

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 824 763**

(51) Int. Cl.:

**A61K 33/06** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015 E 17189527 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3269376**

---

(54) Título: **Tratamiento y a la prevención de la enfermedad de Alzheimer (AD)**

(30) Prioridad:

**29.04.2014 EP 14166355**

**29.04.2014 EP 14166354**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.05.2021**

(73) Titular/es:

**MATTNER, FRANK (50.0%)**

**Cobenzlgasse 134**

**1190 Wien, AT y**

**SCHMIDT, WALTER (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**MANDLER, MARKUS;**

**SCHNEEBERGER, ACHIM;**

**VON BONIN, ARNE;**

**MATTNER, FRANK y**

**SCHMIDT, WALTER**

(74) Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 824 763 T3

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento y a la prevención de la enfermedad de Alzheimer (AD)

5 La presente invención se refiere al tratamiento y a la prevención de la enfermedad de Alzheimer (AD).

La AD se caracteriza por la acumulación aberrante de polipéptidos de amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) que resulta en la deposición de  $\beta$ -amiloide. La AD es el trastorno neurodegenerativo más prevalente, afectando actualmente a 28 millones de personas en todo el mundo. Típicamente se presenta con una disfunción amnésica característica asociada a otros cambios cognitivos, comportamentales y neuropsiquiátricos. La AD se caracteriza por la acumulación anormal de depósitos amiloides intracelulares y extracelulares, estrechamente asociada a astrocitosis y microgliosis extensiva, así como a neuronas distróficas y pérdida neuronal. Estos depósitos amiloides consisten principalmente en los péptidos  $A\beta$  llamados  $A\beta40$  y  $A\beta42$  derivados de la proteína precursora del amiloide (PPA, gi:112927), que se expresa sobre diversos tipos celulares del sistema nervioso. Se considera que los péptidos  $A\beta$  participan directamente en la patogénesis y progresión de la AD.

Además de los depósitos de amiloide, los ovillos neurofibrilares (ONF) representan la segunda característica neuropatológica distintiva de la AD, descrita por primera vez por Alois Alzheimer. Estas lesiones se producen en el hipocampo, cortezas de asociación a la amígdala y determinados núcleos subcorticales. Los ONF se localizan en el citoplasma de las neuronas y están compuestas de proteína Tau hiperfosforilada. La proteína Tau es una proteína axonal de unión a los microtúbulos que estimula el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos bajo condiciones normales. La hiperfosforilación de Tau resulta en la pérdida de la asociación a microtúbulos y el consiguiente des-ensamblaje de los mismos, que a su vez conduce a un deterioro del transporte axonal y consecuente degeneración axonal y neuronal. Todavía no está claro si la hiperfosforilación de Tau y la formación de ovillos constituyen una causa o una consecuencia de la AD.

Además de la patología de amiloide y Tau/Tau hiperfosforilado, la neuroinflamación puede considerarse el tercer pilar integral de los cambios fisiopatológicos que provocan la neurodegeneración en la AD. El fenotipo neuroinflamatorio en la AD se caracteriza por una activación robusta y generalizada de la microglía y los astrocitos en las regiones cerebrales afectadas, resultando en la expresión endógena de citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión celular y quimiocinas. Se cree que estos cambios resultan de la reacción glial a sucesos relacionados con la toxicidad persistente inducida por el amiloide y Tau/Tau hiperfosforilado y los mediadores de los mismos.

35 Actualmente se cree que una estrategia potencial de tratamiento para la AD y trastornos relacionados podría basarse en la inmunoterapia para prevenir o reducir la acumulación de agentes neurotóxicos como  $A\beta$  o Tau/Tau hiperfosforilado.

Diversas estrategias de tratamiento activo y pasivo con diana en Tau/Tau hiperfosforilado han conducido a una 40 reducción de la deposición de Tau/Tau hiperfosforilado y cambios neuropatológicos asociados en modelos animales; sin embargo, hasta el momento no se dispone de datos positivos de pacientes humanos de AD. En contraste, se ha producido un número significativo de fracasos en ensayo clínico en los últimos años: "los resultados de los ensayos clínicos de fase III de dos anticuerpos monoclonales, bapineuzumab y solanozumab, con diana en el amiloide  $\beta$  han demostrado poco beneficio clínico a través del ataque inmunológico sobre el 45 amiloide  $\beta$  en el estadio de demencia de la enfermedad esporádica" (Aisen et al., Nat. Rev. Drug Disc. 12:324-325, 2013; Mullard, Nat. Rev. Drug Disc. 11:657-660, 2012). También otros estudios de modificadores candidatos de la enfermedad planteados mediante hipótesis "tales como fármacos antiinflamatorios, inhibidores y moduladores de secretasa, terapias hormonales, estatinas y otros fármacos han resultado decepcionantes", incluyendo el "fracaso 50 clínico de los dos inhibidores líderes de secretasa y: semagacestat [...] y avagacestat" (Aisen et al., 2013; Mullard, 2012). Se ha comentado que este pobre resultado clínico de los ensayos clínicos de la AD es "la culminación de una 'década perdida' en las pruebas terapéuticas de la enfermedad de Alzheimer, sin éxito sustancial desde la autorización de la memantina" (Aisen et al., 2013). Durante el curso de estos desarrollos, la FDA estadounidense 55 también ha modificado las reglas para la autorización de nuevos tratamientos para la AD y ha recomendado la utilización de biomarcadores específicos de la AD, tales como biomarcadores radiológicos que utilizan escaneos PET (por sus siglas en inglés, tomografía por emisión de positrones) (Kozauer et al., N. Engl. J. Med. 368:1170-1171, 2013).

El documento nº WO 94/16327 A1 da a conocer agentes terapéuticos que implican un "canal iónico de proteína amiloide". Sin embargo, este concepto de canal iónico de la proteína amiloide del documento nº WO 94/16327 A1 60 no ha sido perseguido posteriormente y finalmente ha sido cuestionado científicamente (Sokolov et al., J. Gen. Physiol. 128:637-647, 2006; comentario por Eliezer, J. Gen. Physiol. 128:631-633, 2006).

Además, las enseñanzas del documento nº WO 94/16327 A1 implican una interacción activa de los iones de Al con potenciales canales iónicos de  $A\beta$  in vivo, que inhiben de esta manera dichos canales. De esta manera, con el fin de que el aluminio cumpla con esta función, el compuesto debe alcanzar el cerebro como sitio de actividad a las concentraciones propuestas. En el cerebro humano los niveles normales de aluminio se encuentran 65

comprendidos entre 0,25 y 0,75 mg/kg de peso húmedo, conteniendo la materia gris (responsable principal de regular las funciones cognitivas afectadas por la AD) aproximadamente el doble de la concentración observada en la materia blanca (The EFSA Journal 754:24-88, 2008; Apéndice al EFSA Journal 754:1-34, 2008, opinión, "Seguridad del aluminio procedente de la ingesta en la dieta"). Hay evidencia de que a mayor edad, las 5 concentraciones de aluminio podrían incluso incrementarse en el tejido cerebral humano. De manera similar, algunos estudios indican además que los cerebros procedentes de pacientes de AD muestran niveles de Al más elevados que los cerebros de control sanos (revisión en Yokel, NeuroToxicology 21:813-828, 2000). De esta manera, la concentración de Al terapéuticamente activa que se sugiere ya se encuentra presente en el cerebro sano y en el cerebro enfermo (en el intervalo de la formulación de uso pretendida tal como se indica en el 10 documento nº WO 94/16327 A1, reivindicación 12: 0,01 a 10 mg/kg). Además, la biodisponibilidad del Al en el cerebro después de la incorporación parenteral y oral se mantiene baja basándose en mecanismos de influjo/eflujo altamente eficientes y activamente regulados y requiere dosis periféricas elevadas para alcanzar las 15 concentraciones cerebrales terapéuticas sugeridas. Por lo tanto, no presenta una base científica plausible que un incremento adicional del Al periférico conduzca a los niveles cerebrales adicionales de Al requeridos para ejercer efectos terapéuticamente beneficiosos directos sin inducir potenciales efectos tóxicos.

Además, las figuras 7 y 8 de dicha solicitud dan a conocer que el oxihidróxido de aluminio de aplicación tópica es 20 capaz de retrasar el declive cognitivo significativamente en un modelo transgénico de APP de enfermedad de Alzheimer (Tg2576) sin modificar significativamente los niveles cerebrales de A $\beta$ . Ello implica un mecanismo independiente de APP/A $\beta$  que subyace a los efectos funcionales beneficiosos ejercidos por el oxihidróxido de aluminio en este modelo de AD.

El documento nº WO 99/27944 A1 da a conocer vacunas para la AD basadas esencialmente en la presencia de 25 un agente eficaz para inducir una respuesta inmunógena contra A $\beta$ . El documento nº WO 2011/120924 A1 se refiere a una vacuna de A $\beta$ , que esencialmente se basa en el péptido A $\beta$ 1-6 unido a una partícula de tipo vírico. Los documentos nº WO 2006/005707 A2, nº WO 2009/149486 A2 y nº WO 2009/149485 A2 dan a conocer péptidos mimotopos de A $\beta$  para la utilización en vacunas para la prevención y el tratamiento de la AD.

30 Heneka et al. (Nature 493 (7434):674-678, 2012) proponen el tratamiento de la AD mediante la inhibición de NLRP3 con el fin de reducir la agregación del amiloide  $\beta$ . Aimanianda et al. (TIPS 30(6):287-295, 2009) dan a conocer que el alumbre activo NLRP3.

35 Magga et al. (J. Cell. Mol. Med. 16:1060-1073, 2012) informan de la producción de células monocíticas procedentes de células madre de la médula ósea y de su utilización terapéutica en la AD. Lebson et al. (Cell Transp. Cogn. Com. 17:470/471, 2008) dan a conocer la terapia génica de monocitos en ratones transgénicos APP+PS1 con AD. El documento nº WO 2012/055981 A1 propone la utilización de un "agonista de TLR4 libre de endotoxina" para la prevención o la reducción del depósito de amiloide. Malm et al. (GLIA 58:889-900, 2010) presentan una revisión 40 del papel y potencial terapéutico de las células monocíticas en la AD.

45 El documento nº WO 2009/105641 A1 da a conocer la utilización de M-CSF para el tratamiento de la amiloidosis. Boissonneault et al. (Brain 132(4):1078-1092, 2008) informan de los efectos de M-CSF sobre el depósito de amiloide y el deterioro cognitivo en la AD. Luo et al. (Neuroscience Letters 367(2):210-172, 2013) dan a conocer que la señalización del receptor del factor 1 estimulante de colonias (CSF1R) en neuronas dañadas facilita la protección y la supervivencia.

50 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, hasta el momento no se dispone de ningún tratamiento eficaz modificador de la enfermedad para detener la neurodegeneración progresiva y declive cognitivo asociado en pacientes humanos. Entre las modalidades de tratamiento disponibles para la AD se incluyen tres inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) y un antagonista de N-metil-D-aspartato (NMDA). Sus efectos son pequeños y sólo 55 sintomáticos en la naturaleza (ver, por ejemplo, Corbett et al., Nat. Rev. Drug Discov. 11:833-846, 2012). De esta manera, existe una elevada necesidad médica de un fármaco modificador de la enfermedad.

60 Es un objetivo de la presente invención proporcionar medios para el tratamiento y la prevención de la AD que permitan la curación de la misma, en el sentido de que el estado de la enfermedad del paciente enfermo no se desarrolle adicionalmente o incluso mejore. Otro objetivo es proporcionar medios para prevenir el desarrollo de la AD en personas que presentan o están en riesgo de presentar AD en desarrollo. Más específicamente, es un objetivo de la presente invención proporcionar un tratamiento eficiente de la AD, demostrado con respecto a por lo menos un biomarcador significativo, según se mida utilizando modalidades de obtención de imágenes cerebrales tales como IRM (imágenes por resonancia magnética) o técnicas basadas en la tomografía de emisión.

65 Por lo tanto, la presente invención proporciona oxihidróxido de aluminio para la utilización en el tratamiento y la prevención de la AD.

Durante el curso de la presente invención ha resultado inesperadamente que el oxihidróxido de aluminio como ingrediente activo en una preparación farmacéutica ha demostrado en ensayos clínicos que resulta eficaz en sus efectos modificadores de la enfermedad reales en pacientes de AD, conduciendo a una eficacia clínica no hallada

hasta el momento en ninguno de los ensayos clínicos de medicación para la AD hasta el momento. Por lo tanto, la presente invención proporciona una tecnología revolucionaria para esta enfermedad. Por primera vez, ha podido detectarse en pacientes de AD un efecto significativo de modificación de la enfermedad. Además, la presente invención ha resultado ser eficaz además sin los efectos secundarios significativos informados en otros ensayos clínicos de la medicación para la AD, especialmente en el campo de la inmunoterapia de la AD.

Más específicamente, la presente invención ha conseguido un efecto de modificación de la enfermedad estadísticamente significativo en pacientes de AD con respecto a los escaneos de IRM del volumen del hipocampo (derecho). Además, por primera vez, se ha demostrado la correlación entre un biomarcador clínico y un biomarcador radiológico durante el curso de los ensayos clínicos realizados para la presente invención. En la literatura científica más reciente se ha destacado el valor de la IRM estructural como un biomarcador significativo (Risacher et al., Annu. Rev. Clin. Psychol. 9:621-648, 2013; Vermuri et al., Neurology 73:287-293 y 294-301, 2009; Weiner et al., Alzh. Demen. 9:e111-94, 2013; Frisoni et al., Nat. Rev. Neurol. 6:67-77, 2010; Fox et al., Arch. Neurol. 57:339-344, 2000).

La IRM proporciona un gran poder de discriminación transversal por grupos y una mejor correlación transversal con la cognición general y el estado funcional. La IRM refleja un estadio de enfermedad definido clínicamente incluso mejor que los diversos biomarcadores del líquido cefalorraquídeo (LCR) sometidos a ensayo (Vermuri et al., Neurology 73:287-293 y 294-301, 2009). Numerosos estudios han demostrado un volumen significativamente reducido del córtex hipocampal y del córtex entorrial (CE), así como un grosor cortical reducido en el córtex temporal medio y lateral, lóbulo parietal y lóbulos frontales, en pacientes destinados a evolucionar de deterioro cognitivo leve (DCL) a AD probable ("convertidos de DCL"), hasta dos años antes de la conversión clínica (Risacher et al., 2013).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, dicho biomarcador fue investigado durante el curso de los ensayos clínicos realizados para la presente invención en paralelo con los parámetros clínicos estándares (seguimiento de la función funcional y cognitiva de los pacientes de AD).

Con la presente invención, puede alcanzarse una mejora significativa en el desarrollo de los pacientes de AD en comparación con el desarrollo habitual de los pacientes de AD (declives cognitivo, funcional y comportamental graduales), satisfaciendo la antigua necesidad de proporcionar un tratamiento modificador de la enfermedad para la AD.

La presente invención comprende la administración eficaz de oxihidróxido de aluminio (en particular en forma de hidrogel de Al) en pacientes de AD.

Las sales de aluminio han tenido una larga tradición de uso como adyuvantes en vacunas; sin embargo, con el tiempo, el uso farmacéutico de dichas sales se ha reducido a principalmente dos preparaciones en suspensión: Alhydrogel (oxihidróxido de aluminio) y AdjuPhos (hidroxifosfato de aluminio), sobre las que adsorben antígenos para las preparaciones de vacuna (revisión en E.B. Lindblad, Vaccine 22:3658-3668, 2004; E.B. Lindblad, Immunology and Cell Biology 82:497-505, 2004; R.K. Gupta, Adv. Drug Delivery Rev. 32:155-172, 1998).

A pesar de su larga tradición de uso, no se entiende bien el modo de acción del Alhydrogel como adyuvante. La hipótesis inicial de que Alhydrogel forma un depósito en el sitio de inyección ha resultado ser sólo una parte de una historia con múltiples caras (revisión en C. Exley, P. Siesjö, H. Eriksson, Trends Immunol. 31:103-109, 2010; S.L. Hem, H. HogenEsch, Expert Rev. Vaccines 6:685-698, 2007; P. Marrack, A.S. McKee, M.W. Munks, Nature Rev. Immunol. 9:287-293, 2009; S.G. Reed, M.T. Orr, C.B. Fox, Nat. Med. 19:1597-1608, 2013).

Las presentaciones principales de los adyuvantes de aluminio utilizados en el ser humano son el hidróxido de aluminio (u oxihidróxido de aluminio) y el fosfato de aluminio. Ambas presentaciones habitualmente se preparan mediante la exposición de una sal soluble de aluminio (históricamente se ha utilizado con frecuencia el alumbre de potasio, es decir  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ) a condiciones básicas, formándose con la exposición una suspensión. La caracterización mediante cristalográfia de rayos X y espectroscopía de IR ha revelado una estructura de tipo boehmita (oxihidróxido de aluminio) del hidróxido de aluminio y una estructura amorfa correspondiente al hidroxifosfato de aluminio del fosfato de aluminio.

Las preparaciones de oxihidróxido de aluminio presentan un punto de carga cero a un pH de ~11, mientras que el hidroxifosfato de aluminio podría presentar un punto de carga cero tan bajo como pH 4 (según el contenido de fosfato). Por lo tanto, el oxihidróxido de aluminio y el hidroxifosfato de aluminio presentan una carga superficial contraria a pH neutro, siendo la última de carga negativa. Sin embargo, debe indicarse que la carga superficial puede cambiar según la composición exacta del tampón; especialmente los iones de fosfato presentan la capacidad de rebajar la carga superficial del oxihidróxido de aluminio.

Para el oxihidróxido de aluminio la preparación no presenta aniones, tales como sulfatos, nitratos o cloruros y presentan un contenido especificado de metales pesados inferior a 20 ppm. La suspensión de oxihidróxido de aluminio presenta una distribución de tamaños de partícula de entre 2 µm y aproximadamente 10 µm, los cuales

son agregados, compuestos de fibras más pequeñas de preferentemente ~ 2 nm x 4,5 nm x 10 nm.

Según dicha forma de realización más preferente, la presente invención se refiere a la utilización de oxihidróxido de aluminio del grado de la Farmacopea Europea (monografía nº 1664), más específicamente al producto preparado por Brenntag Biosector (Alhydrogel al 2%) sometido a ensayo para asegurar la conformidad con EP. Alhydrogel se encuentra disponible en tres variedades: Alhydrogel al 1,3%, Alhydrogel al 2% y Alhydrogel "85". Se seleccionó Alhydrogel al 2% como preparación estándar internacional para los geles de hidróxido de aluminio. La preparación farmacéutica según la presente invención se formuló asepticamente en un tampón adecuado, preferentemente un tampón isotónico de fosfato (1 mM a 100 mM), preferentemente a una concentración  $\geq$  1,0 mg/ml de Alhydrogel (expresada como equivalentes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; esta métrica (Al como "equivalentes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ") se utiliza de manera general en la presente invención; de acuerdo con ello, todas las dosis y cantidades de oxihidróxido de aluminio a las que se hace referencia en la presente solicitud se refieren a equivalentes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (de oxihidróxido de aluminio (Alhydrogel)), todavía más preferentemente a una concentración  $\geq$  1,5 mg/ml de Alhydrogel (expresada como equivalentes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), todavía más preferentemente a una concentración  $\geq$  2,0 mg/ml de Alhydrogel (expresada como equivalentes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). La cantidad de sal de aluminio para el Alhydrogel se expresa en equivalentes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  en concordancia con la concentración declarada por el fabricante (es decir, Alhydrogel al 2% equivale a  $\text{Al}_2\text{O}_3$  al 2%, es decir, 20 mg/ml). Esta concentración es directamente convertible en la concentración respectiva de aluminio mediante la utilización de las masas moleculares respectivas (20 mg/ml de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (PM: 101,96) corresponde a 10,6 mg/ml de aluminio (masa molecular de 26,98)). Según la sal utilizada, dicho valor puede convertirse fácilmente en la cantidad/concentración necesaria de una sal de aluminio diferente (resulta evidente que estos valores se basan únicamente en la cantidad de aluminio (Al) y no se consideran otros aspectos, tales como la contribución de la naturaleza particulada del Alhydrogel).

El Alhydrogel al 2%, con frecuencia también denominado alumbré, es una suspensión de gel húmedo de oxihidróxido de aluminio.

En la forma de realización más preferente de la presente invención, el oxihidróxido de aluminio destinado a administrarse en el paciente de AD es una suspensión de oxihidróxido de aluminio, preferentemente oxihidróxido de aluminio del grado de la Farmacopea Europea (monografía nº 1664), especialmente Alhydrogel. El oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad eficaz para conseguir un efecto de mejora de la AD, tal como se define en las directrices EMEA sobre productos médicos destinados al tratamiento de la AD y otras demencias (documento nº de ref. CPMP/EWP/553/95 rev. nº 1, de 24 de julio de 2008). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, cualquier procedimiento de administración o régimen de administración para la formulación de oxihidróxido de aluminio según la presente invención que resulte adecuada para conseguir el efecto modificador de la AD tal como se proporciona en la presente invención es objeto de la presente invención. Aunque resulta posible administrar la preparación según la presente invención mediante infusión lenta, la estrategia preferente de administración es la administración de dosis, por ejemplo mediante inyección subcutánea. Por lo tanto, preferentemente la dosis de administración de oxihidróxido de aluminio es de por lo menos 0,5 mg, preferentemente de por lo menos 1,0 mg, especialmente de por lo menos 1,2 mg, en un paciente de AD. Un intervalo preferente de cantidades que debe administrarse en el paciente es una cantidad de oxihidróxido de aluminio comprendida entre 1,2 mg y 5,0 mg. El efecto de mejora de la AD de la administración de oxihidróxido de aluminio es todavía más pronunciado a una cantidad de por lo menos 1,5 mg. Según otra forma de realización preferente, el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad comprendida entre 1,5 mg y 5,0 mg, preferentemente comprendida entre 1,5 y 3,0 mg, especialmente entre 1,5 mg y 2,5 mg, en el paciente de AD. Otra forma de realización preferente comprende la administración de oxihidróxido de aluminio en una cantidad comprendida entre 1,6 mg y 2,5 mg, preferentemente comprendida entre 1,8 y 2,2 mg, especialmente entre 1,9 y 2,0 mg, en el paciente de AD.

Según otra forma de realización preferente, el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de 2,2 mg o superior. Esta cantidad es todavía superior a la prescrita en los estándares generales US de productos biológicos (U.S.C. 21 CFR 610.15 (de 1 de abril de 2013)). Dichos intervalos más elevados de oxihidróxido de aluminio son, entre otros, 2,2 a 10 mg, 2,2 a 8 mg, 2,2 a 5 mg y 2,2 a 4 mg para una dosis de administración.

Preferentemente, el oxihidróxido de aluminio es la única sustancia eficaz para la aplicación en la dosis de administración. Sin embargo, la preparación de oxihidróxido de aluminio según la presente invención puede contener diversas sustancias auxiliares que no presentan ningún efecto clínico específico pero que resultan útiles en la forma de administración que debe administrarse, sea para fines de administración, fines de almacenamiento u otros fines. Según una forma de realización preferente, la preparación de oxihidróxido de aluminio destinada a la aplicación según la presente invención contiene un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua para inyección. Preferentemente, la preparación de oxihidróxido de aluminio según la presente invención contiene además uno o más estabilizadores, especialmente timerosal, detergentes, antioxidantes, agentes complejantes para iones metálicos mono- o di-valentes, especialmente ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA), azúcares, alcoholes de azúcares, glicerol y/o sustancias tamponadoras, especialmente sustancias tamponadoras TRIS o fosfato. Evidentemente lo anterior también incluye mezclas de dichas sustancias auxiliares.

La forma de administración que debe administrarse en los pacientes puede proporcionarse en cualquier volumen

conveniente, preferentemente en forma de suspensión inyectable, por ejemplo con un volumen de entre 0,1 y 10 ml, más preferentemente de entre 0,2 y 5 ml, especialmente de entre 0,4 y 3 ml. Los volúmenes específicamente preferentes son 0,5, 1, 1,5 y 2 ml. Las preparaciones farmacéuticas según la presente invención se producen de acuerdo con las Buenas prácticas de fabricación (BPF) farmacéutica, según requiere y define la Farmacopea Europea y/o estadounidense.

Según una forma de realización preferente, el oxihidróxido de aluminio se administra en el paciente en una suspensión de pH comprendido entre 4 y 10, preferentemente entre 5 y 9, más preferentemente entre 6 y 8, especialmente entre 7,0 y 7,5. Preferentemente, la suspensión es una suspensión isotónica.

Preferentemente, el oxihidróxido de aluminio se administra mediante una vía tan conveniente como resulte posible para el paciente de AD pero que todavía resulta eficaz para conseguir un efecto de modificación de la AD. Las vías de tratamiento más eficaces para el oxihidróxido de aluminio según la presente invención son la administración subcutánea, intranodal, intradérmica o intramuscular, especialmente la administración subcutánea. La administración subcutánea se lleva a cabo en forma de un bolo en la hipodermis, la capa de la piel situada directamente bajo la dermis y la epidermis, especialmente en el tejido adiposo de la hipodermis.

Los regímenes de administración pueden optimizarse individualmente para cada paciente de AD, dependiendo del éxito del tratamiento, según se mida mediante diversos parámetros, especialmente por los rendimientos cognitivo y funcional y mediante biomarcadores, especialmente escaneos de PET referidos al volumen del hipocampo (ver posteriormente). Durante el curso de los ensayos clínicos llevados a cabo para la presente invención, la administración como mínimo mensual de oxihidróxido de aluminio en el paciente de AD ha demostrado tener éxito en la mejora de la enfermedad. Con el fin de conseguir un efecto terapéutico duradero, dichas administraciones como mínimo mensuales deberían prolongarse durante por lo menos tres meses, especialmente durante por lo menos seis meses.

La administración del oxihidróxido de aluminio según la presente invención también puede llevarse a cabo por lo menos dos veces al mes (por ejemplo quincenal o semanalmente); también en dicho régimen de administración, debería administrarse el oxihidróxido de aluminio en el paciente de AD durante un periodo mínimo de tres meses, preferentemente de por lo menos seis meses, más preferentemente de por lo menos doce meses, especialmente de por lo menos 24 meses.

Según una forma de realización preferente, el oxihidróxido de aluminio se administra en el paciente de AD por vía subcutánea en la (zona externa del) parte superior del brazo, preferentemente alternando el izquierdo y el derecho (es decir, administrando la primera dosis en la parte superior del brazo derecho (o izquierdo) y la segunda dosis en el brazo izquierdo (derecho) y de esta manera sucesivamente). Otras zonas convenientes (o alternativas) para la administración subcutánea son inmediatamente sobre y bajo la línea de la cintura (excepto la zona inmediatamente circundante al ombligo (un círculo de 2 pulgadas de radio)), la zona superior del glúteo, preferentemente inmediatamente detrás del hueso pélvano, la parte delante del muslo, lado entre medio y exterior del mismo, 4 pulgadas más abajo del límite superior del muslo a 4 pulgadas más arriba de la rodilla, etc.

Alternativamente, la dosis que debe administrarse también puede dividirse en dos (o más) dosis divididas que se administran simultáneamente (en la misma visita del médico; como mínimo el mismo día) en el paciente de AD. Por ejemplo, una dosis de 2 mg puede dividirse en dosis divididas de 1,8 y 0,2 mg, 1,7 y 0,3 mg, 1,5 y 0,5 mg, 1,34 y 0,76 mg, 1,0 y 1,0 mg, 1,05 y 0,95 mg, 1,0, 0,5 y 0,5 mg, 0,6, 0,6 y 0,7 mg, 0,2, 0,5 y 1,3 mg, 0,5, 0,5, 0,5 y 0,5 mg, 0,2, 0,3, 0,5 y 1,0 mg, etc. Las dosis divididas pueden administrarse en diferentes sitios de administración o, preferentemente, en el mismo sitio de administración. El "mismo sitio de administración" se encuentran dentro de una superficie de 10 cm<sup>2</sup> de piel, preferentemente dentro de una superficie de 5 cm<sup>2</sup> de piel, especialmente dentro de 1 cm<sup>2</sup> de piel. Las dosis divididas preferentes contienen oxihidróxido de aluminio en una cantidad comprendida entre 0,8 y 5,0 mg, preferentemente entre 1,0 y 3,0, especialmente entre 1,0 y 1,5 mg.

Con el fin de conseguir un efecto muy duradero de la mejora de la AD, el tratamiento según la presente invención se lleva a cabo durante más de un año. Según una forma de realización preferente de la presente invención, el oxihidróxido de aluminio se administra como mínimo mensualmente durante por lo menos dos años, preferentemente por lo menos cuatro años, especialmente por lo menos 8 años, en el paciente de AD.

La administración del oxihidróxido de aluminio según la presente invención puede llevarse a cabo con cualquier dispositivo de administración adecuado. Por motivos de conveniencia, la dosis de oxihidróxido de aluminio se administra con un dispositivo de inyección, especialmente una jeringa, en el paciente de AD. Las preparaciones farmacéuticas para la utilización en la presente invención pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada. Preferentemente se proporcionan en una forma de almacenamiento estable. La estabilidad de almacenamiento puede garantizarse por diversos medios, tales como la esterilización, la adición de estabilizadores, la congelación, la liofilización, etc. Preferentemente, se utilizan combinaciones de dichos medios para incrementar las estabilidades de almacenamiento de dichas preparaciones. En el caso de que las composiciones que contienen oxihidróxido de aluminio se congelen o se liofiliçen, puede observarse una agregación de las partículas de adyuvante durante el procesamiento. Mediante el enfriamiento de dichas formulaciones de oxihidróxido de aluminio

- (Alhydrogel) a tasas más rápidas o mediante la adición de cantidades suficientes de un excipiente formador de cristales, tales como trehalosa, puede evitarse o minimizarse la agregación del Alhydrogel. Se ha propuesto que la concentración mediante congelación de las sales tamponadoras induce modificaciones en la química superficial y la cristalinidad de dichos agentes de aluminio, favoreciendo a su vez la agregación. Estas modificaciones y la agregación resultante de dichas partículas de Alhydrogel pueden excluirse o minimizarse mediante la elección de los iones del tampón, o inhibirse cinéticamente mediante la formación rápida de un estado cristalino durante la congelación (ver, por ejemplo, Clausi et al., J. Pharm. Sci. 97(6):2049-61, junio de 2008).
- 5 Las composiciones farmacéuticas para la aplicación en los pacientes de AD según la presente invención se preparan (y se acaban) en envases adecuados y se comercializan en, por ejemplo, viales sellados, ampollas, cartuchos, bolsas flexibles (con frecuencia construidas con plástico multicapa), botellas de vidrio o polipropileno o, preferentemente, en jeringas, especialmente en jeringas precargadas (listas para utilizar o listas para reconstituir).
- 10 Según una forma de realización preferente de la presente invención, el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad mínima de 1,8 mg en el paciente de AD.
- 15 Los pacientes preferentes en que se administran preparaciones de oxihidróxido de aluminio según la presente invención son los pacientes de AD que son pacientes de estadio temprano, incluyendo aquellos pacientes que con frecuencia también se denominan "pacientes con deterioro cognitivo leve" (DCL). El concepto de DCL se desarrolló 20 en los años noventa del siglo pasado para referirse a pacientes con indicios clínicos tempranos de enfermedad de Alzheimer (AD) que todavía no satisfacían los criterios de demencia. La variante amnésica de DCL presenta las características siguientes: problemas de memoria, preferentemente advertidos por un informante; deterioro de la memoria para la edad, según un indicador de bajo rendimiento cognitivo en uno o más ensayos neuropsicológicos 25 que analizan las capacidades de aprendizaje (por ejemplo la memoria de prosa, lista de palabras, etc.), una función cognitiva general conservada (por ejemplo una puntuación del miniexamen de estado mental de 24 de 30 o superior); actividades intactas de la vida cotidiana y ausencia de demencia. Aproximadamente dos tercios del total de pacientes con DCL amnésica incluye las características patológicas de la AD y desarrolla el síndrome clínico 30 de la demencia de Alzheimer en un plazo de 5 años, mientras que el tercio restante muestra causas no progresivas o muy lentamente progresivas de deterioro cognitivo (por ejemplo, depresión o deterioro cognitivo asociado a la edad). Los nuevos criterios diagnósticos propuestos para la AD desarrollados en 2007 (Dubois et al., Lancet Neurol. 6:734-746, 2007) proponen que la enfermedad puede identificarse en el estadio de DCL en el caso de que el paciente sea positivo para como mínimo uno de los cuatro marcadores siguientes: atrofia temporal medial en el MRI, hipometabolismo del córtex temporoparietal en PET con <sup>18</sup>F-fluorodesoxiglucosa, anormalidad de marcadores 35 del líquido cefalorraquídeo (Tau, amiloide-β42 o fosfo-Tau) y positividad de amiloide en las imágenes de PET. Esta población de pacientes no sólo se incluye entre los pacientes de AD que deben tratarse según la presente invención, es un grupo específicamente preferente de pacientes para los que resulta específicamente eficaz el método de tratamiento según la presente invención. Lo anterior concuerda con los criterios revisados para los ensayos clínicos de AD adoptados por la FDA estadounidense (Aisen et al., 2013; Kozauer et al., 2013). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, resulta preferente tratar los pacientes en un estadio temprano de AD, tal 40 como se define por una puntuación de MMSE (acrónimo en inglés de miniexamen de estado mental, o prueba de Folstein). Preferentemente, el paciente de AD que debe tratarse según la presente invención es un paciente con una puntuación de MMSE de entre 23 y 30 (siendo 30 el máximo), preferentemente de entre 24 y 30, más preferentemente de entre 25 y 29, especialmente de entre 26 y 29. Otros grupos de pacientes preferentes son los pacientes con 27 puntos o más (que indican una cognición normal), 25 a 27 (cognición ligeramente inferior a la normal) o 19 a 24 (puntos de deterioro cognitivo leve).
- 45 Los pacientes de AD de estadio temprano también pueden seleccionarse mediante otras puntuaciones, preferentemente puntuaciones que combinan parámetros cognitivos y funcionales (y límites numéricos) para limitar la población de AD a los tratados eficazmente, tales como ADAS-cog, etc.
- 50 La presente invención proporciona por primera vez un tratamiento de la AD que es modificador de la enfermedad. La eficacia del tratamiento según la presente invención se demuestra mediante los parámetros requeridos por las autoridades de autorización de medicamentos, especialmente la EMEA y la FDA estadounidense. Por ejemplo, las 55 directrices de la EMEA para el tratamiento de la AD requieren criterios de valoración primaria que reflejen el dominio cognitivo y el dominio funcional. De acuerdo con ello, se utiliza una puntuación combinada (compuesta) para la evaluación clínica de la presente invención. Esta puntuación compuesta combina dos puntuaciones establecidas, una para la función cognitiva (ADAS-cog (subescala cognitiva de la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer)) y una para la capacidad funcional (ADCS-ADL (estudio colaborativo de la enfermedad de Alzheimer - inventario de actividades de la vida cotidiana)). El ADAS-cog adaptado combina ítems que evalúan la función 60 cognitiva. El ADCS-ADL adaptado incluye ítems que son sensibles a la capacidad funcional. La predicción es que las habilidades cognitivas declinan hacia el inicio de la enfermedad, mientras que se considera que la capacidad de realizar funciones básicas declina más tarde en la enfermedad. El resultado primario combinado (puntuación compuesta según la presente invención) combina tanto ADAS-cog adaptado como ADCS-ADL adaptado para crear una variable compuesta que es sensible al declive de las funciones cognitivas y básicas. Se utiliza la ecuación 65 proporcionada a continuación para obtener el resultado primario combinado, es decir, la variable compuesta combinada:

Variable compuesta combinada según la presente invención:

$$= 1,67^*\text{Memoria de palabras} + 1,35^*\text{Orientación} + 1,42^*\text{Reconocimiento de palabras} + 0,55^*\text{Instrucciones de recuerdo} + 0,81^*\text{Lenguaje hablado} + 1,01^*\text{Dificultades para encontrar palabras} + 5,42^*\text{ONB} + 0,15^*\text{VPAL} + 0,19^*\text{Fluidez de categorías} + 0,28^*\text{Pertenencias} + 0,35^*\text{Compras} + 0,23^*\text{Aficiones} + 0,38^*\text{Bebidas} + 0,37^*\text{Comidas} + 0,23^*\text{Sucesos actuales} + 0,26^*\text{TV} + 0,33^*\text{Cumplimiento de citas} + 0,37^*\text{Viajes} + 0,33^*\text{Soledad} + 0,35^*\text{Dispositivos} + 0,49^*\text{Ropa} + 0,36^*\text{Lectura} + 0,62^*\text{Teléfono} + 0,33^*\text{Escritura}$$

10 Además, se observaron biomarcadores de AD con la presente invención que son característicos del desarrollo de AD. Los criterios de la EMEA y la FDA recomienda técnicas más nuevas, tales como MRI, especialmente la atrofia del córtex entorinal o (para-) hipocampal. En la presente invención se aplicó el MRI estructural. Más específicamente, se utilizó el volumen del hipocampo derecho (importante para el aprendizaje y la memoria de material que resulta difícil verbalizar) según la presente invención como biomarcador significativo de la AD para el éxito del tratamiento.

15 Según la presente invención, puede observarse un efecto clínico en el tratamiento de la AD que puede medirse como una reducción del declive cognitivo y/o funcional (durante un periodo de tratamiento de aproximadamente un año) de por lo menos 30% (calculado como caída de la puntuación), preferentemente de por lo menos 50%, especialmente de por lo menos 70%, respecto al desarrollo normal del declive de los pacientes de AD. Preferentemente, los parámetros cognitivos y funcionales se mantienen esencialmente sin cambios durante el tratamiento. Ello puede ser conseguido por la presente invención especialmente en pacientes en el estadio más temprano (tal como sugieren y recomiendan las directrices de la EMEA y la FDA), por ejemplo pacientes de AD con MMSE de 23 o superior, preferentemente de 24 o superior, más preferentemente de 25 o superior, especialmente de 26 o superior. Para dichos pacientes, el cambio de la puntuación compuesta durante el tratamiento según la presente invención todavía se encontraba en torno a la puntuación inicial tras 18 meses. Lo anterior resulta significativamente superior a los requisitos mínimos de "efectos modificadores de la enfermedad" según requiere la EMEA ("desde un punto de vista normativo, un producto medicinal puede considerarse modificador de enfermedad en el caso de que la progresión de la enfermedad medida mediante herramientas de evaluación cognitiva y funcional resulte reducida o enlentecida y en el caso de que estos resultados se asocien a un efecto sobre el proceso patológico subyacente"; "se considerará efecto modificador de enfermedad en el caso de que el tratamiento farmacológico retrase los procesos de enfermedad patológicos o fisiopatológicos subyacentes y en el caso de que ello se vea acompañado de una mejora de los signos y síntomas clínicos de la condición de demencia").

35 La invención se explica adicionalmente a título de los ejemplos y figuras siguientes, aunque sin limitarse a los mismos.

40 La figura 1 muestra los resultados del ensayo clínico según la presente invención con respecto al cambio de la puntuación compuesta de cambio de ADL adaptado (parcialmente) y cambio de ADAS-cog adaptado para todos los pacientes que habían recibido los tratamientos de 2 mg y 1 mg de oxihidróxido de aluminio.

45 La figura 2 muestra una comparación entre la población de pacientes leves (la población leve se define por una puntuación MMSE de línea base de 24 o superior) de ambos grupos, que demuestra que dicho efecto es más pronunciado en la cohorte de pacientes con enfermedad en estadios más tempranos.

50 La figura 3 muestra un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad en los grupos de 2 mg y 1 mg de aluminio que se puso de manifiesto por ADAS-cog adaptado (sólo ítems de ADAS-cog, medias de mínimos cuadrados) para el grupo de 1 mg y 2 mg de oxihidróxido de aluminio en comparación con el control histórico (valores de p: 1 mg vs. HC-ADNI, NS, HC: <0,0001; 2 mg vs. HC-ADNI, NS, HC: <0,0001).

55 La figura 4 muestra el desarrollo del volumen (en mm<sup>3</sup>) del hipocampo derecho para el grupo de tratamiento de 2 mg y 1 mg de oxihidróxido de aluminio de la población de pacientes leves (la población leve se define por una puntuación MMSE de línea base de 24 o superior), que demuestra que dicho efecto es más pronunciado en la cohorte de pacientes en estadios más tempranos de la enfermedad.

60 La figura 5 muestra la calidad de vida-enfermedad de Alzheimer (QOL-AD) según los cuidadores. Los cuidadores completaron un cuestionario sobre la calidad de vida de sus pacientes. La medida consistía en 13 ítems, evaluados en una escala de 4 puntos, en la que 1 era mala y 4 era excelente. Se muestran los resultados como cambio en el tiempo utilizando las medias de mínimos cuadrados de un modelo mixto.

65 La figura 6 muestra la respuesta inmunológica de los ratones sometidos a ensayo en el modelo animal Tg2576: en ratones Tg2576 se inyectaron 6x, por vía s.c., a intervalos de 4 semanas, conjugado de vacuna que contenía 30 µg de péptido solo, KLH formulado con alumbre o sólo alumbre. Las dosis de alumbre utilizadas eran equivalentes a 2 mg/ml. Se midieron los anticuerpos inducidos por la vacunación en muestras de plasma extraídas en el momento del sacrificio (SeCID 1 (n=10), SeCID 2 (n=8), KLH-Alum (n=10) y sólo alumbre (n=8)).

Las muestras se analizaron para su concentración de anticuerpos IgG contra péptidos específicos. Los valores ilustrados son el título calculado como  $D_{max}/2$  (a 405 nm) más SEM. La respuesta de IgG hacia el péptido inmunizante correspondiente (SeclD 1: anti-SeclD 1; SeclD 2: anti-SeclD 2, KLH-alumbre: anti-KLH, alumbre: anti-AD02); B) reactividad con A $\beta$ 1-40/42 humana tras la inmunización. Los animales tratados con SeclD 1 (n=10) y SeclD 2 (n=8) mostraban reactividad anti-A $\beta$ 40/42; los animales tratados con KLH-alumbre y sólo alumbre no mostraron reactividad sobre el fondo. Se fijó el fondo para este ensayo en 1/100, indicado por líneas negras y un asterisco en A+B.

La figura 7 muestra la memoria y el aprendizaje de los ratones sometidos a ensayo: grupos de ratones Tg2576 (n≤10/grupo) recibieron 6 inyecciones al mes de KLH/ALUMBRE (n=9) o vacunas conjugadas con SeclD 1-KLH-Alumbre (n=10) o SeclD 2-KLH-Alumbre (n=7) o sólo alumbre (n=8). Se utilizaron animales de tipo salvaje previamente no expuestos (n=20) como controles positivos para el acondicionamiento de miedo contextual (CFC - Contextual Fear Conditioning). Se evaluó el aprendizaje y memoria contextuales mediante análisis de CFC utilizando el % de tiempo de bloqueo al final del ensayo de CFC. Los parámetros ilustrados son el % de tiempo en que los animales se encontraban 99% inmóviles durante un periodo representativo de 2 minutos el día 2 del paradigma de ensayo CFC. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

La figura 8 muestra la carga de amiloide en los animales sometidos a ensayo: grupos de ratones Tg2576 (n≤10/grupo) recibieron 6 inyecciones al mes de KLH/ALUMBRE (n=9) o vacunas conjugadas con SeclD 1 (n=10) o con SeclD 2 (n=7) o sólo alumbre (n=8). La dosis de alumbre en todas las formulaciones era equivalente a 2 mg/ml. Se aislaron los cerebros, 8 semanas después de la sexta inmunización. La cuantificación de la superficie cerebral total relativa cubierta por depósitos de amiloide (en % de tejido total analizado) se basa en la tinción de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal 3A5 específico de A $\beta$ . Se muestran subregiones representativas del córtex (A, B) y giro dentado (C, D) de ratones inmunizados con los controles (A, C) y SeclD 1 (B, D). E) SeclD 1-KLH alumbre + SeclD 2-KLH alumbre redujo la superficie relativa cubierta por depósitos de amiloide respecto a los controles de KLH-Alumbre significativamente (amiloide difuso y núcleo amiloide denso, \*p<0,05; \*\*p<0,01). Era detectable una reducción ligera aunque no significativa del depósito de A $\beta$  en los animales tratados con sólo alumbre vs. animales tratados con KLH-Alumbre. (ns) La cabeza de flecha en C señala la fluorescencia no específica de un vaso cerebral. Barra de escala: 200  $\mu$ m; las fotografías se obtuvieron a una magnificación de 10x.

### Ejemplos

#### 1. Extracto de un ensayo clínico de AD (AFF006; Eudract: 2009-016504-22)

##### Materiales y métodos:

Los datos que apoyan la invención se derivan de un ensayo clínico aleatorizado de pacientes de AD temprana. El estudio (AFF006; Eudract: 2009-016504-22) asignó aleatoriamente a pacientes de AD temprana a 5 brazos de tratamiento. Los pacientes de 2 brazos de estudio recibieron 1 mg de aluminio o 2 mg de aluminio. En total, se incluyeron 99 pacientes de AD temprana en los 2 brazos del estudio. La participación de cualquier paciente dado se prolongó durante 18 meses.

##### Diseño del estudio:

Se llevó a cabo el estudio AFF006 como un estudio de fase II multicentro de doble ciego aleatorizado, en grupos paralelos y controlado por placebo y se evaluó la actividad clínica e inmunológica, así como la seguridad y tolerabilidad de las administraciones s.c. repetidas de, entre otros, aluminio (diferentes dosis) en pacientes con AD temprana, tal como se define en el protocolo. Se llevó a cabo en un total de 6 países: Austria, Francia, Alemania, Eslovaquia, República Checa y Croacia.

El ensayo clínico comprendía 10 visitas regulares de pacientes ambulatorios y 6 entrevistas telefónicas. Hasta cuatro semanas antes del inicio del tratamiento se llevó a cabo una visita de cribado (visita 1) para garantizar la idoneidad de los pacientes para el ensayo clínico y para establecer las características de línea base de los pacientes. Tras el cribado, los pacientes elegibles fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento. Tras la aleatorización en la semana 0, los pacientes recibieron 6 inyecciones de 1 o 2 mg de aluminio. Las inyecciones fueron realizadas s.c. por el investigador las semanas 0, 4, 8, 12, 40 y 65 (visitas 2, 3, 4, 5, 7 y 9).

En las visitas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9, se evaluaron posibles reacciones locales y sistémicas a la vacuna y las constantes vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura corporal). Además, se llevó a cabo un examen físico y neurológico. Se evaluaron parámetros de eficacia en las visitas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. La visita final (visita 10) se llevó a cabo doce semanas después e la última administración del fármaco del estudio (visita 9). En el caso de que un paciente suspendiera el ensayo clínico se llevaba a cabo una visita de suspensión temprana (VST).

Población de estudio:

El estudio se llevó a cabo con pacientes que presentaban AD temprana. Se definió el diagnóstico a partir de los criterios siguientes:

- 5 - enfermedad de Alzheimer probable según los criterios NINCDS/ADRDA (1)
- puntuación MMSE  $\geq 20$  (2)
- 10 - resultado de la prueba de recuerdo selectivo libre y guiado (FCSRT, Free and Cued Selective Reminding Test), resultado de recuerdo total  $\leq 40$  o recuerdo libre  $\leq 17$ , que indicaban daños en el hipocampo que reducían la memoria episódica del paciente (3)
- 15 - el resultado de un MRI leído centralmente de un cerebro de un paciente debe ser compatible con el diagnóstico de AD, en particular, la presencia de una atrofia del lóbulo temporal medial (puntuación de Scheltens  $\geq 2$ ) (4)

Otros criterios de inclusión/exclusión aplicados (por ejemplo, consentimiento informado por escrito, edad entre 50 y 80 años, tratamiento con fármacos inmunosupresores (exclusión)).

Administración del fármaco de estudio

Durante las visitas de estudio 2, 3, 4, 5, 7 y 9, los pacientes recibieron fármaco de estudio del investigador; en total: seis inyecciones durante un periodo de tratamiento de 65 semanas. Las inyecciones se realizaron en la superficie externa de la parte superior del brazo, aproximadamente 8 a 10 cm en la parte superior del codo. Era un requisito previo respecto al sitio final la presencia de una estación ganglionar linfática regional intacta. En el caso de que las estaciones ganglionares linfáticas drenantes de la parte superior de ambos brazos no se encontraban intactas, la inyección se lleva a cabo en el muslo en un sitio próximo a los ganglios linfáticos inguinales. Se utilizaron dos sitios de inyección alternantes (por ejemplo la parte superior de los brazos izquierdo y derecho, parte superior del brazo izquierdo y muslo izquierdo) durante las 6 inyecciones.

Las inyecciones se llevaron a cabo en el tejido subcutáneo (s.c.). Se tuvo especial cuidado en evitar la aplicación intravasal mediante la aspiración cuidadosa antes de cada inyección. Todas las administraciones se llevaron a cabo en el sitio de la prueba.

Morfometría basada en el volumen

El hipocampo (izquierdo y derecho) y las regiones de interés (RDI) del ventrículo lateral completo se delinearon en un molde de MRI anatómico con el fin de generar el atlas para las medidas volumétricas. Los volúmenes del hipocampo y de los ventrículos laterales de cada sujeto se determinaron utilizando un método totalmente automatizado que combina transformaciones derivadas del registro no lineal de las etiquetas en el atlas y escaneos individuales del sujeto e información de imágenes específica del sujeto (Collins et al., J. Comput. Assist. Tomogr. 18:192-205, 1994). Las segmentaciones del ventrículo lateral y del hipocampo que no pasaban la revisión de control de calidad (CC) posterior al procesamiento se corrigieron manualmente. Se estimó el volumen intracranial total (VIT) a partir de la máscara cerebral generada durante el preprocesamiento y se determinó el VIT medio ( $VIT_m$ ) para cada sujeto promediando el VIT estimado en todas las visitas. Se utilizó el factor de normalización ( $VIT_{molde}/VIT_m\_sujeto$ ) para normalizar los volúmenes hipocampal y ventricular de cada sujeto a fin de controlar las diferencias de tamaño de cabeza.

Evaluaciones de seguridad:

Entre las evaluaciones de seguridad se incluyeron las siguientes:

- 55 - sucesos adversos (SA) y sucesos adversos graves (SAG) (número de pacientes que abandonaron debido a SA; motivo para el abandono).
- Evaluaciones de laboratorio: hematología, bioquímica, coagulación, serología, urinanálisis y reactividad cruzada de APP.
- 60 - Constantes vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura corporal).
- Examen físico y neurológico.

Evaluaciones de eficacia:

65 Las variables primarias de eficacia eran el cambio respecto a la línea base (CLB) de la cognición según medición

realizada mediante un ADAS-cog; CLB de función según medición realizada mediante un ADCS-ADL adaptado, y una combinación de CLB de cognición y de función según mediciones realizadas mediante una variable compuesta combinada:

- 5      1. Coprimaria: ADAS-cog adaptado,
- 2. Coprimaria: ADCS-ADL adaptado,
- 3. Resultado primario combinado: compuesto.

10     Se midió ADAS-cog y otros ítems incluidos en el ADAS-cog adaptado en las visitas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o visitas a urgencias (VAU). Se midió ADCS-ADL en las visitas 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o VAU. Se midieron los ítems que contribuían al resultado primario combinado en las visitas 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o VAU.

15     Todos los resultados de eficacia primaria se encontraban comprendidos entre 0 y 100. Para cada escala adaptada y variable compuesta, una puntuación más baja indica un mejor rendimiento. Sin embargo, algunos ítems incluidos en la escala pueden presentar la dirección contraria, es decir, una puntuación más alta indicar un mejor rendimiento. Antes de calcular el valor de una variable compuesta, se invirtieron los ítems contribuyentes que puntuaban en la dirección contraria. Se invertía la puntuación de un ítem restando el valor observado del máximo valor posible para el ítem. De esta manera se invertía la escala de los ítems de manera que una puntuación más baja ahora indicaba un mejor rendimiento. Los ítems siguientes incluidos en ADAS-cog adaptado y la variable compuesta combinada requerían una puntuación invertida: PAL verbal, fluidez de categorías NTB y CogState ONB.

#### Resultados de eficacia secundarios:

25     Calidad de vida (QOL) - cuidador

30     El cuestionario de QOL - cuidador es un cuestionario breve, de 13 ítems, diseñado para obtener específicamente una valoración de la QOL del paciente desde la perspectiva del cuidador. Las preguntas cubren las relaciones con amigos y familia, las preocupaciones económicas, el estado físico, el humor y una evaluación global de la calidad de vida. Todos los ítems se evaluaron en una escala de cuatro puntos, siendo 1 mala y siendo 4 excelente. La puntuación total era la suma de todos los ítems, que puede encontrarse comprendida entre 13 y 52. Los valores de QOL - cuidador se presentan en la presente memoria como cambio respecto a la línea base. Los resultados se midieron en las visitas 1, 6, 8 y 10.

35     Análisis estadísticos

Datos de línea base

40     Los sujetos se describieron utilizando información demográfica y características de línea base registradas durante la etapa de cribado (visita 1).

45     Los datos demográficos evaluados fueron la edad, el género, el grupo étnico, los hábitos de tabaquismo, el nivel educativo, la altura y el peso. Se resumieron los datos demográficos de los sujetos según tratamiento para las poblaciones de Seguridad, ITT y Según protocolo.

Análisis de eficacia primaria

50     Se analizaron los resultados de eficacia primaria, secundaria y exploratoria mediante la comparación del cambio en el tiempo entre los grupos. Los análisis de eficacia utilizaron el modelo mixto que describe posteriormente. El análisis de modelo mixto comparaba el cambio estimado respecto a la línea base entre los 3 grupos de vacuna y los 2 grupos de aluminio en todas las puntuaciones de resultado de eficacia en cada visita. El modelo utilizaba modelos longitudinales separados de medidas repetidas para cada variable principal de eficacia. Este análisis evaluaba si existía una diferencia o no entre los valores de CLB estimados entre los grupos de tratamiento.

55     Se utilizó el programa SAS, PROC MIXED, para ajustar un modelo mixto con medidas repetidas (MMRM), con el CLB de cada uno de los resultados de eficacia (por ejemplo, ADAS-cog adaptado) como variable de respuesta y las covariables y efectos fijos siguientes:

- 60     • Edad (covariable),
- Nivel educativo (efecto fijo dividido entre las categorías ≤12 años y >12 años),
- Género (efecto fijo),
- Puntuación de ensayo de línea base de parámetro de eficacia (covariable),
- Centro (efecto fijo),
- Tratamiento (efecto fijo),

- Estado de APOEe4 (efecto fijo, positivo o negativo),
- Utilización de inhibidores de AChE (efecto fijo, determinado a partir de las medicaciones),
- Tiempo (covariable; el tiempo se define en términos de visitas),
- Tiempo según interacción de tratamientos (Tiempo\*Tratamiento).

5 La estructura de covarianza del modelo era autorregresiva heterogénea de primer orden (ARH[1]). Se estimaron las medias de cuadrados mínimos (LCM) en cada visita durante el estudio. Las LCM estimadas en una visita particular se interpretaron como el CLB esperado en el resultado de eficacia en ese punto del tiempo (Visita) al administrar el tratamiento especificado. Se estimaron las medias de los cuadrados mínimos y los errores estándares a partir del modelo mixto en cada visita y se muestran para los diversos grupos.

10 El ADAS-cog adaptado combina ítems que evalúan la función cognitiva. El ADCS-ADL adaptado incluye ítems que son sensibles a la capacidad funcional. Se espera que las habilidades cognitivas declinen hacia el inicio de la enfermedad y se espera que la capacidad de realizar funciones básicas decline más tarde en la enfermedad. El 15 resultado primario combinado (denominado en la presente memoria "puntuación compuesta") combina tanto el ADAS-cog adaptado como el ADCS-ADL adaptado para generar una puntuación compuesta que es sensible al declive de las funciones cognitivas y básicas. Se utiliza la ecuación siguiente para obtener el resultado primario combinado, es decir, la puntuación compuesta combinada:

20 Puntuación compuesta combinada:

$$=1,67 \cdot \text{Memoria de palabras} + 1,35 \cdot \text{Orientación} + 1,42 \cdot \text{Reconocimiento de palabras} + 0,55 \cdot \text{Instrucciones de recuerdo} + 0,81 \cdot \text{Lenguaje hablado} + 1,01 \cdot \text{Dificultades para encontrar palabras} + 5,42 \cdot \text{ONB} + 0,15 \cdot \text{VPAL} + 0,19 \cdot \text{Fluidez de categorías} + 0,28 \cdot \text{Pertenencias} + 0,35 \cdot \text{Compras} + 0,23 \cdot \text{Aficiones} + 0,38 \cdot \text{Bebidas} + 0,37 \cdot \text{Comidas} + 0,23 \cdot \text{Sucesos actuales} + 0,26 \cdot \text{TV} + 0,33 \cdot \text{Cumplimiento de citas} + 0,37 \cdot \text{Viajes} + 0,33 \cdot \text{Soledad} + 0,35 \cdot \text{Dispositivos} + 0,49 \cdot \text{Ropa} + 0,36 \cdot \text{Lectura} + 0,62 \cdot \text{Teléfono} + 0,33 \cdot \text{Escritura}$$

25 La contribución en porcentaje de cada ítem a la puntuación compuesta combinada puede encontrarse en la tabla 1, a continuación:

30

Ítem	Contribución en porcentaje
ADAS-cog Memoria de palabras	16,6
ADAS-cog Orientación	10,8
ADAS-cog Reconocimiento de palabras	17,0
ADAS-cog Instrucciones de recuerdo	2,8
ADAS-cog Lenguaje hablado	4,1
ADAS-cog Dificultades para encontrar palabras	5,1
CogState Memoria "One-Back"	8,5
NTB VPAL	8,5
NTB Fluidez de categorías	8,5
ADCS-ADL Pertenencias	0,8
ADCS-ADL Compras	1,4
ADCS-ADL Aficiones	0,7
ADCS-ADL Bebidas	1,1
ADCS-ADL Comidas	1,5
ADCS-ADL Sucesos actuales	0,7
ADCS-ADL TV	0,8
ADCS-ADL Cumplimiento de citas	1,0
ADCS-ADL Viajes	1,5
ADCS-ADL Soledad	1,0
ADCS-ADL Dispositivos	1,4
ADCS-ADL Ropa	1,5
ADCS-ADL Lectura	0,7
ADCS-ADL Teléfono	3,1
ADCS-ADL Escritura	1,0

## Resultados

35 El estudio AFF006 agrupó una población de estudio que recordaba a los pacientes de AD temprana según los datos demográficos (tabla 2) y los datos que mostraban las características de línea base de los grupos de estudio (tabla 3).

Tanto la frecuencia como la intensidad de las reacciones locales dependía de la dosis de aluminio administrada (tabla 4). Dichas reacciones locales (RL) sirven como medida de la activación de la respuesta inmunológica innata.

El grupo de 2 mg de aluminio mostraba resultados más positivos incluso que el grupo de 1 mg de aluminio (otros grupos) con respecto a parámetros que informaban de la progresión de la enfermedad (figs. 1 y 5). La comparación de la población leve de pacientes de ambos grupos demostró que dicho efecto era más pronunciado en la cohorte

5 de pacientes en los estadios más tempranos de la enfermedad (fig. 2). El entorpecimiento de la progresión de la enfermedad durante 18 meses resultaba específicamente evidente en el grupo de 2 mg de aluminio, ejemplificado por ADAS-cog adaptado (fig. 3).

10 Se compararon los resultados obtenidos con bases de datos públicas. Los datos históricos identificados eran ADNI 1 cohorte de AD leve (estudio observacional), los pacientes leves con placebo del estudio ADCS Homocisteína (HC, MMSE≥20) y el grupo de placebo del estudio ADCS NSAID de rofecoxib y naproxeno (NS, MMSE≤20). Se agruparon dichas tres cohortes, rindiendo el control de historia (HC-ADNI, NS, HC). Se disponía de datos para 344 pacientes el mes 6, 317 pacientes el mes 12 y 226 pacientes el mes 18. El estudio ADNI sólo realizó evaluaciones los meses 6, 12 y 24, de manera que el valor del mes 18 se dedujo mediante una línea recta. El estudio NS presentaba una duración de sólo 12 meses, de manera que no se disponía de datos de los 18 meses de este estudio.

15 Aunque el ADAS-cog adaptado utilizaba algunos ítems del ADAS-cog complementado con ítems del NTB y la batería CogState, estos ítems no se encontraban disponibles para todos los estudios históricos. Por lo tanto, se creó un ADAS-cog 2 adaptado que aplicó las mismas ponderaciones que ADAS-cog adaptado para los ítems de ADAS-cog, pero no incluía los ítems de NTB y CogState (1,67\*Memoria de palabras + 1,35\*Orientación + 1,42\*Reconocimiento de palabras + 0,55\*Instrucciones de recuerdo + 0,81\*Lenguaje hablado + 1,01\*Dificultades para encontrar palabras).

20 25 El ADAS-cog 2 adaptado mostraba un declive sustancialmente mayor en el grupo de control de historia que los grupos tratados con 1 o 2 mg de oxihidróxido de aluminio del estudio AFF006 (figura 3). Los valores de p eran: 1 mg vs. HC-ADNI, NS, HC: <0,0001; 2 mg vs. HC-ADNI, NS, HC: <0,0001.

30 35 Los datos de MRI también mostraban un efecto modificador de la enfermedad estadísticamente significativo para el grupo de 2 mg de pacientes y una correlación entre el volumen del hipocampo y los criterios de evaluación clínica, por ejemplo el hipocampo derecho con adapADAS: p=0,0006 o Puntuación compuesta: p=0,0095) (fig. 4). Debe indicarse específicamente que la presente investigación ha proporcionado por primera vez un desarrollo paralelo de datos clínicos con un biomarcador radiológico (MRI en el presente caso). La figura 4 muestra que los pacientes tratados según la presente invención mostraban prácticamente ninguna reducción relacionada con la AD del volumen del hipocampo durante un periodo de 18 meses, mientras que la tasa de atrofia cerebral en un año en pacientes de AD se encontraba comprendida en el intervalo de entre 3% y 6% anual (Risacher et al., 2013; tabla 2; la tasa en personas sanas de edad avanzada habitualmente es de entre 0,5% y 2,2% (ver también este dato en la tabla 2 en Risacher et al.).

40 45 40 La figura 5 muestra que los cuidadores de pacientes tratados según la presente invención evaluaron la QOL del paciente como significativamente mejorada durante un periodo de 18 meses tras el tratamiento de 2 mg en comparación con 1 mg de alumbrado y los demás grupos (no representado).

Tabla 2: población y estado de los pacientes

Estado del paciente	1 mg (N=48)	2 mg (N=51)
Número de sujetos n (%)		
Completado	41 (85,4%)	45 (88,2%)
Interrumpido	7 (14,6%)	6 (11,8%)
Valor de p1		
Motivo para la suspensión del estudio		
Muerte	2 (4,2%)	0 (0,0%)
Suceso adverso	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Abandono por el sujeto	4 (8,3%)	5 (9,8%)
Pérdida durante el seguimiento	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Otro	1 (2,1%)	1 (2,0%)

Tabla 3: datos demográficos: etnia, género, educación y edad

Datos demográficos	1 mg (N=48)	2 mg (N=51)
Grupo étnico		
Asiático/de las islas del Pacífico	0 (0,0%)	1 (2,0%)
Caucásico	48 (100,0%)	50 (98,0%)

Datos demográficos	1 mg (N=48)	2 mg (N=51)
Género		
Masculino	28 (58,3%)	19 (37,3%)
Femenino	20 (41,7%)	32 (62,7%)
Valor de p <sup>1</sup>		
Años de educación		
Media (SD)	12,3 (4,03)	11,8 (3,18)
Mediana	12	11
(Q1, Q3)	(9,0, 15,0)	(10,0, 13,0)
Mín, máx	8, 26	6, 22
Valor de p <sup>1</sup>		
Edad (años)		
n	48	51
Media (SD)	70,3 (6,56)	68,9 (8,36)
Mediana	71	69
(Q1, Q3)	(65,0, 75,5)	(64,0, 77,0)
Mín, máx	57, 80	50, 80
Valor de p <sup>1</sup>		
Peso (kg)		
n	48	51
Media (SD)	70,45 (10,375)	67,62 (13,700)
Mediana	70,5	65
(Q1, Q3)	(64,00, 77,70)	(57,00, 78,00)
Mín, máx	47,5, 101,0	45,0, 100,0
Valor de p <sup>1</sup>		
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		
n	48	51
Media (SD)	24,66 (2,903)	24,81 (3,627)
Mediana	24,8	24,2
(Q1, Q3)	(22,95, 26,15)	(22,30, 27,30)
Mín, máx	17,8, 31,2	18,2, 35,4
Valor de p <sup>1</sup>		

Tabla 4: resumen de sucesos adversos de reacciones locales

Clase de órganos según el sistema medDRA	1 mg	2 mg
Término preferente		
	(N=48)	(N=51)
Número de sujetos con suceso adverso informado	31 (64,6%)	42 (82,4%)
Número de sucesos únicos	96	162
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración	31 (64,6%), 209	42 (82,4%), 487
Sitio de inyección Eritema	26 (54,2%), 64	37 (72,5%), 143
Sitio de inyección Hinchazón	13 (27,1%), 27	26 (51,0%), 86
Sitio de inyección Calor	18 (37,5%), 31	25 (49,0%), 67
Sitio de inyección Induración	13 (27,1%), 32	14 (27,5%), 34
Sitio de inyección Dolor	14 (29,2%), 41	31 (60,8%), 99
Sitio de inyección Prurito	4 (8,3%), 5	10 (19,6%), 17
Sitio de inyección Nódulo	4 (8,3%), 5	11 (21,6%), 31
Sitio de inyección Hipersensibilidad	2 (4,2%), 2	4 (7,8%), 9
Sitio de inyección Hematoma	2 (4,2%), 2	1 (2,0%), 1
Sitio de inyección Decoloración	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Sitio de inyección Inflamación	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Sitio de inyección Reacción	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Fatiga	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Sensación de calor	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Hipotermia	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Sitio de inyección Urticaria	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Pirexia	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Investigaciones: ganglio linfático palpable	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Investigaciones: temperatura corporal incrementada	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos de los sistemas sanguíneo y linfático: linfoadenopatía	0 (0,0%), 0	1 (2,0%), 1

Clase de órganos según el sistema medDRA	1 mg	2 mg
Término preferente		
Trastornos gastrointestinales: glositis	0 (0,0%), 0	1 (2,0%), 1
Trastornos gastrointestinales: náusea	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos gastrointestinales: vómitos	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos del sistema nervioso: parestesia	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos del sistema nervioso: mareo	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos cardíacos: cianosis	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Infecciones e infestaciones: erupción pustulosa	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos del tejido musculoesquelético y conectivo: dolor en extremidades	0 (0,0%), 0	1 (2,0%), 1
Trastornos psiquiátricos: tensión	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0
Trastornos vasculares: hematoma	0 (0,0%), 0	0 (0,0%), 0

**2. Immunogenicidad de dos vacunas con diana en Aβ: SeCID 1-KLH-Alumbre y SeCID 2-KLH-Alumbre en comparación con KLH-Alumbre y sólo alumbre.**

5 SeCID:

SeCID 1: SWEFRRTC

SeCID 2: SEFKHGC

10

Experimentos animales:

15

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la norma Austrian Animal Experiments Act (TVG2012) utilizando ratones Tg2576 (Taconic Farms, USA; 129S6/SvEvTac). Se comprobó el estado general de salud mediante el cribado observacional primario de evaluación fenotípica (SHIRPA) de Smith Kline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital (Rogers D.C. et al., Behav. Brain Res. 105:207-217, 1999). Los ratones recibieron 6 inyecciones s.c. a intervalos mensuales. Se extrajo sangre a intervalos regulares, se preparó plasma y se almacenó hasta la utilización posterior. Al final del estudio los ratones fueron sacrificados, se recolectaron los cerebros y se separaron los hemisferios. Se fijó un hemisferio en paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma Aldrich, USA), se deshidrató y se incluyó en parafina. Se prepararon secciones del tejido cerebral de 7 µm utilizando un micrótomo deslizante (Leitz, Alemania) y las secciones se montaron sobre portaobjetos Superfrost Plus (Menzel, Alemania).

20

Determinación de títulos mediante ELISA:

25

Se utilizó la tecnología estándar de ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) para medir los niveles de anticuerpos inducidos por la vacuna en el plasma y en el LCF (Mandler M. et al., J. Alzheimers Dis. 28:783-794, 2012). Entre los sustratos utilizados se incluyeron Aβ1-40/42 humana (BACHEM, CH) (a una concentración de 5 µg/ml), KLH (1 µg/ml) y conjugados de péptido-albúmina de suero (BSA) (SeCID 1 y SeCID 2, 1 µM). Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm utilizando un lector de microplacas (Tecan, CH). Se calculó DO<sub>max</sub>/2.

30

Ensayos de comportamiento:

35

Con el fin de analizar la disfunción cognitiva, los animales Tg2576 inmunizados se sometieron a condicionamiento de miedo contextual (CFC, Comery T.A. et al., J. Neurosci. 25:8898-8902, 2005), se analizaron utilizando software AnyMaze (Stoelting Co., USA). Para el CFC, el día 1 los ratones se introdujeron en una cámara de condicionamiento (AFFiRiS AG, Austria), se dejó que se habituasen durante 2 min y recibieron tres descargas eléctricas de 0,8 mA en la pata a intervalos de 2 min más 30 s de reposo. Para evaluar el aprendizaje contextual el día 2, los animales fueron reintroducidos en la cámara y seguidos durante 5 min, seleccionando la ventana temporal de s120-240 para el análisis (inmóvil temporal=falta de movimiento excepto de respiración). Los primeros dos minutos del día 1 se consideraron inmovilidad de línea base, que se restó de los valores del día 2.

40

Análisis de Aβ cerebral:

45

Se llevó a cabo un análisis de inmunofluorescencia (IF) tal como se ha descrito con anterioridad (Mandler M. et al., J. Alzheimers Dis. 28:783-794, 2012). para el análisis de IF específico de Aβ, se procesaron secciones cerebrales de los Tg2576 inmunizados para el análisis de la carga de amiloide utilizando el anticuerpo monoclonal 3A5 (AFFiRiS AG, Austria). Todos los reactivos secundarios utilizados se obtuvieron de Vector Labs (USA). Para la IF, las secciones se montaron y contratiñeron utilizando medio de montaje VECTASHIELD-HardSet que contenía DAPI. Las secciones se examinaron utilizando MIRAX-SCAN (Carl Zeiss AG, Alemania). La patología de tipo AD en los animales se evaluó mediante la determinación de la superficie cerebral relativa ocupada por depósitos de amiloide utilizando un programa de reconocimiento de superficies semiautomatizado (eDe-finiens Architect XD,

www.definiens.com, Mandler M. et al., PLoS ONE 10(1):e0115237, 2015). Para el análisis, se evaluaron tres portaobjetos/animal y ≤ cinco secciones individuales/portaobjetos. Las secciones que portaban artefactos de tejido o tinción aberrante fueron excluidos. Con el fin de evaluar el número de vasos positivos para A $\beta$ , se analizaron las secciones teñidas con 3A5 (3 portaobjetos/animal que cubrían el córtex y el hipocampo y hasta cinco secciones individuales por cada portaobjetos). Los vasos positivos para A $\beta$  se contaron manualmente en subregiones del córtex así como en el hipocampo. Se determinó el número de vasos positivos por cada mm<sup>2</sup>.

#### Referencias:

- 10 Rogers et al., Behav Brain Res 105:207-217, 1999.  
Mandler et al., PLoS ONE 10(1) (2015): e0115237. doi:10.1371/journal.pone.0115237.
- 15 Mandler et al., J Alzheimers Dis. 28:783-794.  
Comery et al., J Neurosci 25:8898-8902, 2005.

#### Resultados:

20 Con el fin de someter a ensayo la inmunogenicidad de dos vacunas con diana en A $\beta$ , SecID 1-KLH-Alumbre y SecID 2-KLH-Alumbre en comparación con KLH-Alumbre y sólo alumbre (oxihidróxido de aluminio), los ratones Tg2576 recibieron 6x inyecciones s.c. a intervalos de 4 semanas de vacuna conjugada que contenía 30 µg de péptido sólo, dosis equivalentes de KLH formulado con alumbre, o sólo alumbre. Las dosis de alumbre utilizadas eran equivalentes a 2 mg/ml. Los anticuerpos inducidos por la vacunación se midieron en muestras de plasma extraídas en el momento del sacrificio (SecID 1 (n=10), SecID 2 (n=8), KLH-Alumbre (n=10) y sólo alumbre (n=8)). La totalidad de las 3 vacunas indujo títulos fuertes y comparables de IgG contra el péptido utilizado para la inmunización (fig. 6A). El alumbre solo no indujo señales superiores al fondo (fig. 6A). Ambas vacunas con diana en A $\beta$ , SecID 1-KLH-Alumbre y SecID 2-KLH-Alumbre, indujeron anticuerpos contra A $\beta$  humano, mientras que la vacuna de KLH-Alumbre y el alumbre solo no indujeron señales superiores al fondo en los animales tratados (fig. 6B).

30 Con el fin de evaluar el efecto de oxihidróxido de aluminio solo (alumbre) en comparación con las vacunas con diana en A $\beta$  (SecID 1- + SecID 2-KLH-Alumbre) y las vacunas no específicas de A $\beta$  (KLH-Alumbre) sobre las funciones cognitivas, se aplicó el condicionamiento de miedo contextual (CFC) que analizaba la memoria y aprendizaje contextuales en ratones Tg2576. Tal como se esperaba, el CFC demostró que los ratones tratados con SecID 1 y los tratados con SecID2 eran superiores a los animales de control, que recibieron KLH-Alumbre (no induciendo de esta manera una respuesta inmunológica específica de A $\beta$ ) en dicho modelo de AD de depósito de A $\beta$  (fig. 7). Resulta interesante que los animales que recibieron sólo alumbre (sin un conjugado que indujese una respuesta inmunológica activa contra KLH o A $\beta$ , respectivamente) mostraron efectos similares, tal como se detectan con vacunas con diana en A $\beta$  en dicho modelo de AD en ausencia de anticuerpos específicos de A $\beta$ .

40 Con el fin de someter a ensayo si el alumbre también influiría significativamente sobre la carga de amiloide cerebral, se sacrificaron los animales sometidos a CFC posteriormente, a los 14 meses de edad. Se evaluaron sus cerebros para placas difusas y núcleos densos mediante tinción de IF utilizando el anticuerpo monoclonal 3A5. Las secciones corticales, además de las hipocampales, de los controles inyectados con KLH/Alumbre se encontraban cubiertas por numerosas placas de amiloide (fig. 8A+C). En contraste, las áreas cerebrales respectivas de ratones Tg2576 inmunizados con SecID 1 y SecID 2 contenían significativamente menos depósitos (fig. 8B+D y E, p<0,05 y datos no mostrados). Resulta importante que el tratamiento de los animales Tg2576 con sólo alumbre no alteró significativamente el depósito de amiloide en comparación con los animales tratados con KLH-Alumbre (fig. 8E) en el presente modelo de AD.

45 De esta manera, las figs. 7 y 8 dan a conocer además que el oxihidróxido de aluminio aplicado tópicamente es capaz de reducir el declive cognitivo significativamente en un modelo de APP transgénico de la enfermedad de Alzheimer (Tg2576) sin modificar significativamente los niveles cerebrales de A $\beta$ . Lo anterior implica un mecanismo independiente de APP/A $\beta$  subyacente a los efectos funcionales beneficiosos ejercidos por el oxihidróxido de aluminio en dicho modelo de AD y pone de manifiesto adicionalmente la falta de fiabilidad científica de la "hipótesis de los canales de amiloide".

50 Se infiere que la presente invención da a conocer las formas de realización individualmente preferentes siguientes:

- 60 1. Oxihidróxido de aluminio para la utilización en el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer (AD).
- 65 2. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según la forma de realización 1, en el que el oxihidróxido de aluminio se encuentra contenido en una preparación farmacéutica.

3. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según la forma de realización 1 o 2, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD en forma de una suspensión.
- 5 4. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 3, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD en forma de oxihidróxido de aluminio de grado de la Farmacopea europea (monografía 1664), especialmente en el que el oxihidróxido de aluminio es Alhydrogel.
- 10 5. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 4 en una forma lista para la utilización destinada a ser aplicada directamente en el paciente, especialmente en una jeringa precargada.
- 15 6. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 5 contenida en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación contiene oxihidróxido de aluminio en forma de único ingrediente eficaz.
- 20 7. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 6 contenidas en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación comprende además sustancias auxiliares, especialmente estabilizadores, detergentes, antioxidantes, agentes complejantes para iones metálicos mono- o di-valentes, carbohidratos y/o sustancias tamponadoras.
- 25 8. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 7 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación ha sido esterilizada y, opcionalmente, es líquida, congelada o liofilizada, preferentemente líquida.
- 30 9. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 8 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación es líquida y presenta un pH de entre 5 y 9, preferentemente de entre 5,5 y 8,0, especialmente de entre 6 y 7,5.
- 35 10. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 9, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad mínima de 0,5 mg (administrado en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
11. Sal de aluminio según cualquiera de las formas de realización 1 a 10, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de por lo menos 1,0 mg (administrado en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
- 40 12. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 11, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad mínima de 1,2 mg (administrada en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
13. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 12, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de entre 1,2 mg y 5,0 mg (administrado en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
- 45 14. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 13, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad mínima de 1,5 mg (administrado en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
15. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 14, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de entre 1,5 mg y 5,0 mg, preferentemente de entre 1,5 y 3,0 mg, especialmente de entre 1,5 y 2,5 mg (administrado en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
- 55 16. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 15, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de entre 1,6 mg y 2,5 mg, preferentemente de entre 1,8 y 2,2 mg, especialmente de entre 1,9 y 2,0 mg (administrado en forma de equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en un paciente de AD.
17. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 16 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación contiene adicionalmente uno o más estabilizadores, especialmente timerosal, detergentes, antioxidantes, agentes complejantes para iones metálicos mono- o di-valentes, especialmente ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA), azúcares, alcoholos de azúcar, glicerol y/o sustancias tamponadoras, especialmente sustancias tamponadoras de TRIS o fosfato.
- 60 18. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 17 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación es una suspensión con un pH de entre 4 y 10,

preferentemente de entre 5 y 9, más preferentemente de entre 6 y 8, especialmente de entre 7,0 y 7,5.

5 19. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 18 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación es una suspensión isotónica.

10 20. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 19, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD por vía subcutánea, intranodal, intradérmica, o intramuscular, especialmente por vía subcutánea.

15 21. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 20, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD por lo menos una vez al mes durante como mínimo dos meses.

20 22. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 21, en el que la sal de aluminio es oxihidróxido de aluminio y se administra por lo menos una vez al mes durante como mínimo seis meses en un paciente de AD.

25 23. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 22, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra por lo menos dos veces al mes durante como mínimo seis meses, preferentemente durante como mínimo doce meses, especialmente como mínimo 24 meses en un paciente de AD.

30 24. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 23, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD por vía subcutánea en la parte superior del brazo, preferentemente alternando en la parte superior del brazo izquierdo y el brazo derecho.

35 25. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 24, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en dosis divididas en un paciente de AD, especialmente en el mismo sitio de administración.

40 26. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 25, en el que oxihidróxido de aluminio se administra en dosis divididas de entre 0,8 y 5,0 mg, preferentemente de entre 1,0 y 3,0, especialmente de entre 1,0 y 1,5 mg (administrada en forma de equivalente de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en un paciente de AD.

45 27. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 26, en el que oxihidróxido de aluminio se administra por lo menos mensualmente durante como mínimo dos años, preferentemente durante como mínimo cuatro años, especialmente durante como mínimo 8 años, en un paciente de AD.

50 28. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 27, en el que oxihidróxido de aluminio se administra mediante un dispositivo de inyección, especialmente una jeringa, en un paciente de AD.

55 29. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 28, en el que oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de por lo menos 1,8 mg (administrada en forma de equivalente de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en un paciente de AD.

30 30. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 29, en el que oxihidróxido de aluminio se administra en el paciente de AD en forma líquida en un volumen de aplicación de entre 0,1 y 10 ml, preferentemente de entre 0,2 y 5 ml, especialmente de entre 0,4 y 3 ml.

55 31. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 30 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación está libre de aniones sulfato, nitrato o cloruro.

60 32. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 31 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación presenta un contenido de metales pesados inferior a 20 ppm.

65 33. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 32 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación es una suspensión de oxihidróxido de aluminio y presenta una distribución de tamaños de partícula entre 2 µm y aproximadamente 10 µm, siendo agregados dichas partículas, compuestos de fibras más pequeñas preferentemente de un tamaño aproximado de 2 nm x 4,5 nm x 10 nm.

34. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 33, en el que

el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad mínima de 2,2 mg, preferentemente de entre 2,2 y 10 mg, más preferentemente de entre 2,2 y 8 mg, todavía más preferentemente de entre 2,2 y 5 mg, especialmente de entre 2,2 y 4 mg (administrado en forma de equivalente de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en un paciente de AD.

- 5      35. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 34, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD con una puntuación MMSE de entre 23 y 30, preferentemente de entre 24 y 30, más preferentemente de entre 25 y 29, especialmente de entre 26 y 29.
- 10     36. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 35, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD con una puntuación MMSE superior o igual a 27.
- 15     37. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 35, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD con una puntuación MMSE de entre 25 y 27.
- 38. Oxihidróxido de aluminio para la utilización según cualquiera de las formas de realización 1 a 35, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en un paciente de AD con una puntuación MMSE de entre 19 y 24.

**REIVINDICACIONES**

1. Oxihidróxido de aluminio para su utilización como un principio activo en el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer (AD).
- 5 2. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según la reivindicación 1, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra a un paciente de AD como oxihidróxido de aluminio de calidad European Pharmacopoeia (monografía 1664), especialmente en el que el oxihidróxido de aluminio es Alhydrogel.
- 10 3. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según la reivindicación 1 o 2 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación contiene oxihidróxido de aluminio como el único ingrediente eficaz.
- 15 4. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de por lo menos 1,2 mg, preferentemente en una cantidad de 1,2 mg a 5,0 mg (proporcionada como equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a un paciente de AD.
- 5 5. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una forma lista para utilizar para ser aplicada directamente a un paciente, especialmente en una jeringa precargada.
- 20 6. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de 1,5 mg a 5,0 mg, preferentemente 1,5 a 3,0 mg, especialmente 1,5 a 2,5 mg (proporcionada como equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a un paciente de AD.
- 25 7. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 contenido en una preparación farmacéutica, en el que dicha preparación contiene adicionalmente uno o más estabilizadores, especialmente tiomersal, detergentes, antioxidantes, agentes complejantes para iones metálicos mono- o divalentes, especialmente ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), azúcares, alcoholes de azúcares, glicerol y/o sustancias amortiguadoras, especialmente sustancias amortiguadoras TRIS o fosfato.
- 30 8. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra a un paciente de AD por vía subcutánea, intranodal, intradérmica o intramuscular, especialmente por vía subcutánea.
- 35 9. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra por lo menos una vez al mes durante por lo menos seis meses a un paciente de AD.
- 40 10. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra a un paciente de AD por vía subcutánea en la parte superior del brazo, preferentemente alternando en la parte superior del brazo izquierdo y derecho.
- 45 11. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra a un paciente de AD con una puntuación de MMSE de entre 23 y 30, preferentemente entre 24 y 30, más preferentemente entre 25 y 29, especialmente entre 26 y 29.
- 50 12. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra a un paciente de AD con una puntuación de MMSE superior o igual a 27.
- 55 13. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra a un paciente de AD con una puntuación de MMSE de 25 a 27.
14. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra en una cantidad de por lo menos 2,2 mg, preferentemente 2,2 a 10 mg, más preferentemente de 2,2 a 8 mg, todavía más preferentemente de 2,2 a 5 mg, especialmente 2,2 a 4 mg (proporcionada como equivalente de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a un paciente de AD.
15. Oxihidróxido de aluminio para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el oxihidróxido de aluminio se administra al paciente de AD en forma líquida en un volumen de aplicación de 0,1 a 10 ml, preferentemente de 0,2 a 5 ml, especialmente de 0,4 a 3 ml.

Figura 1

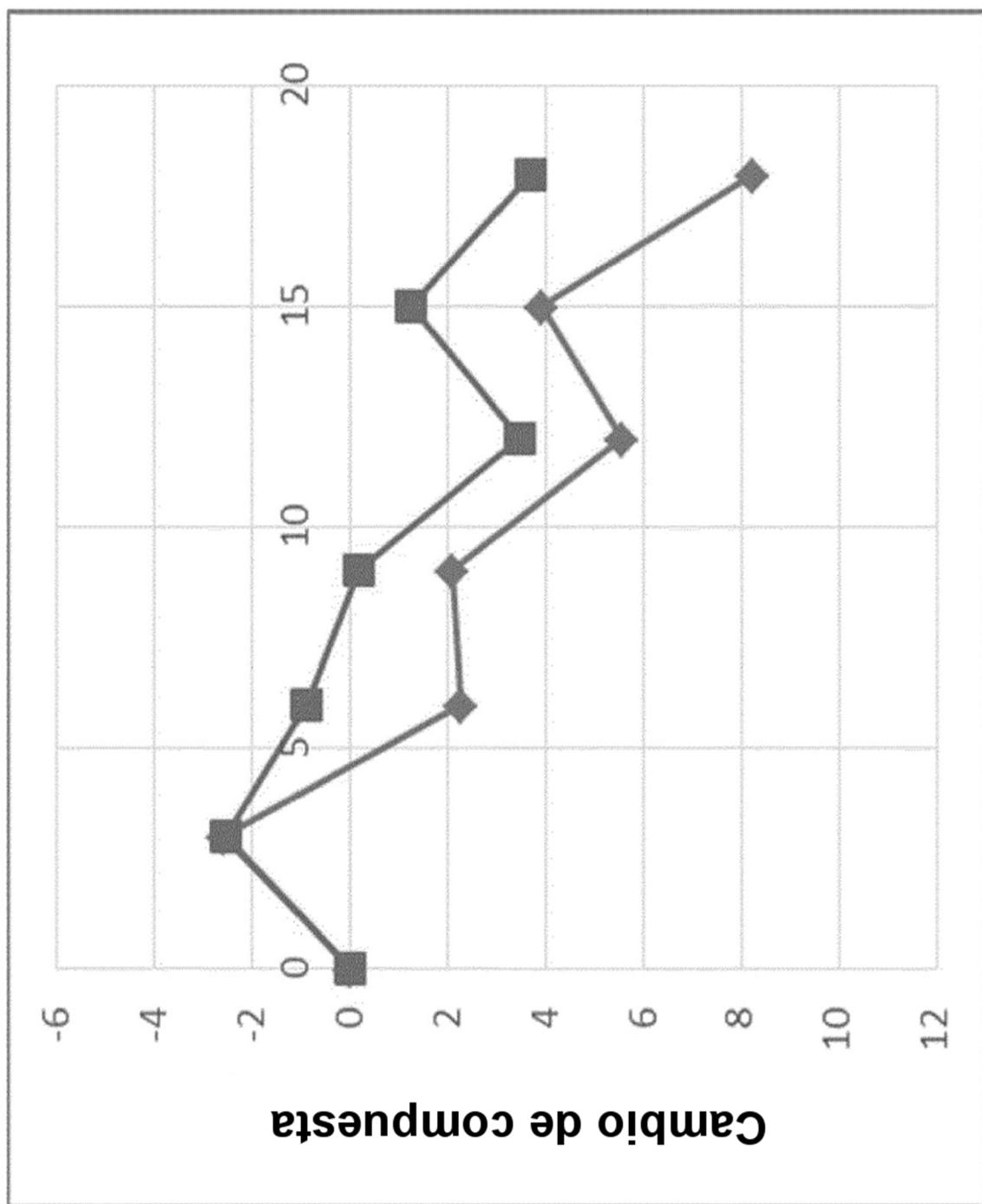


Figura 2

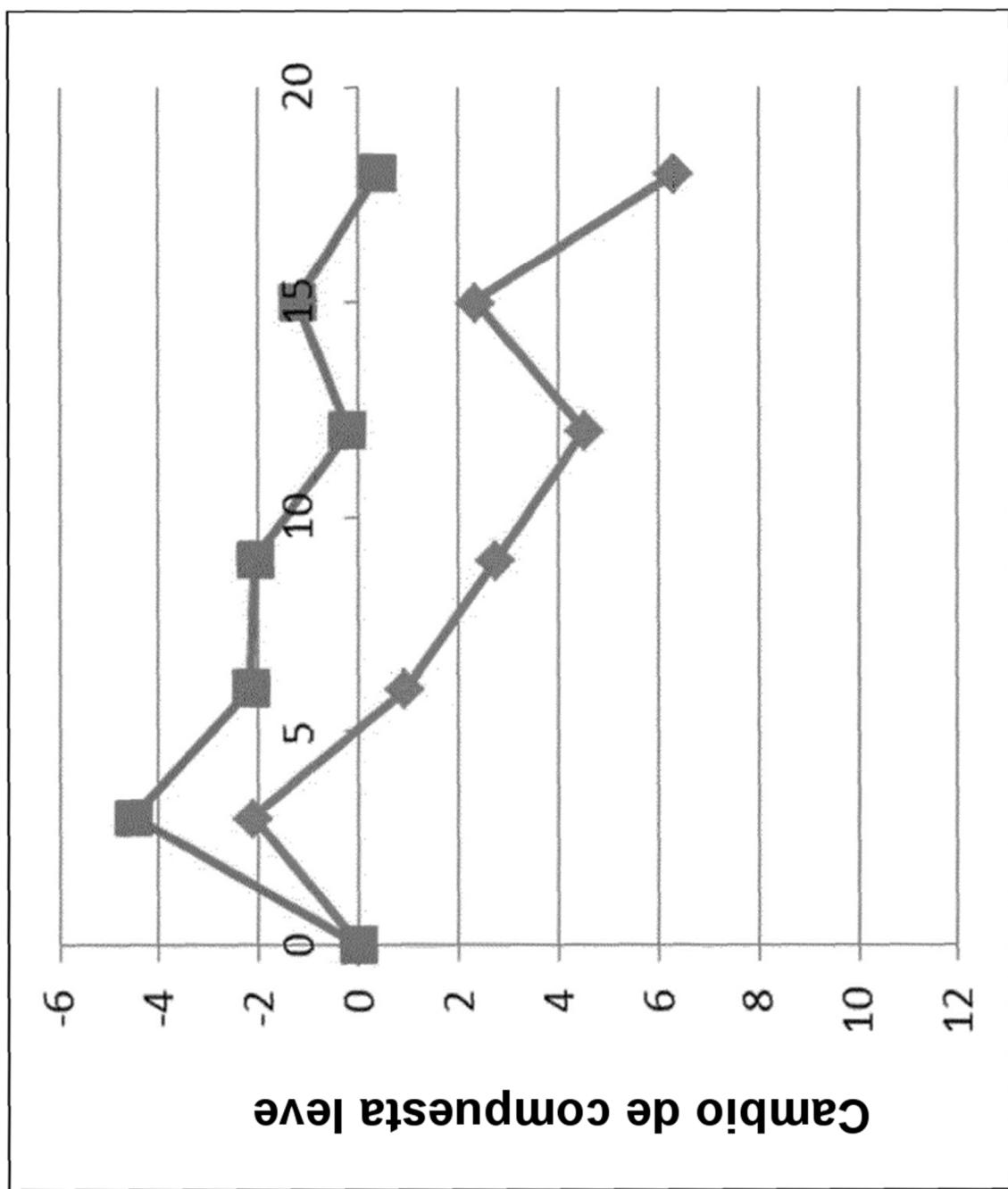


Figura 3

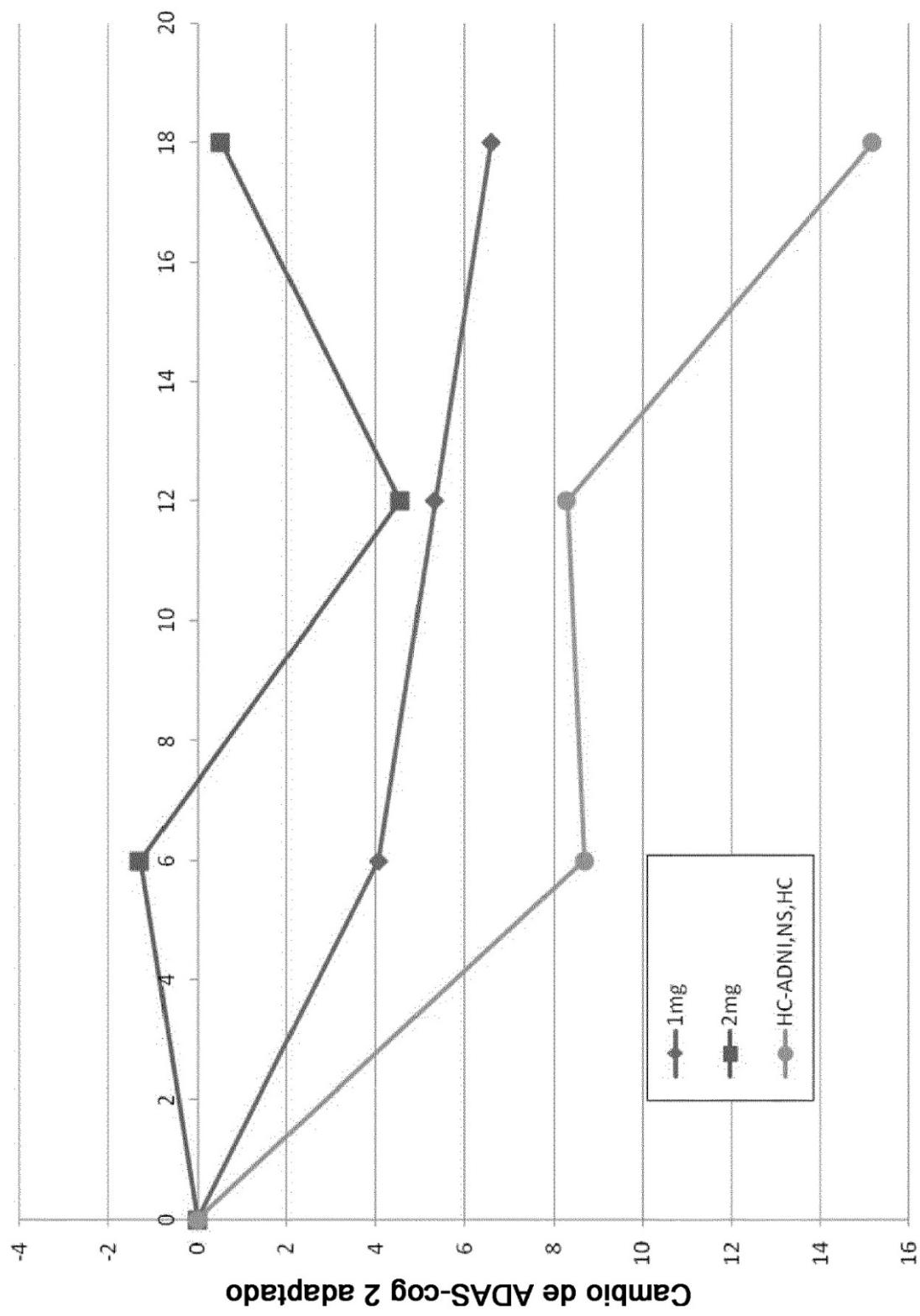


Figura 4

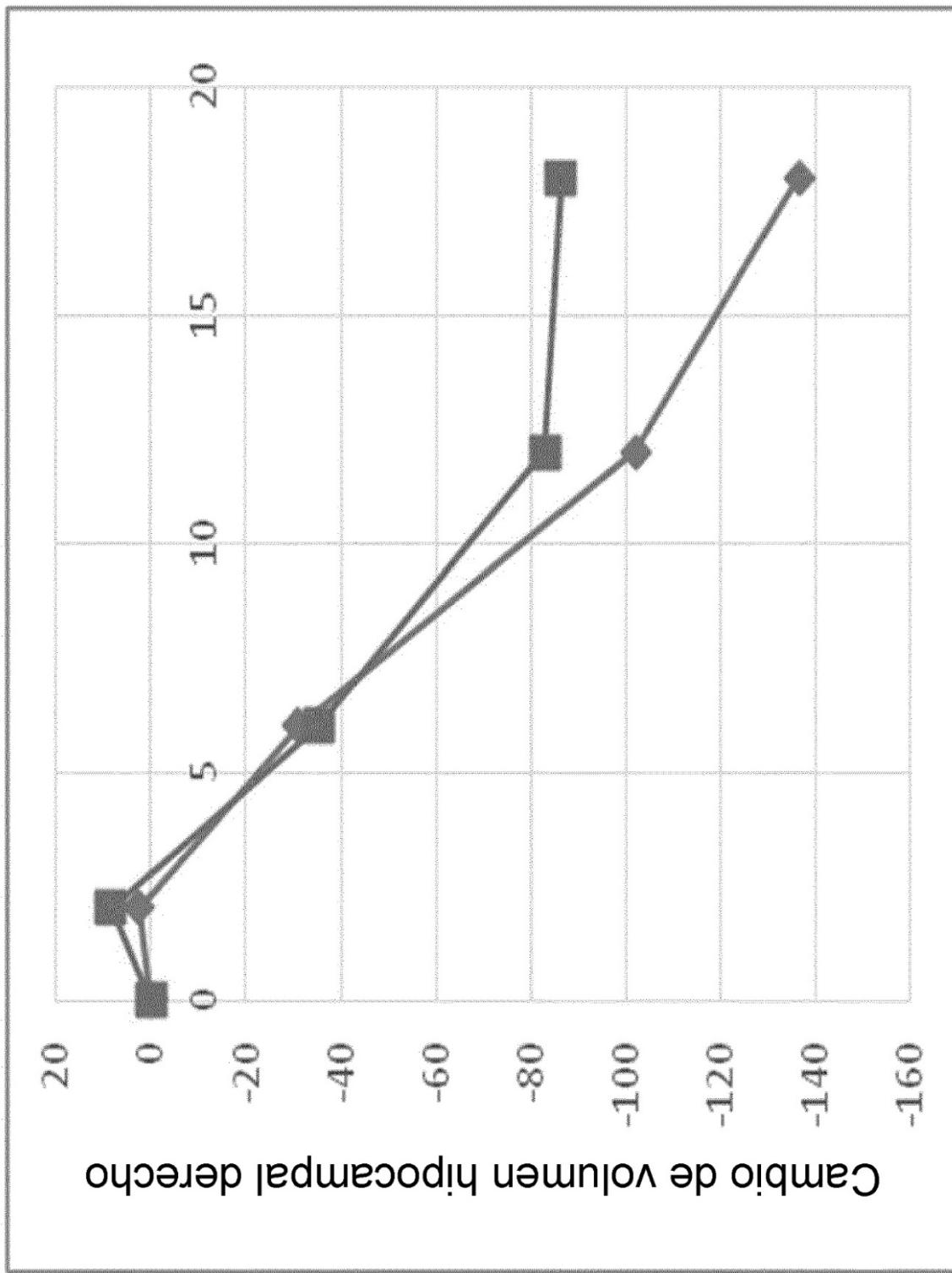


Figura 5

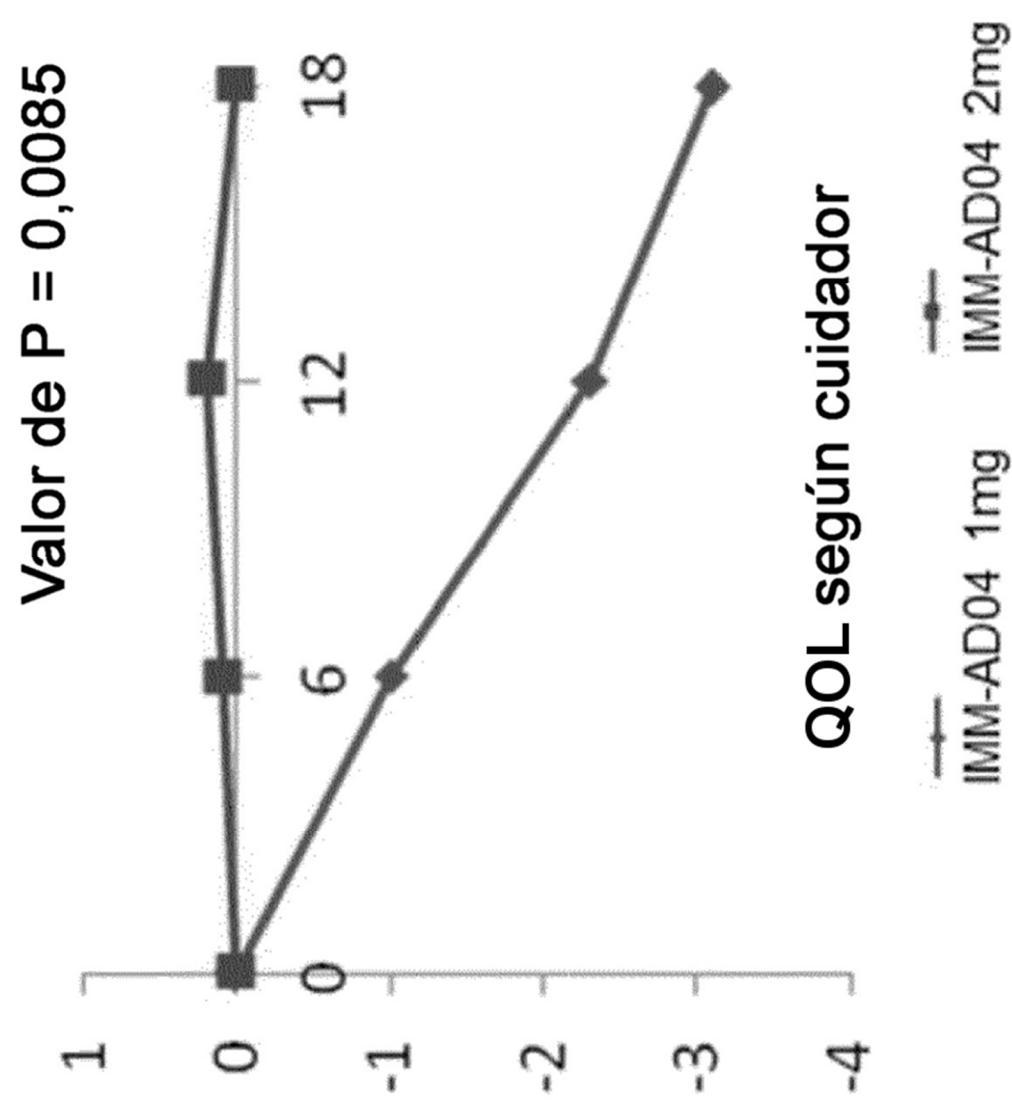


Figura 6A

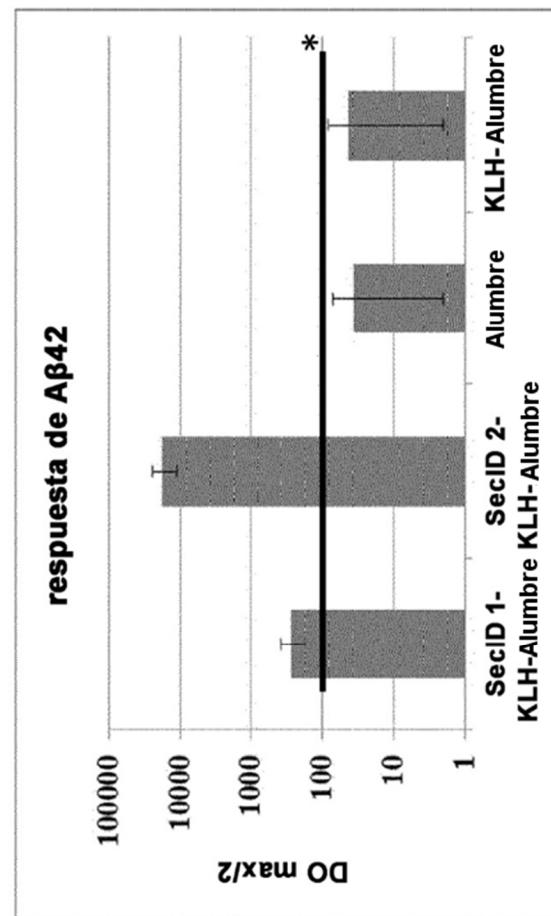
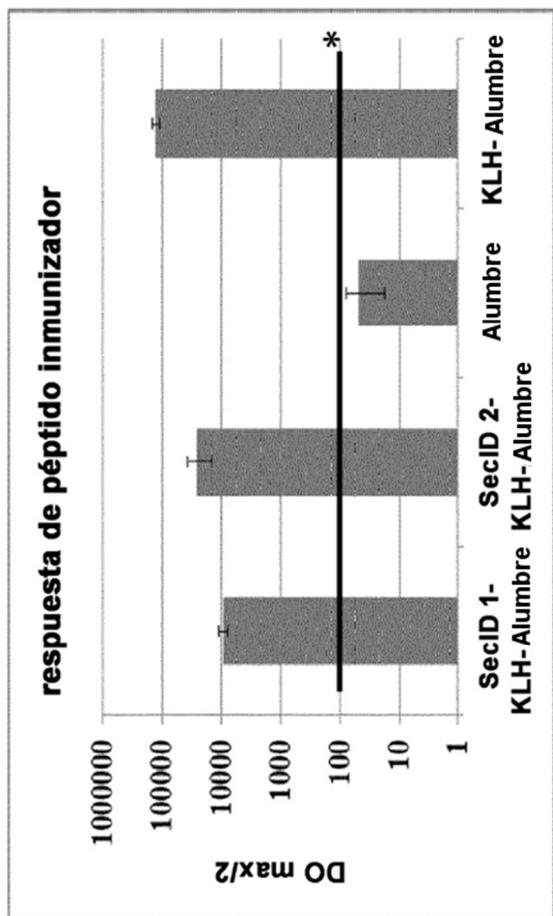


Figura 7

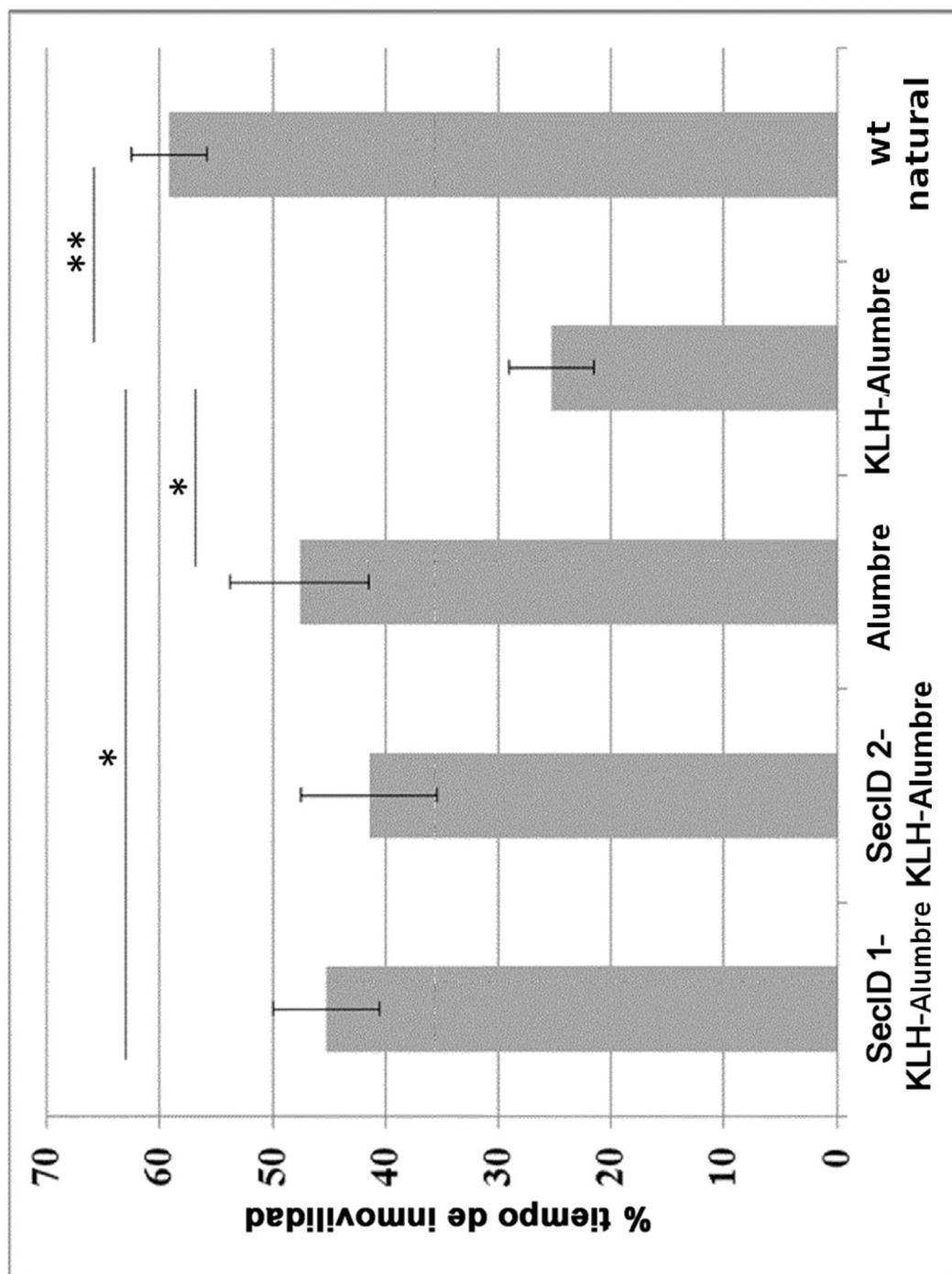


Figura 8

