



최 성 혜

인하대학교 의과대학 신경과학교실

Current research action in dementia patient management

Seong Hye Choi, MD, PhD

Department of Neurology, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. It is characterized by an imbalance between the production and clearance of amyloid β ($A\beta$) and tau proteins. In AD these normal proteins accumulate, leading to aggregation and a conformational change forming oligomeric and fibrillary species with a high β -sheet content. Active and passive immunotherapeutic approaches result in dramatic reduction of $A\beta$ pathology in AD animal models. However, there is much more limited evidence in human studies of significant clinical benefits from these strategies and it is becoming apparent that they may only be effective very early in AD. Recently, one year of monthly intravenous infusions of aducanumab in prodromal or mid AD reduced brain $A\beta$ in a dose- and time-dependent manner. Vaccination targeting only tau pathology has shown benefits in some mouse studies but human studies are limited. Beta secretase (BACE 1) inhibitors are also investigated in prodromal AD and mild AD. The treatment targeting beta amyloid could result in amyloid-related imaging abnormalities (ARIA) such as vasogenic edema and sulcal effusions (ARIA-E) or microhemorrhages and hemosiderosis (ARIA-H). The ARIA is more common in APOE $\epsilon 4$ carriers and the patients receiving high-dose treatment.

Key Words: Alzheimer's disease, Treatment, Beta amyloid

서론

서구의 치매 유병률은 65세 이상 노인에서 6-10%이다. 국내에서 시행한 역학조사에서는 65세 이상 노인에서 치매의 유병률이 9.5-13%로 서구보다 높았다. 60-64세에서 치매의 유병률은 1%이다. 나이가 5세 많아질 때마다 치매의 유병률을 두 배가 된다. 그래서 85-89세에서는 치매의 유병률이 30%, 90세 이상에서는 40% 이상으로 증가한다. 국내를 비롯하여 전 세계적으로 평균 수명이 연장되면서 치매 환자들의 급증이 예상된다.

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 치매의 가장 흔한 원인 질환이다. 전 세계적으로 알츠하이머치매의 유

병률은 2010년에는 약 2500만명이나, 평균 수명의 연장으로 2030년에는 약 5000만명에 육박할 것으로 추정하고 있다.¹ 알츠하이머병의 특징적인 뇌 병리소견은 베타아밀로이드($\text{amyloid } \beta$, $A\beta$) 단백질과 신경원섬유매듭(neurofibrillary tangle)의 축적이다.² 베타아밀로이드 단백질의 축적은 신경원섬유매듭의 축적보다 먼저 시작되는 병리적 현상이다. 베타아밀로이드 단백질은 단체(monomer), 소중합체(oligomer), 섬유형태(fibrillary)로 존재하는데 이 중 소중합체가 가장 신경세포에 유해하다. 65세 이전에 발병하는 조기발현(early onset) 알츠하이머치매(dementia due to AD)는 5% 이내이고, 95%가 65세 이후에 발병하는 산발성 후기발현(sporadic late-onset) 알츠하이머치매이다. 14번 염색체의 presenilin 1 (PS1) 유전자, 1번 염색체의 presenilin 2 (PS2) 유전자 및 21번 염색체의 amyloid precursor protein (APP) 유전자의 돌연변이에 의하여 상염색체우성으로 유전되는 가족성 알츠하이머치매가 발생한다.³ 이는 조기발현 알츠하이머치매의 약 10%에 해당하

Seong Hye Choi, MD, PhD

Department of Neurology, Inha University Hospital, 27 Inhang-ro, Jung-gu, Incheon 22332, Korea

Tel: +82-32-890-3860 Fax: +82-32-890-1140

E-mail: seonghye@inha.ac.kr

고 대부분의 조기발현 알츠하이머치매의 원인은 밝혀져 있지 않다. 아포지단백 E ε4(apolipoprotein E ε4, APOE ε4)는 산발성 후기발현 알츠하이머치매의 위험인자이다.⁴ 그 외에 후기 발현 알츠하이머치매에서는 고령으로 인한 베타아밀로이드 제거의 감소,⁵ 혈액 내 베타아밀로이드의 뇌로의 유입, glymphatic system의 장애 등이 발병 기전으로 생각되고 있다.⁶

알츠하이머병에서는 뇌에 아세틸콜린과 아세틸콜린의 합성 효소인 choline acetyltransferase가 감소한다. 시냅스에서 아세틸콜린을 분해하는 효소인 아세틸콜린에스테라제의 억제제가 인지기능개선제로 개발되었다. 현재 임상에서 사용하는 아세틸콜린에스테라제 억제제는 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민이 있다.⁷ 그 외에 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 가역적인 억제제인 메만틴(Memantine)이 중등도 및 중증 알츠하이머치매 환자들의 인지기능개선제로 사용되고 있다.⁸ 그러나 이와 같은 약물들은 알츠하이머병의 진행을 늦추거나 멈추는 데는 한계가 있다. 최근에는 알츠하이머병의 진행을 멈추거나 지연시키기 위하여, 병의 초기 단계에 베타아밀로이드를 제거하거나 생성을 억제하는 약물에 대한 많은 연구들이 진행 중이다. 본문에서는 가장 활발하게 연구가 진행되고 있는 알츠하이머병 치료제에 초점을 맞추어 현재 진행 중인 연구들에 대하여 살펴보고자 하겠다.

본 론

1. 능동 면역요법 (active immunotherapy)

AN1782은 알츠하이머병의 능동 면역요법으로 최초로 시도된 물질이다(Table 1). AN1782는 응집된 Aβ1-42와 항원보강제(adjuvant)인 QS21로 구성되어 있다. AN1782는 강력한 세포매개 면역반응을 유도한다. 그러나 phase IIa 임상시험의 6% 환자들에서 무균 수막뇌염이 발생하여

연구가 중단되었다.⁹ AN1782를 투여 받았던 환자들의 사후 부검에서 뇌의 아밀로이드판(amyloid plaque)이 소실된 소견이 관찰되었다.¹⁰ 이들에서 AN1782를 투여 후 임상적으로 호전되지는 않았지만 아밀로이드판이 소실되었다는 것은 면역요법이 베타아밀로이드의 제거에는 효과가 있음을 보여준 것이다. 그 이후 CAD106, ACC-001, AFFITOME AD02, ACI-24의 물질들을 사용하여 알츠하이머치매의 능동면역요법의 임상시험이 실시 되었지만 위약군에 비하여 유의한 결과를 도출하지는 못하였다(Table 1).

최근에는 타우단백질을 표적으로 하는 능동면역치료가 임상시험 중이다. 타우의 응집은 주로 세포내에서 이루어지나 최근 연구들에서 응집된 타우 단백질이 세포에서 방출되기도 한다는 것이 밝혀졌다.¹¹ 타우단백질 표적의 능동면역치료는 주로 세포 밖의 타우단백질을 표적으로 한다. ADDVac1은 타우단백질 294-305 펩타이드의 합성 펩타이드이다. 초기 및 중기 알츠하이머치매 환자들에서 3개월마다 피하주사하고 18개월간 추적하는 1상 임상시험이 진행 중이다.¹² ACI-35도 타우단백질을 표적으로 하는 능동면역치료 물질로 초기와 중기 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 1상 임상시험 중이다.¹²

2. 수동 면역요법 (passive immunotherapy)

경도 또는 중등도 알츠하이머치매 환자들에서 바피뉴주맙(Bapineuzumab)을 4개의 다른 용량(0.15 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg and 2 mg/kg)군으로 나누어 78주 동안 13주마다 정맥주사로 투여하고 위약과 비교하였는데, Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive subscale (ADAS-Cog) 등의 인지기능 평가에서 위약군에 비하여 유의한 효과가 관찰되지 않았다(Table 2).¹³ 그러나 사후 분석에서 APOE ε4 보인자들에서는 바피뉴주맙 투여군에서 위약군에 비하여 유의한 인지기능의 개선이 관찰되었다. 11C-PiB PET 영상에서도 바피뉴주맙 투여군

Table 1. Active immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease

Vaccine	Company	Aβ Target	Stage	Status
AN1792	ELAN/Wyeth	Aβ42	Phase II	(2000-2002) halted, no clinical improvement, encephalitis in 6% of subjects
CAD106	Novartis	Aβ1-6	Phase I Phase II	Aβ titers, no change biomarkers Not reported
ACI-24	AC Immune	β-sheet conformation of Aβ peptide	Phase I/IIa	Not reported
AFFITOME AD02	Affinis AG/GSK	Mimotope of unmodified Aβ N-terminus	Phase II	Not reported
ACC-001	Janssen/Pfizer	Aβ1-6-QS21	Phase II	Not reported, finishing

Table 2. Passive immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease

Company	Vaccine	Stage	Status	Epitope and A β Target
Janssen/Pfizer	Bapineuzumab AAB-001	Phase II Phase III	No clinical improvement, ARIA toxicity noted Not improvement, halted	Humanized 3D6, anti-A β 1-5, binds all forms of A β (monomeric, oligomeric and fibrillar)
Eli Lilly	Solaneuzumab	Phase III(2)	No improvement overall, secondary analysis slight improvement in early AD	Humanized mAb266 Anti-A β 16-24,
Biogen	A4	Phase III	Ongoing, asymptomatic AD with positive PET	bindings monomeric A β
	Aducanumab	Phase Ib	Concluded, Benefit in MMSE and CDR-SB at 3 and 10mg/kg doses, ARIA toxicity noted	Full human IgG1, to aggregated A β (fibrillar and oligomeric)
		Phase III	Ongoing, ENGAGE and EMERGE trials will assess the efficacy and safety of aducanumab in approximately 2,700 people with early AD	
Hoffman-La Roche	Gantenerumab DIAN	Phase III Phase III	Ongoing Ongoing in autosomal dominant AD	Antibody to fibrillar form of A β Positions 3-12; 18-27
Hoffman-La Roche	Crenezumab	Phase III	Ongoing in prodromal and mild AD	Hu IgG4 anti-multiple epitopes A β 1-40,
	ABBY	Phase II	No difference in biomarkers/ FDG-PET	bindings all forms of A β
	BLAZE	Phase II	Ongoing in EOAD families with PS1 mut. E280A	(monomeric, oligomeric and fibrillar)
	API	Phase II		

API, alzheimer's prevention initiative.

에서 유의하게 뇌피질의 베타아밀로이드 축적이 감소하였다.¹⁴ 바피뉴주맙 투여군에서 FLAIR MRI 상에서 'amyloid-related imaging abnormalities (ARIA)'가 관찰되었다.¹⁵ 뇌의 혈관탕부종(vasogenic edema)과 고랑삼출물(sulcal effusion)의 'ARIA-E'가 17%에서 관찰되었는데 증상이 동반한 경우는 이들 중에서 22%이었다. 미세출혈과 혈철소증(hemosiderosis)의 'ARIA-H'는 ARIA-E를 보인 환자들의 약 50%에서 동반되었다. ARIA-E를 보이지 않는 환자들에서는 약 4%에서 ARIA-H가 관찰되었다. ARIA는 APOE ϵ 4 보인자들과 고용량 투약군에서 더 흔하게 관찰되었다. 이는 APOE ϵ 4 보인자에서 혈관에 아밀로이드가 더 많이 침착되기 때문이다.

솔라네주맙(Solanezumab)은 베타아밀로이드의 단체에 작용하는 단클론항체(monoclonal antibody)이다(Table 2). 경도에서 중등도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 2개의 3상 임상시험(EXPEDITION 1, EXPEDITION 2)이 시행되었다. 18개월 동안 400mg의 솔라네주맙을 4주마다 정맥 주사하여 위약군과 비교하였는데 인지기능에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.¹⁶ 그러나 경도 알츠하이머치매 환자들에서는 솔라네주맙 투여군에서 위약군에 비하여 유의하게 인지기능이 개선 되었다. 솔라네주맙 투여군에서는 ARIA가 관찰되지 않았다. 2013-2016년에 경중 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 한 솔라네주맙 3상 임상시험(EXPEDITION 3)을 실시하였는데 위약군에 비하여 유의한 인지기능의 개선효과가 관찰되지 않았다.

'Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)' 연구는 돌연변이 유전자가 밝혀진 알츠하이머치매 환자의 가족들 중에서 돌연변이 유전자의 보인자이나 아직 증상이 없거나 매우 경미한 가족들을 대상으로 하는 임상시험으로 여기에 솔라네주맙이 사용되고 있다. 'Anti-Amyloid Treatment for asymptomatic Alzheimer's disease (A4)' 연구는 65세 이상이고 아밀로이드 PET에서 양성 소견을 보이는 증상발현전 알츠하이머병(preclinical AD) 환자들을 대상으로 솔라네주맙과 위약을 비교하는 임상시험이다.

DIAN 임상시험에는 간테네루맙(Gantenerumab)이라는 단클론항체도 치료군에서 사용되고 있다. 간테네루맙은 섬유성 베타아밀로이드에 주로 작용하고, 미세아교세포의 베타아밀로이드 포식작용(phagocytosis)을 활성화한다. 전구단계 알츠하이머병 환자들을 대상으로 4주에 한번씩 간테네루맙을 피하주사 하면서 위약군과 비교한 phase II/III 연구(Scarlet RoAD 연구)에서 위약에 비하여 일차유효성 변수인 Clinical Dementia Rating scale-Sum of Boxes (CDR-DB)에서 유의한 개선 효과가 관찰되지 않았다. 최근에 간테네루맙을 고용량으로 용량을 증량하여 3상 임상시험을 시행하고 있다.

크레네주맙(Crenezumab)은 단체, 소중합체, 섬유형태의 베타아밀로이드에 작용하는 IgG 항체이다. 크레네주맙은 미세아교세포(microglia)에 대한 작용이 적어서 ARIA의 발생 가능성이 적고, 실제로 1상 임상시험에서 ARIA는 발생하지 않았다. ABBY 연구는 경도 및 중등도 알츠하이머

치매 환자들을 대상으로 1달에 1회 크레네주맵을 피하 주사 또는 정맥 주사하고 위약과 비교하는 2상 임상시험인데, 인지기능의 개선을 조사하는 일차 유효성 변수에서 크레네주맵과 위약 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 Mini-Mental State Examination (MMSE) 22-26점의 정도 환자들에서는 고용량의 크레네주맵 정맥주사군에서 유의한 인지기능의 개선이 관찰되었다. BLAZE 연구에서는 경도 및 중등도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 1달에 1회 크레네주맵을 피하 주사 또는 정맥 주사하고 뇌에 베타아밀로이드 축적의 감소를 1차 유효성 변수로 하여 위약군과 비교하였는데 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 현재는 전구단계(prodromal AD)와 경도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 1달에 1회 크레네주맵을 정맥주사로 투약하며 위약과 비교하는 3상 임상시험을 진행하고 있다. 여기서 1차 유효성변수는 CDR-SB이다. 그 외에 콜롬비아의 PS1 mutation (E280A)을 가진 가계에서 아직 치매 증상이 발현되지 않은 300명의 PS1 mutation (E280A) 보인자들을 대상으로 크레네주맵을 1달에 1회 정맥 주사하며 5년간 위약과 비교하는 Alzheimer's Prevention Initiative (API) 연구가 진행 중이다(Table 2).

현재 가장 기대가 큰 약물은 아듀카누맵(Aducanumab)이다. 아듀카누맵은 소중합체와 섬유행태의 베타아밀로이드에 작용하는 IgG 항체이다. "PRIME" 연구에서 166명의 전구단계 및 경도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 52주 동안 위약, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg의 아듀카누맵을 4주마다 1회 정맥주사 하였다. 아밀로이드 PET에서 베타아밀로이드의 축적이 관찰된 환자들을 대상으로 하였고, 아밀로이드 PET는 24주와 연구종료 시점에 재촬영하였다. 아밀로이드 PET에서 용량에 비례하여 베타아밀로이드의 축적이 감소하는 소견이 관찰되었다.¹⁷ 또한 MMSE 점수에서 3 mg/kg군과 10 mg/kg 군에서 위약군에 비하여 유의하게 개선되는 소견이 관찰되었고, CDR-SB 점수에서 10 mg/kg 군에서 위약군에 비하여

유의하게 호전되는 소견이 관찰되었다. 베타아밀로이드 면역요법에 의한 뇌부종이나 뇌출혈의 ARIA가 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg 군 각각에서 6%, 13%, 37%, 47%로 용량에 비례하여 상당히 빈번하게 관찰되었다. 특히 APOE ε4 보인자에서 더 빈번하게 관찰되었다. 현재는 전구단계 및 경도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 3상 연구를 진행하고 있다.

2. Beta secretase 1 (BACE 1) 억제제

Beta secretase 1은 아밀로이드 전구단백질을 분해하여 Aβ42를 생성하는 효소이다. 현재 BACE 1 억제제가 알츠하이머치매의 치료제로 개발되어 임상시험이 활발하게 진행 중이다. MERK에서는 경도에서 중등도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 Verubecestat를 위약과 비교하는 Phase II/III 임상시험을 시행하여 2016년에 중간 분석을 시행하였는데, 치료군과 위약군 간에 1차 유효성변수인 ADAS-cog와 Alzheimer's Disease Cooperative Study - Activities of Daily Living (ADCS-ADL)에서 유의한 차이가 관찰되지 않아서 연구를 중단하였다. 이 연구에서는 알츠하이머치매의 진단이 임상적으로만 시행되었고 아밀로이드 PET나 뇌척수액의 베타아밀로이드를 측정하여 뇌의 베타아밀로이드 축적 여부를 확인하지는 않았다. 또한 MMSE 15-26의 환자들을 등록하여 중등도 알츠하이머치매 환자들이 많이 포함되어 약물의 효과가 유의하지 않았을 가능성을 배제할 수 없다. 현재 전구단계의 알츠하이머병 환자들을 대상으로 하는 Verubecestat의 3상 임상시험은 지속되고 있다(Table 3).

그 외에도 AZD3293과 Elenbecestat가 경도인지장애와 경도 알츠하이머치매 환자들을 대상으로 3상 임상시험이 진행 중이다. 노바티스에서는 인지기능이 정상인 APOE ε4 동형접합자(homozygote) 또는 아밀로이드 PET이나 뇌척수액검사에서 뇌의 베타아밀로이드 축적이 확인된 APOE ε4 이형접합자(heterozygote)를 대상으로 CNP-520과 위약

Table 3. Beta secretase I (BACE 1) inhibitors for Alzheimer's disease

Company	Drugs	RCTs	Status
Merk	Verubecestat (MK-8931)	Phase II/III, mild to moderate AD Phase III, prodromal AD	No improvement Ongoing
Astrazeneca/ Eli Lilly	AZD3293 (LY3314814)	Phase II/III (Amaranth), prodromal to mild AD Phase III, mild AD (Daybreak study)	Ongoing Ongoing
Eisai	E2609 (Elenbecestat)	Phase III, MCI and mild AD	Ongoing
Novartis	CNP520	Phase III, preclinical AD	Ongoing

을 비교하여 5년 이내에 알츠하이머병에 의한 경도인지장애 또는 알츠하이머치매로 진행되는 시간과 인지기능의 변화를 비교하는 임상시험을 시행하고 있다.

결론

현재 가장 활발하게 연구가 진행되고 있는 알츠하이머치매 치료제는 수동면역요법의 단클론항체와 BACE 1 억제제이다. 아밀로이드 PET나 뇌척수액의 베타아밀로이드를 측정하여 뇌에 베타아밀로이드 축적이 확인된 환자를 대상으로 하고 있으며 전구단계인 경도인지장애와 경도 알츠하이머치매 환자들이 주된 대상군이다. 아듀카누맙의 연구에서 저용량보다는 고용량의 단클론항체 치료제가 베타아밀로이드의 제거에 효과적임이 밝혀진 이후로 단클론항체 연구는 고용량으로 진행되고 있는 추세이다. 베타아밀로이드 단백질의 표적치료제에서는 뇌부종이나 미세출혈 등의 ARIA가 발생할 수 있어서 주의가 요한다. 특히 APOE ε4 보인자이거나 고용량의 치료에서 ARIA 발생이 더 흔하다.

References

1. Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA* 2015;313:1924-1938.
2. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer's disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71:362-381.
3. Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron* 2014;83:11-26.
4. Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and Abeta in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron* 2014;81:740-754.
5. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain and Alzheimer's Disease. *Nature Neurology Reviews* 2015;11:457-470.
6. Morrone CD, Liu M, Black SE, McLaurin J. Interaction between therapeutic interventions for Alzheimer's disease and physiological Abeta clearance mechanisms. *Front Aging Neurosci* 2015;7:64. [PubMed: 25999850]
7. Lockhart IA, Mitchell SA, Kelly S. Safety and tolerability of donepezil, rivastigmine and galantamine for patients with Alzheimer's disease: systematic review of the 'real-world' evidence. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009;28:389-403.
8. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003;348:1333-1341.
9. Boche D, Nicoll JA. The role of the immune system in clearance of Ab from the brain. *Brain Pathol* 2008;18:267-278.
10. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nat Med* 2005;9:448-452.
11. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009;11:909-913.
12. Wisniewski T, Drummond E. Developing therapeutic vaccines against Alzheimer's disease. *Expert Rev Vaccines* 2016;15:401-415.
13. Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2009;7:2061-2070.
14. Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, et al. (11)C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* 2010;9:363-372.
15. Sperling R, Salloway S, Brooks DJ, Tampieri D, Barakos J, Fox NC, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis. *Lancet Neurol* 2012;11:241-249.
16. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild- to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014;370:311-321.
17. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 2016;537:50-56.