina, R. Schmidt, P. Scheltens, E. Kontsekova, S. Ropele, L. Fialova, M. Kramberger, N. Paulenka-Ivanovova, M. Smisek, J. Hanes, E. Ste-

- vens, A. Kovac, S. Sutovsky, V. Parrak, P. Koson, M. Prcina, J. Galba, M. Cente, T. Hromadka, P. Filipcik, J. Piestansky, M. Samcova, C. Prenn-Gologranc, R. Sivak, L. Froelich, M. Fresser, M. Rakusa, J. Harrison, J. Hort, M. Otto, D. Tosun, M. Ondrus, B. Winblad, M. Novak, and N. Zilka. Adamant: a placebo-controlled randomized phase 2 study of aadvac1, an active immunotherapy against pathological tau in alzheimer's disease. *Nature Aging*, 1(6):521–534, June 2021. ISSN 2662-8465. doi: 10.1038/s43587-021-00070-2. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s43587-021-00070-2>.
- F. Panza, M. Lozupone, G. Logroscino, and B. P. Imbimbo. A critical appraisal of amyloid--targeting therapies for alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(2): 73–88, Jan. 2019. ISSN 1759-4766. doi: 10.1038/s41582-018-0116-6. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>.
- T. Pardo-Moreno, A. González-Acedo, A. Rivas-Domínguez, V. García-Morales, F. J. García-Cozar, J. J. Ramos-Rodríguez, and L. Melguizo-Rodríguez. Therapeutic approach to alzheimer's disease: Current treatments and new perspectives. *Pharmaceutics*, 14(6):1117, May 2022. ISSN 1999-4923. doi: 10.3390/pharmaceutics14061117. URL <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14061117>.
- H. A. Parray, S. Shukla, S. Samal, T. Shrivastava, S. Ahmed, C. Sharma, and R. Kumar. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*, 85:106639, Aug. 2020. ISSN 1567-5769. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106639. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>.
- V. G. Parth H. Patel 1. *Rivastigmine*. StatPearls Publishing, 2024.
- D. Plantone, M. Pardini, D. Righi, C. Manco, B. M. Colombo, and N. De Stefano. The role of tnf- in alzheimer's disease: A narrative review. *Cells*, 13(1):54, Dec. 2023. ISSN 2073-4409. doi: 10.3390/cells13010054. URL <http://dx.doi.org/10.3390/cells13010054>.
- S. S. Plotkin and N. R. Cashman. Passive immunotherapies targeting a and tau in alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 144:105010, Oct. 2020. ISSN 0969-9961. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105010. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105010>.

- M. J. Pontecorvo, M. Lu, S. C. Burnham, A. E. Schade, J. L. Dage, S. Shcherbinin, E. C. Collins, J. R. Sims, and M. A. Mintun. Association of donanemab treatment with exploratory plasma biomarkers in early symptomatic alzheimer disease: A secondary analysis of the trailblazer-alz randomized clinical trial. *JAMA Neurology*, 79(12):1250, Dec. 2022. ISSN 2168-6149. doi: 10.1001/jamaneurol.2022.3392. URL <http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.3392>.
- J. Posner, P. Barrington, T. Brier, and A. Datta-Mannan. *Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future*, page 81–141. Springer International Publishing, 2019. ISBN 9783030353629. doi: 10.1007/164\_2019\_323. URL [http://dx.doi.org/10.1007/164\\_2019\\_323](http://dx.doi.org/10.1007/164_2019_323).
- I. A. Qureshi, G. Tirucherai, M. K. Ahlijanian, G. Kolaitis, C. Bechtold, and M. Grundman. A randomized, single ascending dose study of intravenous biib092 in healthy participants. *Alzheimer's amp; Dementia: Translational Research amp; Clinical Interventions*, 4(1):746–755, Jan. 2018. ISSN 2352-8737. doi: 10.1016/j.trci.2018.10.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.trci.2018.10.007>.
- V. K. Ramanan, M. J. Armstrong, P. Choudhury, K. A. Coerver, R. H. Hamilton, B. C. Klein, D. A. Wolk, S. R. Wessels, and L. K. Jones. Antiamyloid monoclonal antibody therapy for alzheimer disease: Emerging issues in neurology. *Neurology*, 101(19):842–852, Nov. 2023. ISSN 1526-632X. doi: 10.1212/wnl.0000000000207757. URL <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000207757>.
- R. Ramos and N. Vale. Dual drug repurposing: The example of saracatinib. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8):4565, Apr. 2024. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms25084565. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25084565>.
- C. Sawda, C. Moussa, and R. S. Turner. Resveratrol for alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1403(1):142–149, Aug. 2017. ISSN 1749-6632. doi: 10.1111/nyas.13431. URL <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13431>.
- D. Sehlin, H. Englund, B. Simu, M. Karlsson, M. Ingelsson, F. Nikolajeff, L. Lannfelt, and F. E. Pettersson. Large aggregates are the major soluble a species in ad brain fractionated with density gradient ultracentrifugation. *PLoS ONE*, 7(2):e32014, Feb.

2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0032014. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032014>.

A. J. Siddiqui, R. Badraoui, S. Jahan, M. M. Alshahrani, M. A. Siddiqui, A. Khan, and M. Adnan. Targeting nmda receptor in alzheimer's disease: identifying novel inhibitors using computational approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 14, June 2023. ISSN 1663-9812. doi: 10.3389/fphar.2023.1208968. URL <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2023.1208968>.

J. R. Sims, J. A. Zimmer, C. D. Evans, M. Lu, P. Ardayfio, J. Sparks, A. M. Wessels, S. Shcherbinin, H. Wang, E. S. Monkul Nery, E. C. Collins, P. Solomon, S. Salloway, L. G. Apostolova, O. Hansson, C. Ritchie, D. A. Brooks, M. Mintun, D. M. Skovronsky, R. Abreu, P. Agarwal, P. Aggarwal, M. Agronin, A. Allen, D. Altamirano, G. Alva, J. Andersen, A. Anderson, D. Anderson, J. Arnold, T. Asada, Y. Aso, V. Atit, R. Ayala, M. Badruddoja, H. Badzio-jagiello, M. Bajacek, D. Barton, D. Bear, S. Benjamin, R. Bergeron, P. Bhatia, S. Black, A. Block, M. Bolouri, W. Bond, J. Bouthillier, S. Brangman, B. Brew, S. Brisbin, T. Brisken, A. Brodtmann, M. Brody, J. Brosch, C. Brown, P. Brownstone, S. Bukowczan, J. Burns, A. Cabrera, H. Capote, A. Carrasco, J. Cevallos Yopez, E. Chavez, H. Chertkow, U. Chyrchel-paszkiwicz, A. Ciabarra, E. Clemmons, D. Cohen, R. Cohen, I. Cohen, M. Concha, B. Costell, D. Crimmins, Y. Cruz-pagan, A. Cueli, R. Cupelo, M. Czarnecki, D. Darby, P. Dautzenberg, P. De Deyn, J. De La Gandara, K. Deck, D. Dibenedetto, M. Dibuono, E. Dinnerstein, A. Dirican, S. Dixit, J. Dobryniewski, R. Drake, P. Drysdale, R. Duara, J. Duffy, A. Ellenbogen, V. Faradji, M. Feinberg, R. Feldman, S. Fishman, S. Flitman, C. Forchetti, I. Fraga, A. Frank, B. Frishberg, H. Fujigasaki, H. Fukase, I. Fumero, K. Furihata, C. Galloway, R. Gandhi, K. George, M. Germain, D. Gitelman, N. Goetsch, D. Goldfarb, M. Goldstein, L. Goldstick, Y. Gonzalez Rojas, I. Goodman, D. Greeley, C. Griffin, E. Grigsby, D. Grosz, K. Hafner, D. Hart, S. Henein, B. Herskowitz, S. Higashi, Y. Higashi, G. Ho, J. Hodgson, M. Hohenberg, L. Hollenbeck, R. Holub, T. Hori, J. Hort, J. Ilkowski, K. J. Ingram, M. Isaac, M. Ishikawa, L. Janu, M. Johnston, W. Julio, W. Justiz, T. Kaga, T. Kakigi, M. Kalafer, M. Kamijo, J. Kaplan, M. Karathanos, S. Katayama, S. Kaul, A. Keegan, D. Kerwin, U. Khan, A. Khan, N. Kimura, G. Kirk, G. Klodowska, H. Kowa, C. Kutz, J. Kwentus, R. Lai, A. Lall, M. Lawrence, E. Lee,

R. Leon, G. Linker, P. Lisewski, J. Liss, C. Liu, S. Losk, E. Lukaszyk, J. Lynch, S. Macfarlane, J. Macsweeney, N. Mannering, O. Markovic, D. Marks, J. Masdeu, Y. Matsui, K. Matsuishi, P. Mcallister, B. Mcconnehey, A. Mcelveen, L. McGill, A. Mecca, M. Meega, J. Mensah, A. Mickielewicz, A. Minaeian, B. Mocherla, C. Murphy, P. Murphy, H. Nagashima, A. Nair, M. Nair, J. Nardandrea, M. Nash, Z. Nasreddine, Y. Nishida, J. Norton, L. Nunez, J. Ochiai, T. Ohkubo, Y. Okamura, E. Okorie, E. Olivera, J. O'mahony, O. Omidvar, D. Ortiz-Cruz, A. Osowa, M. Papka, A. Parker, P. Patel, A. Patel, M. Patel, C. Patry, E. Peckham, M. Pfeffer, A. Pietras, M. Plopper, A. Porsteinsson, R. Poulin Robitaille, N. Prins, O. Puente, M. Ratajczak, M. Rhee, A. Ritter, R. Rodriguez, L. Rodriguez Ables, J. Rojas, J. Ross, P. Royer, J. Rubin, D. Russell, S. M. Rutgers, S. Rutrick, M. Sadowski, B. Safirstein, T. Sagisaka, D. Scharre, L. Schneider, C. Schreiber, M. Schrift, P. Schulz, H. Schwartz, J. Schwartzbard, J. Scott, L. Selem, P. Sethi, S. Sha, K. Sharlin, S. Sharma, T. Shiovitz, R. Shiwach, M. Sladek, B. Sloan, A. Smith, P. Solomon, E. Sorial, E. Sosa, M. Stedman, S. Steen, L. Stein, A. Stolyar, J. Stoukides, S. Sudoh, J. Sutton, J. Syed, K. Szigeti, H. Tachibana, Y. Takahashi, A. Tatenno, J. D. Taylor, K. Taylor, O. Tcheremissine, A. Thebaud, S. Thein, L. Thurman, S. Toenjes, H. Toji, M. Toma, D. Tran, P. Trueba, M. Tsujimoto, R. Turner, A. Uchiyama, D. Ussorowska, S. Vaishnavi, E. Valor, J. Vandersluis, A. Vasquez, J. Velez, C. Verghese, K. Vodickova-borzova, D. Watson, D. Weidman, D. Weisman, A. White, K. Willingham, I. Winkel, P. Winner, J. Winston, A. Wolff, H. Yagi, H. Yamamoto, S. Yathiraj, Y. Yoshiyama, and M. Zboch. Donanemab in early symptomatic alzheimer disease: The trailblazer-alz 2 randomized clinical trial. *JAMA*, 330(6):512, Aug. 2023. ISSN 0098-7484. doi: 10.1001/jama.2023.13239. URL <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2023.13239>.

M. Sirerol-Piquer, P. Gomez-Ramos, F. Hernández, M. Perez, M. A. Morán, A. Fuster-Matanzo, J. J. Lucas, J. Avila, and J. M. García-Verdugo. Gsk3 overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 21(8):910–922, July 2011. ISSN 1098-1063. doi: 10.1002/hipo.20805. URL <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20805>.

B. Sivaraman, V. Raji, B. A. Velmurugan, and R. Natarajan. Acetylcholinesterase enzyme inhibitor molecules with therapeutic potential for alzheimer's disease. *CNS*

- amp; Neurological Disorders - Drug Targets*, 21(5):427–449, June 2022. ISSN 1871-5273. doi: 10.2174/1871527320666210928160159. URL <http://dx.doi.org/10.2174/1871527320666210928160159>.
- T. Stark, T. Lieblein, M. Pohland, E. Kalden, P. Freund, R. Zangl, R. Grewal, M. Heilemann, G. P. Eckert, N. Morgner, and M. W. Göbel. Peptidomimetics that inhibit and partially reverse the aggregation of a $\beta$ 1–42. *Biochemistry*, 56(36):4840–4849, Aug. 2017. ISSN 1520-4995. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00223. URL <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00223>.
- C. J. Swanson, Y. Zhang, S. Dhadda, J. Wang, J. Kaplow, R. Y. K. Lai, L. Lannfelt, H. Bradley, M. Rabe, A. Koyama, L. Reyderman, D. A. Berry, S. Berry, R. Gordon, L. D. Kramer, and J. L. Cummings. A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early alzheimer’s disease with lecanemab, an anti-a $\beta$  protofibril antibody. *Alzheimer’s Research amp; Therapy*, 13(1), Apr. 2021. ISSN 1758-9193. doi: 10.1186/s13195-021-00813-8. URL <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-021-00813-8>.
- B. Tang, Y. Wang, and J. Ren. Basic information about memantine and its treatment of alzheimer’s disease and other clinical applications. *Ibrain*, 9(3):340–348, June 2023. ISSN 2769-2795. doi: 10.1002/ibra.12098. URL <http://dx.doi.org/10.1002/ibra.12098>.
- S. Thakur, R. Dhapola, P. Sarma, B. Medhi, and D. H. Reddy. Neuroinflammation in alzheimer’s disease: Current progress in molecular signaling and therapeutics. *Inflammation*, 46(1):1–17, Aug. 2022. ISSN 1573-2576. doi: 10.1007/s10753-022-01721-1. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-022-01721-1>.
- A. K. J. S. F. L. J. W. Tsao. *Alzheimer Disease*. StatPearls Publishing, 2024.
- M. S. Uddin, M. T. Kabir, M. S. Rahman, T. Behl, P. Jeandet, G. M. Ashraf, A. Najda, M. N. Bin-Jumah, H. R. El-Seedi, and M. M. Abdel-Daim. Revisiting the amyloid cascade hypothesis: From anti-a $\beta$  therapeutics to auspicious new ways for alzheimer’s disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16):5858, Aug. 2020. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms21165858. URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165858>.

- H. N. Urvashi K. Kalola, Preeti Patel. *Galantamine*. StatPearls Publishing, 2024.
- B. Uttara, A. Singh, P. Zamboni, and R. Mahajan. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1):65–74, Mar. 2009. ISSN 1570-159X. doi: 10.2174/157015909787602823. URL <http://dx.doi.org/10.2174/157015909787602823>.
- E. Vakkila and M. Jehkonen. Apraxia and dementia severity in alzheimer’s disease: a systematic review. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 45(1):84–103, Jan. 2023. ISSN 1744-411X. doi: 10.1080/13803395.2023.2199971. URL <http://dx.doi.org/10.1080/13803395.2023.2199971>.
- C. H. van Dyck, C. J. Swanson, P. Aisen, R. J. Bateman, C. Chen, M. Gee, M. Kanekiyo, D. Li, L. Reyderman, S. Cohen, L. Froelich, S. Katayama, M. Sabbagh, B. Vellas, D. Watson, S. Dhadda, M. Irizarry, L. D. Kramer, and T. Iwatsubo. Lecanemab in early alzheimer’s disease. *New England Journal of Medicine*, 388(1):9–21, Jan. 2023. ISSN 1533-4406. doi: 10.1056/nejmoa2212948. URL <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>.
- R. Vandenberghe, M. Riviere, A. Caputo, J. Sovago, R. P. Maguire, M. Farlow, G. Marotta, R. Sanchez-Valle, P. Scheltens, J. M. Ryan, and A. Graf. Active a immunotherapy cad106 in alzheimer’s disease: A phase 2b study. *Alzheimer’s amp; Dementia: Translational Research amp; Clinical Interventions*, 3(1):10–22, Dec. 2016. ISSN 2352-8737. doi: 10.1016/j.trci.2016.12.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.trci.2016.12.003>.
- C. M. Vander Zanden and E. Y. Chi. Passive immunotherapies targeting amyloid beta and tau oligomers in alzheimer’s disease. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1):68–73, Jan. 2020. ISSN 0022-3549. doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.024. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.024>.
- M. Vaz and S. Silvestre. Alzheimer’s disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*, 887:173554, Nov. 2020. ISSN 0014-2999. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173554. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>.

- D. Venkatesan, S. Muthukumar, M. Iyer, H. W. S. Babu, A. V. Gopalakrishnan, M. K. Yadav, and B. Vellingiri. Heavy metals toxicity on epigenetic modifications in the pathogenesis of alzheimer's disease (ad). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(6), May 2024. ISSN 1099-0461. doi: 10.1002/jbt.23741. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.23741>.
- V. L. Villemagne, V. Doré, P. Bourgeat, S. C. Burnham, S. Laws, O. Salvado, C. L. Masters, and C. C. Rowe. A-amyloid and tau imaging in dementia. *Seminars in Nuclear Medicine*, 47(1):75–88, Jan. 2017. ISSN 0001-2998. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.09.006. URL <http://dx.doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.09.006>.
- D. Wang, Y. Ling, K. Harris, P. E. Schulz, X. Jiang, and Y. Kim. Characterizing treatment non-responders vs. responders in completed alzheimer's disease clinical trials. *medRxiv*, 2023. doi: 10.1101/2023.10.27.23297685. URL <http://dx.doi.org/10.1101/2023.10.27.23297685>.
- H. Wang, S. Huang, K. Yan, X. Fang, A. Abussaud, A. Martinez, H.-S. Sun, and Z.-P. Feng. Tideglusib, a chemical inhibitor of gsk3, attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(10):2076–2085, Oct. 2016. ISSN 0304-4165. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.06.027. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.027>.
- W. Wang, E. Wang, and J. Balthasar. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacology amp; Therapeutics*, 84(5):548–558, Sept. 2008. ISSN 1532-6535. doi: 10.1038/clpt.2008.170. URL <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2008.170>.
- G. K. Wilcock, S. Gauthier, G. B. Frisoni, J. Jia, J. H. Hardlund, H. J. Moebius, P. Bentham, K. A. Kook, B. O. Schelter, D. J. Wischik, C. S. Davis, R. T. Staff, V. Vuksanovic, T. Ahearn, L. Bracoud, K. Shamsi, K. Marek, J. Seibyl, G. Riedel, J. M. Storey, C. R. Harrington, and C. M. Wischik. Potential of low dose leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulphonate) (lmtm) monotherapy for treatment of mild alzheimer's disease: Cohort analysis as modified primary outcome in a phase iii clinical trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(1):435–457, Nov. 2017. ISSN 1875-8908. doi: 10.3233/jad-170560. URL <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-170560>.

- C. M. Wischik, C. R. Harrington, and J. M. Storey. Tau-aggregation inhibitor therapy for alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4):529–539, Apr. 2014. ISSN 0006-2952. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.008>.
- T. Wisniewski and F. Goñi. Immunotherapeutic approaches for alzheimer's disease. *Neuron*, 85(6):1162–1176, Mar. 2015. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.064. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.064>.
- K. G. Yiannopoulou and S. G. Papageorgiou. Current and future treatments in alzheimer disease: An update. *Journal of Central Nervous System Disease*, 12:117957352090739, Jan. 2020. ISSN 1179-5735. doi: 10.1177/1179573520907397. URL <http://dx.doi.org/10.1177/1179573520907397>.
- X.-X. Zhang, Y. Tian, Z.-T. Wang, Y.-H. Ma, L. Tan, and J.-T. Yu. The epidemiology of alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, page 1–9, 2021. ISSN 2274-5807. doi: 10.14283/jpad.2021.15. URL <http://dx.doi.org/10.14283/jpad.2021.15>.
- Z. Zhang, X. Li, D. Li, M. Luo, Y. Li, L. Song, and X. Jiang. Asiaticoside ameliorates -amyloid-induced learning and memory deficits in rats by inhibiting mitochondrial apoptosis and reducing inflammatory factors. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(2):413–420, Dec. 2016. ISSN 1792-1015. doi: 10.3892/etm.2016.4004. URL <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.4004>.



# Ringraziamenti

Sono stati cinque anni lunghi, pieni di soddisfazioni, anche se faticosi, in cui sono cresciuta e non mi sono mai sentita sola.

Ringrazio innanzitutto la prof.ssa *Mariagrazia Grilli*, la dott.ssa *Emanuela Pessolano*, la dott.ssa *Greta De Cicco* e la dott.ssa *Valeria Bortolotto*, che mi hanno dato fiducia e mi hanno accompagnata verso il capitolo finale di questo percorso in modo scrupoloso e attento. I loro consigli sono stati per me uno stimolo in più per migliorare il mio lavoro.

Ringrazio *Nonna Pinuccia*, che non mi ha mai fatto mancare nulla, dai piatti pronti che mi aspettavano dopo le lunghe giornate di lezione, alle preghiere prima di ogni esame. Sei un pilastro fondamentale nella mia vita.

Ringrazio *Mamma* e *Papà*. Grazie per avermi lasciata libera di scegliere il percorso che desideravo per il mio futuro, per avermi permesso di cadere e imparare dai miei errori, e per avermi sempre dato una mano a rialzarmi. Se oggi sono quella che sono, lo devo a voi. Il vostro amore è stato il mio sostegno più grande.

Ringrazio le mie amiche di infanzia, *Francesca* e *Martina*. Grazie perché, pur avendo intrapreso percorsi totalmente diversi, non è mai mancato il vostro appoggio. Grazie per avermi sempre ascoltata e compresa, soprattutto nei momenti più difficili. Custodisco la nostra amicizia come un dono prezioso.

Ringrazio il mio gruppo di *Amici*, con il quale condivido la maggior parte dei miei sabati sera. Grazie per avermi fatta svagare dopo aver dato esami difficili e per avermi strappato un sorriso quando era l'ultima cosa che avrei fatto.

Ringrazio *Chiara*, *Elisa* e *Giulia*. Ho intrapreso con voi l'inizio della mia carriera universitaria, e nonostante i nostri percorsi abbiano preso strade diverse, con voi il mondo

accademico ha fatto meno paura. Vi ringrazio di essere sempre state al mio fianco.

Ringrazio *Lorenzo* e *Francesca*, con i quali ho iniziato il cammino in questa Facoltà. Grazie per aver condiviso con me lezioni, pranzi ed esami. Grazie perché so che posso contare su di voi sempre.

Ringrazio le mie compagne di corso di questi ultimi anni: *Alessia*, *Rebecca*, *Giorgia*, *Rebecca*, *Isabella* e *Nada*, per aver reso più leggere le giornate di lezione e di laboratorio. La vostra compagnia è stata fondamentale, soprattutto nei momenti più intensi.

Ringrazio anche la *Farmacia Raimondi* e tutti i suoi collaboratori. Grazie di avermi offerto un ambiente di crescita professionale ed umana, nel quale ho potuto apprendere, sbagliare e migliorare, sempre con il vostro supporto. Grazie di avermi accompagnata in questo viaggio accogliendo le mie paure e insicurezze, facendomi sentire parte di una vera famiglia.

Un grazie dal profondo del cuore va a *Federico*. Grazie di essermi stato vicino fin dall'inizio di questo percorso. Hai creduto in me anche quando io stessa non riuscivo a farlo, dandomi la forza di andare avanti. Ho sentito il tuo supporto sempre, soprattutto nei momenti più difficili. Condividere questo traguardo importante con te è un privilegio immenso. Grazie per tutta la luce che costantemente porti nella mia vita.

Infine, un grazie alla bambina testarda che è in me. Grazie perché, nonostante tutto, non ho mai smesso di credere nei sogni, che con determinazione e un pizzico di magia, sono diventati realtà. Oggi si chiude un importante, lungo e bellissimo capitolo della mia vita e se ne aprirà presto un nuovo che onestamente mi fa un po' paura. Ma sono certa che, circondata da tutto questo Amore, sarà più semplice.

Questo è solo l'inizio!