






Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

# TERAPIA PERSONALIZADA CON CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

---

ENSAYO CLÍNICO FASE I (TOLERVIT-MS)

**Doctoranda:**

Silvia Presas Rodríguez

**Directoras:**

Dra. Cristina Ramo Tello

Dra. Eva Martínez Cáceres

**Tutor:**

Dr. Antoni Dávalos Errando

## Listado de abreviaturas

AA	Acontecimiento adverso
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AR	Artritis Reumatoide
Anti-AQP4	anticuerpos anti-receptor de la aquaporina 4
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
BST	Banc de Sang i Teixit
CD	Célula dendrítica
CDtol	Célula dendrítica tolerogénica
CDtol-VitD3	Célula dendrítica tolerogénica tratada con vitamina D3
CI	Consentimiento informado
CIS	Síndrome clínico aislado
CPA	Células presentadoras de antígenos
CUN	Clínica Universidad de Navarra
DE	Desviación estándar
Dexa	Dexametasona
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
EA	Evento adverso
EAE	Encefalomiелitis Autoimmune Experimental
EC	Enfermedad de Crohn
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EM	Esclerosis Múltiple
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EMR	EM recurrente
EMRR	EM remitente-recurrente
EMP	EM progresiva
EMPP	EM primaria progresiva
EMSP	EM secundaria progresiva
EVA	Escala Visual Analógica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos Norteamericana
GMP	Good Manufacturing Practice
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HUGTIP	Hospital Universitario Germans Trias I Pujol

LB	Linfocito B
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
LT	Linfocito T
MBP	Proteína Básica de la Mielina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOG	Glicoproteína Oligodendrocitaria de la Mielina
MSQoL-54	Multiple Sclerosis Quality of Life
NK	Células Natural Killer
NMOSD	Enfermedades del espectro de la neuromielitis óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Células mononucleares autólogas de sangre periférica
PLP	Proteína proteolipídica
Rapa	Rapamicina
RIS	Síndrome radiológico aislado
RM	Resonancia magnética
SAE	Evento adverso grave
SDMT	Symbol Digit Modalities Test
SNC	Sistema nervioso central
TAB	Tasa anualizada de brotes
TME	Tratamiento modificador de enfermedad
VitD3	Vitamina D3
VEB	Virus Epstein-Barr
9HPT	9 Hole Peg Test
25FWT	25 Foot Walk Test

# Índice

RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	8
1.1.1. Desde la neuropatogenia a la clínica	9
1.1.2. Criterios para el diagnóstico	12
1.1.3. Tratamientos modificadores de la evolución natural de la enfermedad	14
1.1.4. Pronóstico en la era de tratamiento	18
1.2. EL SISTEMA INMUNITARIO EN LA PATOGENIA DE LA EM	19
1.2.1. La célula dendrítica	20
1.2.2. Péptidos de mielina como autoantígenos	22
1.2.3. El drenaje linfático del SNC	23
1.3. TERAPIAS INDUCTORAS DE TOLERANCIA	23
1.3.1. Mecanismos de tolerancia inmunológica	24
1.3.2. Estrategias terapéuticas utilizadas	25
1.4. ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS	27
1.4.1. La célula dendrítica tolerogénica	27
1.4.2. Agentes tolerogénicos	28
1.4.3. Estudios in vitro con CDtol de pacientes con EM	28
1.4.4. Estudios in vivo con CDtol: modelos de experimentación animal	29
1.5. ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS	30
1.5.1. Vías de administración	31
1.5.2. Ensayos clínicos con CDtol en otras enfermedades autoinmunes	32
1.5.3. Ensayos clínicos con CDtol en EM	36
2. HIPÓTESIS	37
3. OBJETIVOS	38
4. METODOLOGÍA	39
4.1. DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO	39
4.2. POBLACIÓN Y ESCENARIO DEL ESTUDIO	42
4.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN	43
4.4. TERAPIA EN INVESTIGACIÓN	44
4.5. VARIABLES A ESTUDIO	47

4.6. RECOGIDA DE DATOS Y MONITORIZACIÓN	52
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
5. RESULTADOS	53
5.1. PACIENTES	53
5.2. PRODUCTO CELULAR	54
5.3. SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD	56
5.4. EFICACIA PRELIMINAR	59
5.4.1. Hallazgos clínicos	59
5.4.2. Hallazgos radiológicos	62
5.4.3. Hallazgos inmunológicos	63
5.5. VIABILIDAD DE LA TERAPIA	65
5.6. SELECCIÓN DE DOSIS ÓPTIMA	66
6. DISCUSIÓN	68
7. CONCLUSIONES	73
8. LÍNEAS DE FUTURO	74
9. BIBLIOGRAFÍA	75
10. ANEXOS	
• 10.1. ARTÍCULO: “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”	88
• 10.2. BATERÍA DE TEST NEUROLÓGICOS FUNCIONALES	100
• 10.3. CUESTIONARIO MSQoL-54	102
• 10.4. REGISTRO DEL ANÁLISIS DE PROLIFERACIONES LINFOCITARIAS	113
• 10.5. PANEL DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS	114

## Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad inflamatoria más frecuente del sistema nervioso central (SNC). Aunque sabemos que se trata de una enfermedad inmunomediada, a día de hoy muchos de los mecanismos implicados en su patogenia siguen siendo desconocidos. Es precisamente esto lo que dificulta encontrar la curación de la enfermedad. En las últimas 2 décadas se han comercializado unos 10 fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores con diferentes mecanismos de acción que nos permiten controlar la actividad inflamatoria, pero a pesar de ello, muchos pacientes experimentan progresión de la enfermedad. Por otra parte, estos fármacos tienen riesgos potencialmente graves que los pacientes deben asumir. En este contexto emergen las terapias celulares como tratamientos que nos permiten abordar la enfermedad desde su origen, intentado reparar la disfunción del sistema inmune sin afectar la inmunidad protectora.

Nuestro equipo lleva más de una década investigando en el desarrollo de una terapia basada en células dendríticas tolerogénicas (CDtol) para pacientes con EM. Los estudios realizados in vitro e in vivo en el modelo animal apuntaron que la terapia podía ser beneficiosa para el control de la enfermedad. Por ello se puso en marcha un ensayo clínico fase I en pacientes con EM para evaluar la seguridad de la terapia celular con CDtol tratadas con vitamina D3 (CDtol-VitD3) y cargadas con péptidos de mielina administrada directamente en los ganglios linfáticos cervicales.

Los resultados derivados de este ensayo clínico, descritos en la presente tesis doctoral, confirman que la administración intraganglionar de nuestra terapia celular con CDtol-VitD3 es segura y bien tolerada. El beneficio terapéutico será determinado en futuros ensayos de fase II.

## Summary

Multiple sclerosis (MS) is the most common inflammatory disease of the central nervous system (CNS). Although we know that it is an immune-mediated disease, today many of the mechanisms involved in its pathogenesis remain unknown. It is precisely this, which makes it difficult to find a cure for the disease. In the last 2 decades, some 10 immunosuppressive or immunomodulatory drugs have been marketed with different mechanisms of action that allow us to control inflammatory activity but, despite this, many patients experience progression of the disease. On the other hand, these drugs have potentially serious risks which patients must assume. In this context, cell therapies emerge as treatments that allow us to address the disease from its origin, trying to repair the dysfunction of the immune system, without affecting protective immunity.

Our team has spent more than a decade researching the development of a tolerogenic dendritic cell (tolDC)-based therapy for MS patients. The studies carried out in vitro and in vivo in the animal model, pointed out that the therapy could be beneficial for the control of the disease. For this reason, a phase I clinical trial was launched to assess the safety of cell therapy with tolDC treated with vitamin D3 (tolDC-vitD3) and loaded with myelin peptides for patients with MS administered directly in the cervical lymph nodes.

The results derived from this clinical trial, described in this doctoral thesis, confirm that the intranodal administration of our cell therapy with tolDC-vitD3 is safe and well tolerated. The therapeutic benefit will be determined in future phase II trials.



# 1. Introducción

## 1.1. La esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad inflamatoria más frecuente del sistema nervioso central (SNC). Su diagnóstico se lleva a cabo habitualmente en una edad entre los 20 y los 40 años por lo que el impacto que genera esta enfermedad en la vida de la persona es innegable, tanto a nivel personal y familiar, como laboral y económico. A día de hoy, sigue siendo considerada la primera causa de discapacidad (no traumática) en el adulto joven<sup>[1]</sup>.

Los estudios epidemiológicos realizados en los últimos años, han mostrado un incremento progresivo de la prevalencia de la enfermedad de forma global. Se estima que afecta a más de 2.5 millones de personas en el mundo y a más de 700.000 en Europa<sup>[2]</sup>. En España, la prevalencia se encuentra entre los 80-180 casos/100.000 habitantes según los estudios realizados en las diferentes regiones, lo que supone una prevalencia media-alta. El aumento de la propia incidencia (4-5 casos/100.000 habitantes) parece estar asociado a determinados factores ambientales, a las mejoras en la asistencia sanitaria que repercuten en una mayor esperanza de vida, y al diagnóstico precoz gracias al mayor conocimiento de la enfermedad y al avance en las tecnologías diagnósticas, fundamentalmente las de radiodiagnóstico<sup>[3]</sup>.

La EM afecta predominantemente a las mujeres en una ratio 3:1 (M:H). Se observa un incremento de dicha diferencia entre sexos en los últimos años posiblemente modulado por factores ambientales y cambios en el estilo de vida de las mujeres, tales como el aumento del consumo de tabaco<sup>[4]</sup>.

La causa de la EM sigue siendo desconocida, sin embargo, la evidencia sugiere que la confluencia de factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la enfermedad<sup>[1]</sup>. La susceptibilidad genética individual viene determinada principalmente por el tipo de complejo mayor de histocompatibilidad, siendo el HLA-DR2 (HLA-DRB1\*15) el más asociado sobre todo en las regiones del norte de Europa y América. Además, estudios familiares revelan una importante agregación familiar. Así, tener un familiar de primer grado con EM condiciona un riesgo 10-25 veces mayor al de la población general de desarrollar la enfermedad observándose una mayor correlación entre gemelos homocigotos<sup>[5,6]</sup>. Otros genes no HLA -descubiertos gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS)- que interfieren en diferentes aspectos del sistema inmune como los receptores de interleucinas (IL7RA, IL2RA) o del factor de necrosis tumoral alfa tienen efectos más modestos sobre el desarrollo de la EM<sup>[7]</sup>.

La relación entre EM y factores ambientales ha sido ampliamente estudiada, pero existen dudas acerca de la robustez de los resultados de estos estudios debido a su diseño. Los factores implicados con mayor evidencia en el desarrollo de EM son el virus Epstein-Barr (VEB) (anti-EBNA IgG), la mononucleosis infecciosa y el tabaco<sup>[8]</sup>. Además, el riesgo de EM se ve incrementado por un mayor índice de masa corporal en la infancia y en la edad adulta

y disminuido por la actividad física y los niveles de vitamina D (25-hidroxivitamina D). Otros factores asociados al riesgo de padecer EM son la exposición a disolventes orgánicos, la infección por citomegalovirus, la vacunación frente a la difteria y el tétanos, así como la diabetes tipo 2, la circunferencia de cintura abdominal, el porcentaje de grasa corporal, la edad de la pubertad y el colesterol HDL<sup>[9]</sup>.

La infección por el VEB como factor predisponente para desarrollar la enfermedad ha cobrado relevancia recientemente debido a un artículo publicado por investigadores de Harvard que estudiaron muestras de sangre de más de 10 millones de adultos jóvenes durante 2 décadas. Hallaron que el riesgo de desarrollar EM era 32 veces mayor tras la infección por VEB, lo que no ocurría con la infección por otros virus. Estos resultados apoyan la hipótesis de la infección por VEB como evento necesario para desarrollar la enfermedad en combinación con otros factores genéticos y ambientales. Este descubrimiento abre la puerta a investigar nuevas estrategias terapéuticas con antivirales y vacunas dirigidas contra este virus<sup>[10]</sup>.

### 1.1.1. Desde la neuropatogenia a la clínica

La EM es una enfermedad muy heterogénea y de curso clínico impredecible. El daño es debido a la presencia de infiltrados inflamatorios, desmielinización, pérdida axonal y degeneración, que se genera en diversas áreas del SNC, a nivel de nervio óptico, médula espinal, tronco cerebral, cerebelo y hemisferios cerebrales, dando lugar a las manifestaciones clínicas<sup>[11]</sup>. La [tabla 1](#) muestra un resumen de los principales síntomas y signos de la enfermedad.

Localización	Síntomas	Signos
Nervio óptico (unilateral > bilateral)	Pérdida de visión Dolor a la movilización ocular Pérdida de nitidez de los colores	Disminución de la agudeza visual Disminución de la visión de los colores (Ishihara) Escotoma Defecto pupilar aferente relativo
Médula espinal (parcial > completa; extremidades inferiores > superiores)	Debilidad (hemiparesia, paraparesia o monoparesia) Rigidez y/o espasmos Alteración de la sensibilidad (hipoestesia, disestesia, parestesia) Disfunción esfinteriana (urinario y/o fecal) Impotencia sexual	Hiperreflexia, babinski Espasticidad Disminución de la sensibilidad propioceptiva y/o artrocinética Lhermitte
Tronco cerebral	Diplopia, oscilopsia Vértigo Neuropatía/neuralgia trigeminal Dificultad para el habla, atragantamiento Fenómenos paroxísticos	Nistagmo, pareasias oculomotoras, oftalmoplejia internuclear u otras complejas Hipoestesia en el territorio del n. trigémino Disartria

Cerebelo	Temblo de extremidades, cabeza y/o voz Falta de coordinación y/o inestabilidad	Temblo postural y de acción, disartria (voz escándida) Dismetría, marcha atáxica
Hemisferios cerebrales	Hemiparesia y/o hemihipoestesia Alteración cognitiva Alteración afectiva Epilepsia	Hiperreflexia, babinski Déficits en atención, razonamiento y función ejecutiva (temprano); demencia (tardía)
Otros	Fatiga Dolor Sensibilidad a la temperatura e intolerancia al ejercicio	

Tabla 1. Síntomas y signos de la EM (modificado de Compston 2008)

En el 80% de los pacientes la EM se presenta por primera vez en forma de brote debido a un episodio agudo de inflamación y desmielinización generalmente focal, aunque ocasionalmente puede ser multifocal. Esta inflamación - mediada por la proliferación de linfocitos T (LT) autorreactivos que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y pasan al SNC, la activación de macrófagos y microglia, la secreción de citoquinas proinflamatorias y la liberación de radicales libres (óxido nítrico, glutamato) - junto con la desmielinización, son las responsables de la alteración de la conducción del impulso nervioso. Este se produce en última instancia como consecuencia del desbalance electrolítico debido al daño en los canales iónicos de los axones (Figura 1). Tras estos episodios puede producirse una recuperación o mejoría de los síntomas gracias a la activación de los mecanismos de reparación, remielinización y plasticidad o reorganización neuronal<sup>[12]</sup>. Sin embargo, esta capacidad compensatoria se va reduciendo a lo largo del tiempo por lo que futuros brotes de la enfermedad generan una acumulación de secuelas que contribuyen a aumentar la discapacidad. Además, se cree que la falta de mielina y la disfunción mitocondrial que sufren los axones neuronales dañados contribuye a la degeneración crónica de los mismos y, por lo tanto, a la progresión de la discapacidad en ausencia de inflamación de forma irreversible<sup>[13]</sup>.

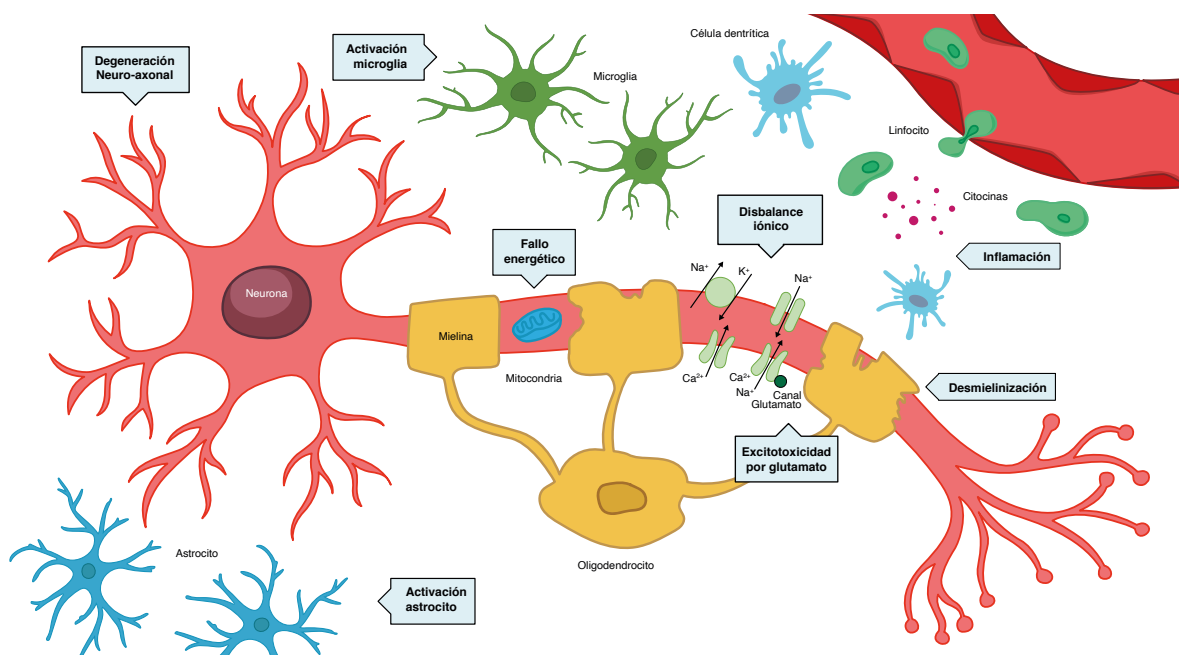


Figura 1. Mecanismos neuropatogénicos de la EM (figura modificada de Thompson et al. 2018).

De esta manera los mecanismos inflamatorios tienen mayor implicación en estadios precoces de la enfermedad mientras que los mecanismos degenerativos cobran mayor relevancia en estadios posteriores<sup>[14]</sup> (Figura 2).

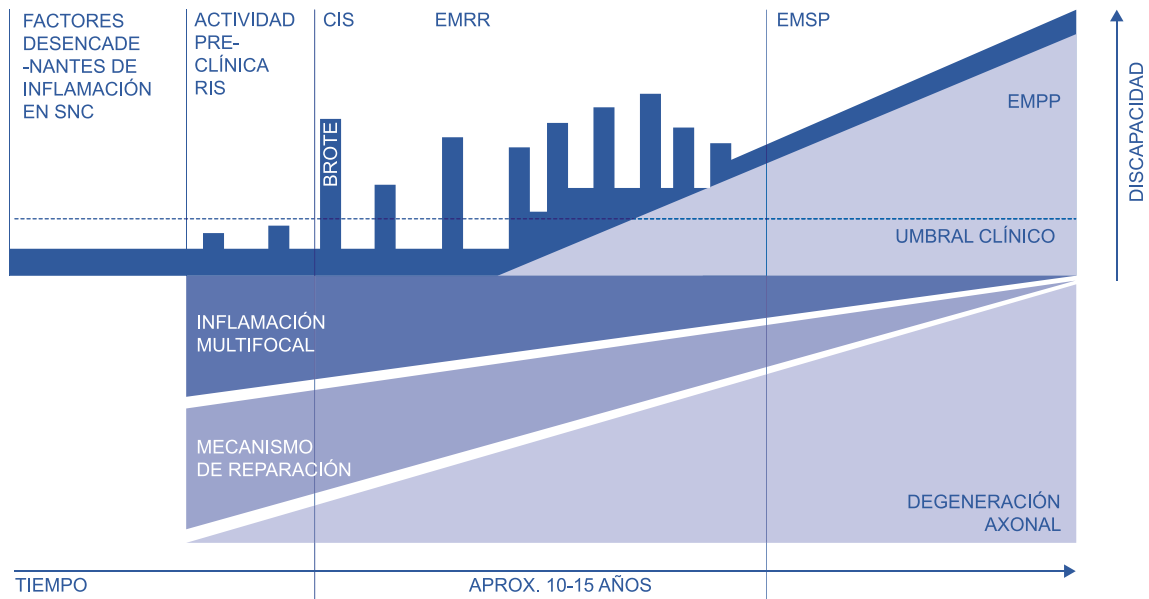


Figura 2. Evolución de la EM e implicación de los mecanismos inflamatorios, de reparación y neurodegeneración a lo largo de la enfermedad.

En 1996 se definieron por primera vez los 4 fenotipos clásicos de la enfermedad según su evolución clínica<sup>[15]</sup>. La **EM remitente-recurrente (RR)** era el fenotipo más común (85%) y se caracterizaba por la presencia de brotes seguidos de periodos de remisión con recuperación parcial o completa. La **EM secundaria progresiva (SP)** fue definida como un empeoramiento progresivo que ocurría después de un tiempo de un curso inicial en forma de brotes. En torno al 50% de los pacientes con una EMRR desarrollaba una forma SP. Aproximadamente el 15% de los pacientes presentaban un fenotipo de **EM primaria progresiva (PP)** caracterizada por una enfermedad progresiva desde el inicio sin brotes de la enfermedad. El 4º fenotipo, la **EM recurrente-progresiva (RP)**, se refirió a aquellos pacientes que acumulaban discapacidad desde el inicio, pero con posibles brotes con o sin recuperación de los mismos.

Estos fenotipos clásicos fueron incorporados en la práctica diaria y se siguen utilizando a día de hoy. Sin embargo, la necesidad de clasificar e identificar mejor a los pacientes que necesitaban iniciar un tratamiento y de monitorizar la respuesta a las terapias, hizo que Lublin y colaboradores<sup>[16]</sup> revisaran la clasificación fenotípica y propusieran nuevas definiciones para describir el curso clínico de la EM, las cuales han sido de gran utilidad (Figura 3). Incorporaron el concepto de **actividad de enfermedad**, definiendo enfermedad activa como la presencia de brotes y/o aparición de lesiones desmielinizantes en SNC en la resonancia magnética (RM) definidas como 1) nuevas o aumentadas lesiones en las secuencias T2 o 2) lesiones captantes de gadolinio en secuencias T1. Además, acuñaron el concepto de **progresión de enfermedad** como el incremento objetivable de la discapacidad sin recuperación medido a través de la Expanded Disability Status Scale of Kurtzke (EDSS)<sup>[17]</sup>. Los criterios de imagen para definir la progresión no fueron incluidos por no estar estandarizados. Además, se incluyó el concepto de **síndrome clínico aislado (CIS)** como la primera presentación de

una enfermedad inflamatoria desmielinizante que podría tratarse de una EM. Todos estos nuevos conceptos han llevado a simplificar los fenotipos en **EM recurrente** que comprende el CIS y la EMRR, y la **EM progresiva** que engloba las formas más progresivas puras de la enfermedad, EMPP y EMSP. No obstante, recientemente se han empezado a incorporar las formas clínicamente activas de EMSP dentro del fenotipo de EM recurrente.

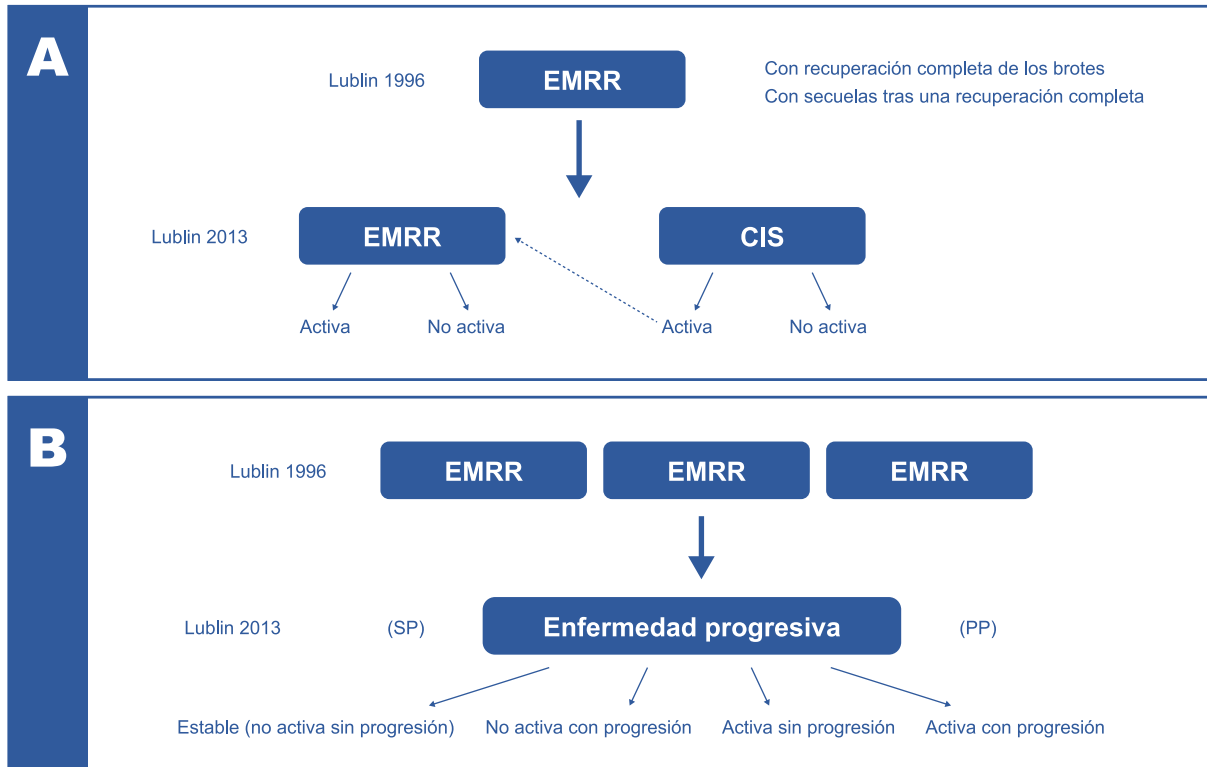


Figura 3. Cambios en la clasificación fenotípica de la EM de Lublin 1996 a Lublin 2013. A) Cambios para la enfermedad recurrente; B) Cambios para la enfermedad progresiva (adaptado de Lublin 2014).

En ocasiones se detectan lesiones desmielinizantes características de la enfermedad en una RM cerebral realizada por otras razones (cefalea, traumatismo craneal...) mucho antes de que la EM provoque los primeros síntomas típicos de la enfermedad. A esta etapa se la define como **síndrome radiológico aislado (RIS)**. Sin embargo, en los últimos años, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, se ha empezado a utilizar el concepto de **fase preclínica o prodrómica de la EM**<sup>[18,19]</sup>. Este matiz podría ser importante en un futuro en el que podamos proponer estrategias terapéuticas eficaces que, utilizadas en esta fase, pudieran frenar el desarrollo de la enfermedad.

### 1.1.2. Criterios para el diagnóstico

El diagnóstico de la EM se basa en la combinación de criterios clínicos, radiológicos y de laboratorio en personas con manifestaciones típicas de la EM en las que se han excluido otras alternativas diagnósticas.

Los criterios de McDonald 2017<sup>[20]</sup> son una actualización de los criterios de 2010<sup>[21]</sup> donde los criterios radiológicos han cobrado mayor protagonismo, alcanzando un aumento de la sensibilidad sin perder especificidad para el diagnóstico.

En los pacientes con un fenotipo **EMRR**, el objetivo es demostrar la diseminación en espacio (DE) y en tiempo (DT) de la enfermedad. El diagnóstico clínico se basa en la aparición de brotes. El brote se define como la aparición de una nueva disfunción neurológica de al menos 24 horas de evolución, seguido de una recuperación parcial o completa, en ausencia de fiebre o infección. El diagnóstico radiológico se basa en la presencia de lesiones desmielinizantes en localizaciones típicas, así como la aparición de lesiones con y sin captación de contraste, o nuevas lesiones en secuencias T2 en una RM cerebral o medular de control. La presencia de bandas oligoclonales (BOC) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido incluida en los actuales criterios, apoyando al criterio de DT y permitiendo un diagnóstico más precoz en algunos casos.

Para los pacientes con un curso clínico de **EMPP**, los criterios diagnósticos establecen que es necesario demostrar al menos 1 año de progresión de la discapacidad, además de criterios radiológicos y/o la presencia de BOC en LCR.

#### Criterios McDonald 2017 para diagnóstico de EM en paciente que debutan con brotes (EMRR)

	Nº de lesiones con evidencia clínica objetiva	Información adicional necesario para el diagnóstico
≥2 brotes clínicos	≥2	Ninguna (aunque al menos una RM cerebral debería ser realizada antes de confirmar el diagnóstico)
≥2 brotes clínicos	1 (así como evidencia histórica clara de un ataque previo que involucró una lesión en una ubicación anatómica distinta)	Ninguna (aunque al menos una RM cerebral debería ser realizada antes de confirmar el diagnóstico)
≥2 brotes clínicos	1	DE demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• un brote clínico adicional que implica un sitio diferente del SNC, o</li> <li>• por RM: ≥1 lesiones hiperintensas en T2 características de la EM en ≥2 de las 4 localizaciones típicas del SNC: periventricular, cortical o yuxtacortical, infratentoriales, y médula espinal</li> </ul>
1 brote clínico	≥2	DT demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• un brote clínico adicional, o</li> <li>• por RM: presencia simultánea de lesiones captantes y no captantes de gadolinio en cualquier momento o por una nueva lesión hiperintensa en T2 o captantes en la RM de seguimiento, o</li> <li>• demostración de BOC específicas del LCR</li> </ul>
1 brote clínico	1	• DE y DT (definidas arriba)

#### Criterios McDonald 2017 para diagnóstico de EM en paciente con curso clínico progresivo desde el debut (EMPP)

1 año de progresión de la discapacidad (determinada retrospectiva o prospectivamente) independientemente de brote	Más 2 de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥1 lesiones hiperintensas en T2 características de la EM en ≥1 localizaciones típicas: periventricular, cortical o yuxtacortical o infratentorial</li> <li>• ≥2 lesiones hiperintensas en T2 en la médula espinal</li> <li>• Presencia de BOC específicas del LCR</li> </ul>
---	--

Tabla 2. Criterios diagnósticos actuales de McDonald 2017.

### 1.1.3. Tratamientos modificadores de la enfermedad (TME)

Hasta el día de hoy no existe un tratamiento curativo para la EM. Las terapias actuales tienen como objetivo modificar el curso de la enfermedad en términos de reducir la tasa de brotes y la aparición de nuevas lesiones en la RM. En consecuencia, la mayoría de ellas van dirigidas al tratamiento de las formas recurrentes de EM. Más recientemente se han incorporado algunos fármacos que han conseguido demostrar una reducción de la progresión de la discapacidad de manera moderada.

Actualmente, y de forma bastante generalizada, se dividen en tratamientos de primera, segunda o tercera línea en base al perfil de paciente al que van dirigidos, con menor o mayor actividad inflamatoria, y según los potenciales riesgos de sus efectos secundarios.

#### Tratamientos de primera línea

**Interferón-β (IFNβ)** fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la EMRR, por la norteamericana Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en 1993, y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 1995. Se han desarrollado diversas formulaciones autoinyectables, subcutáneas o intramusculares de IFNβ, con diferentes dosis y frecuencia de administración (1-5\*\*). Aunque su mecanismo de acción no está claro, funciona principalmente a través de las vías de señalización JAK / STAT lo que resulta en un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador<sup>[22,23]</sup>. Durante estas décadas, el IFNβ ha demostrado beneficios clínicos moderados en la EMRR con un buen perfil de seguridad por lo que se ha mantenido como terapia de primera línea para el tratamiento de la EM. Entre sus beneficios se ha observado una reducción de la tasa anualizada de brotes (TAB) de aproximadamente el 30%, así como una reducción de nuevas lesiones en la RM cerebral de entre el 50 y el 85%. Además, se ha observado un incremento en el tiempo desde el primer brote (CIS) hasta el diagnóstico de EM<sup>[22,24]</sup>. Los eventos adversos (EA) más comunes son los síntomas pseudogripales, y las reacciones cutáneas en el lugar de la inyección. Además, el IFNβ ha sido aceptado recientemente para su uso durante el embarazo y la lactancia, si es clínicamente necesario.

1. Avonex | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avonex-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avonex-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 3, 2022)
2. Rebif | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rebif-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rebif-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 3, 2022)
3. Plegridy | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/plegridy-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/plegridy-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 3, 2022)
4. Betaferon | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/betaferon-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/betaferon-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 3, 2022)
5. Extavia | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/extavia-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/extavia-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 3, 2022)

**Acetato de glatirámero (6\*\*)** es otra formulación autoinyectable subcutánea utilizada para el tratamiento del CIS y de a EMRR. Es un polímero sintético compuesto por cuatro aminoácidos (ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina) que es un análogo químico e inmunológico del principal antígeno de la mielina, la proteína básica de mielina (MBP). Aunque su mecanismo de acción no está claro, se cree que su efecto sobre el sistema inmunológico induce a las células B y T reguladoras, reduce las células T autorreactivas y produce un cambio de un fenotipo de células B proinflamatorio a antiinflamatorio<sup>[25,26]</sup>. Este fármaco ha demostrado un perfil similar al del INFβ en cuanto a beneficios clínicos, tolerabilidad y seguridad<sup>[27,28]</sup> pero menor beneficio radiológico<sup>[29]</sup>. Las reacciones en el lugar de la inyección, los nódulos cutáneos y/o la necrosis son EA frecuentes. El acetato de glatiramer, Copaxone®, ha sido el primer medicamento aprobado para su uso durante el embarazo.

**Teriflunomida (7\*\*)** es un fármaco oral aprobado en 2012 que se utiliza para la EMRR. Interfiere con la síntesis de pirimidina y la replicación del ADN, reduciendo la proliferación de células T y B activadas<sup>[30,31]</sup>. Los diferentes ensayos clínicos demostraron un perfil beneficio / riesgo favorable, similar al del IFNβ y el acetato de glatirámero<sup>[32]</sup>. Este fármaco es potencialmente teratogénico por lo que está prohibido en hombres y en mujeres tanto durante la planificación de embarazo como durante el embarazo. Otros EA, como la hepatotoxicidad y la trombocitopenia requieren un seguimiento estrecho con análisis de sangre periódicos. Además, es importante destacar que la teriflunomida se elimina muy lentamente del plasma (media de 8 meses, hasta 2 años en casos individuales), por lo que si se requiere discontinuar el tratamiento por algún contratiempo (ej. embarazo), puede ser necesario realizar un procedimiento de eliminación acelerada con colestiramina o carbón activado. Recientemente ha sido autorizado para población pediátrica >10 años, ajustando la dosis según el peso.

**Dimetil-fumarato (DMF) (8\*\*)** es un fármaco oral aprobado en 2013 que se utiliza para el tratamiento de la EMRR. Ha mostrado una reducción de más de 50% de la TAB, con una efectividad similar a algunas terapias de segunda línea<sup>[33]</sup>. El DMF induce la inhibición de la vía NF-kB y la activación del factor de transcripción Nrf2 induciendo un perfil antiinflamatorio, antiproliferativo y antioxidante<sup>[34,35]</sup>. A pesar de que los EA como el *flushing* o los síntomas gastrointestinales son relativamente frecuentes, el DMF tiene una tolerancia y seguridad adecuadas. También se ha observado linfopenia grave en algunos pacientes, siendo más significativa en pacientes de más edad y considerada un posible factor de riesgo para desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP)<sup>[36]</sup>. Recientemente, la ficha técnica del fármaco ha sido modificada incorporando la posibilidad de usarlo durante el embarazo y en población pediátrica a partir de los 10 años, si se considera necesario.

6. Copaxone | Spanish Agency of Medicines and Health Products [Internet]. Available online at: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/65983/65983\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/65983/65983_ft.pdf) (accessed April 3, 2022)

7. Tecfidera | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information_en.pdf) (accessed April 23, 2022)

8. Tecfidera | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information_en.pdf) (accessed April 23, 2022)



## Tratamientos de segunda línea

**Fingolimod** (9\*\*) fue el primer fármaco oral para el tratamiento de la EM. Se aprobó en 2010 para el tratamiento de la EMRR con alta actividad como terapia de segunda línea. Posteriormente fue aprobado para su uso en EM pediátrica. Actúa secuestrando linfocitos en los ganglios periféricos mediante la unión al receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P)<sup>[37]</sup>. Como consecuencia, provoca linfopenia y cambios en subpoblaciones de linfocitos menores en la sangre periférica de los pacientes<sup>[38–40]</sup>. Fingolimod ha demostrado una reducción relativa de alrededor del 50% en la TAB y una reducción de más del 70% en las lesiones cerebrales por resonancia magnética<sup>[41]</sup>. Al inicio del tratamiento con fingolimod se puede producir una bradicardia transitoria y/o ralentización de la conducción del impulso auriculoventricular en una pequeña proporción de pacientes. Se cree que este efecto se debe a la interacción de fingolimod con los receptores S1P en la membrana superficial de los miocitos auriculares (subtipo S1P3)<sup>[37]</sup>. Como otros AEs destacables, se han descrito algunos casos de LMP, y la aparición de un fenómeno de rebote de la enfermedad (actividad exacerbada en relación a la previa) tras la retirada del fármaco. Para reducir principalmente los efectos cardíacos, se han desarrollado nuevos fármacos que se unen selectivamente a los receptores S1P1 y/o S1P5, como **Siponimod** (10\*\*) que es el primer tratamiento aprobado para las formas EMSP, **Ozanimod** (11\*\*), aprobado recientemente para EMRR activa y que, a diferencia del **Fingolimod**, podrá ser utilizado como terapia de 1ª línea, y Ponesimod (12\*\*) que ha sido el último fármaco autorizado, con indicación para las formas recurrentes de EM también en 1ª línea.

**Cladribina** (13\*\*) fue investigada hace años para su uso en EMRR pero la EMA no la autorizó hasta 2017 tras la evaluación de los resultados de los ensayos que indicaban mayor riesgo de tumores en los pacientes tratados con ella. Interfiere en la síntesis y reparación del ADN produciendo una depleción de las células T y B principalmente<sup>[42]</sup>. La linfopenia es su EA más frecuente. Este fármaco oral no precisa de una administración continuada, sino que se trata de una terapia de inducción que se aplica en 2 cursos de tratamiento durante 2 años (2 semanas de tratamiento separadas en 1 mes en el primer año que se repite un año más tarde). Los resultados de los ensayos han demostrado reducir la TAB más de un 50% y retrasar la progresión de la enfermedad en pacientes con EM recurrente (RR o SPMS activas)<sup>[43]</sup>.

9. Mayzent | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mayzent-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mayzent-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23, 2022)
10. Zeposia | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zeposia-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zeposia-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23, 2022)
11. Ponvory | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ponvory-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ponvory-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23, 2022)
12. Mavenclad | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mavenclad-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mavenclad-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23, 2022)
13. Tysabri | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tysabri-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tysabri-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23, 2022)

**Natalizumab (NTZ)** (14\*\*), fue el primer anticuerpo monoclonal para tratar la EMRR de alta actividad. Sin embargo, poco después de su aprobación en 2004, fue retirado por la aparición de varios casos de LMP. No obstante, después de varios estudios exhaustivos para investigar el riesgo de desarrollar LMP, NTZ fue reautorizado en 2006 después de incluir medidas altamente específicas de minimización del riesgo<sup>[44]</sup>. Actúa bloqueando la entrada de los linfocitos al SNC mediante la unión a la subunidad  $\alpha 4$  de la integrina VLA-4<sup>[45]</sup>. Es un fármaco altamente eficaz tanto a nivel radiológico como clínico, consiguiendo una reducción de la TAB del 68%<sup>[46]</sup>. Recientemente se ha permitido su uso durante el embarazo si se considera necesario, prestando especial atención a las plaquetas de los niños nacidos de madres en tratamiento con NTZ, debido a algunos casos de trombocitopenia. Tras la retirada del fármaco, se han descrito algunos casos de fenómeno de rebote<sup>[47]</sup>.

**Ocrelizumab** (15\*\*), un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20, fue el primer fármaco aprobado para la EMPP en 2017, pero también se ha indicado su uso para EMRR de alta actividad. Ocrelizumab demostró una TAB sustancialmente reducida<sup>[48]</sup> y una reducción significativa de la progresión de la discapacidad, especialmente en pacientes más jóvenes y radiológicamente activos<sup>[49]</sup>. Se están utilizando otras terapias anti-CD20, como **Rituximab** que, aunque no está aprobado para la EM ha mostrado beneficios en varios estudios. Además, se está investigando la eficacia de **Ofatumumab** y **Ublituximab**<sup>[50]</sup>. En los últimos años, estas terapias se han vuelto más relevantes debido al creciente interés en el papel que juegan las células B en la patogénesis de la enfermedad.

### Tratamientos de tercera línea

**Mitoxantrona** (16\*\*), fue el primer fármaco de inducción intravenoso para el tratamiento de la EM, aprobado en 2000 por la FDA. Es un agente quimioterápico que afecta la proliferación de células T, B y presentadoras de antígeno (CPA)<sup>[51]</sup>. La principal desventaja es que puede ocasionar EA graves que incluyen toxicidad cardíaca y leucemia aguda, por lo que su uso se ha restringido a pacientes con alta actividad que no cuentan con otras alternativas terapéuticas.

14. Tysabri | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tysabri-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tysabri-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23 2022)
15. Ocrevus | European Medicine Agency [Internet]. Available online at : [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information_en.pdf) (acceded April 23, 2022)
16. Mitoxantrone | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/novantrone-article-30-referral-annex-iii\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/novantrone-article-30-referral-annex-iii_en.pdf) (acceded April 23, 2022)

**Alemtuzumab** (17\*\*) es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado que produce una depleción de las células CD52 como células T, B, NK y monocitos, tras la cual se genera la repoblación de un nuevo repertorio de dichas células<sup>[52,53]</sup>. Esta terapia de inducción intravenosa fue aprobada en 2013 y está indicada para EMRR de alta actividad, dados los resultados de eficacia de los ensayos clínicos<sup>[54]</sup>. Además de las reacciones a la infusión, se han descrito enfermedades autoinmunes como la tiroiditis, la púrpura trombótica idiopática y la nefropatía autoinmunitaria como EAs de este tratamiento. En noviembre de 2019, la EMA recomendó restringir su uso debido a la aparición de EAs graves (trastornos cardiovasculares y relacionados con el sistema inmunológico, incluidas las muertes). Por esta razón, Alemtuzumab ha pasado a una tercera línea terapéutica y se ha publicado un paquete de medidas para minimizar el riesgo con el fin de preservar la seguridad de los pacientes (18\*\*).

El **trasplante de progenitores hematopoyéticos**, aunque no es una terapia aprobada en todos los países, suele formar parte del algoritmo terapéutico destinado a pacientes con una EM muy agresiva en los que han fracasado >2 líneas terapéuticas de alta eficacia. Los resultados de los últimos ensayos clínicos han demostrado muy buenos resultados de eficacia y menores EAs graves que ensayos anteriores, gracias a la modificación del esquema terapéutico de los tratamientos quimioterápicos para la movilización, inducción y consolidación del trasplante<sup>[55,56]</sup>.

Pese a esta gran diversidad de TME, la decisión terapéutica para el paciente y el médico sigue siendo difícil. En la práctica clínica actual, no contamos con biomarcadores o calculadoras de riesgo que nos ayuden a elegir el mejor fármaco para cada paciente, los TME de alta eficacia de los que disponemos no consiguen evitar la progresión de la enfermedad y tienen potenciales riesgos que ponen en peligro la seguridad del paciente. En este panorama emergen las **terapias celulares**, como tratamientos capaces de actuar de forma antígeno-específica, preservando la inmunidad protectora.

#### 1.1.4. Pronóstico en la era de tratamiento

Hemos podido evidenciar que los TME han conseguido modificar la historia natural de la EM, sobre todo a corto plazo, gracias a la reducción del número de brotes. Sin embargo, quedaba por confirmar si realmente se había conseguido un efecto beneficioso sobre la discapacidad a largo plazo.

Estudios anteriores a la era de tratamiento observaron que casi la mitad de los pacientes entraba en una fase progresiva de la enfermedad aproximadamente a los 15 años de su inicio. Sin embargo, un estudio más reciente realizado en casi 500 pacientes bajo TME con

17. Lemtrada | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lemtrada-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lemtrada-epar-product-information_en.pdf) (accessed April 23, 2022)

18. Referral Lemtrada | European Medicine Agency [Internet]. Available online at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/lemtrada-article-20-procedure-measures-minimise-risk-serious-side-effects-multiple-sclerosis\\_en-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/lemtrada-article-20-procedure-measures-minimise-risk-serious-side-effects-multiple-sclerosis_en-0.pdf) (accessed April 23, 2022)

un seguimiento >10 años, encontró una tasa de conversión a EMSP del 18% y tan sólo el 10% había llegado a una discapacidad de EDSS  $\geq 6.0$ <sup>[57]</sup>.

Así pues, la “nueva” historia natural de la EM en la era de tratamiento, describe una evolución de enfermedad en la que, con el uso de terapias de alta eficacia, los brotes desaparecen en la mayoría de los pacientes, pero la progresión insidiosa independiente de los brotes (PIRA, progression independent of relapse activity), denominada “progresión silenciosa”, es ahora más evidente<sup>[58]</sup> (Figura 4).

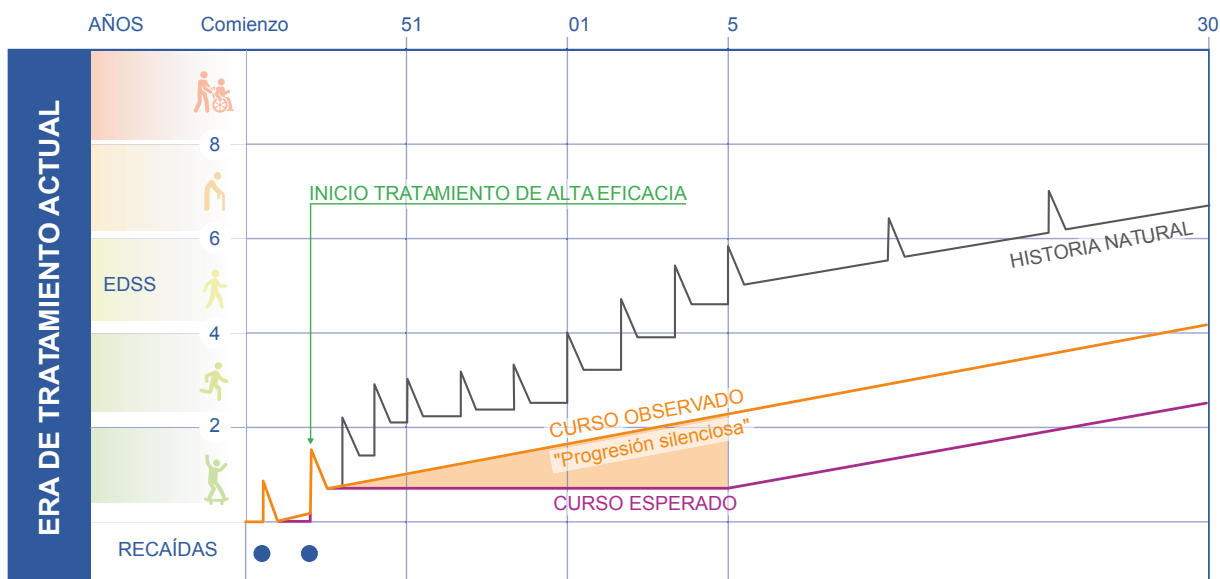


Figura 4. La nueva historia natural de la EM en la era actual gracias a los tratamientos de alta eficacia (figura modificada de Hauser et al. 2020).

## 1.2. El sistema inmunitario en la patogenia de la EM

Existen 2 modelos que podrían explicar la patogenia de la enfermedad. El primero es el llamado **modelo intrínseco (“in-out”)**, que plantea la hipótesis de que el evento inicial tiene lugar en el SNC por destrucción tisular, desde donde se liberarían antígenos que llegan a la periferia a través del drenaje a los ganglios linfáticos o mediante transporte activo por células presentadoras de antígenos (CPA). Posteriormente, en el contexto de un entorno proinflamatorio, se generaría una respuesta autoinmune en periferia que se dirigiría al SNC. El segundo modelo, llamado **extrínseco (“out-in”)** plantea la hipótesis de que el evento inicial tiene lugar fuera del SNC (como, por ejemplo, una infección vírica) el cual, por diferentes mecanismos, induciría una respuesta autorreactiva contra el SNC. Entre estos mecanismos destaca la reactividad cruzada entre antígenos microbianos y autoantígenos, o la activación de una respuesta autoinmune tras un fuerte estímulo inflamatorio<sup>[12]</sup>.

Ambos escenarios confluyen en la liberación de antígenos a la periferia, lo que lleva a la activación de los **linfocitos T (LT) CD4+ antígeno-específicos** frente a las proteínas de la mielina u otras proteínas del SNC. De esta manera se permite el paso de dichos linfocitos a través de la BHE y su llegada al SNC donde se reactivan para atacar a los antígenos

correspondientes e inducir la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias y a través de la activación de otras células como macrófagos y microglía, que a su vez producen otros mediadores proinflamatorios y la liberación de radicales libres<sup>[59]</sup>. Esta teoría se sustenta en los modelos de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en la que se puede inducir la enfermedad mediante la inmunización con estas proteínas<sup>[60]</sup>.

Como queda reflejado, la disregulación del sistema inmunitario no sólo afecta al sistema inmune adaptativo como inicialmente se pensaba, sino que también implica a células del **sistema inmune innato**. Entre estas últimas se encuentran las CPA que tienen la capacidad de presentar los antígenos a los LT CD4+ y producir su activación, así como los macrófagos y microglía que colaboran promoviendo y perpetuando la inflamación dentro del SNC<sup>[14]</sup>.

A diferencia de los LT CD4+, los **LT CD8+** contribuyen al desarrollo de la EM al provocar la apoptosis de los oligodendrocitos a través de la secreción de mediadores citotóxicos (granzimas y perforina) lo que provoca daño axonal<sup>[61]</sup>.

La contribución de los **linfocitos B (LB)** en la patogenia de la EM ha sido menos estudiada. Se sabe desde hace años que los pacientes con EM presentan BOC en el LCR, y que los anticuerpos específicos frente a la mielina tienen un papel patogénico en la EAE. No obstante, no ha sido hasta los últimos años en que se ha reconocido la importancia crucial de dichas células en el desarrollo de la EM. Además de ser capaces de generar anticuerpos autorreactivos y contribuir al daño tisular del SNC mediante la secreción local de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF, GM-CSF), los LB tiene la capacidad de actuar como CPA presentando antígenos propios a los LT. Este papel se ha visto ratificado a través del modelo de EAE donde la eliminación de la expresión del MHC clase II en los LB del modelo confiere resistencia a la enfermedad<sup>[59,62,63]</sup>.

Por otro lado, los LB en el SNC constituyen folículos linfoides terciarios en las meninges de los pacientes con EM. Estos folículos han sido relacionados con el tamaño y número de lesiones corticales, el grado de neurodegeneración cortical y la discapacidad [64,65]. Finalmente, la implicación de los LB ha sido fuertemente avalada por los resultados positivos obtenidos del ensayo clínico con Ocrelizumab, una terapia anti-CD20<sup>[66]</sup>.

### 1.2.1. La célula dendrítica

La célula dendrítica (CD), forma parte del sistema inmune innato y es la CPA por excelencia. Su función principal consiste en preservar el balance entre inmunidad y tolerancia, gracias a su capacidad de determinar, según las señales que recibe, el tipo de estímulo adecuado para estimular a los LT naïve y generar una respuesta inmune.

Respecto a la patogenia de la EM, se postula que, o bien las CD maduras cargadas con los antígenos son drenadas desde el SNC a los ganglios linfáticos periféricos, o bien los antígenos son drenados desde el SNC para encontrarse en el ganglio linfático con la CD<sup>[67]</sup>. Es aquí, donde las CD presentan diferentes tipos de antígenos (entre ellos los antígenos de

la mielina) a los LT naïve mediante la interacción del péptido-MHC con el receptor T, las moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias, como la IL-12 o la IL-23. Así se produce la activación de dichos linfocitos y la generación de los LT CD4+ Th1 o Th17 autorreactivos frente a proteínas de la mielina. Estos LT con capacidad autorreactiva producen mayor secreción de citocinas proinflamatorias, facilitando su entrada al SNC a través de la BHE. Una vez dentro, CD residentes en el SNC junto con otras CPA, presentan a los LT autorreactivos antígeno-específicos, epítomos derivados de la mielina, provocando su reactivación y, como consecuencia, la puesta en marcha de la cascada inflamatoria<sup>[68,69]</sup>.

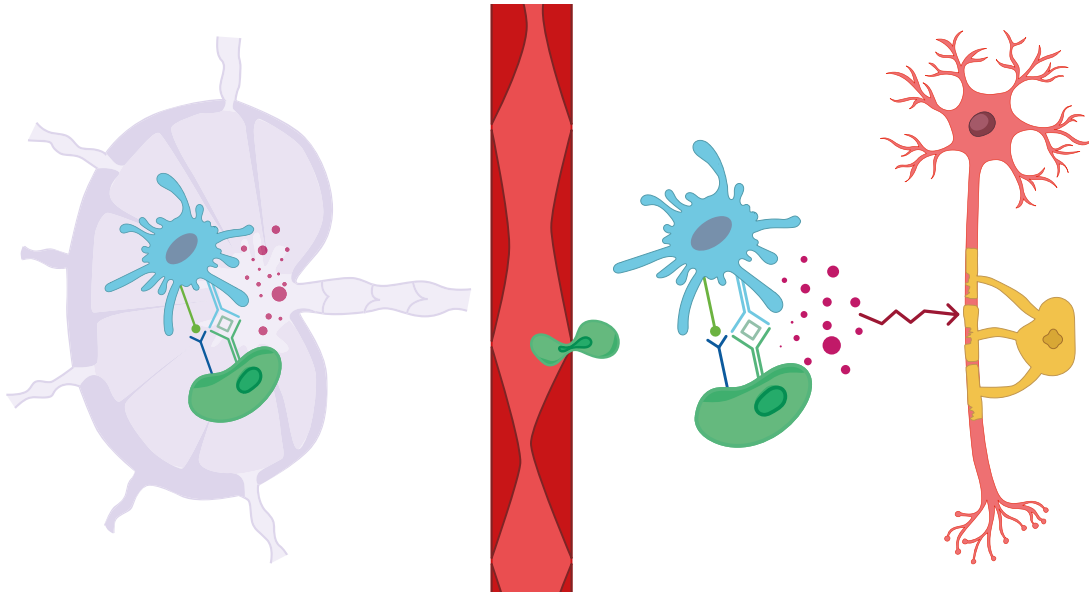


Figura 5. Papel de la célula dendrítica en la patogénesis de la EM.

En condiciones normales es posible encontrar CD en las meninges, los plexos coroideos y el LCR, pero no en el parénquima cerebral. Algunos estudios han demostrado la presencia de cúmulos de CD tanto en las leptomeninges como en las lesiones de sustancia blanca de cerebros de pacientes con EM<sup>[70]</sup>. También se ha observado que la presencia de CD en el LCR es más frecuente en pacientes con EM que en pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias. Además, existe una correlación inversa entre el número de CD que tienen los pacientes con el tiempo de evolución de la enfermedad (siendo mayor en estadios precoces) así como una relación directa con la actividad inflamatoria, al evidenciarse un incremento de las CD en LCR durante el brote<sup>[71,72]</sup>.

Por otro lado, se han descrito diferentes tipos de CD en relación con su fenotipo y funcionalidad. Dos de estos subtipos principales son las CD mieloides o convencionales (CDc) y las CD plasmocitoides (CDp). Las primeras expresan CD11c, HLA-DR, antígeno de células dendríticas sanguíneas (BDCA)-1 (también conocido como CD1c) y expresan fuertemente el receptor tipo Toll (TLR)2 y TLR4 activando al LT y secretando grandes cantidades de IL-12p70. No obstante, las CDc pueden dar una respuesta Th1 o Th2 dependiendo del entorno inflamatorio en el que se encuentren. Además, son precursoras de CD de Langerhans y CD intersticiales. Las CDp tiene un fenotipo caracterizado por expresar CD11c-HLA-DR+CD123, así como TLR7 y TLR9 y al activarse producen cantidades significativas de interferón tipo I<sup>[73]</sup>.

Otro tipo de CD es la CD folicular, que se encuentra en los órganos linfoides secundarios y terciarios y cuya función principal es contribuir a la maduración de los LB mediante la presentación antigénica<sup>[74]</sup>. Se ha observado que el fenotipo de las CD varía según el curso clínico de la EM. En este sentido, los pacientes con una EMRR o una EMSP tienen CD circulantes que muestran un fenotipo más maduro y una expresión más pronunciada de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) y citocinas proinflamatorias. Por el contrario, las CD de los pacientes con EMPP tienen un fenotipo más inmaduro con una reducida expresión de estos marcadores<sup>[69]</sup>.

### 1.2.2. Péptidos de mielina como autoantígenos

Varios antígenos del SNC han sido estudiados mediante modelos animales de EAE demostrando su potencial encefalitogénico. Además, se ha hallado un incremento de varios de estos antígenos en la sangre periférica de los pacientes, así como un aumento de la proliferación celular de los LT CD4+ frente a dichos antígenos, identificándolos como dianas de la respuesta inmune anómala que presentan los pacientes con EM. Los principales antígenos estudiados son péptidos de las proteínas de la mielina como la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) o la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG)<sup>[75]</sup>.

Un estudio de reactividad celular T que investigaba la respuesta de varios epítomos de estas proteínas de mielina observó una mayor reactividad de los LT CD4+ frente a los siguientes epítomos: MBP13-32, MBP111-129, MBP146-170, PLP139-154, MOG1-20 y MOG35-55<sup>[76]</sup> por lo que fueron considerados los más inmunodominantes. Además, el epítomo MBP83-99, que en este estudio fue considerado como subdominante debido a no encontrarse diferencias significativas entre los pacientes con EM y los controles sanos, también se había postulado como uno de los antígenos con potencial encefalitogénico al observarse una exacerbación de la EM en algunos de los pacientes que recibieron un ligando peptídico alterado de MBP83-99 a través de un ensayo clínico fase II<sup>[77]</sup>.

Con estos datos de la literatura, nuestro grupo evaluó la proliferación de las células T frente a este pool de 7 péptidos de la mielina (considerados como los más encefalitogénicos) en 42 pacientes con EMRR, 15 con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y 18 controles sanos, y se detectó una respuesta positiva en el 74% de los pacientes con EM, 40% de los pacientes con otras enfermedades y el 30% de los controles, manteniéndose estable durante los 12 meses de seguimiento en la mayoría de casos (78%). Además, se encontró una correlación entre la reactividad LT a los péptidos y la actividad clínica, observándose mayor índice de reactividad en pacientes con mayor discapacidad, menor tiempo libre de brotes y mayor frecuencia de los mismos<sup>[78]</sup>.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, estos péptidos de mielina se han propuesto como dianas para el desarrollo de terapias celulares antígeno-específicas en EM, que se desarrollarán más adelante en la presente tesis.

### 1.2.3. El drenaje linfático del SNC

Aunque el SNC había sido considerado clásicamente un órgano inmunoprivilegiado gracias a la existencia de la BHE y la ausencia de vasos linfáticos convencionales, sabemos que ocurren reacciones inmunomediadas en el contexto de enfermedades autoinmunes como la EM.

Una de las teorías más aceptadas sobre el drenaje linfático de las CD es que, en su camino hacia el ganglio linfático periférico, viajan a través del LCR por los ventrículos y los espacios subaracnoideos, atraviesan la lámina cribiforme por los espacios perineurales y periarteriales de las fibras nerviosas del nervio olfatorio, y pasan a los vasos linfáticos aferentes de la mucosa nasal, para llegar finalmente a los ganglios linfáticos cervicales profundos<sup>[79]</sup>. Más recientemente se ha descubierto la existencia de estructuras linfáticas en las meninges del SNC, por lo que es posible que éstas participen en la absorción del LCR y de las células inmunes circulantes en él. Sin embargo, los detalles acerca de cómo funcionan estos vasos linfáticos meníngeos están aún por dilucidar<sup>[80]</sup>.

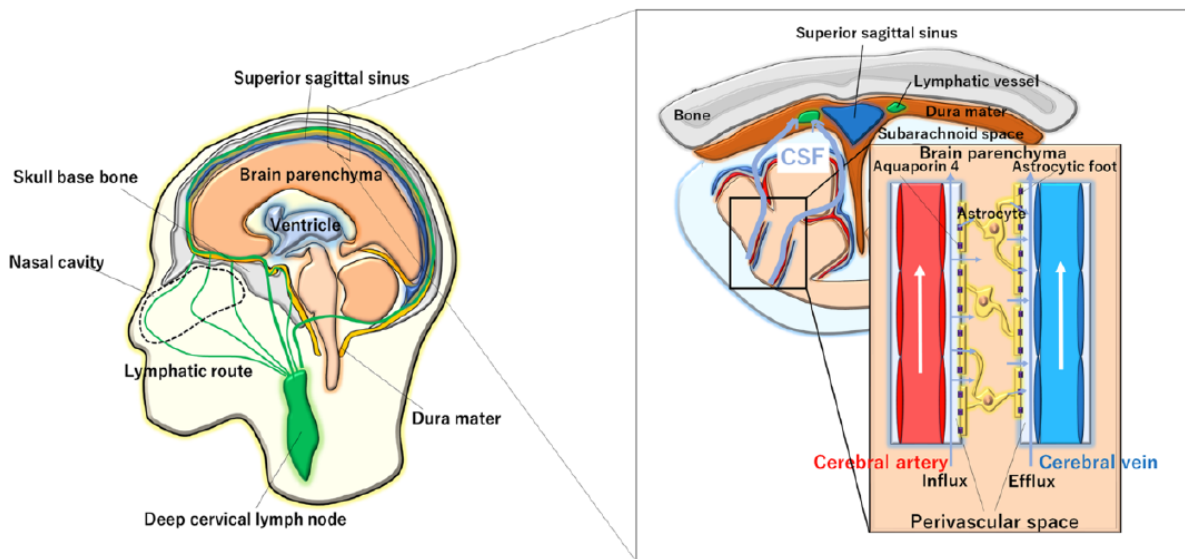


Figura 6. Mecanismo del drenaje linfático del SNC, desde los vasos linfáticos meníngeos hasta los ganglios linfáticos cervicales profundos (figura de Tamura et al. 2020).

Dado que los ganglios linfáticos cervicales son considerados la primera estación de drenaje desde el SNC, se plantea que podrían tener un papel clave en la inducción de tolerancia a las proteínas del SNC<sup>[79]</sup>.

### 1.3. Terapias celulares inductoras de tolerancia

El concepto de tolerancia inmunológica se define como la falta de respuesta inmune específica frente a un antígeno inducida por el contacto previo con dicho antígeno. La relación entre tolerancia e inmunidad es dinámica y se denomina “dicotomía del sistema inmune”. Es así porque el sistema inmune tiene la capacidad de discriminar entre lo propio y lo extraño con el objetivo de mantener la tolerancia inmunológica frente a los antígenos propios, pero a su



vez, generar una respuesta inmune frente a los patógenos y células malignas. La pérdida o fallo en los mecanismos de tolerancia puede desencadenar el desarrollo de patologías autoinmunes, como es el caso de la EM.

En los últimos años han emergido diversas líneas de investigación en terapias celulares enfocadas a restaurar la tolerancia perdida en diferentes patologías, especialmente autoinmunes, alergias y trasplante. El atractivo de estas terapias se basa en que tienen un bajo potencial de toxicidad, los costes de la producción celular son más económicos que la mayoría de los tratamientos utilizados actualmente para estas enfermedades, y además se plantea que el efecto terapéutico de estas terapias podría tener una duración prolongada en el tiempo (más allá que la propia vida de las células)<sup>[81]</sup>.

### 1.3.1. Mecanismos de tolerancia inmunológica

Nuestro propio sistema inmunitario tiene diversos mecanismos que ayudan a mantener la tolerancia inmunológica. Un mecanismo primario es la denominada tolerancia central, cuyo objetivo es eliminar aquellos linfocitos T o B autorreactivos, y para cuando esta fracasa, tenemos los mecanismos de tolerancia periférica enfocados a desactivar los linfocitos autorreactivos que sobreviven<sup>[82,83]</sup>:

- **Tolerancia central:** Se adquiere de forma temprana, durante el desarrollo del sistema inmune, desde el estadio fetal hasta los primeros meses de vida. Consiste en la delección de clones autorreactivos de LT y LB durante su maduración en los órganos centrales, el timo y la médula ósea respectivamente. Las CPA del timo presentan los antígenos propios a los LT en desarrollo. Los LT que tienen una moderada afinidad para reconocer los péptidos propios, consiguen completar su maduración, salir del timo y dirigirse a los órganos linfoides secundarios. Esto se conoce como selección positiva. Sin embargo, si el LT en desarrollo presenta receptores con muy alta afinidad frente a antígenos propios, son eliminados mediante apoptosis (selección negativa) o modificando la afinidad del receptor (edición del receptor).
- **Tolerancia periférica:** Algunos linfocitos altamente autorreactivos consiguen escapar de la tolerancia central, por lo que existen otros mecanismos de control que actúan sobre los linfocitos maduros en los órganos periféricos: anergia (falta de señal de las moléculas coestimuladoras CD28), ignorancia inmunológica (ausencia de activación por estar en bajas concentraciones o en sitios inmunoprivilegiados), delección clonal periférica (apoptosis del LT autorreactivo mediante la expresión de Fas-L, inducida por los autoantígenos) y células T reguladoras (anteriormente llamado mecanismo de supresión, LT reguladores inhiben a otros LT mediante la producción de citocinas inhibitorias). Estos mecanismos actúan durante toda la vida del individuo.

### 1.3.2. Estrategias terapéuticas utilizadas en EM

Las estrategias terapéuticas inductoras de tolerancia más desarrolladas en este ámbito son las terapias con células mononucleares autólogas de sangre periférica (PBMC) unidas a péptidos fijados, células T reguladoras y CPA tolerogénicas, principalmente CD.

#### Terapia con PBMC con péptidos fijados

Se trata de una de las primeras aproximaciones a una terapia tolerogénica antígeno-específica probada en pacientes con EM. Los estudios con modelos de EAE habían mostrado potenciales beneficios tanto en la prevención como en la reducción de la gravedad de la enfermedad<sup>[84]</sup>.

El ensayo clínico ETIMS realizado en 10 pacientes, utilizó PBMC unidas químicamente al pool de 7 péptidos de mielina comentados en el apartado correspondiente (MOG<sub>1-20</sub>, MOG<sub>35-55</sub>, MBP<sub>13-32</sub>, MBP<sub>83-99</sub>, MBP<sub>111-129</sub>, MBP<sub>146-170</sub>, y PLP<sub>139-154</sub>). Las células fueron administradas en una única infusión vía intravenosa. El ensayo mostró que la terapia era viable y segura, y encontró una reducción en la respuesta T antígeno-específica en los que recibieron la dosis más alta del producto. Sin embargo, 2 de estos pacientes que, además, tenía una enfermedad muy activa a nivel basal, presentaron brotes y actividad radiológica en las 2 semanas siguientes a la administración de la terapia por lo que los autores exponen que no pueden excluir que esos eventos estuvieran relacionados con la terapia<sup>[85]</sup>.

#### Terapia con células T reguladoras

Las células T reguladoras tienen como función suprimir y regular la respuesta inmunológica excesiva de otras células. Así, por ejemplo, pueden controlar la función de los LT efectores activados, e incluso inhibir a las CPA, las NK, los LB y otras células del sistema innato<sup>[86]</sup>. Ya en 1995, un experimento en un modelo murino mostró que la falta de diferenciación a células T CD4+CD25+ provocaba una disfunción multiorgánica autoinmune<sup>[87]</sup>. Posteriormente, se identificó que ello era debido a una mutación en el gen FoxP3+<sup>[88]</sup>. La utilidad de las células T reguladoras como terapia ha sido explorada tanto en trasplante como en enfermedades autoinmunes<sup>[89]</sup>.

Los pacientes con EM tienen una pérdida significativa de la función de estas células reguladoras en sangre periférica en comparación con controles sanos<sup>[90]</sup>. Experimentos en modelos de EAE han demostrado la remisión o prevención de la enfermedad tras la inducción de células T CD4+CD25+<sup>[91,92]</sup>. Un ensayo clínico recientemente publicado, ha confirmado que la administración de células T reguladoras CD4+CD25<sup>high</sup>CD127+FoxP3+ vía intravenosa e intratecal es una terapia segura, y sus resultados han sugerido que la vía intratecal podría ser más prometedora que la intravenosa por observarse menor actividad clínica y radiológica en estos pacientes. No obstante, el bajo número de pacientes del grupo con administración intratecal (n=3, vs n=10 vía intravenoso) hace necesario que estos resultados sean confirmados<sup>[93]</sup>.

#### Terapia con CD tolerogénicas

Se explica detalladamente en el siguiente apartado.

### Otras terapias celulares

Pese a que no se trata de una terapia inductora de tolerancia propiamente dicha, cabe destacar la **terapia con células madre mesenquimales** ya que ha sido una de las más investigadas hasta la fecha en EM. Éstas son células estromales precursoras que se encuentran en diversos tejidos, incluida la médula ósea, donde contribuyen a la hematopoyesis. En los modelos de EAE, las células mesenquimales demostraron tener potencial antiinflamatorio e inmunomodulador, así como la capacidad de generar remielinización y neurogénesis<sup>[94,95]</sup>. Estos alentadores resultados impulsaron el desarrollo de diversos ensayos clínicos en pacientes con EM en diferentes países. Varios de estos ensayos se englobaron dentro del ensayo clínico multicéntrico MESEMS que ha publicado sus resultados recientemente. Con un total de 144 pacientes incluidos que recibieron las células mesenquimales en una única infusión vía intravenosa, el estudio concluye que, pese a ser una terapia segura, no se ha conseguido demostrar la eficacia deseada<sup>[96]</sup>.

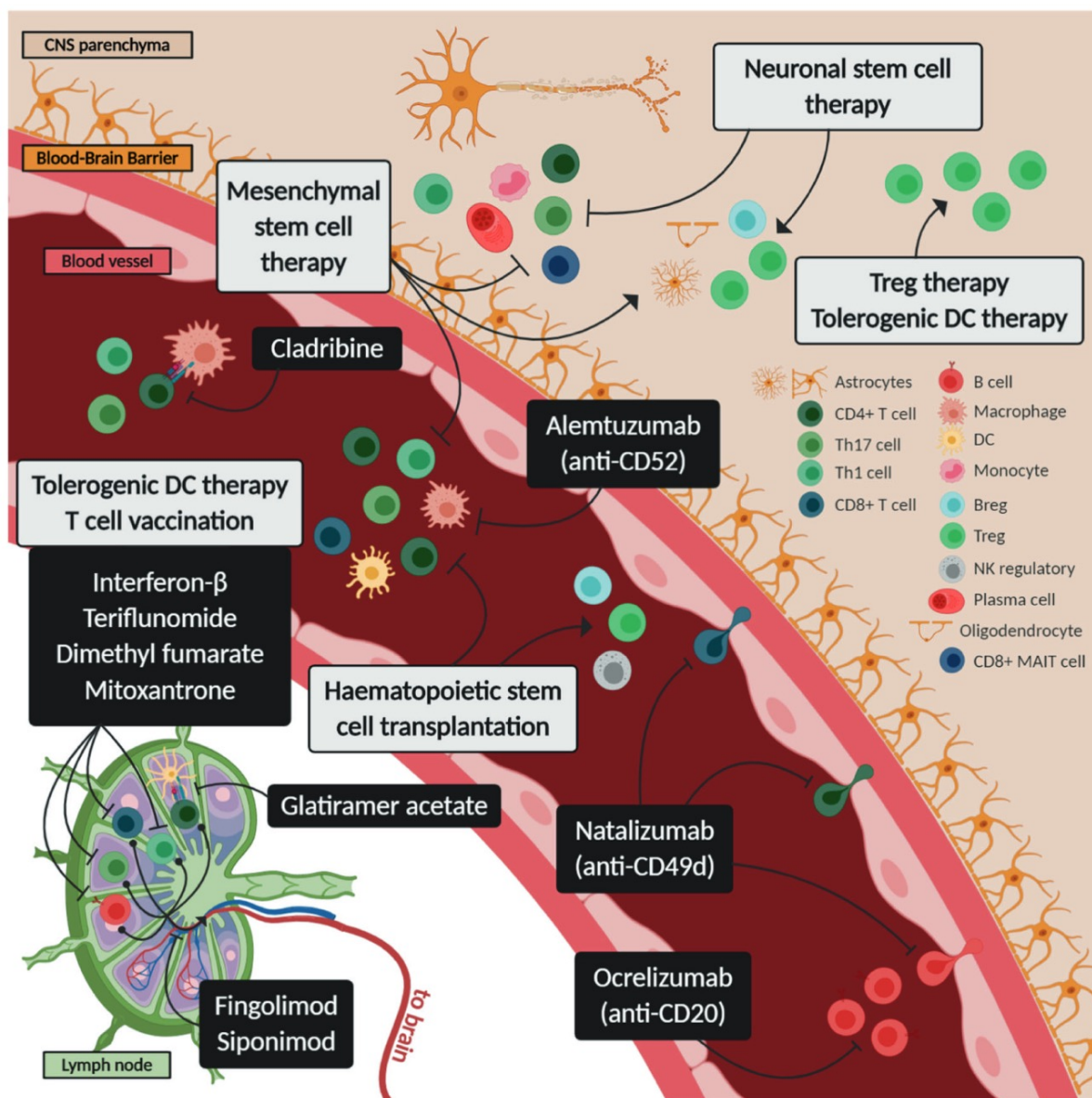


Figura 7. Mecanismo de acción de los tratamientos farmacológicos actuales y las terapias celulares mencionadas que intervienen en la patogénesis de la enfermedad. Los fármacos actuales en recuadro negro, y las terapias celulares en blanco (Mansilla et al 2021).

## 1.4. Estudios pre-clínicos con células dendríticas tolerogénicas

### 1.4.1. La célula dendrítica tolerogénica

La CD tolerogénica (CDtol) es una CD con un fenotipo estable de semi-maduración, es decir, un fenotipo resistente a la maduración o que presenta un estado intermedio de maduración. No está claro si se pueden considerar un subtipo de CD diferente por sí misma.

Se caracterizan por: bajos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras (es decir, CD80, CD86 y CD40) y complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II; capacidad reducida para producir citocinas proinflamatorias, expresión regulada al alza de moléculas inhibitoras como PDL1, ILT3 e ILT4 y secreción de citocinas inmunorreguladoras y mediadores (IL-10, TGF- $\beta$ , IDO, hemo oxigenasa-1 o FasL). Las CDtol actúan sobre los LT, induciendo tolerancia a través de diversos mecanismos: inducción de anergia del LT, apoptosis o la inducción de la diferenciación de las células T a Treg<sup>[97,98]</sup>.

En los últimos años varios grupos de investigación han diseñado protocolos para generar CDtol ex vivo autólogas, con el objetivo de poder utilizarlas en pacientes con patologías autoinmunes o sometidos a trasplante de órgano sólido, con la intención de restaurar la tolerancia inmune frente a determinados autoantígenos. En la mayoría de estos protocolos las CDtol se obtiene de los monocitos en sangre periférica, que se cultivan en presencia de factores estimulantes de colonias de granulocitos (GM-CSF) e interleukina 4 (IL-4), y algún agente farmacológico inductor de tolerancia. Posteriormente es necesario añadir un cóctel de citoquinas (por ejemplo: TNF $\alpha$ , PGE2, IL1b) así como los antígenos frente a los que se quiere inducir tolerancia<sup>[98,99]</sup>.

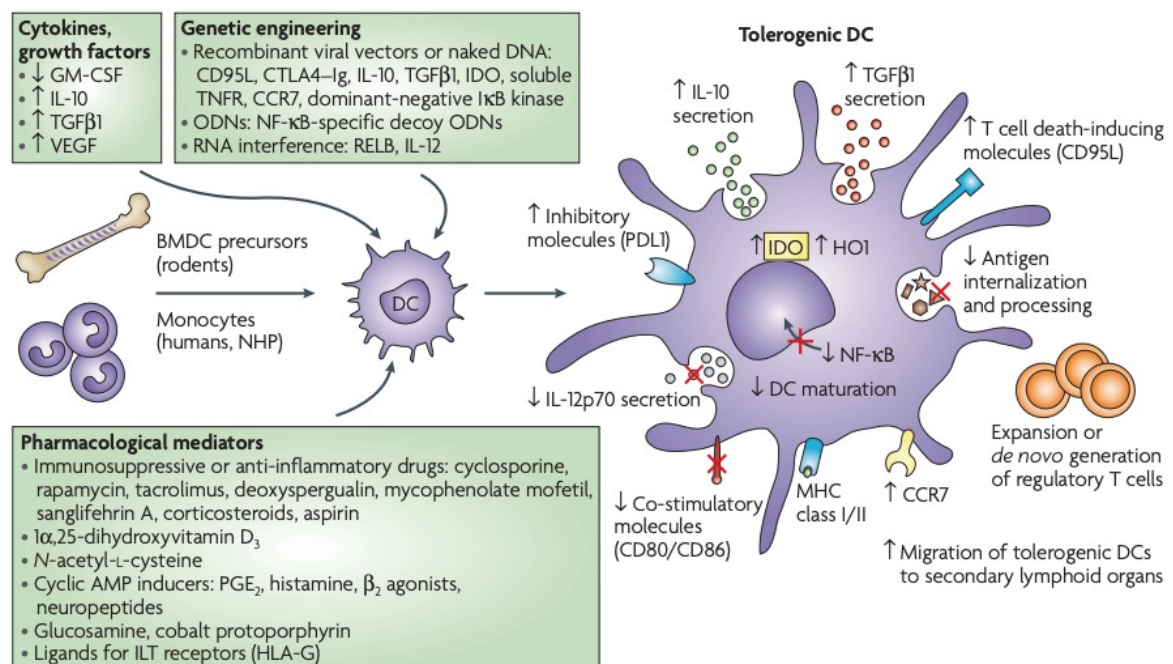


Figura 8. Generación de CDtol in vitro y las características funcionales que adquieren las CDtol generadas (figura de Morelli et al. 2007).

A continuación, analizaremos los estudios pre-clínicos que han llevado al desarrollo de la terapia celular con CDtol que se ha utilizado en la presente tesis.

### 1.4.2. Agentes tolerogénicos

Diversos agentes han mostrado su utilidad para inducir la producción de CDtol a partir de monocitos de sangre periférica, aunque se han hallado algunas diferencias entre ellos. Un estudio comparativo realizado por nuestro grupo evaluó el efecto de 3 de los principales agentes tolerogénicos estudiados (dexametasona (Dexa), vitamina D3 (VitD3) y rapamicina (Rapa)), sobre la viabilidad, la diferenciación celular, el fenotipo y la funcionalidad de las CDtol generadas. Los resultados mostraron que las CDtol inducidas por VitD3 tenían una viabilidad y rendimiento ligeramente reducidos, pero presentaban un fenotipo similar a las CD inmaduras y una producción moderada de IL-10. Las CDtol inducidas por Dexa también presentaban un fenotipo inmaduro y una óptima producción de la IL-10. Sin embargo, esto no ocurría con las CDtol inducidas por Rapa, en el que sus CD mostraban un fenotipo maduro. Sin embargo, estas últimas eran capaces de inducir la diferenciación de LT hacia Treg (CD4+CD25+ FOXP3+). En todos los casos, los perfiles de secreción de citocinas de las CDtol generadas no se modificaron mediante la estimulación con un lipopolisacárido (endotoxina) permaneciendo estables. Además, se indujo una clara reducción en la proliferación de LT aloantígenos y de la producción de IFN $\gamma$ <sup>[100]</sup>.

Considerando la vitamina D3 como un prometedor agente tolerogénico, determinamos los niveles en plasma de vitamina D3 (25(OH)D) de un grupo de pacientes con EM (EMPP n=15; EMRR n=40) y de controles sanos (n=40) y estudiamos su relación con la proliferación de LT frente a los péptidos de mielina. Observamos que los pacientes con una EMRR tenían niveles claramente más bajos de 25(OH)D que los controles sanos, y además los pacientes con EM mostraban mayor la proliferación LT cuanto menor era su nivel de 25(OH)D. Estos resultados apoyaban el potencial inmunomodulador de la vitamina D3 y su papel regulador sobre la proliferación LT antígeno-específica<sup>[101]</sup>.

Por otro lado, el piruvato de etilo (PE), un análogo redox del dimetilfumarrato (Tecfidera), uno de los fármacos actuales para el tratamiento de la EM, ha sido estudiado por nuestro grupo y otros colaboradores como potencial agente tolerogénico para inducir CDtol. Los análisis fenotípicos en las CDtol generadas desde monocitos de muestras de pacientes con EMRR sin tratamiento y muestras de donantes sanos, encontraron una reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras, así como una restricción de la proliferación de los LT alogénicos, demostrando la capacidad del PE para generar CDtol<sup>[102]</sup>.

### 1.4.3. Estudios in vitro con CDtol de pacientes con EM

En 2012, nuestro grupo de investigación publicó un trabajo que tenía como objetivo generar y caracterizar CDtol en pacientes con EMRR, cargadas con péptidos de mielina, con el fin de desarrollar una terapia celular para la enfermedad. En este trabajo, se generaron CD derivadas de monocitos de sangre periférica de pacientes con EMRR (estables y sin TME) y de

controles sanos. Las CD se maduraron en cultivo con un cóctel de citocinas proinflamatorias y en ausencia o presencia de vitamina  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin-D3 (1,25(OH)2D3), potente agente inductor de tolerancia. Las CDtol de pacientes con EMRR mostraron un fenotipo semimaduro estable y un perfil antiinflamatorio. Además, las CDtol cargadas con péptidos de mielina, inducían una hiporrespuesta de los LT frente a dichos péptidos. Estos hallazgos sugerían que esta terapia podría ser capaz de inducir tolerancia antígeno-específica en pacientes con EM<sup>[103]</sup>.

Posteriormente, otro grupo de investigadores, colaboradores nuestros, replicó nuestros resultados en una muestra de pacientes con EM más heterogénea (diferentes fenotipos de EM, y con/sin TME), y además evaluó la capacidad de las CDtol tratadas con 1,25(OH)2D3 y cargadas con péptidos de mielina, tras congelación-descongelación. Encontraron que estas CDtol tenían un rendimiento del 78% y una viabilidad del 75% tras la descongelación, y que la criopreservación no afectaba a la expresión de sus marcadores de membrana ni a la inducción de la hiporrespuesta celular T frente a los péptidos de mielina<sup>[104]</sup>.

Con el fin de la traslación de las CDtol a la clínica, nuestro grupo también ha trabajado en la búsqueda de biomarcadores para las CDtol-VitD3 que ayuden al desarrollo de esta terapia celular. Los estudios de transcriptómica y expresión de genes analizados identificaron 2 genes, MAP7 y MUCL1, como biomarcadores robustos y potencialmente funcionales, lo que plantea la posibilidad de su uso como controles de calidad en los ensayos clínicos que utilizan esta terapia<sup>[105]</sup>. En esta misma línea y más recientemente, se ha estudiado el perfil transcriptómico de los LT CD4+ modulados por las CDtol-VitD3, evidenciando una significativamente baja modulación de genes implicados en el ciclo celular y respuesta a estímulos principalmente proinflamatorios, destacando el papel del gen JUNB como posible biomarcador de estos procesos<sup>[106]</sup>. No obstante, este trabajo ha sido realizado en muestras de donantes sanos y no con muestras de pacientes con EM.

#### 1.4.4. Estudios in vivo con CDtol: modelos de experimentación animal

En el camino para conseguir una traslación de la terapia celular con CDtol a la práctica clínica, nuestro grupo investigó el efecto de las CDtol-VitD3 pulsadas con el péptido MOG40-55 en un modelo de EAE. La administración intravenosa de la terapia consiguió disminuir la incidencia de la enfermedad cuando se aplicaba en la fase pre-clínica, y redujo su gravedad cuando se administraba posteriormente a la aparición de los síntomas. Este efecto era mediado por el incremento en los LT reguladores y en producción de IL-10, así como por la reducción de la proliferación linfocitaria antígeno-específica. También se encontró que el efecto terapéutico era transitorio y que, por lo tanto, precisaba de repetidas administraciones para obtener una estabilidad clínica. Además, se realizó un seguimiento de trazabilidad celular en los ratones y se observó que las CDtol-VitD3 administradas vía intravenosa migraban principalmente a pulmones, hígado y bazo, detectándose sólo transitoriamente en cerebro, por lo que parecía que no era necesario que las CDtol pasaran la BHE para ejercer su función<sup>[107]</sup> (Figura 9).

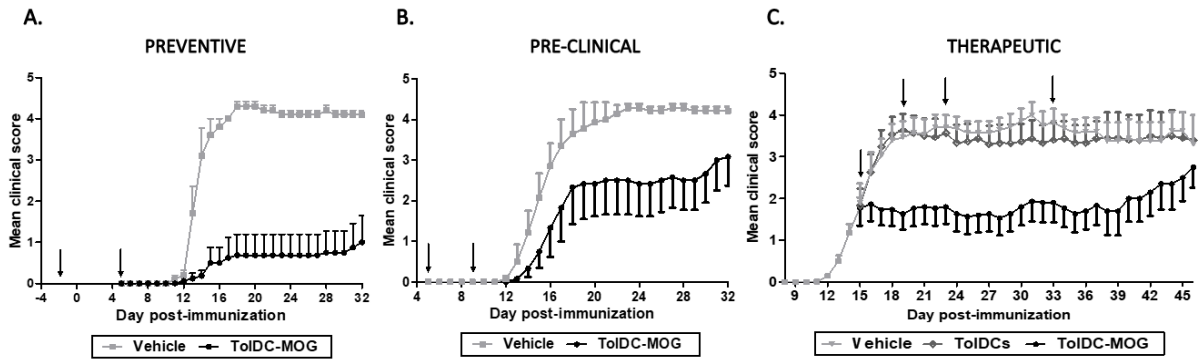


Figura 9. Resultados del estudio con CDtol-VitD3 pulsadas con MOG40-55 en un modelo de EAE en ratón. La terapia se probó en 3 fases diferentes para probar su efecto en cada uno de los supuestos: de forma preventiva (A), preclínica (B) y de forma terapéutica (C) (figura de Mansilla et al. 2015).

Siguiendo la misma línea, también demostramos que era posible criopreservar esta misma terapia (CDtol-VitD3-MOG) y posteriormente descongelarla para su administración, manteniendo su efectividad en el modelo de EAE. Este hecho ha sido clave para su potencial aplicabilidad en la práctica clínica en humanos<sup>[108]</sup>.

En este contexto, Xie et al [109], describieron que las CDtol-VitD3 en EAE además de incrementar los linfocitos reguladores y las IL-10, también ejercen una reducción en la infiltración de células Th1 y Th17 dentro de la médula espinal.

Otros trabajos realizados en modelos de EAE han utilizado diferentes estrategias para generar CDtol, por ejemplo, por electroporación con mRNA de MOG, consiguiendo también estabilidad clínica en la EAE<sup>[110]</sup>.

Así mismo, se han descrito otras moléculas como agentes tolerogénicos: K313, cloroquina, tofacitinib, BD750, IL-35, LPS y timocitos apoptóticos. Algunos de ellos también han demostrado su efecto beneficioso en el modelo de EAE tanto a nivel terapéutico como profiláctico (revisado en Mansilla et al. 2021<sup>[111]</sup>).

## 1.5. Ensayos clínicos con células dendríticas tolerogénicas

Los resultados de los estudios pre-clínicos no sólo en el área de la EM sino también en otras patologías, impulsaron el desarrollo de ensayos clínicos fase I para probar esta estrategia terapéutica en humanos. A pesar de que la extrapolación directa de la dosis y la vía de administración adecuada de CDtol desde modelos EAE a los humanos no era posible, sí que proporcionaba información acerca de los potenciales beneficios de la terapia y sobre la duración del efecto de las CDtol, planteando que podía ser transitorio y que requería de repetidas dosis para mantener dicho efecto<sup>[108]</sup>.

Los primeros ensayos clínicos con esta terapia se realizaron en otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1, la artritis reumatoidea y la enfermedad de Crohn<sup>[112]</sup>. Asimismo, se investigó su utilidad en el campo de las alergias (NCT01711593)

y los trasplantes alogénicos de órgano sólido<sup>[113]</sup>. Finalmente, y siguiendo el ejemplo de las patologías mencionadas, se impulsaron 3 ensayos clínicos para evaluar la seguridad y tolerabilidad de la CDtol en los pacientes con EM, siendo uno de ellos el motivo de esta tesis.

### 1.5.1. Vía de administración

Se desconoce cuál es la mejor vía de administración para la utilización de la terapia con CDtol, aunque se considera que puede tener un papel crucial en el potencial efecto de la misma. Su relevancia está en que las CDtol deberían llegar, o bien al órgano diana para reducir la inflamación in situ, o bien a los ganglios linfáticos de drenaje de dicho órgano diana para intervenir en la presentación antigénica a los LT<sup>[81]</sup>.

Las CDtol tienen una baja capacidad para migrar a los ganglios linfáticos, debido a la reducida expresión de CCR7<sup>[114]</sup>, lo que podría disminuir su efectividad dependiendo de la vía de administración. No obstante, un estudio observó que las CD derivadas de monocitos de pacientes con EM tenían una expresión mayor de CCR7 en comparación con los controles<sup>[115]</sup>.

Posiblemente la vía más utilizada hasta la fecha ha sido la intradérmica, si bien se han utilizado otras vías como la intravenosa, la subcutánea o incluso la intraarticular o la intraperitoneal, en el caso de la Artritis Reumatoide y la enfermedad de Crohn respectivamente (ver apartado siguiente). La administración directamente intraganglionar de CD ha sido una vía explorada en otras patologías como en alergias y sobre todo en cáncer, mostrándose como una opción segura y viable. No obstante, las CD que se utilizan en cáncer no son tolerogénicas, sino al contrario, son CD maduras capaces de generar una respuesta T específica frente a los antígenos del tumor<sup>[116]</sup>.

Existen estudios en cáncer que comparan las diferentes vías de administración. Algunos de ellos han demostrado una mejor capacidad de migración de las CD si se administran de forma intradérmica que de forma subcutánea<sup>[117-120]</sup>. También se ha visto que las CD administradas vía intravenosa circulaban de forma transitoria por los pulmones y posteriormente se mantenían en hígado y bazo durante al menos 7 días, mientras que con la administración intraganglionar las CD migraban a los ganglios linfáticos de drenaje y permanecían allí más de 24h<sup>[121]</sup>. Existen algunos ensayos que han comparado las 3 vías de administración, la vía intradérmica, intravenosa e intraganglionar, observando que todos los pacientes desarrollaban respuesta inmune T antígeno-específica pero sólo presentaron inducción de la producción de IFN $\gamma$  a los que se le administró vía intradérmica e intraganglionar. Por el contrario, se encontraron anticuerpos antígeno-específicos en más pacientes que recibieron las CD por vía intravenosa que por las otras vías<sup>[122]</sup>. Un segundo ensayo que comparó estas 3 vías, demostró que todas las vías eran viables y seguras, pero que la administración intraganglionar parecía superior en cuanto a generar una mayor respuesta T CD8+ específica<sup>[123]</sup>. Sin embargo, un estudio similar concluyó que la vía intradérmica era superior a la intraganglionar induciendo células T tumor-específicas<sup>[124]</sup>. Gracias a un ensayo clínico que comparó las vías intradérmica e intraganglionar con un radiotrazador mediante gammagrafía sabemos que las CD inyectadas en los ganglios linfáticos migraban a cadenas ganglionares profundas de forma más eficaz



que en las inyectadas intradérmicamente. Sin embargo, en aproximadamente 1/3 de los pacientes no se observaba esta distribución, por lo que los investigadores planean que pueda ser debido a que las CD hayan sido inyectadas, no intencionadamente, en la región periganglionar, en vez de intraganglionar<sup>[125]</sup>.

Algunos investigadores han dilucidado que la necesidad de admisiones repetidas de estas terapias podría limitar la viabilidad de la vía intraganglionar. En este sentido, un estudio utilizó un dispositivo implantable de liberación prolongada y repetitiva para la infusión de las CDtol concluyendo que era una opción viable y bien tolerada. Sin embargo, no podía mantenerse a largo plazo (>7.5 semanas) por riesgo de infección<sup>[126]</sup>.

Como se puede observar existen controversias sobre el beneficio de una vía de administración sobre otra debido a la falta de datos consistentes en los diferentes estudios. En su conjunto, la mayoría de estos trabajos parecen apuntar a que las vías de administración más eficaces podrían ser la intradérmica o la intraganglionar.

Considerando todo lo mencionado, nos planteamos la administración de CDtol vía intraganglionar en los ganglios cervicales directamente conectados con la cadena de drenaje linfático del SNC como una alternativa potencialmente eficaz para pacientes con EM. Esta idea parte de la hipótesis de que en dichos ganglios se produce el drenaje de los antígenos derivados del SNC y, en el contexto de una EM, las CD que llegan al ganglio presentarían los antígenos a los LT de forma inmunogénica. Sin embargo, si gracias a la administración de CDtol se consiguiera generar en el ganglio un ambiente tolerogénico, estas células podrían emitir señales de tolerancia a los LT y evitar que se activaran de forma patogénica.

### 1.5.2. Ensayos clínicos con CDtol en otras enfermedades autoinmunes

La prevalencia de las enfermedades autoinmunes ha aumentado en los últimos años. Se estima que, a nivel mundial, 1 de cada 10 personas padece una enfermedad autoinmune (7.6 - 9.4%)<sup>[127]</sup>. La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), la artritis reumatoide (AR) y la enfermedad de Crohn (EC) tienen en común con la EM, que son enfermedades autoinmunes inflamatorias crónicas en las que se ven involucrados factores genéticos y factores ambientales. Todo ello induce en los pacientes predispuestos una disregulación del sistema inmunitario que genera una hiperactivación de la respuesta inmunitaria con una pérdida de los mecanismos de tolerancia. Además, también tienen en común que, a pesar de tener tratamientos para el control de la enfermedad (fármacos inmunosupresores o sustitutivos como el caso de la insulina para la DM1), no tienen un tratamiento curativo. Esto ha generado que algunos investigadores hayan decidido explorar el beneficio de la inmunoterapia con CDtol en estas patologías<sup>[112]</sup>.

#### Diabetes Mellitus tipo 1

Hasta la fecha se han puesto en marcha 4 ensayos clínicos en DM1, dos de los cuales ya han publicado sus resultados. El primero<sup>[128]</sup> fue un ensayo clínico fase I en el que se

administraron a los pacientes 4 inyecciones separadas en 2 semanas de CDtol tratadas con oligonucleótido antisentido de CD80, CD86 y CD40, vía intradérmica. El tratamiento fue bien tolerado y no se evidenció ningún EA, mostrando un buen perfil de seguridad. Además, los pacientes no tuvieron que modificar su estilo de vida, dieta y tratamiento con insulina durante el tiempo del estudio y mostraron estabilidad en el control de su enfermedad. Por otro lado, los investigadores observaron un incremento de una subpoblación de LB reguladoras (B220+ CD11c2), que apuntaba a que las CDtol podrían ser beneficiosas. El siguiente ensayo publicado<sup>[129]</sup> se trató también de un ensayo fase I pero con un diseño de escalado de dosis de 3 cohortes. Las CDtol en esta ocasión fueron tratadas con VitD3 + Dexa y cargadas con péptidos de pro-insulina, y se administraron 2 dosis separadas en 28 días también por vía intradérmica. Al igual que en el ensayo previo los pacientes mostraron estabilidad de la enfermedad sin cambios en los controles analíticos ni en los requerimientos de insulina. Sin embargo, se describieron reacciones cutáneas en el lugar de inyección (eritema) no dependiente de la dosis que se resolvieron en horas-días, generalmente en menos de 48h.

Los otros 2 estudios en marcha son ensayos fase I/II y fase II, con un número mayor de pacientes, controlados con placebo, y en uno de ellos las CDtol se administran por vía intravenosa. Los resultados de estos ensayos no han sido publicados hasta el momento.

### Artritis Reumatoide

En AR también se han llevado a cabo 4 ensayos clínicos fase I que ya han publicado sus resultados, demostrando que la terapia con CDtol es segura y bien tolerada.

El primero fue Rheumavax<sup>[130]</sup>, que utilizó CDtol modificadas con el inhibidor del factor nuclear kB (NF-kB) y cargadas con péptidos citrulinados en 2 dosis diferentes. Las células fueron administradas en una única inyección vía intradérmica en la región inguinal para drenar desde ahí a los ganglios linfáticos inguinales cercanos donde se generaría la respuesta inmune esperada para regular la inflamación. Desde el punto de vista clínico se produjeron brotes en los pacientes menos activos, y disminuyó la actividad de la enfermedad en los pacientes más activos.

Otros 2 ensayos clínicos han valorado la utilidad de las CDtol administradas directamente a nivel intra-articular en la rodilla. Uno de ellos, AutoDECRA<sup>[131]</sup>, incluyó pacientes no sólo con AR, sino también con otras artritis inflamatorias. Las CDtol fueron elaboradas con Dexa + VitD3 y cargadas con líquido sinovial autólogo, y se evaluaron 3 dosis diferentes. La terapia consiguió la estabilización de los síntomas sólo en 2 de los pacientes tratados con la dosis alta, pero no fueron detectados otros efectos beneficiosos clínicos ni inmunológicos. El otro ensayo que evaluó la administración intra-articular, ToIDCfoRA<sup>[132]</sup>, tolerizó las CD sólo con Dexa y utilizaron dosis ascendentes de CDtol. En este caso, sí se observaron beneficios clínicos en cuanto a reducción del dolor, desaparición de signos de sinovitis tanto clínicos como a nivel ecográfico, ausencia de recurrencias en los 3 meses siguientes, y mejoría clínica a los 6 meses en el 50% de los pacientes.

El cuarto ensayo clínico, CreaVax-RA<sup>[133]</sup>, utilizó CDtol autólogas pulsadas con diferentes antígenos administradas vía subcutánea cerca de los nódulos linfáticos inguinales. En este caso también se observó una buena respuesta clínica en la mayoría de los pacientes (58%), pero sobre todo en el grupo de dosis más alta (83% vs 33%).

## Enfermedad de Crohn

El primer ensayo clínico fase I realizado para pacientes con EC fue un ensayo de cohortes y de escalado de dosis en el que las 3 primeras cohortes recibieron una única inyección de CDtol tratadas con Dexa + vitamina A, y las 3 cohortes siguientes recibieron 3 inyecciones repetidas bisemanalmente, administradas a nivel intraperitoneal guiadas ecográficamente. Se incluyeron un total de 9 pacientes. Aunque 3 pacientes fueron retirados por empeoramiento de la EC, el índice de actividad de la enfermedad del resto disminuyó, observando mejoría clínica. Además, en los 6 pacientes analizados se observaron cambios inmunológicos favorables<sup>[134]</sup>.

Posteriormente, otro ensayo clínico fase I fue puesto en marcha, TolDec-CD-intra, con la intención de evaluar la seguridad y eficacia de las CDtol tratadas con Dexa administradas a nivel intralesional en 2 grupos de pacientes con diferentes dosis. Sólo 3 pacientes fueron incluidos tras 4 años de reclutamiento, por lo que el ensayo fue finalizado.

El resumen de los detalles sobre los ensayos clínicos mencionados, se recogen en la [tabla 3](#).

Enfermedad autoinmune	ID EECC	Diseño	Generación CDtol	Administración CDtol	Resultados			REF.
					Seguridad	Clínicos	Inmunológicos	
DM1	1	Fase I, randomizado, grupo único, doble-ciego  N= 10 (3 con CD autólogas sin manipular vs 7 con CDtol)	1x10 <sup>7</sup> CDtol tratadas con oligonucleótidos sin sentido de CD80, CD86 y CD40	Intradérmica en la región abdominal  4 inyecciones (1 c/2sem)	Bien tolerada No EA	Estabilidad clínica (no requirieron cambios en el estilo de vida ni en la dosis de insulina)	Aumento de LB reguladores (B220+ CD11c2)	[128]
	2	Fase I, no randomizado, escalado de dosis  N= 9 (3 pacientes por cohorte)	5x10 <sup>6</sup> , 10x10 <sup>6</sup> o 20x10 <sup>6</sup> CDtol tratadas con vitD3 y cargadas con péptidos de pro-insulina	Intradérmica  2 inyecciones (1 c/28 días)	Reacciones cutáneas a la inyección  Otros EA leves	Estabilidad clínica (no cambios en los niveles de glucemias, ni requerimientos de insulina)	No evaluados/ publicados	[129]
	3	Fase II, cruzado, doble-ciego, controlado con placebo  N= 24	1x10 <sup>7</sup> CDtol tratadas con oligonucleótidos sin sentido de CD80, CD86 y CD40	Intradérmica en la región abdominal  4 inyecciones (1 c/2sem)	No publicados	No publicados	No publicados	
	4	Fase I/II, randomizado, paralelo, doble-ciego, controlado con placebo  N= 24	CDtol autólogas (AVT001)	Intravenosa  3 inyecciones (1 c/mes)	En fase de reclutamiento	En fase de reclutamiento	En fase de reclutamiento	

1. NCT00445913

2. NTR5542 - (Trial NL5425)

3. NCT02354911

4. NCT03895996

Enfermedad autoinmune	ID EECC	Diseño	Generación CDtol	Administración CDtol	Resultados			REF.
					Seguridad	Clínicos	Inmunológicos	
AR	5	Fase I, no randomizado, escalado de dosis, controlado con placebo N= 34 (9 dosis baja, 9 dosis alta, 16 controles)	1×10 <sup>6</sup> o 5×10 <sup>6</sup> CDtol modificadas con inhibidor de NF-kB y cargadas con péptidos citrulinados	Intradérmica en la región inguinal Dosis única	Bien tolerada EA leves	Reducción de la actividad de enfermedad	Reducción LT efectores y citocinas pro-inflamatorias, y aumento de la ratio LT reguladores/efectores	[130]
	6	Fase I, randomizado, escalado de dosis N= 12 (3 pacientes y 1 control por cohorte)	1×10 <sup>6</sup> , 3×10 <sup>6</sup> o 10×10 <sup>6</sup> DCtol tratadas con dexta y vitD3 y cargadas con líquido sinovial autólogo	Intra-articular (rodilla) Dosis única	Segura y bien tolerada	Estabilización de los síntomas en 2 pacientes (10×10 <sup>6</sup> )	No detectados efectos inmunológicos	[131]
	7	Fase I, no randomizado, escalado de dosis N= 10	1×10 <sup>6</sup> , 3×10 <sup>6</sup> , 5×10 <sup>6</sup> o 8×10 <sup>6</sup> DCtol tratadas con dexta	Intra-articular (rodilla) Dosis única	Segura y bien tolerada	Reducción del dolor, desaparición de signos de sinovitis, ausencia de recurrencias, mejoría en el 50%	No evaluados/publicados	[132]
	8	Fase I, no randomizado, dosis variable N= 12 (6 por grupo)	5×10 <sup>6</sup> o 1.5×10 <sup>7</sup> DCtol pulsadas con PAD4 recombinante, RA33, filagrina citrulinada y vimentina	Subcutánea cerca de los ganglios linfáticos inguinales 5 inyecciones (1c/2-4 semanas)	Bien tolerada EA leves	Buena respuesta en 58%, siendo mayor en los pacientes de dosis alta (83%).	Reducción IFN-γ y niveles de autoac antígeno-específicos	[133]
EC	9	Fase I, de cohortes y escalado de dosis N= 12 esperados (9 incluidos)	2×10 <sup>6</sup> , 5×10 <sup>6</sup> o 10×10 <sup>6</sup> CDtol tratadas con dexta y vitA	Intraperitoneal guiadas ecográficamente Cohortes 1-3: dosis única Cohortes 4-6: 3 inyecciones (1 c/2semanas)	Bien tolerada No EA	3 pacientes retirados por empeoramiento, la actividad de la enfermedad mejoró en el resto	Aumento LT reguladores, disminución de IFN-γ y IL17 tras activación policlonal con aCD3	[134]
	10	Fase I, randomizado, paralelo N= 20 esperados (3 incluidos)	10×10 <sup>6</sup> o 100×10 <sup>6</sup> CDtol tratadas con dexta	Intralesional	No evaluables	No evaluables	No evaluables	

Tabla 3. Ensayos clínicos con terapia celular basada en CDtol en otras enfermedades autoinmunes

5. ACTRN12610000373077 (Rheumavax)

6. NCT01352858 (AutoDECRA)

7. NCT03337165 (ToIDCfoRA)

8. KCT0000035 (CreaVax-RA)

9. EudraCT 2007-003469-42

10. NCT02622763 (ToIDec-CD-intra)

### 1.5.3. Ensayos clínicos con CDtol en esclerosis múltiple

Hasta el momento, se han puesto en marcha 3 ensayos clínicos con CDtol para pacientes con EM.

El único ensayo clínico que ha sido publicado se trata de un ensayo fase Ib, abierto y de escalado de dosis para pacientes con EM y enfermedades del espectro de la neuromielitis óptica (NMOSD) (NCT0228367). Se incluyeron 8 y 4 pacientes, respectivamente. Las CDtol fueron tratadas con Dexa y cargadas con el pool de 7 péptidos descrito con anterioridad<sup>[78]</sup>, además de con AQP4<sub>63-76</sub> en el caso de los pacientes con NMOSD. Se realizaron 4 cohortes según la dosis, y las CDtol se administraron vía intravenosa en 3 inyecciones separadas cada 2 semanas, para recibir un total de  $50 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$ ,  $150 \times 10^6$  o  $300 \times 10^6$  células. Sin embargo, dado que no se pudieron obtener el número de células necesarias para la última cohorte, ésta también recibió  $150 \times 10^6$ . Se incluyeron pacientes sin un criterio de actividad de enfermedad específico y, un detalle a destacar es que se permitió mantener el tratamiento inmunosupresor a los pacientes con NMOSD. El seguimiento del estudio duró 24 semanas. Los resultados del ensayo concluyeron que la terapia con CDtol vía intravenosa era bien tolerada y segura, no detectaron ningún SAE o AE relacionado con la terapia. Desde el punto de vista clínico, los pacientes se mantuvieron estables. A nivel radiológico, sólo 2 pacientes con EM presentaron una nueva lesión en T2 en la semana 12, pero sin captación de gadolinio ni alteraciones en la tomografía óptica computarizada. Además, observaron un aumento significativo en la producción de IL-10 en PBMC estimuladas con los péptidos ex vivo, así como un aumento no significativo en la frecuencia de un subtipo de LT reguladores<sup>[135]</sup>.

Los otros 2 ensayos clínicos en marcha para pacientes con EM, incluido el de la presente tesis, se comentarán más adelante.

## 2. Hipótesis

Teniendo en cuenta lo mencionado sobre la enfermedad, sus mecanismos patogénicos, el papel de las células dendríticas tolerogénicas y la experiencia de su uso en los ensayos tanto para EM como para otras patologías autoinmunes, se ha diseñado un **ensayo clínico fase I** para probar el uso de CDtol en pacientes con EM, con las siguientes **hipótesis**:

1. La terapia con células dendríticas autólogas, tolerogénicas y antígeno-específicas (CDtol-VitD3) administrada en los ganglios linfáticos cervicales es una terapia segura y bien tolerada para las personas con EM.
2. La terapia CDtol-VitD3 ofrece beneficios clínicos, radiológicos e inmunológicos para el control de la actividad inflamatoria de la EM.
3. La terapia CDtol-VitD3 es una alternativa terapéutica viable para las personas con EM.

## 3. Objetivos

### Objetivo principal

1. Evaluar la seguridad y tolerabilidad de la terapia celular CDtol-VitD3 administrada en los ganglios linfáticos cervicales de los pacientes con EM durante el periodo del estudio.

### Objetivos secundarios

1. Evaluar la eficacia preliminar de la terapia celular con CDtol-VitD3 mediante la actividad clínica, radiológica y los marcadores inmunológicos.
2. Evaluar la viabilidad de la terapia como alternativa terapéutica para las personas con EM.
3. Seleccionar el régimen de dosis más adecuado para el desarrollo de futuros ensayos clínicos fase II.

## 4. Metodología

### 4.1. Diseño del ensayo clínico

Se trata de un ensayo clínico abierto, de fase I y escalado de dosis (“best of five”), para determinar la seguridad, tolerabilidad y eficacia preliminar de la administración intraganglionar de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica, tratadas con vitamina D3 y cargadas con péptidos de la mielina, para pacientes con EM.

**Título del ensayo clínico:** Inducción de TOLERancia con células dendríticas tratadas con VITamina D3 y cargadas con péptidos de mielina, en pacientes con eSclerosis Múltiple

**Código:** TOLERVIT-MS

**Nº EUDRACT:** 2015-003541-26

**ClinicalTrials.gov:** NCT02903537

Aprobación por el Comité de Ética del Hospital Germans Trias i Pujol (HUGTiP) de Badalona (13/01/2016), y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (03/06/2016).

Es un ensayo clínico académico que ha sido financiado a través de una ayuda **FIS del Instituto de Salud Carlos III** (PI16/01737), un **proyecto internacional del gobierno belga** (IWT-TBM 140191) y un **proyecto europeo Horizon 2020** (Grant Agreement 779316). Este ensayo clínico está integrado dentro del **proyecto europeo ReSToRe** que tiene como acción implementar la “Neuronal Sel-renewal by antigen-specific tolerization in multiple sclerosis reinstalling the balance between inflammation and regeneration”. Además del presente ensayo clínico, este proyecto incluye otro ensayo clínico en Bélgica (nº EudraCT 2015-002975-16 y código CCRG15-001), con un diseño casi idéntico, que prevé la administración de un producto celular de las mismas características producido bajo normas de GMP en Bélgica, pero administrado por vía intradérmica. Por este motivo, y con el objetivo de homogeneizar ambos ensayos, el cronograma original del ensayo clínico objeto de esta tesis sufrió algunas modificaciones entre la cohorte 1 y 2. La armonización del diseño del protocolo de ambos ensayos clínicos dentro del proyecto ReSToRe, fue publicado en 2019<sup>[136]</sup> [ver ANEXO 10.1].

**Ensayo clínico de fase I de escalada de dosis, diseño “best of five”**

El diseño “best of five” = “lo mejor de 5” = 3+1+1, es una alternativa al diseño de escalado de dosis más tradicional “3 + 3”, que permite un escalado de dosis más rápido, cuando se prevé que la tasa de reclutamiento para el estudio será baja y minimiza el número de pacientes tratados con posibles dosis infraterapéuticas<sup>[137]</sup>.



Aunque este método pueda parecer más agresivo que el tradicional, no permite una escalada de dosis en el mismo paciente, lo que reduce el riesgo de dosis acumulativa, y sí permite el seguimiento de toxicidades retardadas en un paciente ya expuesto a un nivel de dosis. Además, el producto celular en investigación es un derivado de células autólogas del propio paciente, sometidas a un proceso de tolerogenización con un producto seguro como es la vitamina D3, y cargadas con péptidos de mielina, una sustancia que tampoco es ajena a nuestro organismo.

Por lo tanto, en este diseño “best of five” o 3+1+1, se podrá añadir un paciente adicional si se observa una toxicidad limitante de dosis (TLD) entre los 3 primeros pacientes incluidos en el estudio, y se podrá añadir otro paciente si se observa un 2º caso de TLD entre los 4 primeros pacientes tratados. El estudio terminará si se observan 3 o más pacientes con TLD en la misma cohorte de dosis.

Se define toxicidad limitante de dosis:

- Si al menos 1 sujeto de la cohorte de dosis presenta un acontecimiento adverso grave y atribuible al producto celular administrado.
- Si al menos 1 sujeto en una cohorte de dosis tiene un grado 2 o superior de toxicidad en relación con alguna anomalía de laboratorio, con la excepción de los siguientes: alteración de grado 3 asintomática de niveles de ácido úrico.

El escalado de dosis seguirá las siguientes normas:

- Si no se observa ninguna TLD en una cohorte de dosis, la siguiente cohorte podrá utilizar la dosis planeada.
- Si se observan 2 o más TLD en 3 pacientes, la dosis de la siguiente cohorte se desescalará a una dosis inferior.
- Si un paciente presenta una TLD a una dosis determinada, se incluirá un paciente más que recibirá la misma dosis.
  - » Si se observa una TLD en 4 pacientes, se escalará la dosis según lo planeado
  - » Si se observan 2 TLD en 5 pacientes, se escalará la dosis según lo planeado
  - » Si se observan  $\geq 3$  TLD en 5 pacientes, el estudio se finalizará.

Teniendo en cuenta la normativa de este tipo de ensayos y pretendiendo probar 3 dosis diferentes del producto en investigación CDtol-VitD3, nuestro ensayo se inició con la cohorte 1 a la dosis prevista ( $5 \times 10^6$  CDtol-VitD3) en 3 pacientes (+1, +1 en función de si se observan casos de TLD), y se escaló a la dosis siguiente prevista en la cohorte 2 ( $10 \times 10^6$  CDtol-VitD3)

sólo cuando se estableció la seguridad y la tolerabilidad para la cohorte previa, procediendo de igual manera para el escalado de dosis entre la cohorte 2 y la cohorte 3 ( $15 \times 10^6$  CDtol-VitD3).

Tras la fase de escalado de dosis, el ensayo clínico incluyó una 4ª cohorte de pacientes con EM tratados con interferón o dimetilfumarato para evaluar la seguridad y eficacia de la terapia combinada. Sin embargo, el seguimiento evolutivo de esta cohorte no finalizado por lo que no ha podido ser incluida en la presente tesis.

Un comité de seguridad interno en nuestro centro y, otro comité externo perteneciente al proyecto europeo ReSToRe (H2020) para la cohorte 2 y 3, evaluaron los datos de seguridad de los pacientes, antes de permitir el escalado de dosis.

### Cronograma del ensayo clínico

El ensayo diseñado comprendía un periodo máximo de screening de 2 meses, una visita basal en la que se realizaba el procedimiento de leucoaféresis, 6 visitas para la administración del producto celular durante un periodo de 14 semanas, y finalmente una fase de seguimiento.

Con la homogeneización de los protocolos para el proyecto europeo, el ensayo clínico sufrió algunas modificaciones entre la cohorte 1 y 2, lo que afectó principalmente al número de RM cerebrales realizadas, que fueron aumentadas en 3, y al esquema de la fase de seguimiento que pasó de tener 2 visitas en 9 meses, a 4 visitas durante los siguientes 12 meses. Tras el inicio de la pandemia por el virus SARS-CoV-2 también fueron incluidas en el protocolo algunas modificaciones en relación con la vigilancia de la infección.

La figura sobre el esquema (Figura 10) y la tabla del cronograma del ensayo (Tabla 4), corresponden a la última versión del protocolo.

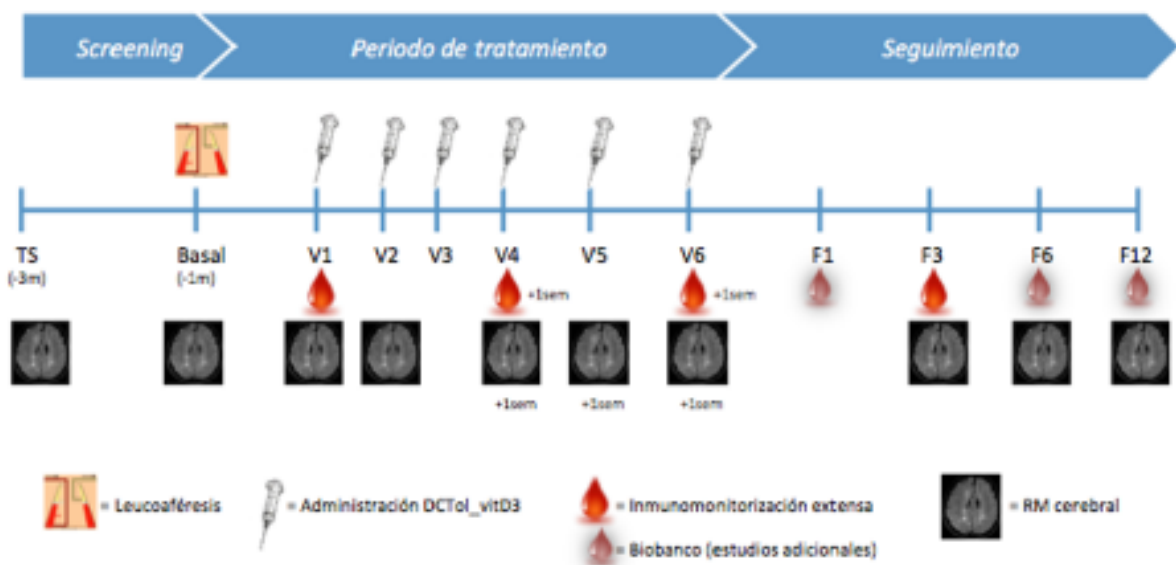


Tabla 3. Ensayos clínicos con terapia celular basada en CDtol en otras enfermedades autoinmunes

	Screening	Basal	V1	V2	V2	V2	V2	V2	V2	F1	F3	F6	F12
	Mes -3	Mes -1	Día 0	Sem 2 (±3 d)	Sem 4 (±3 d)	Sem 6 (±3 d)	Sem 10 (±3 d)	Sem 14 (±3 d)		+1m (±3 d)	+3m (±2 s)	+6m (±2 s)	+12m (±2 s)
Consentimiento informado	⊗												
Historia clínica	⊗												
Criterios de in-/exclusión	⊗	⊗											
Mapeo gangliar, inspección de accesos venosos	⊗												
Leucoaféresis		⊗											
Administración ToDC			⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗					
Expl. física, signos vitales; ECG	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗		⊗	⊗	⊗	⊗
Test embarazo	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗		⊗	⊗	⊗	⊗
Análisis laboratorio Serologías (1), PCR COVID (2)	⊗ +(1)+ (2op- cional)	⊗ +(1) +(2)	⊗ +(2)	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗		⊗	⊗	⊗	⊗
Estudio de reactividad LT	⊗		⊗			⊗/⊗ +1s		⊗/⊗ +1s			⊗		
Inmunomonitorización extensa y anti-SARS-CoV-2			⊗			⊗ +1s		⊗ +1s			⊗		
Inmunomonitorización básica			⊗	⊗	⊗	⊗/⊗ +1s	⊗	⊗/⊗ +1s		⊗	⊗	⊗	⊗
Biobanco (estudios adicionales)										⊗		⊗	⊗
Exploración neurológica (EDSS, 9HPT, 25FWT, SDMT, MSWOL-54)	⊗		⊗			⊗		⊗		⊗	⊗	⊗	⊗
RM cerebral	⊗	⊗	⊗	⊗		⊗ +1s	⊗ +1s	⊗ +1s			⊗	⊗	⊗
Escala de Dolor (EVA)			⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗					
Medicación concomitante	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗		⊗	⊗	⊗	⊗
Acontecimientos adversos (AEs-SAEs)	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗		⊗	⊗	⊗	⊗

Tabla 4. Cronograma del ensayo con el detalle de la actividad a realizar en cada una de las visitas del estudio.

## 4.2. Población y escenario del estudio

El ensayo clínico se llevó a cabo en el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (HUGTiP) de Badalona, bajo la coordinación del equipo de neurólogas de la Unidad de Esclerosis Múltiple, que realizan el seguimiento de más de 700 pacientes con Esclerosis Múltiple (registrados en la base internacional iMed).

Para el ensayo se incluyeron el número de pacientes con EM necesarios para alcanzar un total de 9 pacientes tratados (3 pacientes por cada cohorte de dosis).

La mayoría de los pacientes incluidos procedían de la Unidad de EM de nuestro hospital, aunque algunos fueron derivados desde otros centros dado el interés de los pacientes en optar a esta terapia celular.

El periodo de inclusión del ensayo que constituye la presente tesis duró de junio de 2017 a diciembre de 2020.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado (CI) después de leer el documento de información al paciente que exponía claramente que recibirían un tratamiento experimental y que serían evaluados durante un periodo de 18 meses para determinar su seguridad. Previamente fueron informados sobre los tratamientos farmacológicos aprobados actualmente indicados para cada caso en particular, de sus beneficios y riesgos, así como que durante el periodo de ensayo no podrían recibirlos, salvo que retiraran el CI para seguir participando en el estudio.

### 4.3. Criterios de selección

Se seleccionaron pacientes adultos con EM que no estuvieran bajo TME y que hubieran mostrado actividad de la enfermedad en el último año.

Como criterio indispensable para la inclusión, los pacientes debían presentar proliferación linfocitaria frente al pool de péptidos de mielina frente a los cuáles se iba a inducir la tolerancia inmunológica con la terapia. Además, debían de tener unos accesos venosos que permitieran la colocación de unas vías con el calibre necesario para la realización de la leucoaféresis, así como unos ganglios cervicales accesibles y con el tamaño adecuado para la administración del producto celular.

En la siguiente tabla se exponen los criterios de inclusión y exclusión del ensayo ([Tabla 5](#)).

#### Criterios de inclusión

Edades comprendidas entre los 18 y 60 años
EDSS entre 0.0 y 6.5
Cumplir criterios de EM según McDonald 2010 <sup>22</sup>
Pacientes con EM (remitente-recurrente o progresiva) que hayan presentado actividad en el último año (al menos 1 brote o 1 lesión Gd+ o 1 nuevas lesiones T2), que hayan rechazado otras opciones de tratamiento
Presentar proliferación linfocitaria frente al grupo de péptidos de la mielina frente a los cuales se quiere inducir la tolerancia inmunológica (MBP <sub>13-32</sub> , MBP <sub>83-99</sub> , MBP <sub>111-129</sub> , MBP <sub>146-170</sub> , PLP <sub>139-154</sub> , MOG <sub>1-20</sub> , MOG <sub>35-55</sub> ), excepto para los pacientes de la cohorte 4.
Adecuados accesos venosos
Adecuado mapeo ganglionar cervical
Firma del consentimiento informado

### Criterios de exclusión

---

Uso de corticoides en las 4 semanas previas

---

Uso de interferón beta – excepto pacientes de la cohorte 4 - y acetato de glatirámero en las 4 semanas previas

---

Uso de fingolimod, dimetilfumarato - excepto pacientes de la cohorte 4 -, natalizumab, inmunoglobulinas o plasmaféresis en las 12 semanas previas; y teriflunomida en las 15 semanas previa

---

Uso de monoclonales: alemtuzumab o cladribina en algún momento, rituximab/ocrelizumab en los 6 meses previos y hasta confirmación de normalización del recuento de linfocitos B.

---

Trasplante de médula ósea o trasplante de células madre mesenquimales en algún momento previo

---

Presentar un brote durante el mes previo al inicio del tratamiento. Si aparece y el paciente cumple los criterios de elegibilidad se deberá esperar el tiempo necesario hasta que transcurran los 30 días libres de brote. Si se administran corticoides, la RM realizada durante ese período no deberá considerarse y se realizará una nueva RM a las 4 semanas tras la administración de corticoides

---

Embarazo, planificación del embarazo o lactancia materna durante el periodo de estudio

---

Pacientes fértiles tanto hombres como mujeres que no estén utilizando un método adecuado de anticoncepción. Si la paciente es menopáusica o estéril debe estar documentado en la historia clínica.

---

Abuso de drogas o alcohol

---

Incapacidad de someterse a evaluaciones de resonancia magnética

---

Serologías positivas para HIV, hepatitis B, C, o lúes

---

Historia de enfermedades oncológicas

---

Enfermedad concomitante clínicamente relevante: cardíaca, pulmonar, neurológica, renal u otra enfermedad importante

---

Esplenectomía

---

Demencia, problemas psiquiátricos u otra comorbilidad que pueda interferir el cumplimiento del protocolo

---

Estar participando en otro estudio clínico, o haber participado en uno, los últimos 3 meses.

---

Tabla 5. Criterios de inclusión y exclusión para los participantes del ensayo clínico.

## 4 .4. Terapia en investigación

El producto en investigación estaba constituido por DC derivadas de monocitos, de sangre periférica del propio paciente, diferenciadas en presencia de vitamina D3 y cargadas con un grupo de 7 péptidos de la mielina (CDtol-VitD3).

### Procedimiento de obtención y producción celular

La sangre del paciente se extrajo mediante un proceso de leucoaféresis. Este procedimiento se realizó en el Banc de Sang i Teixt (BST) del propio HGtIP, bajo supervisión del equipo de hematología habitual. La duración aproximada fue de entre 3 y 5 horas, dependiendo del calibre de las venas del paciente y del volumen necesario de células según la cohorte. En los casos en los que los accesos venosos no fueron adecuados, se ofreció la posibilidad de colocación de una vía central. Una vez finalizado el procedimiento, se obtenía la bolsa de aféresis que era adecuadamente etiquetada y empaquetada a una temperatura media de

20-22°, y posteriormente enviada al Laboratorio de Terapia Celular de la Clínica Universidad de Navarra (CUN) donde se generaba el producto celular en condiciones GMP (*Good Manufacturing Practice*).

Mediante un proceso de separación celular, se obtenían los monocitos y, durante un período de 6 días, los monocitos se diferenciaban a DC semi-maduras en presencia de vitamina D3 y un cóctel de citocinas. Posteriormente, las CD eran son cargadas con el pool de 7 péptidos de la mielina (MBP<sub>13-32</sub>, MBP<sub>83-99</sub>, MBP<sub>111-129</sub>, MBP<sub>146-170</sub>, PLP<sub>139-154</sub>, MOG<sub>1-20</sub>, MOG<sub>35-55</sub>) frente a los que se presume que se induce tolerancia (Figura 12).

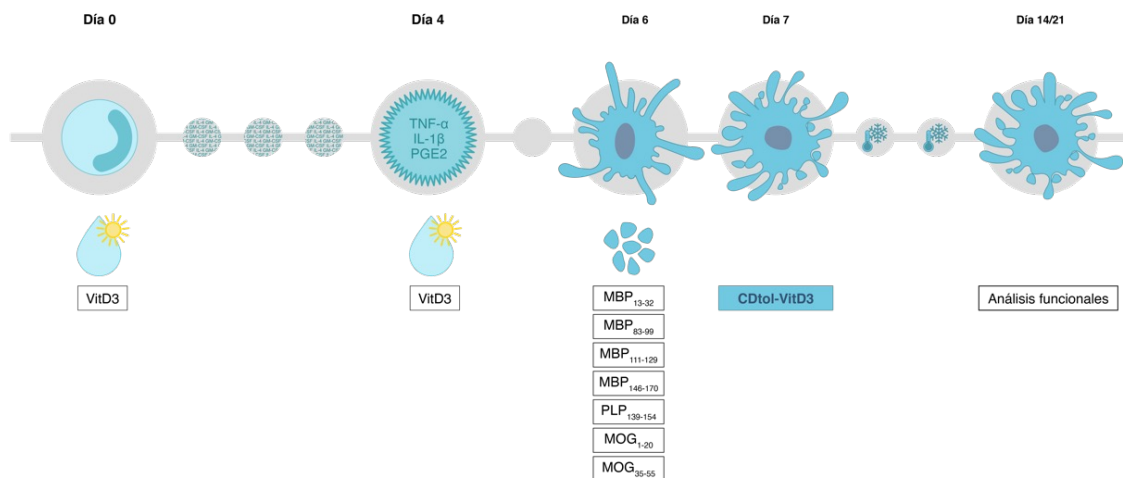


Figura 12. Procedimiento utilizado para la generación de las CDtol-VitD3 utilizadas en el ensayo clínico.

Una vez obtenido el producto celular, se prepararon los viales con una densidad celular de  $26 \times 10^6$  DC/mL y se congelaron a  $-80^\circ$  para su conservación. Al día 7 y al día 14 de la congelación, se realizaron pruebas de funcionalidad, fenotipado y de contaminación ambiental para asegurar que el producto cumplía las condiciones necesarias para poder ser liberado como terapia y utilizado para su administración a pacientes.

Finalmente, el producto celular CDtol-VitD3 congelado a  $-80^\circ$  era enviado de nuevo al HUGTiP en un contenedor de nitrógeno líquido y, a su llegada a nuestro Laboratorio de Inmunología se mantenía conservado en las mismas condiciones en contenedores exclusivos para pacientes con serologías negativas, monitorizado con un registro de temperatura.

En los casos en los que no se consiguió generar un producto celular adecuado o una cantidad de CDtol-VitD3 suficiente para conseguir todos los viales necesarios para completar todas las administraciones del estudio, se propuso al paciente la realización de una segunda leucoaféresis.

#### Administración del producto celular

El producto celular CDtol-VitD3 se administró en los ganglios linfáticos cervicales por un profesional con experiencia en la técnica (Dr. Reverter del Servicio de Endocrinología de HUGTiP), guiado ecográficamente (Figura 13), en condiciones de máxima esterilidad, previo

control electrocardiográfico y monitorización de las constantes vitales antes y después de su administración. Para asegurar la viabilidad de las células, el producto debía ser administrado en un tiempo máximo de 30 minutos tras su descongelación.



Figura 13. A la izquierda, fotografía de la administración de la terapia a una de las pacientes del ensayo, guiado ecográficamente. A la derecha, imagen de la ecografía donde se observa la aguja introducida en el ganglio linfático cervical.

Cuando el volumen del producto celular lo permitió (aprox. <math><500</math> microlitros), se administró todo el vial en un único ganglio. Cuando se superó dicho volumen, se valoró la administración en uno o dos ganglios en función del tamaño de éstos.

En total, los pacientes recibieron 6 administraciones del producto, las 4 primeras cada 2 semanas y las 2 últimas cada 4 semanas.

Antes de cada inyección de las CDtol-VitD3, se administró premedicación consistente en 1 ampolla iv de 5 mg de polaramine (dexclorfeniramina) para prevenir posibles reacciones alérgicas secundarias al conservante del producto (dimetil sulfóxido, DMSO) y paracetamol 1g por vía oral para disminuir posibles molestias en relación con la inyección.

Los pacientes quedaron ingresados en observación durante 6 horas tras cada administración del tratamiento en la Unitat Polivalent d'Investigació Clínica (UPIC), y se monitorizaron las constantes vitales a los 30 min, a la 1h, 2h, 4h y a las 6 horas después de la inyección (momento del alta), así como la aparición de posibles acontecimientos adversos (AA).

El procedimiento completo desde la extracción de los monocitos de la sangre periférica mediante la leucoaféresis hasta la administración del producto celular en los ganglios linfáticos de los pacientes, se refleja en la [Figura 14](#).

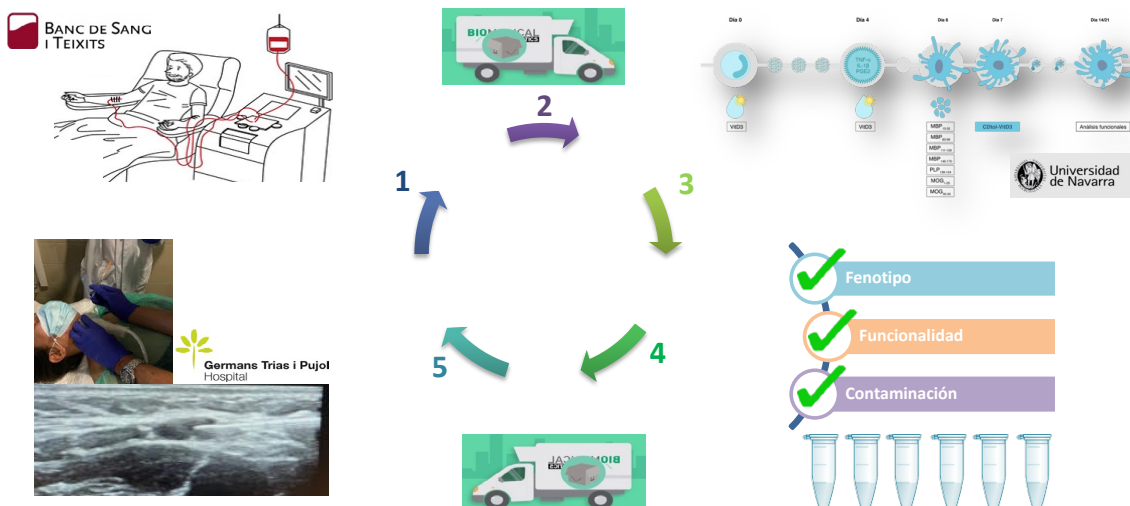


Figura 14. Obtención, generación y administración de las CDtol-VitD3 del ensayo clínico.

## 4.5. Variables a estudio

Se describen las variables del ensayo en función de los objetivos del mismo.

### Seguridad y tolerabilidad

La evaluación de la seguridad y tolerabilidad se realizó a través de la aparición de **acontecimientos adversos (AA)**, especialmente los considerados relacionados con la medicación a estudio.

Los pacientes fueron controlados en cada visita mediante la entrevista clínica, la determinación de constantes vitales, electrocardiograma, exploración física y análisis generales con hemograma, coagulación y bioquímica.

Los AA relacionados con la toxicidad o alteraciones en los parámetros analíticos se determinaron según los criterios de la OMS. Para las alteraciones de los sistemas inmune y linfático, y las alteraciones relacionadas con la administración del tratamiento inyectable se aplicaron los Criterios Comunes de Terminología para los Eventos Adversos en Cáncer (CTCAE versión 4.0).

A partir de la cohorte 2, se incluyó la Escala Visual Analógica (EVA) para evaluación del dolor tras cada administración del tratamiento a estudio.

En relación con AA derivados de la propia EM, se consideró un AA la actividad radiológica y el empeoramiento de la discapacidad. Se consideró un evento adverso grave (SAE) la aparición de un brote, independientemente de su gravedad.

Todos los AA han sido monitorizados por un equipo de Farmacovigilancia del Instituto de Investigación IDIAP Jordi Gol.



### Eficacia clínica preliminar

Se recogieron datos demográficos y clínicos en relación con la enfermedad: edad de debut, años de evolución de enfermedad, número de brotes en los últimos 2 años, fecha del último brote, TME recibidos previamente y fecha del último.

Para estudiar la **actividad clínica** durante el ensayo, se analizó la tasa anual de brotes previa y tras el tratamiento, durante el periodo del ensayo. Se definió **brote** como un deterioro neurológico agudo o subagudo de un mínimo de 24 h de evolución, con ausencia de fiebre y seguido de una recuperación parcial o total<sup>[138]</sup>. Para aceptar la existencia de 2 brotes éstos tenían que afectar distintas partes del sistema nervioso central y estar separados por un periodo de al menos 1 mes. Los brotes se clasificaron en:

- **Leves:** Aumento del EDSS < 1 punto
- **Moderados:** Aumento del EDSS  $\geq$  1 punto (si el EDSS basal se sitúa entre 3.0-5.0) o un cambio  $\geq$  0,5 puntos (si el EDSS basal es  $\geq$  5.5) junto con un cambio de 2 puntos en cualquiera de los sistemas funcionales o 1 punto en cualquiera de 2 sistemas funcionales
- **Grave:** Aumento del EDSS  $\geq$  3 puntos

La **progresión** de la enfermedad, fue definida como el empeoramiento mantenido a 3 meses, medido a través del aumento de puntuación en la escala **EDSS** con respecto al EDSS basal (aumento de  $\geq$  1 en pacientes con EDSS basal 0.0-5.0, o  $\geq$  0.5 en pacientes con EDSS basal  $\geq$  5.5). Además, se incluyó una batería de test neurológicos funcionales [ANEXO 10.2], ampliamente utilizados en los ensayos clínicos en EM, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de los cambios clínicos:

- **25-Foot Walk Test (25FWT)**, un test de velocidad de marcha: considerando progresión si se observaba un incremento mantenido a 3 meses de al menos el 20% con respecto al basal, en el tiempo empleado en completar la distancia de la prueba.
- **9-Hole Peg Test (9HPT)**, un test de destreza manual: considerando progresión de la EM si se observaba un incremento mantenido a 3 meses de al menos el 20% con respecto al basal, en el tiempo empleado para completar la prueba.
- **Symbol Digit Modality Test (SDMT)**, un test cognitivo: no fue considerado en la evaluación de la progresión, pero se analizó el porcentaje de cambio con respecto al basal, considerándose empeoramiento una reducción de >4 puntos o >10% con respecto al basal.

La **calidad de vida** durante el estudio, antes, durante y después del tratamiento, fue

evaluada mediante la escala **MSQoL-54** [ANEXO 10.3]. Esta escala contiene 54 preguntas, y su puntuación va del 0 al 100, donde un valor más elevado indica una mejor calidad de vida relacionada con la salud. Se divide en 2 subescalas, una sobre la salud física y otra sobre la salud mental.

#### Eficacia radiológica preliminar

Todas las RM cerebrales del ensayo se realizaron en la misma máquina 3T (SIEMENS), siguiendo el protocolo específicamente diseñado para ello. Incluyó planos 3D, secuencia T1 pre y postcontraste (resolución voxel  $0.9 \times 0.9 \times 0.9$ , TR2300.0, TE2.29, TI 900.0), y secuencias T2/FLAIR 3D (resolución voxel  $0.4 \times 0.4 \times 0.9$ , TR5000.0, TE387.0, TI1800.0). El contraste de gadolinio utilizado fue Dotarem (20mL).

Se consideró **actividad radiológica**, el incremento en el nº de lesiones y/o tamaño de lesiones pre-existentes en secuencias T2/FLAIR, y la aparición de lesiones captantes de gadolinio, en comparación con las RM basales (previas al inicio del tratamiento a estudio).

Para el análisis de los resultados radiológicos, se realizó una primera evaluación por parte de un radiólogo local experto en EM (visualización estándar), y posteriormente las imágenes fueron re-analizadas con un software integrado en la máquina Philips (LOBI: Longitudinal Brain Imaging) para incrementar la sensibilidad de detectar nuevas lesiones hiperintensas en T2 en comparación con la RM previa (Figura 15).

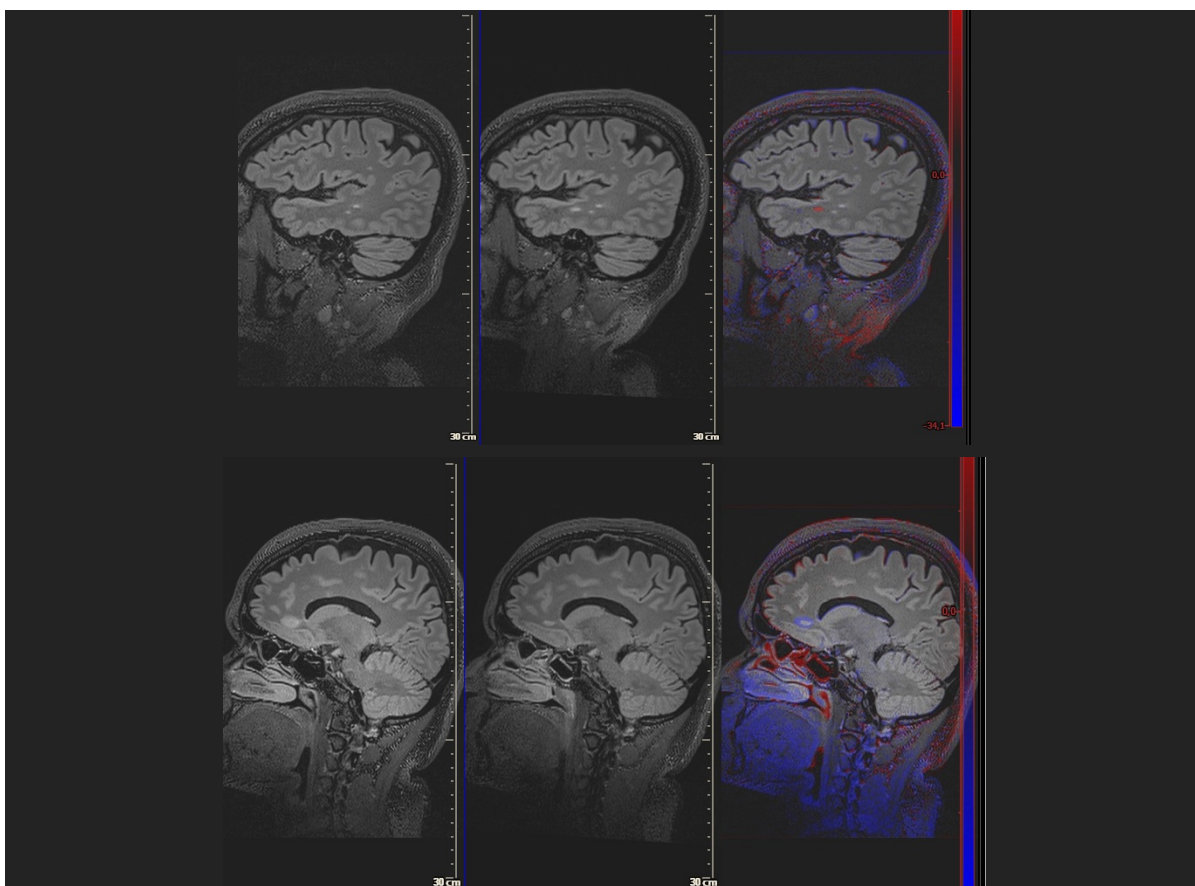


Figura 15. Ejemplo de visualización de imágenes con el software LOBI. La primera imagen es la RM anterior, la segunda es la RM nueva, y la tercera imagen es la comparativa que se genera entre ambas. En la figura de arriba, se marca en rojo la lesión nueva aparecida en la última RM. En la figura de abajo, se marca en azul la reducción de tamaño de una lesión antigua.

### Eficacia inmunológica preliminar

Se obtuvo una muestra de sangre periférica total de los pacientes, entre 35-100 ml según los estudios a realizar en cada uno los tiempos del ensayo, con el objetivo de evaluar los cambios en la respuesta inmunológica durante y después del tratamiento, con respecto al estudio inmunológico basal (antes del tratamiento).

**Proliferación de los linfocitos T específicos frente a un pool de 7 péptidos de mielina** (MBP<sub>13-32</sub>, MBP<sub>11-129</sub>, MBP<sub>146-170</sub>, MBP<sub>83-99</sub>, MOG<sub>1-20</sub>, MOG<sub>35-55</sub>, PLP<sub>139-154</sub>). Fue determinada a través de 3 métodos diferentes para evaluar la sensibilidad de detectar la respuesta linfocitaria específica: Timidina-[H]<sup>3</sup>, Violeta 450 (VPD-450) y ELISpot.

- **Timidina-[H]<sup>3</sup>:** Las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Se cultivaron en placas de 96 pocillos en presencia del pool de péptidos de mielina y otros estímulos utilizados como controles, a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 6 días, se añadió 1μCi de timidina-<sup>3</sup>[H] por pocillo y se incubó durante 18h más. La proliferación se determinó en función de la radiactividad incorporada (cpm) y se midió mediante recuento de centelleo (cuentas por minuto, cpm) (1450 Microbeta Trilux; Wallac, Turku, Finlandia). Los pocillos se consideraron positivos/reactivos cuando las cpm fueron mayores del promedio de los 12 pocillos del control negativo (no estimulado) + 3 veces la desviación estándar (DE).
- **VPD-450:** Las PBMC frescas fueron marcadas con la molécula vital violeta 450 (VPD-450) a 37°C y se incubaron en oscuridad durante 12 min. Posteriormente fueron lavadas para eliminar exceso de colorante y cultivadas en placas de 96 pocillos durante 7 días en presencia del pool de péptidos de mielina. Después de 7 días de cultivo, las PBMC se tiñeron con anticuerpos monoclonales CD3-V500, CD4FITC/CD8PE y con 7ADD (BD Horizon). La muestra fue adquirida por el citómetro BD FACS Lyric y se analizó el resultado utilizando un software FlowJo. Se consideró positivo cuando el porcentaje de proliferación frente a los péptidos fue mayor que el promedio del porcentaje de proliferación de los pocillos del control negativo + 3 DE.
- **ELISpot:** Las PBMC aisladas se incubaron durante 6 días con el pool de péptidos de mielina. El día 3 de cultivo se añadió IL-2 e IL-7 en algunos de los pocillos. El día 6 se recogieron las células y se transfirieron a una placa para detectar la secreción de IFN $\gamma$  tras unas 18h de re-estimulación con los péptidos de mielina utilizando el kit human IFN $\gamma$  ELISpot (Mabtech) y el lector de spots AID EliSpot. Se consideró positivo/reactivo si cumplía los siguientes criterios: (1) si 50% de los pocillos positivos del paciente era mayor a media del control negativo + 3 DE; y (2) si la relación entre el número de “spots” del paciente y del control negativo era mayor a 2,5.

Se consideró paciente reactivo si al menos lo era una de las 3 técnicas realizadas siguiendo el esquema de la [Figura 16 \[ANEXO 10.4\]](#).

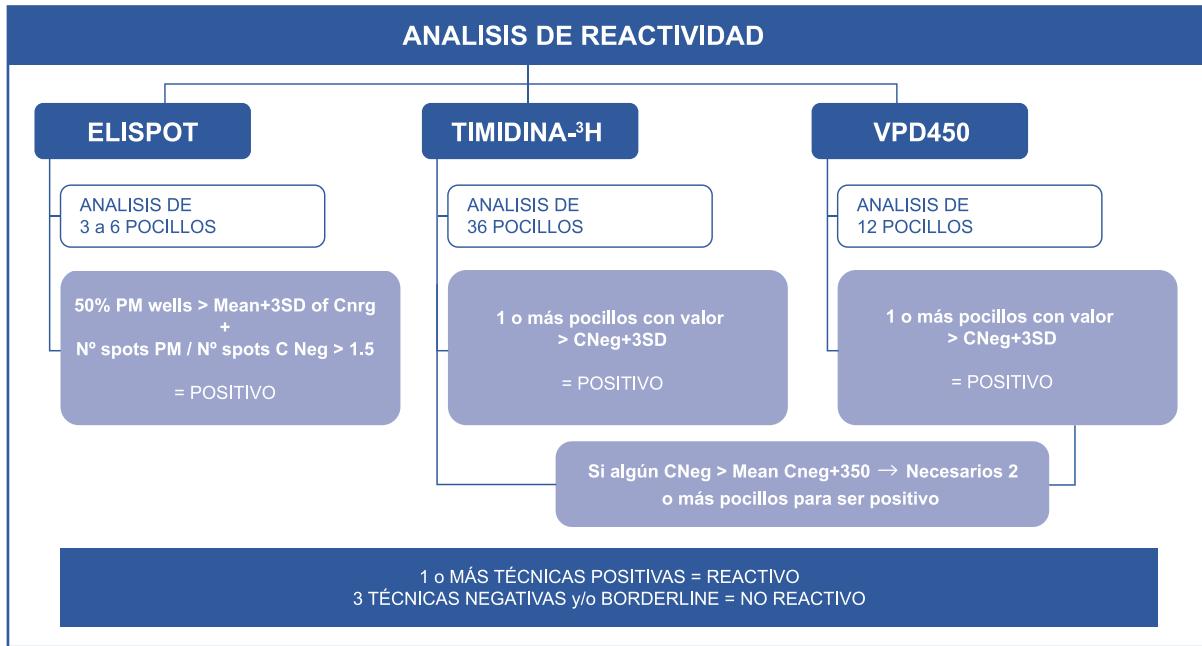


Figura 16. Esquema del análisis de la reactividad linfocitaria frente a los péptidos de mielina realizado para el ensayo TOLERVIT-MS.

**Determinación de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo.** Se estudiaron en muestras de sangre total fresca en las 4 horas siguientes a la extracción. Las muestras fueron incubadas con las cantidades de anticuerpos monoclonales adecuadas durante 20 minutos y protegidas de la luz. Después de la lisis de eritrocitos, las muestras se lavaron y se adquirieron un total de 100.000 linfocitos en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences). Las subpoblaciones de linfocitos se definieron de acuerdo con los marcadores especificados en el [ANEXO 10.5], con algunas diferencias entre la cohorte 1 y las cohortes 2-3, debido al procedimiento de armonización del proyecto ReSToRe a partir de la cohorte 2. Se determinaron sus porcentajes relativos y números absolutos. Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando los softwares FACSDiva y FlowJo (BD Biosciences). Además, las subpoblaciones linfocitarias fueron estudiadas de forma paralela en un grupo control sano apareado por sexo y edad, para los pacientes de las cohortes 2 y 3, con el objetivo de determinar las posibles variabilidades derivadas de la propia técnica.

**Cuantificación de citocinas.** Se realizará en las muestras de suero congeladas de los pacientes, como estudios centralizados dentro del proyecto ReSToRe.

**Biobanco.** Conservación de muestras de aproximadamente 50 ml de sangre periférica de los pacientes en algunos de los tiempos del ensayo según se indica en el protocolo, para futuros estudios inmunológicos adicionales (estudios centralizados dentro del proyecto ReSToRe en Sanquin (NL) y en la Universidad de Münster (GER)).

#### Viabilidad

Teniendo en cuenta que la terapia utilizada en este ensayo es innovadora y con una metodología con cierta complejidad, era importante demostrar que se podía obtener un producto celular viable que permitiera su uso como tratamiento para los pacientes con EM,

siguiendo los procedimientos tal y cómo se describen en el protocolo. Así que la viabilidad fue evaluada mediante el porcentaje de pacientes reemplazados antes de empezar el tratamiento por no haber conseguido completar con éxito algún paso del procedimiento: proliferación LT frente a los péptidos, realización de leucoaféresis, producción celular, criopreservación o administración de las CDtol-VitD3.

#### 4.6. Recogida de datos y monitorización

Todos los datos fueron incluidos en un cuaderno de recogida de datos electrónico (CRDe) diseñado específicamente para este estudio. Este CRDe fue realizado por el IDIAPS - Hospital Clinic Barcelona.

La monitorización del ensayo clínico fue llevada a cabo por 2 entidades diferentes, la cohorte 1 fue monitorizada a través de la plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), y la cohorte 2 y 3 a través de la CRO Keyrus, que monitorizó además de forma paralela el ensayo clínico belga dentro de proyecto ReSToRe (H2020).

#### 4.7. Análisis estadístico

Al tratarse de un estudio fase I de escalado de dosis, no se realizó un cálculo del tamaño muestral, sino que se fijó la n de 9 pacientes (3 válidos por cada cohorte) siguiendo los patrones utilizados en este tipo de estudios. Es por ello también, que el análisis estadístico realizado no es confirmatorio, sino exploratorio.

Se realizó un análisis “por intención de tratar” para evaluar la seguridad, tolerabilidad y viabilidad. Para el resto de variables, se realizó un análisis “por protocolo”.

Se utilizó un estudio principalmente descriptivo (media, desviación estándar, mediana, intervalo, tablas de frecuencia) para la mayoría de variables. El estudio comparativo se analizó de acuerdo con la prueba estadística adecuada:  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher para comparar variables categóricas, la prueba t dependiente o independiente para variables continuas con distribución gaussiana y la prueba de Wilcoxon o Mann-Whitney para valores ordinales y distribución no normal, así como la prueba ANOVA para comparar las medias entre los diferentes grupos. El nivel de significancia alfa se estableció en 0.05.

El programa estadístico utilizado fue el SPSS v.21, y los gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 9.

## 5. Resultados

### 5.1. Pacientes

El reclutamiento de los pacientes del ensayo fue llevado a cabo desde julio 2017 hasta diciembre 2020. Se evaluaron un total de 17 pacientes con EM, previa firma del CI. De ellos, 13 pacientes fueron incluidos cumpliendo todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión para participar en el ensayo. Hubo 2 fallos de selección por falta de reactividad linfocitaria a los péptidos de mielina. Finalmente 9 pacientes recibieron la terapia en investigación, 3 pacientes por cada cohorte (Figura 17). Los detalles sobre las discontinuaciones serán tratados en el apartado de viabilidad.

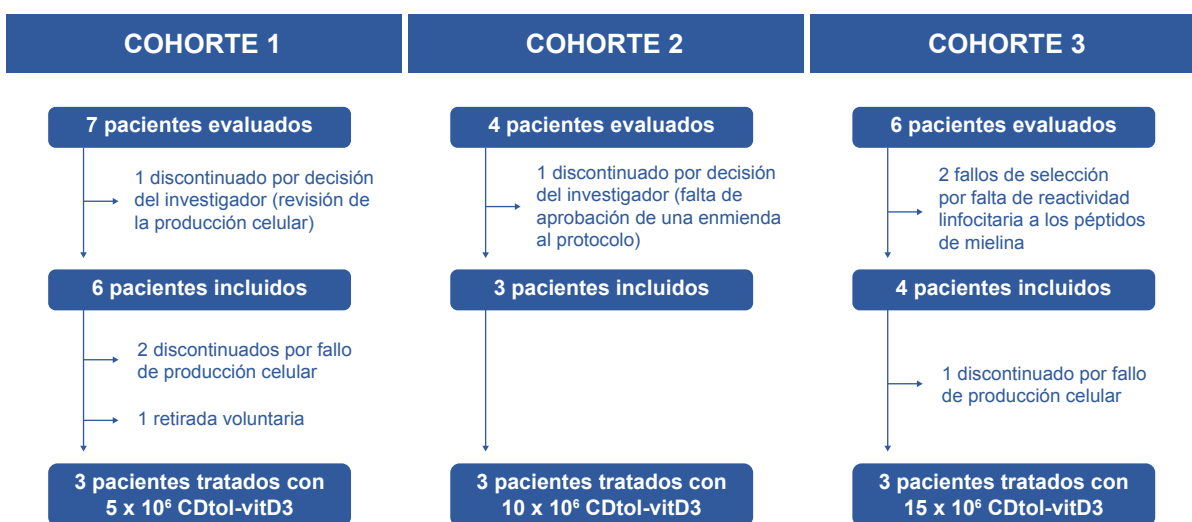


Figura 17. Diagrama de flujo de los pacientes que han participado en el ensayo.

De los 9 pacientes tratados, todos eran mujeres menos un varón, con una edad media de 41 años y un tiempo de evolución de enfermedad de unos 8 años. La mayoría estaban diagnosticados de una EMRR, excepto 2 pacientes que eran EMPP con actividad. Una paciente había recibido previamente tratamiento para la EM con fármacos de 1ª línea (interferón-beta y dimetilfumarato), que fueron discontinuados por intolerancia y efectos adversos. Del resto, ninguno había recibido otros tratamientos previos para la enfermedad, o bien por no cumplir todos los criterios que se utilizan en la práctica clínica actual (ej. tener sólo actividad radiológica sin brotes ni empeoramiento clínico) o bien por voluntad propia debido al miedo sobre la seguridad de los fármacos. Todos los pacientes habían mostrado actividad de la enfermedad en el último año como requisito para la inclusión en el ensayo, el 66 % en forma de brotes y el 77 % con actividad radiológica. En el momento de la inclusión tenían una media de EDSS de 3.0 y la mayoría de los pacientes mostraban una alta carga lesional (media de 40 lesiones en T2), y más de la mitad presentaron lesiones con captación de gadolinio en la RM cerebral de la visita de *screening* (Tabla 6).

Características basales	COHORTE 1			COHORTE 2			COHORTE 3			Total n=9
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
Edad (años), media (DE)	39	43	35	41	37	45	44	37	48	41 (4,3)
Género (F/M), n F (%)	F	F	F	M	F	F	F	F	F	8 (88)
Tipo EM (RR/PP), n RR (%)	RR	PP	RR	RR	RR	RR	RR	RR	PP	7 (77)
Tiempo evolución EM (años), media (DE)	10	6	7	3	6	13	12	1.5	15	8.1 (4.6)
TAB desde inicio EM. media (DE)	0.5	0.2	0.7	1	0.33	0.23	0.3	2	0	0.6 (0.6)
Tratamientos previos, n (%)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1 (11)
Actividad año previo, n (%)										
Brotos	1	1	1	1	0	1	0	1	0	6 (66)
Actividad RM	Sí	No	-	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	7 (77)
EDSS screening, media (DE)	6.0	4.0	4.5	2.5	2.0	1.0	2.5	1.5	3.5	3.0 (1.5)
RM cerebral screening,										
Lesiones T2 (n), media (DF)	60	25	33	31	26	12	40	58	75	40 (20)
Captantes Gd (n), media (DE)	2	2	0	0	0	0	5	2	1	1.3 (1.7)

Tabla 6. Características demográficas, clínicas y radiológicas basales en relación con la EM de los pacientes tratados.

## 5.2. Producto celular

Para la fabricación del número de células necesarias para el tratamiento de los pacientes establecido en cada cohorte, se realizó una leucoaféresis a cada uno de los ellos, excepto en una paciente que requirió 2 leucoaféresis. En las leucoaféresis el número medio de leucocitos recolectados fue  $12.4 \pm 3.7 \times 10^9$ , de los cuáles el 18.1% ( $\pm 5.8$ ) fueron monocitos (células CD14+). Tras el procesamiento y marcaje de la leucoaféresis se realizó la selección inmunomagnética de los monocitos. El rendimiento de la selección fue del 65.7% ( $\pm 19.4$ ) y la pureza de las células seleccionadas del 94.2%. El número de monocitos que se puso a cultivar para su diferenciación a células dendríticas osciló entre  $402.6 \times 10^6$  y  $2453 \times 10^6$  según el paciente. Tras el proceso de producción se obtuvo una media de  $264.2 \pm 164.1 \times 10^6$  CDtol pulsadas con los péptidos de mielina, lo que supone un rendimiento de la producción (proporción entre el número de CDtol pulsadas y el número de monocitos que se pusieron a diferenciar) del 21.13% ( $\pm 8.7$ ) (Tabla 7).

Rendimiento de la producción	COHORTE 1			COHORTE 2			COHORTE 3			
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P7-bis	P8	
Nº leucocitos en leucoaféresis	$15.7 \times 10^9$	$8.95 \times 10^9$	$7.2 \times 10^9$	$19.8 \times 10^9$	$13.6 \times 10^9$	$8.36 \times 10^9$	$12.6 \times 10^9$	$12.462 \times 10^9$	$11.96 \times 10^9$	$13.32 \times 10^9$
% células CD14+	21.00	22.80	17.00	24.60	12.00	18.90	11.00	19.50	9.10	25.50
Nº monocitos pre-selección	$3297 \times 10^6$	$2040.6 \times 10^6$	$1224 \times 10^6$	$4870 \times 10^6$	$1642 \times 10^6$	$1579.4 \times 10^6$	$1386 \times 10^6$	$2430 \times 10^6$	$1088 \times 10^6$	$3397 \times 10^6$
Nº monocitos post-selección	$2280 \times 10^6$	$1620 \times 10^6$	$560 \times 10^6$	$2596 \times 10^6$	$485.1 \times 10^6$	$1050.9 \times 10^6$	$950 \times 10^6$	$1345 \times 10^6$	$1190 \times 10^6$	$2620 \times 10^6$
Rendimiento de la selección inmunomagnética (%)	70.80	79.40	45.00	64.90	29.50	66.50	68.50	55.00	100.00	77.00
Nº monocitos cultivados	$2000 \times 10^6$	$1418 \times 10^6$	$413 \times 10^6$	$2319 \times 10^6$	$402.6 \times 10^6$	$966.4 \times 10^6$	$865 \times 10^6$	$1178 \times 10^6$	$1107.5 \times 10^6$	$2453 \times 10^6$
Nº CDtol pulsadas con los péptidos de mielina	$522 \times 10^6$	$276 \times 10^6$	$78 \times 10^6$	$536.4 \times 10^6$	$151.2 \times 10^6$	$315 \times 10^6$	$126 \times 10^6$	$156 \times 10^6$	$141.6 \times 10^6$	$340 \times 10^6$
Rendimiento producción Cdtol pulsadas (%)	26.10	19.40	18.80	23.10	37.55	32.60	14.00	13.00	12.80	13.90

\*Monocitos seleccionados  $4 \times 10^9$

Tabla 7. Rendimiento de la producción para cada uno de los productos celulares generados.

Los productos celulares administrados a los 9 pacientes fueron liberados según el procedimiento establecido en el IMPD (dossier del producto medicamentoso en investigación). En concreto, para la liberación del producto terapéutico se requiere que tanto la sustancia activa (CDtol pulsadas con los péptidos de mielina y resuspendidas en albúmina humana al 5%) como el producto terapéutico (CDtol pulsadas y criopreservadas) cumplan especificaciones relativas a viabilidad, fenotipo, función y esterilidad. La sustancia activa de todos los pacientes cumplió los requisitos establecidos, excepto en uno en que la viabilidad de la sustancia activa fue inferior al 70%. Los productos terapéuticos de los 9 pacientes cumplieron especificaciones. A pesar de que la sustancia activa del paciente mencionado mostraba una disconformidad, se decidió liberar el producto terapéutico tras realizar un análisis de riesgo/beneficio para el paciente. Analizando las características del producto terapéutico administrado a los pacientes, se observó que el grado de inhibición de la producción de IFN $\gamma$  de PBMC alogénicos inducido por las CDtol pulsadas en una reacción mixta leucocitaria fue superior al 50% en todos los pacientes, con una media de 72.4 % ( $\pm 19.1$ ), destacando los pacientes de la cohorte 1 en los que fue superior al 90%. Además, las CD del producto terapéutico presentaban un fenotipo tolerogénico, lo que viene dado por una menor expresión de los marcadores de maduración en comparación con las CD control (CD maduras del propio paciente). En este sentido, el porcentaje de CDtol pulsadas que expresaron el marcador CD80 fue del 58.6% ( $\pm 17$ ) menos que las CD control, para el CD83 fue del 70.5% ( $\pm 15.8$ ), y para el CD86 fue del 59.7% ( $\pm 13.4$ ) (Tabla 8).

Sustancia activa <sup>f</sup>	COHORTE 1			COHORTE 2			COHORTE 3			
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P7-bis	P8	P9
Viabilidad ( $\geq 70\%$ )	81.30	93	80.80	60	88.70	89.20	80	80.7	91.9	73.5
% Inhibición producción IFN- $\gamma$ *	92	89.7	94.01	88.50	82.40	74.70	57.67	51.9	90.12	89.94
% células CD209+ ( $\geq 80\%$ )	99.90	99.98	99.50	93.80	99.83	99	99.88	99.97	99.9	99.81
% células HLADR+ ( $\geq 90\%$ )	99.10	99.60	98.77	93.15	91.55	98.74	99.77	99.97	98.5	100
% células CD3+ ( $\leq 2\%$ )	0.16	0.20	0.07	0.01	0.08	1.02	0.22	0.062	0.19	0.027
% células CD80 **	-28.99	74.82	63.49	90.82	48.68	20.57	35	27.4	-5.57	34.04
% células CD83 **	-2.6	94.31	84.59	90.39	35.53	81.53	53.5	74.4	48.63	85.88
% células CD86 **	38.29	56.49	56.86	52.92	37.38	54.13	39.8	25.4	50.68	67.71
Esterilidad (negativa)	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Mycoplasma (negativa)	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Endotoxina ( $\leq 20$ UE/ml)	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03



Producto terapéutico <sup>##</sup>	COHORTE 1			COHORTE 2			COHORTE 3			
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P7-bis	P8	P9
% Inhibición en la visibilidad de la sustancia activa (≤20%)	5.40	20	2.50	16.60	7.60	12.20	11.25	8	9.2	4
% Inhibición producción IFN-γ *	96.30	96.67	96.67	55.90	52.80	65.77	58.97	50.9	65.56	84.7
% células CD209+ (≥80%)	99.80	99.61	97.09	99.40	99.88	96.70	99.7	99.95	99.95	99.4
% células HLADR+ (≥90%)	98.48	99.11	97.09	95.84	92.67	91.90	99.52	99.66	100	99.8
% células CD3+ (≤2%)	0.14	0.68	0.27	0.00	0.28	0.28	0.59	0.24	0.15	0.029
% células CD80 **	54.02	89.53	65.2	82.80	54.94	46.28	59.66	49.4	32.52	51.54
% células CD83 **	69.94	87.43	76.86	77.84	51.14	79.01	77.83	63.8	37	84.06
% células CD86 **	54.26	74.52	49.45	48.85	59.63	80.57	51.31	39.2	66.27	72.66
Esterilidad (negativa)	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Mycoplasma (negativa)	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Endotoxina (≤20 UE/ml)	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03

# CDtol pulsadas con los péptidos de mielina y resuspendidas en albúmina humana al 5%

## CDtol pulsadas con los péptidos de mielina y criopreservadas

\* ≥50% de la media de 4 PBMC donantes; para cohorte 1: inhibición de la proliferación de PBMC alogénicos.

\*\* Expresión (MFI) de al menos uno de los 3 marcadores ≥35% menos en comparación con las CD control (maduras); para cohorte 1: ≥15%

IFN-γ: interferón gamma; PBMC: células mononucleadas de sangre periférica; MFI: intensidad media de fluorescencia

Tabla 8. Características de los productos generados, tanto de la sustancia activa (A) como del producto terapéutico (B) liberado para tratar a los pacientes. En rojo se destacan los valores que no cumplieron las especificaciones requeridas.

### 5.3. Seguridad y tolerabilidad

El análisis de seguridad y tolerabilidad se realizó por intención de tratar sobre los 13 pacientes incluidos en el ensayo.

No se observó ningún SAE relacionado con la terapia en investigación, y sólo el 21.8% de los AA estuvieron relacionados con el procedimiento de leucoaféresis o con la administración de la terapia. Los AA relacionados con la administración fueron principalmente debidos a reacciones en el lugar de inyección, como dolor, presión o quemazón durante la administración de las CDtol-vitD3 de intensidad leve-moderado, que se resolvió inmediatamente en la mayoría de los casos, sin necesidad de medicación. Tras la observación de estos AA en los primeros pacientes de la cohorte 1, se implementaron 2 medidas en el protocolo para las siguientes cohortes: descongelar el producto celular al baño maría a 37°C e incorporar la escala visual analógica (EVA) para medir el dolor. La puntuación media en la escala EVA referidas por los pacientes fue de 1.5 sobre 10, 0.6 para los pacientes de la cohortes 2 y, 2.4 para la cohorte 3. La puntuación máxima referida fue de 6 (Figura 18). También hubo algunos AA de carácter leve relacionados con el procedimiento de leucoaféresis.

Los AA derivados de la propia EM comportaron el 27.9% de todos los AA. Se reportaron AA en relación con aparición de actividad radiológica en todos los pacientes, así como 3 brotes leves que fueron reportados como SAE según el protocolo del ensayo. Los detalles de los brotes y la actividad radiológica se tratarán en el apartado sobre los datos de eficacia clínica y radiológica preliminar.

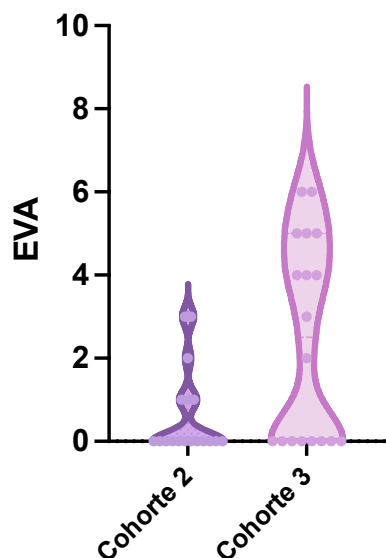


Figura 18. Gráfico de violines que muestra las puntuaciones de los pacientes referidas en la escala EVA para medir la intensidad del dolor debida a la administración de la terapia tras cada una de las 6 administraciones.

Cabe mencionar que se notificó un embarazo en una paciente de la cohorte 1 (paciente P3) un mes antes de la finalización del periodo de seguimiento del ensayo, por lo que no se pudo realizar la RM cerebral y la inmunomonitorización de la última visita (F12). El embarazo evolucionó sin complicaciones. En la semana 37 se evidenció un leve retraso del crecimiento intrauterino tipo 1, pero finalmente la paciente dio a luz vía vaginal a un recién nacido vivo a término sin malformaciones ni trastornos del desarrollo notificados hasta la fecha.

No se notificó ninguna infección por el virus SARS-CoV-2 en ningún paciente durante su periodo en el estudio. Tras el inicio de la pandemia, se incluyó en el protocolo la determinación de serologías en 4 tiempos diferentes del estudio. Todos los pacientes mantuvieron serologías negativas.

Todos los AA mencionados, así como un resumen de otros AA no relacionados se muestran en la [tabla 9](#).

AA	COHORTE 1 (n=6)	COHORTE 2 (n=3)	COHORTE 3 (n=4)	Total (n=13)
<b>Total AA</b>	<b>73</b>	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>179</b>
<b>AA relacionados con terapia en investigación</b>	<b>19 (26%)</b>	<b>6 (11.3%)</b>	<b>14 (26.4%)</b>	<b>39 (21.8%)</b>
· SAE	0	0	0	0
· Relacionados con procedimiento de leucoaféresis	2	0	2	4
Calambres	1		0	1
Dolor brazos	0		2	2
Astenia	1		0	1
· Reacciones en el lugar de inyección	13	6	12	31
Dolor	5	4	12	21
Presión	2	2	0	4
Quemazón	6	0	0	6
· AA inmediatos post-administración	4	0	0	4
Cefalea	1			1
Debilidad transitoria	1			1
Ansiedad	1			2
<b>AA derivados de la propia EM</b>	<b>22 (30.1%)</b>	<b>12 (22.6%)</b>	<b>16 (30.2%)</b>	<b>50 (27.9%)</b>
· Brotes (SAE)	3	0	0	3
· Actividad radiológica	9	5	13	27
· Otros síntomas:				
Trastorno cognitivo	4	0	1	5
Fatiga/astenia	4	2	1	7
Fenómenos paroxísticos	2	1	0	3
Fluctuaciones clínicas de secuelas	0	3	1	4
Pseudobrote	0	1	0	1
<b>Otros AA no relacionados</b>	<b>32 (43.8%)</b>	<b>35 (66%)</b>	<b>23 (43.4%)</b>	<b>90 (50.3%)</b>
· Trastornos gastrointestinales (vómitos, estreñimiento)	2	1	1	4
· Trastornos oculares (miodesopsias)	1	0	0	1
· Infecciones (conjuntivitis, sinusitis, orzuelo, ITU, GEA, resfriado, gripe)	4	8	1	13
· Trastornos sistema inmunológico (reacciones alérgicas, reacción post-vacunal)	3	1	2	6
· Trastornos musculoesqueléticos (cervicalgia, lumbociatalgia, artralgias, atrosis, tendinopatía, caídas)	6	7	11	24
· Trastornos ginecológicos (dismenorrea, metrorragia, síntomas premenopáusia)	4	6	1	11
· Trastornos psiquiátricos (ansiedad, depresión)	6	3	1	10
· Trastornos cardiovasculares (vasovagales, crisis hipertensiva, bradicardia)	2	2	1	5
· Trastornos neurológicos (cefalea, somnolencia farmacológica)	0	2	3	5
· Alteraciones analíticas	0	4	1	5
· Embarazo	1	0	0	1
· Otros (procedimientos médico-quirúrgicos)	3	1	1	5

Tabla 9. AA reportados en cada una de las cohortes durante el periodo de estudio. Se muestra el n° de AA totales y se describe el tipo de AA teniendo en cuenta si está relacionado con la terapia en investigación, con la propia EM o no relacionado.

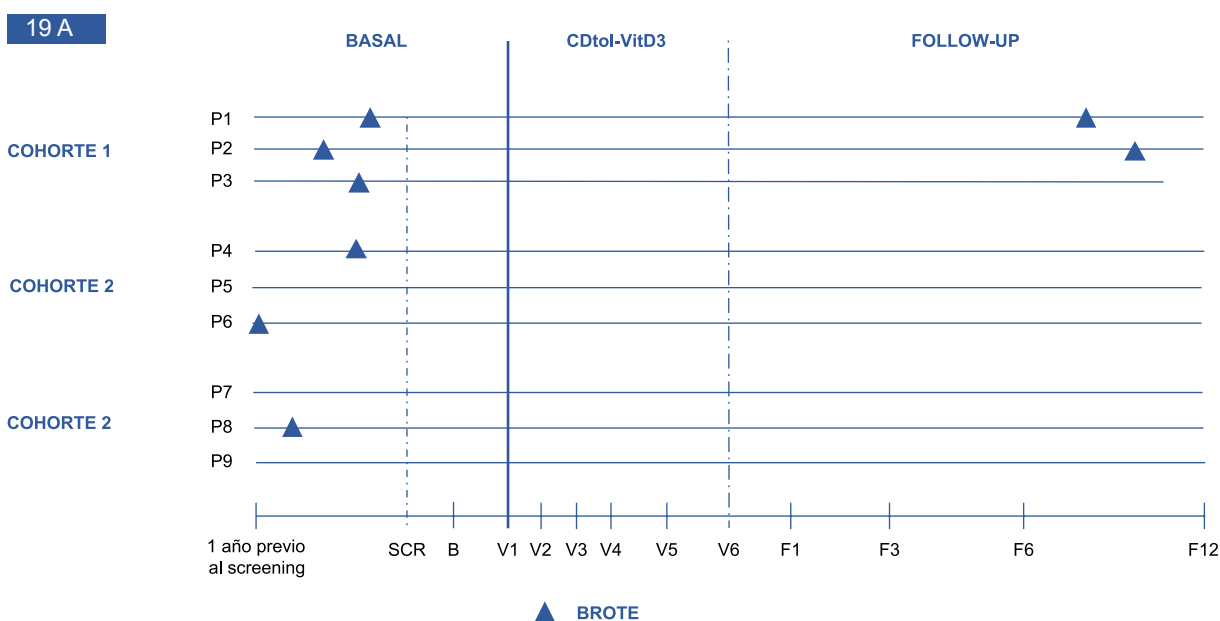
## 5.4. Eficacia preliminar

Aunque se trata de un ensayo clínico fase I y la “n” de pacientes no permite dar resultados confirmatorios sobre la eficacia de la terapia, se analizaron los hallazgos clínicos, radiológicos e inmunológicos más relevantes.

### 5.4.1. Hallazgos clínicos

**Brotos.** De los 9 pacientes que recibieron las CDtol-VitD3, 2 presentaron un brote de la enfermedad. Ambos brotes ocurrieron en 2 pacientes de la cohorte 1 (cohorte de dosis baja), durante la fase de seguimiento a más de 3 meses de la administración de la terapia (Figura 19 A). Uno de ellos fue un brote medular sensitivo-motor leve (sin modificación del EDSS), que recibió tratamiento con metilprednisolona oral 1g/día por 3 días. El otro, fue un brote de tronco-cerebelo (vértigo) pero el diagnóstico fue retrospectivo ya que la paciente no consultó con nosotros en el momento del brote. Fue identificado por anamnesis en la visita siguiente y corroborado con la aparición de una nueva lesión en esta localización en la RM cerebral. Añadir que un paciente de la cohorte 2 presentó un empeoramiento clínico general con aumento de 1 punto en la EDSS en contexto de estrés y sobrecarga laboral, sin asociar actividad en la RM cerebral de ese momento, por lo que fue considerado como un pseudobrote.

Si comparamos la tasa anualizada de brotes (TAB) del año previo con la TAB durante el periodo del estudio en cada cohorte, observamos una reducción en la TAB del 66% en los pacientes de la cohorte 1, y una reducción del 100% en los pacientes de las cohortes 2 y 3 (Figura 19 B).



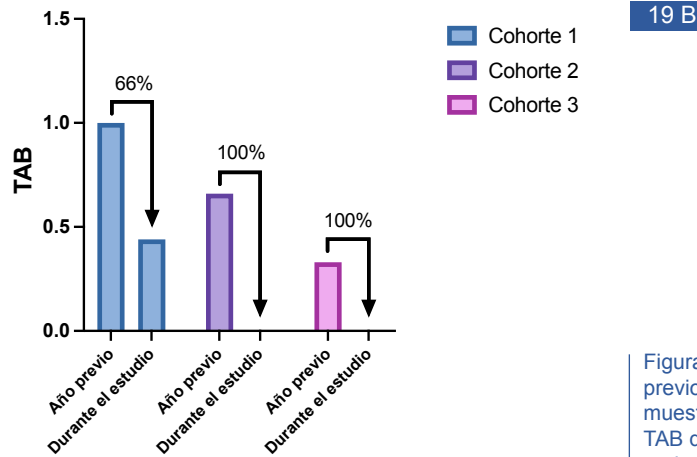


Figura 19. Actividad clínica de los pacientes en el año previo y durante el periodo de estudio. (A) Diagrama que muestra los brotes en el tiempo en el que presentan. (B) TAB del año previo comparada con la TAB durante el periodo de estudio, en cada cohorte.

**Progresión.** Sólo la paciente de la cohorte 1 con diagnóstico de EMPP, presentó progresión de la EM con empeoramiento de 1.5 puntos en la EDSS. El resto de pacientes se mantuvieron estables o incluso se observó mejoría en algunos de ellos. (Figura 20).

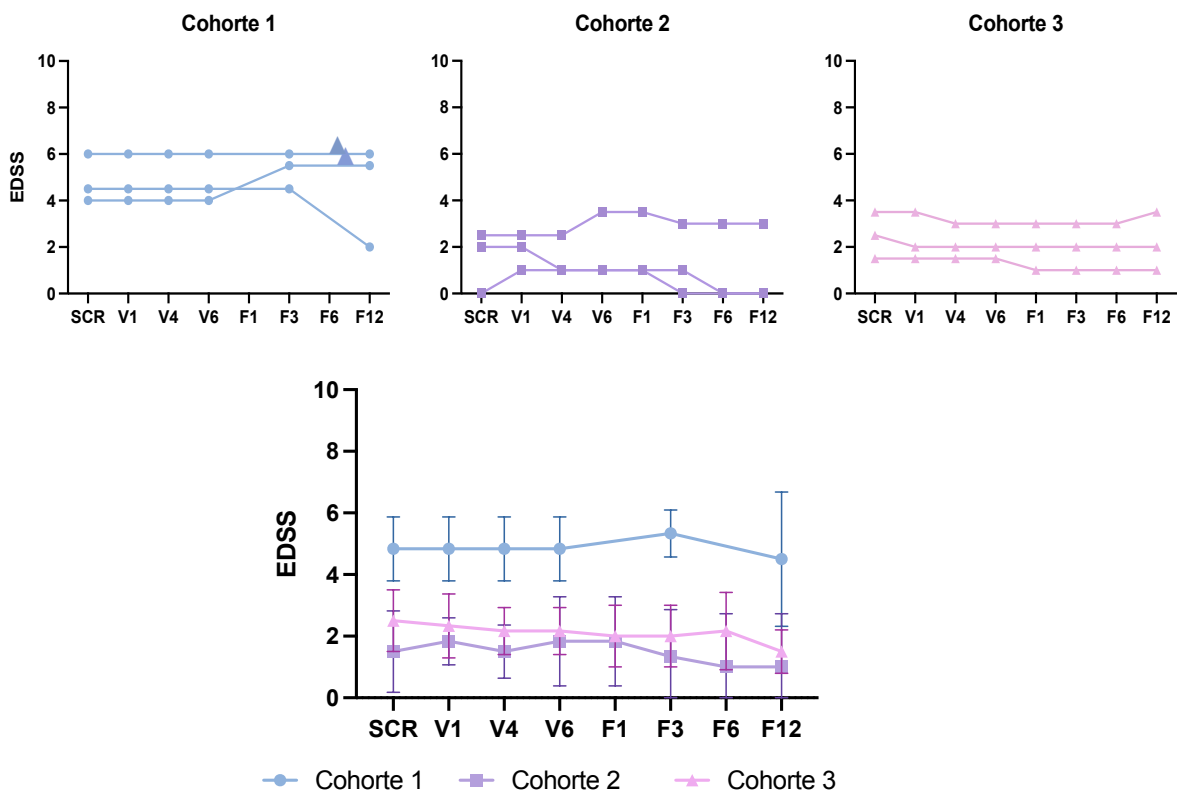


Figura 20. Puntuaciones en la escala EDSS de los pacientes de forma individual durante las visitas del estudio, en cada una de las cohortes. Los triángulos azules representan los brotes en el momento que se presentaron. La última figura muestra la media (+/- DE) de las puntuaciones en la EDSS, en cada uno de los tiempos evaluados.

En relación a los resultados obtenidos en la batería de test neurológicos funcionales, no se observaron cambios que reflejaran un empeoramiento significativo en los test realizados en ninguno de los pacientes, salvo en la paciente P1 que si se evidencia un empeoramiento mantenido de >4 puntos en los test cognitivos (SDMT). Cabe destacar, sin embargo, la mejoría de las puntuaciones en estas pruebas cognitivas de algunos otros pacientes, debido al efecto aprendizaje de la prueba (Tabla 10).

		Screening	V1	V4	V6	F1	F3	F6	F12
P1	25FWT	13					17		10
	9HPT (Dom/Non-D)	37/34.5	NA	NA	NA	NA	50.5/34	NA	41.5/31
	SDMT	41					35		35
P2	25FWT	6					5		5.5
	9HPT (Dom/Non-D)	35.5/21.5	NA	NA	NA	NA	33.5/20	NA	32.5/23
	SDMT	27					20		25
P3	25FWT	7					7.5	6	
	9HPT (Dom/Non-D)	34/22	NA	NA	NA	NA	23.5/28.5	24/25.5	NE
	SDMT	45					39	41	
P4	25FWT	4.5	6	5.5	5	5	5	5	5
	9HPT (Dom/Non-D)	21.5/21	23/22.5	25.5/24	22/22	21/22	21/25	19.5/22	20.5/22
	SDMT	51	47	49	45	50	52	44	47
P5	25FWT	3.5	4	4	4	4	3.5	4	4
	9HPT (Dom/Non-D)	17/17	18.5/19.5	16.5/18	17.5/17	20/18	19/16.5	16/17	17/17
	SDMT	68	77	82	79	83	80	61	87
P6	25FWT	3	3	3.5	4	3.5	4	4	4
	9HPT (Dom/Non-D)	17.5/18.5	16/20	18.5/18.5	18.5/20	16.5/19.5	15.5/18.5	16.5/19	16.5/21.5
	SDMT	54	47	53	53	56	61	56	57
P7	5FWT	4	4	4	4	4	4	4	4
	9HPT (Dom/Non-D)	16.5/19.5	16.5/24.5	17.5/22.5	16/18.5	15.5/17	16/19	16/19	16/17.5
	SDMT	57	51	58	53	57	56	56	56
P8	25FWT	4	4	4	3.5	4	3.5	3.5	3.5
	9HPT (Dom/Non-D)	19.5/18.5	18/18.5	16/17.5	17/20	18.5/20	19/23	18/17	17/19
	SDMT	56	58	73	99	110	110	110	110
P9	25FWT	4	5	4.5	5	5	5	4.5	4
	9HPT (Dom/Non-D)	24.5/18	23.5/20.5	20/19.5	21/21	20/20	18.5/18.5	20.5/21	24.6/23.6
	SDMT	48	48	45	47	51	51	51	45

Tabla 10. Resultados de la batería de test neurológicos funcionales (25FWT, 9HPT y SDMT) de los pacientes durante el estudio. NA= no aplica (no incluidos en el protocolo para la cohorte 1). NE= no evaluable. En rojo, se remarcan las puntuaciones consideradas como empeoramiento significativo.

**Calidad de vida.** Los resultados del análisis de los cuestionarios MSQoL-54 cumplimentados por los pacientes, no mostraron cambios sustanciales en su calidad de vida durante el periodo de estudio (Figura 21).

Los pacientes con mayor EDSS (los de la cohorte 1), obtuvieron unas puntuaciones más bajas en los cuestionarios que los pacientes de las otras 2 cohortes, lo que podría relacionarse con el impacto negativo de la discapacidad en la calidad de vida de los pacientes. Los ítems con las puntuaciones más bajas de forma global en los 9 pacientes fueron: energía (50.8+/-19.1), percepción de la salud (53.7+/-12.4) y función cognitiva (55.8+/-23.4).

A la pregunta específica de cómo dirían que es su salud actual (realizada en la visita F3, tras haber recibido la terapia celular) comparada con la de hace un año (antes de participar en el estudio), el 55.5% refirió estar más o menos igual y el 44.4% algo peor.

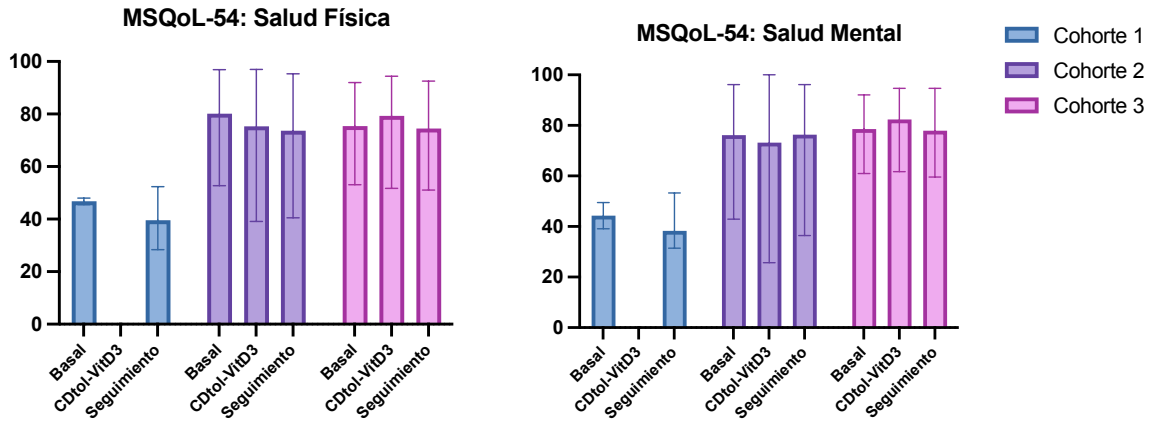
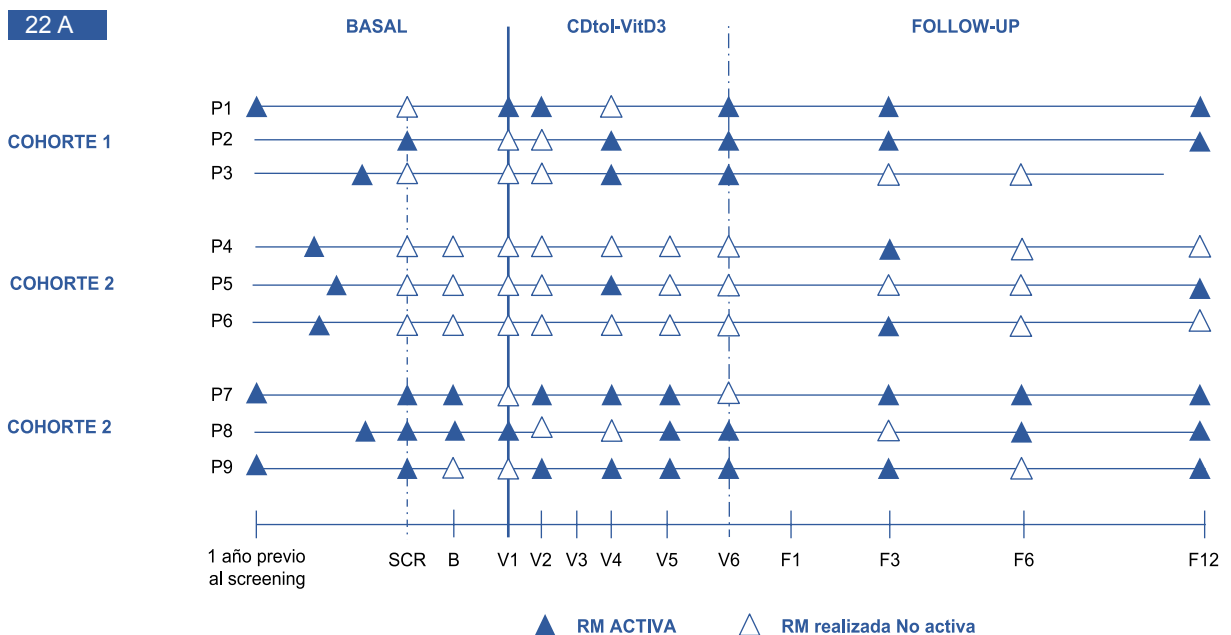


Figura 21. Puntuaciones medias por cada cohorte de los cuestionarios de calidad de vida MSQoL-54 según cada una de las subdimensiones de salud física y mental, en los 3 periodos del estudio. Periodo basal incluye visita de screening, basal y V1; periodo tratamiento con CDtol-VitD3 incluye V4, V6 y F1; y periodo seguimiento incluye F3, F6 y F12. La versión de protocolo que aplicó a la cohorte 1, no incluía cuestionarios durante el periodo tratamiento. La línea incluida en el interior de las barras corresponde al rango entre la puntuación máxima y mínima.

#### 5.4.2. Hallazgos radiológicos

Todos los pacientes incluidos mostraron actividad radiológica en algún momento del periodo de estudio (18 meses) (Figura 22 A). Dos pacientes de la cohorte 1 presentaron un aumento destacable de la actividad radiológica en la fase de seguimiento, asociado a la actividad clínica descrita en el apartado previo. Los pacientes de la cohorte 2 presentaron un mejor control radiológico, con aparición escasas lesiones principalmente en el seguimiento. La cohorte 3, sin embargo, mostró una destacable actividad radiológica, aunque analizando más en detalle esta cohorte, observamos ya en las RM basales los pacientes presentaban un elevado nº de lesiones nuevas/aumentadas en T2, y sobre todo las lesiones captantes de gadolinio. Esta actividad parece reducirse durante el periodo de tratamiento para volver a aumentar posteriormente (Figura 22 B).



22 B

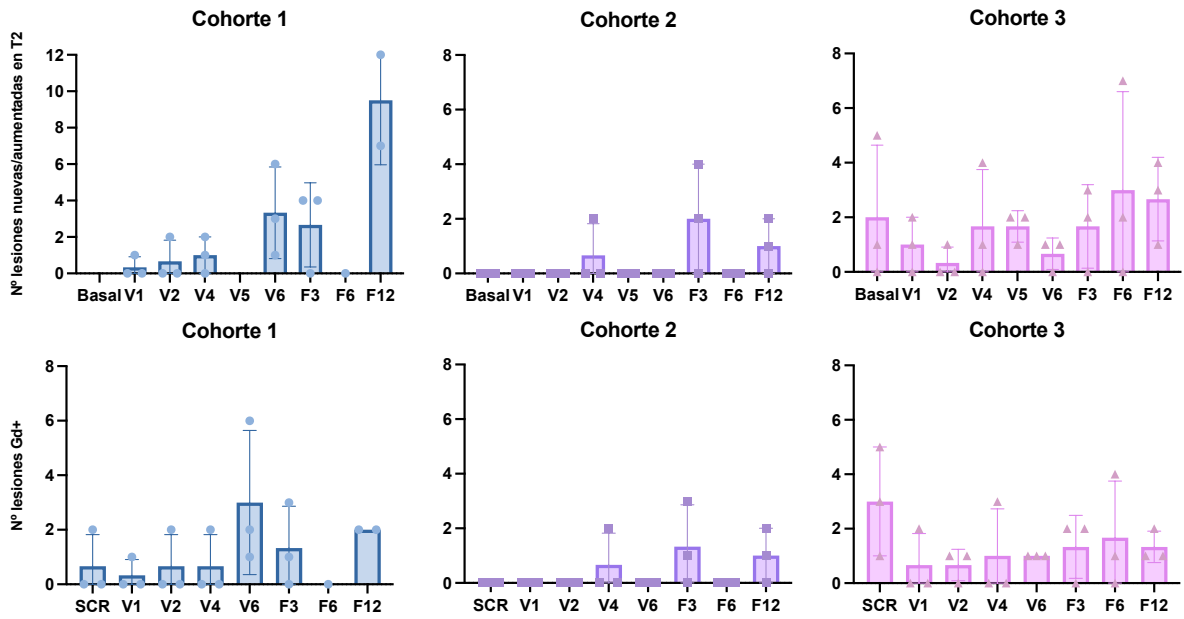


Figura 22. Actividad radiológica de los pacientes. (A) Diagrama que muestra las RM activas (con nuevas lesiones en T2 y/o captantes de gadolinio (Gd+) en el año previo y durante el estudio. (B) N° de lesiones nuevas o aumentadas de tamaño en secuencias T2/FLAIR y n° de lesiones Gd+ en cada uno de los tiempos del estudio, se representa la media +/- DE en cada cohorte.

### 5.4.3. Hallazgos inmunológicos

**Proliferación linfocitaria frente a péptidos de mielina.** Como criterio de inclusión para entrar en el estudio los pacientes debían presentar una reactividad linfocitaria T frente al pool de péptidos de mielina. De los 9 pacientes, 6 mostraron reactividad mediante la técnica de Timidina-[H]<sup>3</sup>, 3 mediante VPD-450, y 1 mediante ELISpot (1 paciente mostró reactividad por 2 técnicas). Tras la administración de la terapia, se encontraron algunas variaciones en los niveles de reactividad, sugiriendo cierto aumento de la proliferación linfocitaria en la visita V4+1sem en varios de los pacientes. Esto podría significar que la terapia estaría induciendo algún tipo de proliferación antígeno-específica, si bien estas técnicas no nos permiten discernir de que tipo de proliferación se trata (proinflamatoria o antiinflamatoria). También se observó cierta variabilidad entre las 3 técnicas utilizadas. En la siguiente figura (Figura 23), se muestran los resultados de los estudios de proliferación realizados con Timidina-[H]<sup>3</sup>.

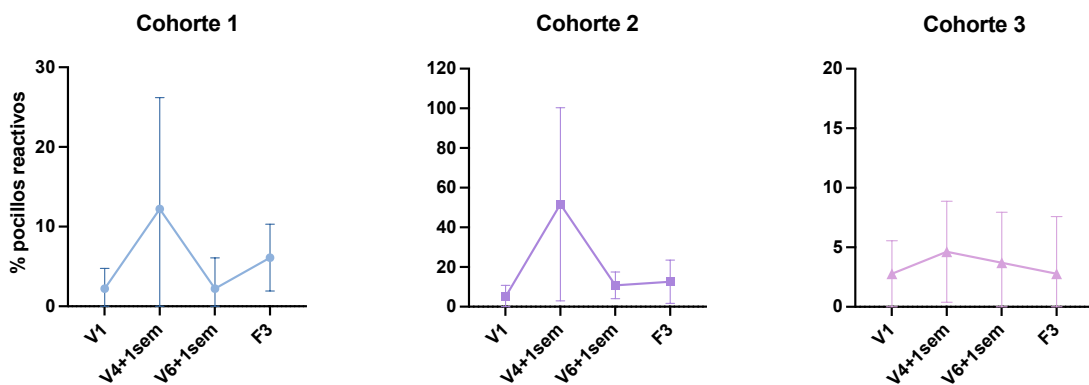
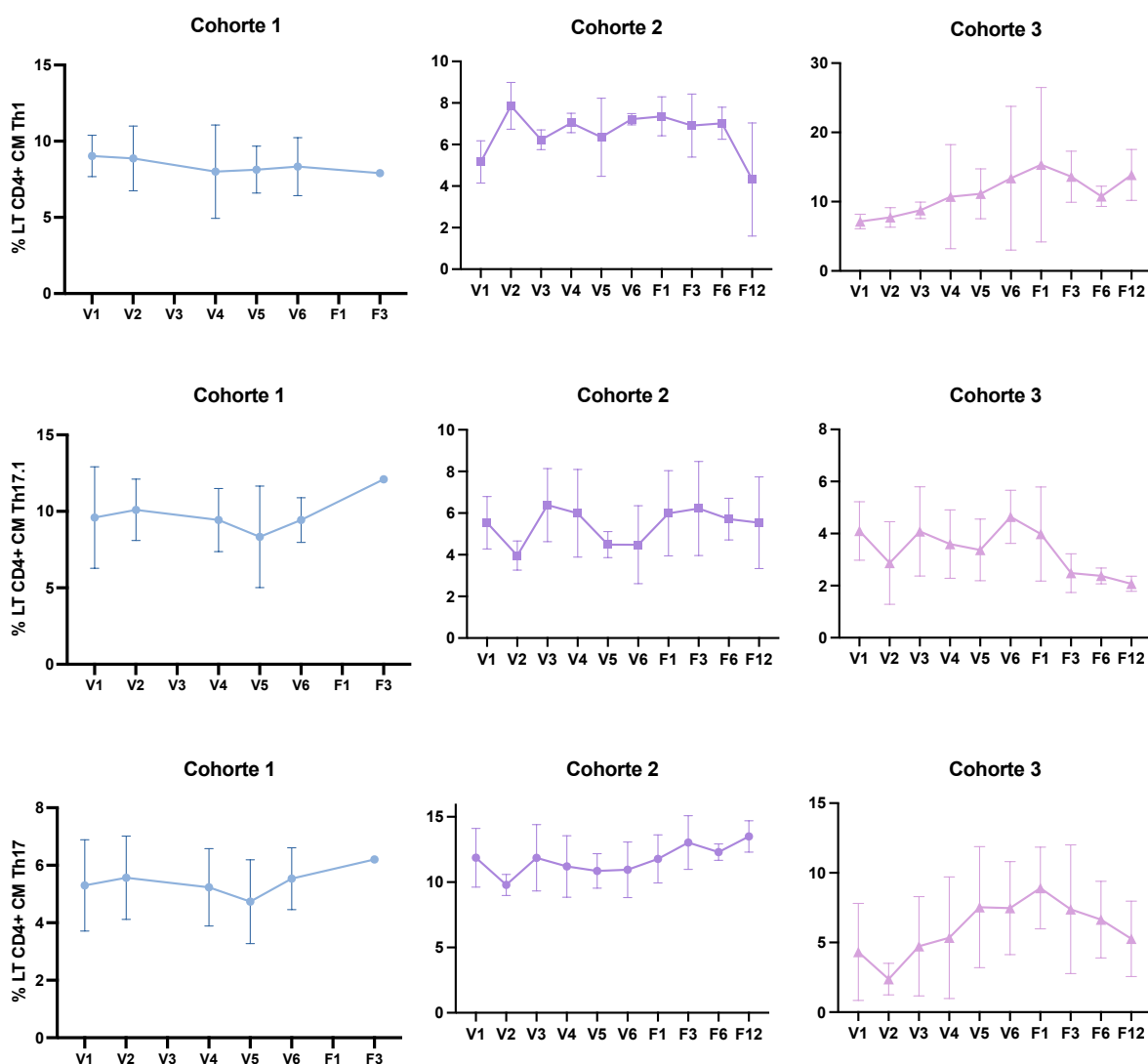


Figura 23. Análisis de la proliferación linfocitaria T frente al pool de péptidos de mielina mediante Timidina-[H]<sup>3</sup>. Se representa la media +/- DE del porcentaje de pocillos reactivos (restando los pocillos reactivos del control) para cada cohorte y en cada uno de los tiempos estudiados.



**Subpoblaciones linfocitarias.** Mediante citometría de flujo, se analizó un amplio panel de subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de los pacientes a lo largo del estudio. No se encontraron cambios destacables en las subpoblaciones B. Tampoco en los distintos subtipos de CD, que se presuponían posibles marcadores, si bien se tratan de subpoblaciones muy minoritarias. En cuanto a las subpoblaciones T, aunque no se evidenciaron cambios significativos a nivel global, algunos pacientes presentaron pequeñas variaciones en los porcentajes de LTCD4+ memoria central (CM), a expensas de estabilidad de las Th1 y/o Th17 y aumento de las Th2 durante el periodo de tratamiento, que posteriormente tienden a revertirse en algunos casos. La ratio entre las subpoblaciones proinflamatorias (Th1, Th17.1, Th17) y las antiinflamatorias (Th2) sugiere que puede existir cierta mejoría en el perfil inmunológico de los pacientes durante este periodo (Figura 24). Estos cambios son más claros en la cohorte 2, y no tanto en los pacientes de la cohorte 3, esto podría estar relacionado con las diferencias entre las condiciones inflamatorias basales de ambas cohortes.



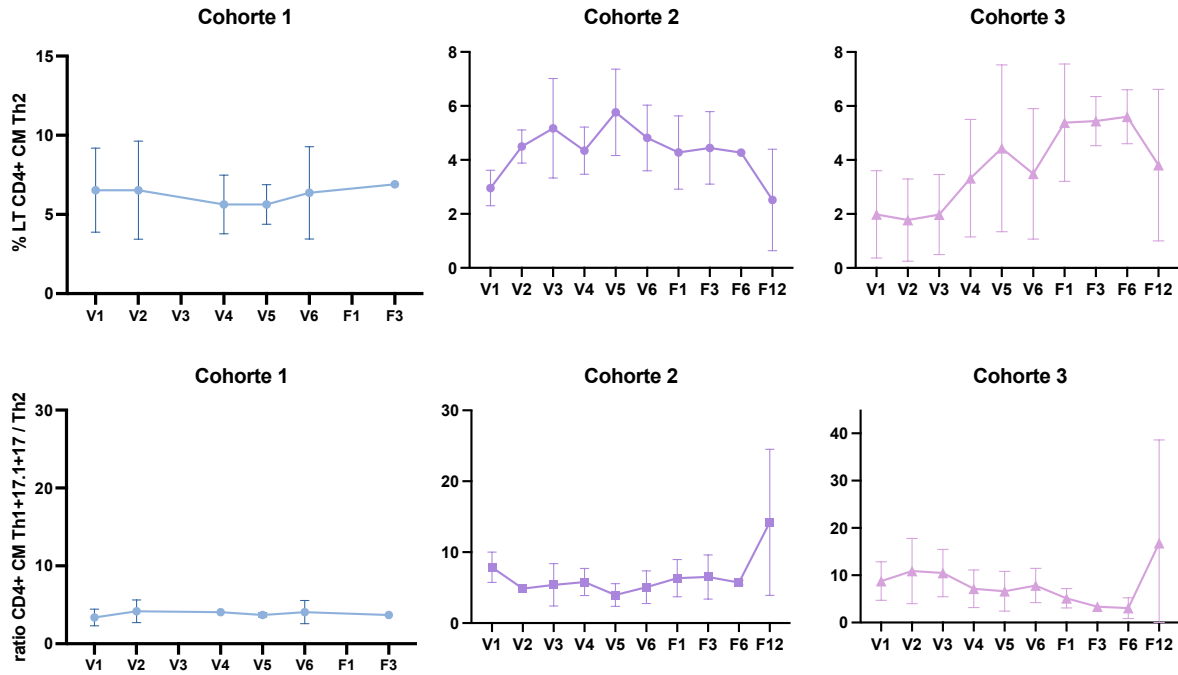


Figura 24. Cambios en las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ CM Th1, Th17, Th17.1 y Th2, así como la ratio entre las subpoblaciones proinflamatorias y las antiinflamatorias, durante el periodo de estudio para cada cohorte. Se representa la media +/- DE.

**Citocinas.** Actualmente no se dispone de resultados Serán estudiadas de forma centralizada a través del proyecto europeo ReSToRe.

## 5.5. Viabilidad de la terapia

En esta investigación se ha conseguido generar el producto celular con CDtol tratadas con VitD3 y pulsadas con péptidos de mielina y, administrarlo a pacientes con EM en los ganglios linfáticos cervicales cumpliendo el protocolo del ensayo clínico. Sin embargo, ha sido necesaria la participación de 17 pacientes para conseguir 9 pacientes tratados, por lo que se ha analizado la viabilidad individual de los procedimientos implicados en su desarrollo.

De los 17 pacientes, 2 pacientes fueron discontinuados por decisiones del investigador y uno por retirada voluntaria, quedando finalmente 14 pacientes evaluables. De estos, el **35.7%** de los pacientes tuvieron que ser **reemplazados** por fallo en algunos de los pasos imprescindibles para llevar a cabo la terapia:

- a. **Falta de proliferación LT a los péptidos de mielina: 2 pacientes (14.3%)** no obtuvieron un resultado positivo en ninguno de los 3 test realizados para detectar la proliferación a los péptidos, por lo que se consideraron un fallo de selección y se discontinuaron del estudio.
- b. **Leucoaféresis:** El procedimiento de leucoaféresis se pudo realizar en todos los pacientes, si bien cabe destacar que: a) 2 pacientes (14%) tuvieron que ser sometidas a colocación

de una vía central yugular por problemas con los accesos venosos periféricos; y b) 2 pacientes (14%) fueron sometidas a 2 leucoaféresis, una por falta células para completar el producto celular ya que fue asignada a la cohorte 3 de dosis más alta, y otra por no obtenerse un producto celular con las cualidades requeridas.

- c. **Fallo en la producción celular: 3 pacientes (21.4%)** fueron discontinuados por fallo en la producción celular, debido a que los productos obtenidos no cumplían los requisitos para ser liberados. Es importante mencionar, que 2 de ellos fueron los 2 primeros pacientes del ensayo, y que tras analizar los potenciales problemas (tiempo de transporte demasiado largo (convencional) desde la extracción celular en BST Badalona hasta su llegada al Laboratorio de Terapia Celular de Navarra, variabilidad térmica durante el transporte, revisión del procedimiento de aféresis) se aplicaron medidas correctoras que resolvieron el problema relacionado con ello. En el resto de pacientes, se obtuvo un producto celular que cumplía con los criterios de liberación, así como una cantidad suficiente de viales para su administración (al menos 6 viales para cada paciente).
- d. **Criopreservación:** No hubo complicaciones relacionadas con la conservación del producto celular a  $-80^{\circ}$ .
- e. **Administración de la terapia:** Se pudo realizar correctamente en todos los pacientes. Si bien, es importante remarcar que su administración intraganglionar en los ganglios linfáticos cervicales requiere de un ecógrafo y un profesional entrenado y cualificado para ello. Las molestias derivadas de este tipo de administración ya han sido mencionadas en el apartado de seguridad y tolerabilidad.

En resumen, la viabilidad de nuestra terapia según los objetivos marcados fue del **64.3%**, debido a algunos fallos de screening relacionado con la proliferación linfocitaria antígeno-específica y problemas de producción celular. Sin embargo, tras la modificación de algunos factores que interferían en la elaboración del producto celular, fueron optimizadas las producciones. En este sentido, es importante considerar que, si no tenemos en cuenta los productos celulares fallidos por estos factores posteriormente resueltos, sólo un paciente fue excluido por no conseguirse un producto celular que cumpliera las especificaciones.

## 5.6. Selección de dosis óptima

La elección de la dosis adecuada se basa principalmente en el principio de seguridad y tolerabilidad, puesto que el tamaño de la muestra del ensayo no permite extraer resultados concluyentes sobre eficacia.

Teniendo en cuenta que los pacientes que recibieron la dosis más alta de CDtol ( $15 \times 10^6$ ) no presentaron ningún SAE y los AA relacionados con la terapia que sufrieron fueron leves (molestias durante la administración), se considera ésta la dosis óptima para aplicar a los pacientes de la cohorte 4, que recibirán las CDtol en terapia combinada con interferón-beta o dimetilfumurato.

Además, la posibilidad de administrar la dosis más alta nos da una mayor capacidad para inducir tolerancia en el sistema inmune de los pacientes, lo que es importante para el potencial beneficio clínico de la terapia.

## 6. Discusión

El futuro de la medicina clínica se dirige a desarrollar alternativas terapéuticas personalizadas, que se adapten a las necesidades del paciente sin comprometer otros aspectos de su salud. La terapia celular forma parte de estas terapias avanzadas que buscan tratar la enfermedad desde su origen, para curar o reparar la disfunción del sistema inmunitario, y con ello, detener o revertir la enfermedad. Pese a considerarse una alternativa esperanzadora, estas terapias tienen una alta complejidad y es necesario llevar a cabo estudios que proporcionen una evidencia científica robusta.

Como ya se ha comentado en el apartado de introducción, hasta el momento, en EM se han probado diferentes terapias celulares, la mayoría de ellas en ensayos clínicos fase I/II dirigidos fundamentalmente a demostrar la seguridad y viabilidad de las terapias, por lo que queda por confirmar el beneficio terapéutico de las mismas<sup>[139]</sup>.

Nuestro ensayo clínico se basa en la administración de una terapia con CDtol autólogas que pretende inducir la tolerancia frente a un grupo de péptidos de la mielina, que ha sido perdida en el contexto de la enfermedad. Se trata del primer ensayo que aplica la vía intraganglionar para la administración de las CDtol en pacientes con EM.

Los resultados de nuestro ensayo confirman que la administración intraganglionar de CDtol en pacientes con EM es una terapia viable, segura y bien tolerada, incluso para los pacientes que recibieron la dosis más alta de CDtol ( $15 \times 10^6$ ). No se han reportado SAEs, y los AA relacionados con la medicación fueron debidos a reacciones locales transitorias durante la inyección mayoritariamente leves (presión, dolor). Hemos observado que, para minimizar estas molestias, se ha de tener en cuenta que el producto celular a administrar haya sido correctamente descongelado y se encuentre a  $37^\circ\text{C}$  en el momento de su infusión.

Desde el punto de vista clínico, se ha observado un buen control de los brotes con una reducción hasta del 100% de la TAB en los pacientes de la cohorte 2 y 3 comparada con la TAB de al previo al estudio, así como estabilidad del EDSS e incluso mejoría en algunos de ellos. Si bien, a nivel radiológico, todos los pacientes han presentado actividad en algún momento del estudio. Estos resultados divergen de los únicos datos publicados actualmente del ensayo clínico con CDtol (NCT0228367), donde sólo 2 pacientes de los 8 incluidos presentaron actividad radiológica<sup>[135]</sup>. Sin embargo, cabe destacar que sus pacientes eran menos activos a nivel basal y que sólo 2 resonancias fueron realizadas durante el estudio (basal y 12 semanas post-inicio de tratamiento), lo que reduce las posibilidades de detectar nuevas lesiones. Pese a que nuestros resultados radiológicos no son óptimos, observamos que en los pacientes de la cohorte 2 la actividad radiológica se mantuvo globalmente baja, y que en los de la cohorte 3, la actividad radiológica parece reducirse durante el periodo en tratamiento, si lo comparamos con el periodo basal.

Al comparar los resultados clínico-radiológicos con la calidad de los productos celulares administrados, encontramos que, aunque los productos que habían obtenido los mejores

resultados en cuando al grado de inhibición de la producción de IFN $\gamma$  eran los de la cohorte 1, no se observó mejoría en esta cohorte respecto a las otras. Esto podría deberse a que la dosis que recibieron del producto celular era la más baja utilizada y, por lo tanto, insuficiente para inducir los cambios terapéuticos esperados.

Hay que destacar que los procedimientos para la elaboración de la terapia con CDtol no están completamente estandarizado. Una de las principales diferencias se debe al tipo de agente tolerogénico, siendo los más utilizados la VitD3 y la DEXA (ver tabla 3). Además, todavía no está claro cuánto tiempo duraría el efecto de las CDtol y cada cuánto deben ser administradas para mantenerlo. Es por este motivo que se han investigado diferentes pautas de administración, siendo la administración de dosis repetidas la que parece más razonable considerando los resultados de los estudios en EAE<sup>[107]</sup>. De la misma manera ocurre con la vía de administración y la dosis. Aunque en términos de seguridad, todos los ensayos clínicos con CDtol han demostrado que este tipo de terapia es segura<sup>[139]</sup>, la heterogeneidad que existe en la elaboración de los productos celulares, es uno de los inconvenientes para progresar en los aspectos sobre eficacia.

Centrándonos en la EM, existen diferencias en la elaboración y administración de las CDtol en los 3 ensayos clínicos realizados. En el ensayo clínico de Zubizarreta et al.<sup>[135]</sup> se trató a los pacientes con CDtol tratadas con DEXA en 3 administraciones por vía intravenosa. En nuestro ensayo y en el ensayo de Willekens et al., las CDtol han sido tratadas con vitD3 y administradas en 6 dosis consecutivas. Como se ha mencionado con anterioridad, estos 2 últimos ensayos han sido desarrollados en el marco del proyecto europeo colaborativo ReSToRe (H2020), en el que, partiendo de un producto celular y una posología común, se compararán 2 vías de administración, la intraganglionar y la intradérmica, con la intención precisamente de dar respuesta a algunas de las preguntas que tenemos sin resolver<sup>[136]</sup>. Actualmente, estos estudios se encuentran en fase de análisis comparativo de los datos

Teniendo en cuenta que nuestra terapia con CDtol pretende restaurar la tolerancia perdida frente a los péptidos de mielina, se seleccionaron pacientes que hubieran demostrado proliferación linfocitaria T frente a los péptidos de mielina. Pese a que se han hecho intentos por optimizar este tipo de técnicas para estudiar la reactividad<sup>[140]</sup>, no se ha llegado todavía a un consenso de qué técnica es la más adecuada. Es por ello por lo que nuestro equipo decidió realizar 3 técnicas diferentes en paralelo. En nuestra experiencia, la técnica que mostró una mayor sensibilidad para detectar la proliferación linfocitaria específica frente a los péptidos fue la Timidina-[H]<sup>3</sup>. Los resultados inmunológicos obtenidos son de difícil interpretación debido al tamaño de la muestra, pero algunos hallazgos apuntan a un posible aumento de la proliferación linfocitaria durante el tratamiento pero que, unido a los pequeños cambios observados en las subpoblaciones linfocitarias, podría sugerir una ligera conversión hacia un perfil más antiinflamatorio. Estos cambios fueron evidenciados principalmente en los pacientes de la cohorte 2, que fue la cohorte con unas condiciones basales menos inflamatorias, lo que se ha postulado que podría ser un aspecto crucial para que las CDtol puedan ejercer su efecto terapéutico.

Un estudio realizado con muestras de pacientes con EM y controles sanos, observó que los pacientes con EM tenían menos proporción de monocitos con fenotipo intermedio y producían una mayor proporción de citocinas proinflamatorias[140]. Bajo la hipótesis de que el contexto inflamatorio de los pacientes con EM podría influir en la funcionalidad de las CD y, por lo tanto, reducir el efecto terapéutico de las CDtol, nuestro grupo ha realizado unos experimentos in vitro y en el modelo de EAE, combinando las CDtol-VitD3 con un tratamiento inmunomodulador como el IFN $\beta$  que es el primer fármaco que se desarrolló para tratar la EM y que sigue siendo utilizado en primera línea en la práctica habitual. Los resultados de dichos experimentos demostraron que las CDtol-VitD3 + IFN $\beta$  potencian el efecto de las CDtol-VitD3 solas, e inducen un cambio hacia un perfil Th2, y que los ratones tratados con la terapia combinada presentan una reducción significativa de la discapacidad comparado con los otros grupos (figura 23)<sup>[142]</sup>.

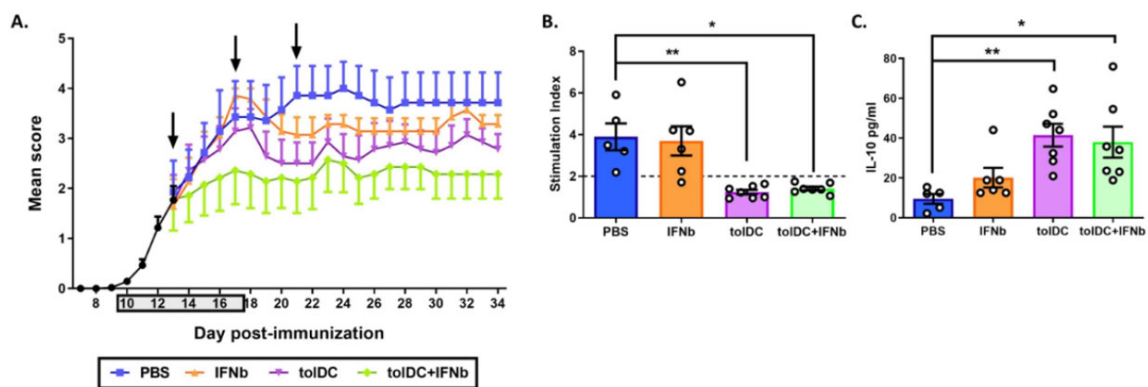


Figura 23. Resultados del experimento de EAE con terapia combinada CDtol-VitD3-MOG + IFN-beta. (A) Representa la puntuación clínica media de ratones tratados con vehículo (PBS) (azul), IFN-beta (IFN $\beta$ ) [5000 UI] (naranja), CDtol-MOG ( $1 \times 10^6$ , CDtol) (violeta) o CDtol-MOG+IFN-beta (CDtol+IFN $\beta$ ) (verde) ( $n = 7$ /grupo) durante 34 días de seguimiento. El cuadrado gris en el eje X y las flechas indican el período de tratamiento diario con IFN-beta (del día 10 al 17 post-immunización, pi) y la administración de VitD3-CDtol-MOG (días 13, 17 y 21 pi), respectivamente. (B) Análisis de la reactividad de células T específicas de antígeno a MOG35-55 en esplenocitos de ratones tratados con vehículo (PBS), IFN-beta (IFN $\beta$ ), VitD3-CDtol-MOG (CDtol) o VitD3-CDtol-MOG+IFN-beta (CDtol+IFN $\beta$ ) el día 34 pi. (C) Nivel de IL-10 en el sobrenadante de esplenocitos reestimulados con antígeno MOG35-55 de cada grupo de ratones. Las barras de errores corresponden al error estándar de la media. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Quirant-Sánchez et al. 2021).

Las conclusiones de este trabajo apoyan la idea de que la terapia combinada con CDtol y un tratamiento inmunomodulador/antiinflamatorio podría ser potencialmente más beneficiosa que las CDtol solas. En esta línea, nuestro ensayo clínico TOLERVIT-MS incluye una 4<sup>a</sup> cohorte que pretende evaluar la seguridad de la terapia combinada con IFN $\beta$  o dimetilfumarato en los pacientes con EM. Estos resultados no se han podido exponer en la presente tesis, puesto que la cohorte no ha sido completada. Si bien, hasta la fecha un paciente ya ha sido tratado satisfactoriamente.

Si revisamos la literatura en busca de estudios que hayan probado las CDtol en combinación con otras terapias, encontramos que algunos de los ensayos clínicos con CDtol en otras patologías autoinmunes como en la AR, ya habían administrado las CDtol a los pacientes manteniendo sus tratamientos habituales con metotrexato, leflunomida, sulfasalazina,

adalimumab o etanercept<sup>[130,131]</sup>, sin problemas relacionados con la seguridad. En un ensayo realizado en pacientes con EM y NMOSD, se incluyeron 2 pacientes con NMOSD que mantuvieron su tratamiento inmunosupresor con micofenolato o rituximab<sup>[135]</sup>. Actualmente, un nuevo ensayo clínico evalúa la seguridad y eficacia de la terapia combinada de CDtol (tratadas con Dexa) con los tratamientos inmunomoduladores de primera línea actuales en pacientes con EM (interferones, acetato de glatirámico, teriflunomida, dimetilfumarato). Dicho ensayo se encuentra en fase de reclutamiento (ToIDec-COMBINEM, ClinicalTrials.gov NCT04530318, EudraCT 2020-000737-41).

Otro de los aspectos a considerar en el desarrollo de una terapia inductora de tolerancia, es la identificación de los autoantígenos adecuados frente a los que se debe restaurar la tolerancia. Esto es especialmente importante en patologías como la EM, en las que todavía existen incógnitas sobre compleja patogenia de la enfermedad. Pese a que en EM ha sido demostrada la implicación de los 7 péptidos de mielina mencionados anteriormente (ver capítulo 1.2.3.), y los 3 ensayos realizados han trabajado con el mismo grupo de péptidos para elaborar sus CDtol, otras investigaciones apuntan que otros péptidos de mielina también podrían estar implicados.

En este sentido, un estudio demostró que los LT de los pacientes con EM responden a epítomos de 8 regiones diferentes de la MBP<sup>[143]</sup>. De hecho, esto impulsó el desarrollo de ATX-MS-1467, una inmunoterapia basada en una mezcla de 4 de estos péptidos sintéticos (ATX-MS1 (MBP<sub>30-44</sub>), ATX-MS4 (MBP<sub>131-145</sub>), ATX-MS6 (MBP<sub>140-154</sub>) y ATX-MS7 (MBP<sub>83-99</sub>)), que se ha asociado a una reducción del número de lesiones captantes durante su administración intradérmica en un ensayo de 37 pacientes con EMR<sup>[144]</sup>. La guanosina difosfato (GDP)-I-fucosa sintasa también ha sido identificada por otros autores como un autoantígeno, el cual es reconocido por los LT CD4+ presentes en el LCR de los pacientes con HLA-DRB3\*02:02. Además, se ha visto un reconocimiento cruzado con péptidos homólogos de la microbiota intestinal<sup>[145]</sup>. En conjunto, estos resultados plantean la necesidad de utilizar de una mezcla de péptidos más amplia, que incorpore todos los péptidos identificados para mejorar la capacidad de inducción de tolerancia de las CDtol a los diversos autoantígenos implicados en la EM<sup>[146]</sup>.

Un punto que también merece la pena remarcar, es el momento de la enfermedad en el que se deben administrar las CDtol. Como para el resto de tratamientos que se utilizan actualmente en EM, se ha sugerido que el periodo de ventana del tratamiento se sitúa en fases iniciales de la enfermedad, antes de que el daño axonal y el fenómeno llamado *epitope spreading* (propagación del epítomo) ocurra, activando el sistema inmune periférico que desencadena la cascada inflamatoria en el SNC<sup>[147]</sup>. Algunos trabajos en EAE como el realizado por nuestro grupo, también evidencian un mayor beneficio de la terapia si se administra en la fase preclínica que una vez manifestada la enfermedad, siendo este efecto aún mayor si se administra como terapia preventiva, antes de que la enfermedad sea inoculada a los ratones<sup>[107]</sup>.

En vista de la experiencia de la terapia con CDtol en EM, actualmente se está planteando que también podría ser útil en otras patologías autoinmunes del SNC como en la enfermedad



asociada a anticuerpos MOG+ o en la NMOSD con anti-AQP4+, dado que, al conocerse bien los autoantígenos, se presupone una respuesta antígeno-específica más eficiente<sup>[148]</sup>.

En resumen, el ensayo TOLERVIT-MS que constituye la presente tesis se trata del primer ensayo clínico con una terapia celular basada en CDtol para pacientes con EM administrada vía intraganglionar, lo que refleja la originalidad de la investigación y la motivación del equipo en buscar vías de administración alternativas que puedan aportar mayores beneficios a las ya conocidas. La fortaleza de nuestro ensayo clínico radica en el exhaustivo seguimiento clínico, radiológico e inmunológico que ha sido realizado a los pacientes del estudio. Las limitaciones vienen derivadas principalmente de: (1) la diferencia de la actividad basal de los pacientes que el azar distribuyó de forma heterogénea entre las cohortes y, (2) el pequeño tamaño muestral de las cohortes. Aunque estas limitaciones no afectan para demostrar el objetivo principal del ensayo, sí que repercuten en los resultados preliminares sobre la potencial eficacia de la terapia.

## 7. Conclusiones

1. La terapia celular con CDtol autólogas tratadas con VitD3 (CDtol-VitD3) y cargadas con un pool de péptidos de mielina administrada en los ganglios linfáticos cervicales de pacientes con EM, es segura y bien tolerada.
2. Los pacientes tratados con las dosis intermedia y alta de la terapia con CDtol-VitD3, han mostrado una reducción significativa de la tasa anualizada de brotes, así como estabilidad de la enfermedad, al no observarse progresión de la discapacidad durante el periodo de estudio.
3. La terapia con CDtol-VitD3 no ha conseguido controlar la actividad radiológica de forma óptima. Sin embargo, parece observarse cierta reducción en el número de lesiones captantes de gadolinio durante el periodo de tratamiento en los pacientes que recibieron la dosis alta de la terapia, en comparación a su actividad basal.
4. Desde el punto de vista inmunológico, cambios sutiles en algunas subpoblaciones minoritarias podría sugerir un cambio hacia un perfil antiinflamatorio durante el periodo de tratamiento, si bien, estos resultados no son concluyentes.
5. TOLERVIT-MS es el primer ensayo clínico con una terapia celular con CDtol-VitD3 administrada por vía intraganglionar cervical, que demuestra la viabilidad de esta vía de administración.
6. Los resultados favorables desde el punto de vista de seguridad, permiten considerar a la dosis más alta de la terapia con CDtol-VitD3 ( $15 \times 10^6$ ), la candidata para futuros estudios de fase II.

## 8. Líneas de futuro

Nuestro ensayo clínico constituye una aproximación más a la búsqueda de una terapia celular personalizada para los pacientes con EM.

Los resultados que obtengamos del análisis comparativo de nuestro ensayo y el ensayo clínico CCRG15-001 (MStoIDC) de la Universidad de Amberes en el marco del proyecto europeo ReSToRe, nos permitirá saber qué vía de administración, intraganglionar o intradérmica, podría ser más adecuada para la utilización de la terapia con CDtol-VitD3 en pacientes con EM. El diseño de un ensayo clínico fase II dentro de este proyecto está siendo estudiado, con la intención de investigar la eficacia de la terapia.

Así mismo, a la vista de nuestros recientes resultados de los experimentos in vitro y en el modelo de EAE que apoyan el potencial beneficio de la terapia combinada de CDtol-VitD3 con un tratamiento inmunomodulador/antiinflamatorio, y según los resultados que obtengamos en nuestros pacientes con EM tratados con IFN $\beta$  o dimetilfumarato de la cohorte 4 de nuestro ensayo clínico TOLERVIT-MS, consideramos interesante seguir investigando en esta línea para sacar el máximo potencial a la terapia, y así, aproximarnos un poco más a la restauración de la tolerancia inmunológica perdida frente a los autoantígenos causantes de esta enfermedad.

## 9. Bibliografía

1. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Current opinion in neurology*. 2018;31:752–9.
2. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83:1022–4.
3. Perez-Carmona N, Fernandez-Jover E, Sempere AP. [Epidemiology of multiple sclerosis in Spain]. *Revista de neurologia*. 2019;69:32–8.
4. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *European Journal of Neurology*. 2019;26:27–40.
5. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*. 2010;9:727–39.
6. Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurologic clinics*. 2016;34:919–39.
7. Jager PLD, Jia X, Wang J, Bakker PIW de, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics*. 2009;41:776–82.
8. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*. 2015;14:263–73.
9. Yuan S, Xiong Y, Larsson SC. An atlas on risk factors for multiple sclerosis: a Mendelian randomization study. *Journal of neurology*. 2021;268:114–24.
10. Bjernevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Sci New York N Y*. 2022;375:296–301.
11. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2008;372:1502–17.
12. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2018;391:1622–36.
13. Lassmann H, Horssen J van, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8:647–56.

14. Grigoriadis N, Pesch V van. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European Journal of Neurology*. 2015;22:3–13.
15. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46:907–11.
16. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83:278–86.
17. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33:1444–52.
18. Tremlett H, Marrie RA. The multiple sclerosis prodrome: Emerging evidence, challenges, and opportunities. *Mult Scler J*. 2020;27:6–12.
19. Tremlett H, Okuda DT, Lebrun-Frenay C. The multiple sclerosis prodrome is just unspecific symptoms in radiologically isolated syndrome patients – No. *Mult Scler J*. 2021;27:1824–6.
20. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17:162–73.
21. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011;69:292–302.
22. Zettl UK, Hecker M, Aktas O, Wagner T, Rommer PS. Interferon  $\beta$ -1a and  $\beta$ -1b for patients with multiple sclerosis: updates to current knowledge. *Expert Rev Clin Immu*. 2018;14:137–53.
23. Markowitz CE. Interferon-beta. *Neurology*. 2007;68:S8–11.
24. Group TIMSSG and the U of BCMA. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: Final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology*. 1995;45:1277–85.
25. Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;170:4483–8.
26. Kuerten S, Jackson LJ, Kaye J, Vollmer TL. Impact of Glatiramer Acetate on B Cell-Mediated Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Cns Drugs*. 2018;32:1039–51.
27. O'Connor P, Filippi M, Arnason B, Comi G, Cook S, Goodin D, et al. 250 microg or 500 microg interferon beta-1b versus 20 mg glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple

- sclerosis: a prospective, randomised, multicentre study. *Lancet Neurology*. 2009;8:889–97.
28. Mikol DD, Barkhof F, Chang P, Coyle PK, Jeffery DR, Schwid SR, et al. Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *Lancet Neurology*. 2008;7:903–14.
29. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS, Group EGAS. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging–measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;49:290–7.
30. González-Alvaro I, Ortiz AM, Domínguez-Jiménez C, Aragón-Bodi A, Sánchez BD, Sánchez-Madrid F. Inhibition of tumour necrosis factor and IL-17 production by leflunomide involves the JAK/STAT pathway. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:1644.
31. Wostradowski T, Prajeeth CK, Gudi V, Kronenberg J, Witte S, Brieskorn M, et al. In vitro evaluation of physiologically relevant concentrations of teriflunomide on activation and proliferation of primary rodent microglia. *J Neuroinflamm*. 2016;13:250.
32. Miller AE. Oral teriflunomide in the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis: clinical evidence and long-term experience. *Ther Adv Neurol Diso*. 2017;10:381–96.
33. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis. *New Engl J Medicine*. 2012;367:1098–107.
34. Diaz GM, Hupperts R, Fraussen J, Somers V. Dimethyl fumarate treatment in multiple sclerosis: Recent advances in clinical and immunological studies. *Autoimmun Rev*. 2018;17:1240–50.
35. Mansilla MJ, Navarro-Barriuso J, Presas-Rodríguez S, Teniente-Serra A, Quirant-Sánchez B, Ramo-Tello C, et al. Optimal response to dimethyl fumarate is mediated by a reduction of Th1-like Th17 cells after 3 months of treatment. *Cns Neurosci Ther*. 2019;25:995–1005.
36. Mehta D, Miller C, Arnold DL, Bame E, Bar-Or A, Gold R, et al. Effect of dimethyl fumarate on lymphocytes in RRMS: Implications for clinical practice. *Neurology*. 2019;92:10.1212/WNL.0000000000007262.
37. Chaudhry BZ, Cohen JA, Conway DS. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017;14:859–73.
38. Claes N, Dhaeze T, Fraussen J, Broux B, Wijmeersch BV, Stinissen P, et al. Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: a

12-month follow-up study. *Plos One*. 2014;9:e111115.

39. Teniente-Serra A, Hervás JV, Quirant-Sánchez B, Mansilla MJ, Grau-López L, Ramo-Tello C, et al. Baseline Differences in Minor Lymphocyte Subpopulations may Predict Response to Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *Cns Neurosci Ther*. 2016;22:584–92.

40. Quirant-Sánchez B, Hervás-García JV, Teniente-Serra A, Brieva L, Moral-Torres E, Cano A, et al. Predicting therapeutic response to fingolimod treatment in multiple sclerosis patients. *Cns Neurosci Ther*. 2018;24:1175–84.

41. Kappos L, O'Connor P, Radue E-W, Polman C, Hohlfeld R, Selmaj K, et al. Long-term effects of fingolimod in multiple sclerosis. *Neurology*. 2015;84:1582–91.

42. Ceronie B, Jacobs BM, Baker D, Dubuisson N, Mao Z, Ammoscato F, et al. Cladribine treatment of multiple sclerosis is associated with depletion of memory B cells. *J Neurol*. 2018;265:1199–209.

43. Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Sørensen PS, et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Cladribine for Relapsing Multiple Sclerosis. *New Engl J Med*. 2010;362:416–26.

44. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *New Engl J Medicine*. 2012;366:1870–80.

45. Sheremata WA, Minagar A, Alexander JS, Vollmer T. The Role of Alpha-4 Integrin in the Aetiology of Multiple Sclerosis. *Cns Drugs*. 2005;19:909–22.

46. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New Engl J Med*. 2006;354:899–910.

47. Członkowska A, Mirowska-Guzel D. Multiple sclerosis: severe exacerbation after stopping disease-modifying drugs. *Eur J Neurol*. 2018;25:1199–200.

48. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *New Engl J Med*. 2017;376:221–34.

49. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *New Engl J Med*. 2017;376:209–20.

50. Ancau M, Berthele A, Hemmer B. CD20 monoclonal antibodies for the treatment of multiple sclerosis: up-to-date. *Expert Opin Biol Th*. 2019;19:829–43.

51. Chan A, Weilbach FX, Toyka KV, Gold R. Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 2005;139:152–8.
52. Rao SP, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin PM, Severy PB, Weeden T, et al. Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *Plos One.* 2012;7:e39416.
53. Baker D, Herrod SS, Alvarez-Gonzalez C, Giovannoni G, Schmierer K. Interpreting Lymphocyte Reconstitution Data From the Pivotal Phase 3 Trials of Alemtuzumab. *Jama Neurol.* 2017;74:961.
54. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2012;380:1829–39.
55. Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, Nicholas R, Sormani MP, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017;13:391–405.
56. Burt RK, Balabanov R, Burman J, Sharrack B, Snowden JA, Oliveira MC, et al. Effect of Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation vs Continued Disease-Modifying Therapy on Disease Progression in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *Jama.* 2019;321:165.
57. Team: U of C San Francisco MS-EPIC, Cree BAC, Gourraud P-A, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, et al. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Annals of neurology.* 2016;80:499–510.
58. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Medicine.* 2020;133:1380-1390.e2.
59. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36:115–27.
60. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133:223–44.
61. Denic A, Wootla B, Rodriguez M. CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Tar.* 2013;17:1053–66.
62. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:15–27.
63. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS



autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med*. 2013;210:2921–37.

64. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130:1089–104.

65. Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, et al. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 2012;135:2925–37.

66. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378:1779–87.

67. Pashenkov M, Teleshova N, Link H. Inflammation in the Central Nervous System: the Role for Dendritic Cells. *Brain Pathol*. 2003;13:23–33.

68. Cools N, Ponsaerts P, Tendeloo VFIV, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukocyte Biol*. 2007;82:1365–74.

69. Nuyts AH, Lee WP, Bashir-Dar R, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2013;19:995–1002.

70. Lande R, Gafa V, Serafini B, Giacomini E, Visconti A, Remoli ME, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Intracerebral Recruitment and Impaired Maturation in Response to Interferon- $\beta$ . *J Neuropathology Exp Neurology*. 2008;67:388–401.

71. Pashenkov M, Huang Y-M, Kostulas V, Haglund M, Söderström M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*. 2001;124:480–92.

72. Longhini ALF, Glehn F von, Brandão CO, Paula RF de, Pradella F, Moraes AS, et al. Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *J Neuroinflamm*. 2011;8:2.

73. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Medicine*. 2001;194:863–9.

74. Liu Y-J, Xu J, Bouteiller O de, Parham CL, Grouard G, Djossou O, et al. Follicular Dendritic Cells Specifically Express the Long CR2/CD21 Isoform. *J Exp Medicine*. 1997;185:165–70.

75. Grau-López L, Raïch D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gómez M, Dávalos A, Pujol-Borrell R, et

- al. Myelin peptides in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2009;8:650–3.
76. Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2004;172:3893–904.
77. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, et al. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nature medicine.* 2000;6:1167–75.
78. Grau-López L, Raïch D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gómez M, Dávalos A, Pujol-Borrell R, et al. Specific T-cell proliferation to myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis. *European Journal of Neurology.* 2011;18:1101–4.
79. Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiol.* 2010;17:295–306.
80. Tamura R, Yoshida K, Toda M. Current understanding of lymphatic vessels in the central nervous system. *Neurosurg Rev.* 2020;43:1055–64.
81. Brinke A ten, Martinez-Llordella M, Cools N, Hilkens CMU, Ham SM van, Sawitzki B, et al. Ways Forward for Tolerance-Inducing Cellular Therapies- an AFACTT Perspective. *Front Immunol.* 2019;10:181.
82. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby.* Interamericana M-H, editor. 2007.
83. Heber SM, Valero O, Antonio IG. Tolerancia inmunológica, un recorrido en el tiempo: ¿cómo discriminar entre lo propio y lo extraño? *Revista Colombiana De Reumatología.* 2013;20:237–49.
84. Su X, Sriram S. Treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis with the intravenous administration of splenocytes coupled to encephalitogenic peptide 91–103 of myelin basic protein. *J Neuroimmunol.* 1991;34:181–90.
85. Lutterotti A, Yousef S, Sputtek A, Stürner KH, Stellmann J-P, Breiden P, et al. Antigen-specific tolerance by autologous myelin peptide-coupled cells: a phase 1 trial in multiple sclerosis. *Science translational medicine.* 2013;5:188ra75-188ra75.
86. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:523–32.
87. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance

maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995;155:1151–64.

88. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30:636–45.

89. Gliwiński M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Trzonkowski P. Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells. *Biodrugs*. 2017;31:335–47.

90. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Medicine*. 2004;199:971–9.

91. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002;169:4712–6.

92. Jee Y, Piao WH, Liu R, Bai XF, Rhodes S, Rodebaugh R, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol*. 2007;125:34–42.

93. Chwojncki K, Iwaszkiewicz-Grześ D, Jankowska A, Zieliński M, Łowiec P, Gliwiński M, et al. Administration of CD4+CD25highCD127–FoxP3+ Regulatory T Cells for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Phase 1 Study. *Biodrugs*. 2021;35:47–60.

94. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, et al. Neuroprotection and Immunomodulation With Mesenchymal Stem Cells in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Arch Neurol-chicago*. 2008;65:753–61.

95. Laroni A, Rosbo NK de, Uccelli A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases: Immunoregulation beyond neuroprotection. *Immunol Lett*. 2015;168:183–90.

96. Uccelli A, Laroni A, Ali R, Battaglia MA, Blinkenberg M, Brundin L, et al. Safety, tolerability, and activity of mesenchymal stem cells versus placebo in multiple sclerosis (MESEMS): a phase 2, randomised, double-blind crossover trial. *Lancet Neurology*. 2021;20:917–29.

97. Morante-Palacios O, Fondelli F, Ballestar E, Martínez-Cáceres EM. Tolerogenic Dendritic Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. *Trends in immunology*. 2021;42:59–75.

98. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:610–21.

99. Kim S-H, Jung H-H, Lee C-K. Generation, Characteristics and Clinical Trials of Ex Vivo Generated Tolerogenic Dendritic Cells. *Yonsei Med J.* 2018;59:807–15.
100. Naranjo-Gómez M, Raïch-Regué D, Oñate C, Grau-López L, Ramo-Tello C, Pujol-Borrell R, et al. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *Journal of translational medicine.* 2011;9:89.
101. Grau-López L, Granada ML, Raïch-Regué D, Naranjo-Gómez M, Borràs-Serres FE, Martínez-Cáceres E, et al. Regulatory role of vitamin D in T-cell reactivity against myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Bmc Neurol.* 2012;12:103.
102. Djedovic N, Mansilla MJ, Jevtić B, Navarro-Barriuso J, Saksida T, Martínez-Cáceres EM, et al. Ethyl Pyruvate Induces Tolerogenic Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2019;10:157.
103. Raïch-Regué D, Grau-López L, Naranjo-Gómez M, Ramo-Tello C, Pujol-Borrell R, Martínez-Cáceres E, et al. Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. *European journal of immunology.* 2012;42:771–82.
104. Lee W-P, Willekens B, Cras P, Goossens H, Martínez-Cáceres E, Berneman ZN, et al. Immunomodulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Dendritic Cells Promote Induction of T Cell Hyporesponsiveness to Myelin-Derived Antigens. *Journal of immunology research.* 2016;2016:5392623–16.
105. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Quirant-Sánchez B, Ardiaca-Martínez A, Teniente-Serra A, Presas-Rodríguez S, et al. MAP7 and MUCL1 Are Biomarkers of Vitamin D3-Induced Tolerogenic Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2019;10:1251.
106. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Quirant-Sánchez B, Teniente-Serra A, Ramo-Tello C, Martínez-Cáceres EM. Vitamin D3-Induced Tolerogenic Dendritic Cells Modulate the Transcriptomic Profile of T CD4+ Cells Towards a Functional Hyporesponsiveness. *Front Immunol.* 2021;11:599623.
107. Mansilla MJ, Sellès-Moreno C, Fàbregas-Puig S, Amoedo J, Navarro-Barriuso J, Teniente-Serra A, et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS neuroscience & therapeutics.* 2015;21:222–30.
108. Mansilla MJ, Contreras-Cardone R, Navarro-Barriuso J, Cools N, Berneman Z, Ramo-Tello C, et al. Cryopreserved vitamin D3-tolerogenic dendritic cells pulsed with autoantigens as a potential therapy for multiple sclerosis patients. *Journal of neuroinflammation.* 2016;13:113.
109. Xie Z, Chen J, Zheng C, Wu J, Cheng Y, Zhu S, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing

proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. *Immunology*. 2017;152:414–24.

110. Derdelinckx J, Mansilla MJ, Laere MD, Lee W-P, Navarro-Barriuso J, Wens I, et al. Clinical and immunological control of experimental autoimmune encephalomyelitis by tolerogenic dendritic cells loaded with MOG-encoding mRNA. *J Neuroinflamm*. 2019;16:167.

111. Mansilla MJ, Presas-Rodríguez S, Teniente-Serra A, González-Larreategui I, Quirant-Sánchez B, Fondelli F, et al. Paving the way towards an effective treatment for multiple sclerosis: advances in cell therapy. *Cell Mol Immunol*. 2021;18:1353–74.

112. Passeri L, Marta F, Bassi V, Gregori S. Tolerogenic Dendritic Cell-Based Approaches in Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2021;22:8415.

113. Marín E, Cuturi MC, Moreau A. Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? *Frontiers in immunology*. 2018;9:274.

114. Anderson AE, Swan DJ, Sayers BL, Harry RA, Patterson AM, Delwig A, et al. LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells. *J Leukocyte Biol*. 2009;85:243–50.

115. Nuyts AH, Ponsaerts P, Tendeloo VFIV, Lee W-P, Stein B, Nagels G, et al. Except for C-C chemokine receptor 7 expression, monocyte-derived dendritic cells from patients with multiple sclerosis are functionally comparable to those of healthy controls. *Cytotherapy*. 2014;16:1024–30.

116. Datta J, Terhune JH, Lowenfeld L, Cintolo JA, Xu S, Roses RE, et al. Optimizing dendritic cell-based approaches for cancer immunotherapy. *Yale J Biology Medicine*. 2014;87:491–518.

117. Quillien V, Moisan A, Carsin A, Lesimple T, Lefeuvre C, Adamski H, et al. Biodistribution of radiolabelled human dendritic cells injected by various routes. *Eur J Nucl Med Mol I*. 2005;32:731–41.

118. Vries IJM de, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, Krieken JH van, Boerman OC, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nature biotechnology*. 2005;23:1407–13.

119. Ridolfi R, Riccobon A, Galassi R, Giorgetti G, Petrini M, Fiammenghi L, et al. Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients. *Journal of translational medicine*. 2004;2:27.

120. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lyerly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer research*. 1999;59:56–8.

121. Mackensen A, Krause T, Blum U, Uhrmeister P, Mertelsmann R, Lindemann A. Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34 + hematopoietic progenitor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1999;48:118–22.
122. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic Cells Injected Via Different Routes Induce Immunity in Cancer Patients. *J Immunol*. 2001;166:4254–9.
123. Bedrosian I, Mick R, Xu S, Nisenbaum H, Faries M, Zhang P, et al. Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol Official J Am Soc Clin Oncol*. 2003;21:3826–35.
124. Lesterhuis WJ, Vries IJM de, Schreiber G, Lambeck AJA, Aarntzen EHJG, Jacobs JFM, et al. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17:5725–35.
125. Alfaro C, Perez-Gracia JL, Suarez N, Rodriguez J, Sanmamed MF de, Sangro B, et al. Pilot Clinical Trial of Type 1 Dendritic Cells Loaded with Autologous Tumor Lysates Combined with GM-CSF, Pegylated IFN, and Cyclophosphamide for Metastatic Cancer Patients. *J Immunol*. 2011;187:6130–42.
126. Radomski M, Zeh HJ, Edington HD, Pingpank JF, Butterfield LH, Whiteside TL, et al. Prolonged intralymphatic delivery of dendritic cells through implantable lymphatic ports in patients with advanced cancer. *J Immunother Cancer*. 2016;4:24.
127. Cooper GS, Bynum MLK, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun*. 2009;33:197–207.
128. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes care*. 2011;34:2026–32.
129. Nikolic T, Zwaginga JJ, Uitbeijerse BS, Woittiez NJ, Koning EJ de, Aanstoot H-J, et al. Safety and feasibility of intradermal injection with tolerogenic dendritic cells pulsed with proinsulin peptide—for type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8:470–2.
130. Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Ramnорuth N, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Science translational medicine*. 2015;7:290ra87-290ra87.
131. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76:227–34.

132. Kurochkina Y, Tikhonova M, Tyrinova T, Leplina O, Sizikov A, Sulutian A, et al. SAT0212 The safety and tolerability of intra-articular injection of tolerogenic dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis: the preliminary results. *Ann Rheum Dis*. 2018;77:966.
133. Joo YB, Park J, Choi EC. Phase 1 study of immunotherapy using autoantigen-loaded dendritic cells in patients with anticitrullinated peptide antigen positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:420–1.
134. Jauregui-Amezaga A, Cabezón R, Ramírez-Morros A, España C, Rimola J, Bru C, et al. Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *Journal of Crohn's & colitis*. 2015;9:1071–8.
135. Zubizarreta I, Flórez-Grau G, Vila G, Cabezón R, España C, Andorra M, et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. *P Natl Acad Sci Usa*. 2019;116:8463–70.
136. Willekens B, Presas-Rodríguez S, Mansilla MJ, Derdelinckx J, Lee W-P, Nijs G, et al. Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonised study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration. *Bmj Open*. 2019;9:e030309.
137. Tourneau CL, Lee JJ, Siu LL. Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101:708–20.
138. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983;13:227–31.
139. Willekens B, Wens I, Wouters K, Cras P, Cools N. Safety and immunological proof-of-concept following treatment with tolerance-inducing cell products in patients with autoimmune diseases or receiving organ transplantation: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Autoimmun Rev*. 2021;20:102873.
140. Blasi DD, Claessen I, Turksma AW, Beek J van, Brinke A ten. Guidelines for analysis of low-frequency antigen-specific T cell results: Dye-based proliferation assay vs 3H-thymidine incorporation. *J Immunol Methods*. 2020;487:112907.
141. Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D, Sammet L, Weksler B, Melms A, et al. Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016;196:1558–67.
142. Quirant-Sánchez B, Mansilla MJ, Navarro-Barriuso J, Presas-Rodríguez S, Teniente-Serra A, Fondelli F, et al. Combined Therapy of Vitamin D3-Tolerogenic Dendritic Cells and

Interferon- $\beta$  in a Preclinical Model of Multiple Sclerosis. *Biomed*. 2021;9:1758.

143. MAZZA G, PONSFORD M, LOWREY P, CAMPBELL MJ, ZAJICEK J, WRAITH DC. Diversity and dynamics of the T-cell response to MBP in DR2+ve individuals. *Clin Exp Immunol*. 2002;128:538–47.

144. Chataway J, Martin K, Barrell K, Sharrack B, Stolt P, Wraith DC, et al. Effects of ATX-MS-1467 immunotherapy over 16 weeks in relapsing multiple sclerosis. *Neurology*. 2018;900:e955–62.

145. Planas R, Santos R, Tomas-Ojer P, Cruciani C, Lutterotti A, Faigle W, et al. GDP-I-fucose synthase is a CD4+ T cell-specific autoantigen in DRB3\*02:02 patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med*. 2018;10.

146. Derdelinckx J, Cras P, Berneman ZN, Cools N. Antigen-Specific Treatment Modalities in MS: The Past, the Present, and the Future. *Front Immunol*. 2021;12:624685.

147. Chalmer TA, Baggesen LM, Nørgaard M, Koch-Henriksen N, Magyari M, Sorensen PS, et al. Early versus later treatment start in multiple sclerosis: a register-based cohort study. *Eur J Neurol*. 2018;25:1262.

148. Derdelinckx J, Reynders T, Wens I, Cools N, Willekens B. Cells to the Rescue: Emerging Cell-Based Treatment Approaches for NMOSD and MOGAD. *Int J Mol Sci*. 2021;22:7925.



## 10.1. Artículo:

“Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

Barbara Willekens, Silvia Presas-Rodríguez, MJ Mansilla, Judith Derdelinckx, Wai-Ping Lee, Griet Nijs, Maxime De Laere, Inez Wens, Patrick Cras, Paul Parizel, Wim Van Hecke, Annemie Ribbens, Thibo Billiet, Geert Adams, Marie-Madeleine Couttenye, Juan Navarro-Barriuso, Aina Teniente-Serra, Bibiana Quirant-Sánchez, Ascensión Lopez-Diaz de Cerio, Susana Inogés, Felipe Prosper, Anke Kip, Herman Verheij, Catharina C Gross, Heinz Wiendl, Marieke (SM) Van Ham, Anja Ten Brinke, Ana Maria Barriocanal, Anna Massuet-Vilamajó, Niel Hens, Zwi Berneman, Eva Martínez-Cáceres, Nathalie Cools, Cristina Ramo-Tello. On behalf of the RESTORE consortium. Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonised study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration. *BMJ Open*. 2019 Sep 9;9(9):e030309. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-030309

## 10.1. Artículo:

“Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

Open access

Protocol

# BMJ Open Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonised study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration

Barbara Willekens,<sup>1,2</sup> Silvia Presas-Rodríguez,<sup>3,4</sup> MJ Mansilla,<sup>5,6</sup> Judith Derdelinckx,<sup>1,2</sup> Wai-Ping Lee,<sup>7</sup> Griet Nijs,<sup>7</sup> Maxime De Laere,<sup>2</sup> Inez Wens,<sup>2</sup> Patrick Cras,<sup>1</sup> Paul Parizel,<sup>8</sup> Wim Van Hecke,<sup>9</sup> Annemie Ribbens,<sup>9</sup> Thibo Billiet,<sup>9</sup> Geert Adams,<sup>10</sup> Marie-Madeleine Couttenye,<sup>11</sup> Juan Navarro-Barriuso,<sup>5,6</sup> Aina Teniente-Serra,<sup>5,6</sup> Bibiana Quirant-Sánchez,<sup>5,6</sup> Ascensión Lopez-Díaz de Cerio,<sup>12,13</sup> Susana Inogés,<sup>12,13</sup> Felipe Prosper,<sup>12,14</sup> Anke Kip,<sup>15</sup> Herman Verheij,<sup>15</sup> Catharina C Gross,<sup>16,17</sup> Heinz Wiendl,<sup>16,17</sup> Marieke (SM) Van Ham,<sup>18,19</sup> Anja Ten Brinke,<sup>18,19</sup> Ana Maria Barriocanal,<sup>20,21</sup> Anna Massuet-Vilamajó,<sup>22</sup> Niel Hens,<sup>23,24</sup> Zwi Berneman,<sup>2,7</sup> Eva Martínez-Cáceres,<sup>5</sup> Nathalie Cools,<sup>2,7</sup> Cristina Ramo-Tello,<sup>3</sup> On behalf of the RESTORE consortium

**To cite:** Willekens B, Presas-Rodríguez S, Mansilla MJ, *et al.* Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonised study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration. *BMJ Open* 2019;9:e030309. doi:10.1136/bmjopen-2019-030309

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030309>).

BW and SP-R contributed equally.  
NC and CR-T contributed equally.

NC and CR-T are senior authors.  
BW and SP-R are first authors.

Received 08 March 2019  
Revised 09 July 2019  
Accepted 23 July 2019



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**  
Nathalie Cools;  
[nathalie.cools@uza.be](mailto:nathalie.cools@uza.be)

Cristina Ramo-Tello;  
[cramot@gmail.com](mailto:cramot@gmail.com)

### ABSTRACT

**Introduction** Based on the advances in the treatment of multiple sclerosis (MS), currently available disease-modifying treatments (DMT) have positively influenced the disease course of MS. However, the efficacy of DMT is highly variable and increasing treatment efficacy comes with a more severe risk profile. Hence, the unmet need for safer and more selective treatments remains. Specifically restoring immune tolerance towards myelin antigens may provide an attractive alternative. In this respect, antigen-specific tolerisation with autologous tolerogenic dendritic cells (tolDC) is a promising approach.

**Methods and analysis** Here, we will evaluate the clinical use of tolDC in a well-defined population of MS patients in two phase I clinical trials. In doing so, we aim to compare two ways of tolDC administration, namely intradermal and intranodal. The cells will be injected at consecutive intervals in three cohorts receiving incremental doses of tolDC, according to a best-of-five design. The primary objective is to assess the safety and feasibility of tolDC administration. For safety, the number of adverse events including MRI and clinical outcomes will be assessed. For feasibility, successful production of tolDC will be determined. Secondary endpoints include clinical and MRI outcome measures. The patients' immune profile will be assessed to find presumptive evidence for a tolerogenic effect *in vivo*.

**Ethics and dissemination** Ethics approval was obtained for the two phase I clinical trials. The results of the trials will be disseminated in a peer-reviewed journal, at scientific conferences and to patient associations.

**Trial registration numbers** NCT02618902 and NCT02903537; EudraCT numbers: 2015-002975-16 and 2015-003541-26.

### Strengths and limitations of this study

- The concept of the clinical trials is built on recent advances in the understanding of tolerance induction via cell-based therapy, and the effort made to precisely silence myelin-antigen-specific, putatively deleterious immune responses in the disease.
- The use of cryopreserved tolerogenic dendritic cells (tolDC) allows production of batches of tolDC, stored in ready-to-use aliquots for the required administrations during the treatment period, thereby reducing variability and global production cost.
- Harmonisation of clinical, MRI and immunological evaluations of the patients will enable us to compare results between two phase I clinical trials evaluating the safety and feasibility of autologous tolDC administration in patients with active MS.
- The patients are not randomised across the trials, limiting direct comparison of both routes of administration.

### INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is the leading cause of non-traumatic disability in young adults and typically presents between the age of 20–40 years, in the prime of a patient's personal and professional life. The heterogeneity of the disease course in MS, that is, relapsing-remitting or progressive, remains a challenge for patient management and design of clinical trials. According to Lublin *et al.*,<sup>1</sup> MS is categorised as relapsing or progressive. In both

## 10.1. Artículo:

### “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

Open access



forms, disease activity (defined by clinical relapse and/or MRI lesions) and disease progression are measured. To date, more than 10 disease-modifying treatments (DMT) are approved for clinical use in patients with active relapsing-remitting MS (RRMS). This has dramatically influenced the management of MS patients in daily practice and has positively influenced prognosis of a subset of MS patients. Indeed, whereas earlier epidemiological studies indicated that 50% of patients develop secondary progressive MS after 15 years when untreated,<sup>2</sup> only 18% of patients treated with modern MS therapeutics were reported to evolve to a secondary progressive course after a median duration of 16.8 years in a recent cohort.<sup>3</sup> Nonetheless, DMT are not specific nor selective for MS, that is, they work in an immunomodulatory or immunosuppressive way by sequestering or depleting lymphocytes, although that some therapies can induce immune reconstitution as well. Moreover, treatment-related side effects or risks can be severe,<sup>4</sup> leaving a significant and unmet need for safer and more disease-selective treatments.

The crux of MS is the patient's own immune cells attacking self-antigens in the central nervous system (CNS), caused by a loss of tolerance against myelin antigens. This is manifested by inflammatory infiltrates, demyelination and axonal loss, resulting in the clinical symptoms of the disease.<sup>5,6</sup> Previously, it was shown that proteins expressed in the myelin sheath, protecting neuronal axons of the CNS, are an important target of the autoreactive T cell response.<sup>7-9</sup> Also in our hands, *ex vivo* T cell reactivity against a mix of seven immunodominant myelin-derived peptides could be demonstrated in RRMS patients as compared with healthy controls and patients with other neurological disorders.<sup>10</sup> Although the underlying cause of the loss of tolerance towards myelin antigens has not been elucidated yet, one ultimate aim in the treatment of MS is to reestablish antigen-specific immune tolerance towards CNS structures.<sup>11-15</sup> In this perspective, it is postulated that tolerance-inducing antigen-specific therapy can be an innovative and promising strategy for the treatment of autoimmunity. This approach is based on the possibility that autoreactive B and T cells, driving myelin destruction and damage in the CNS, will be eradicated by inducing tolerance to myelin-derived peptides, without interfering with protective immunity. Several approaches involving the induction of antigen-specific tolerance have reached the clinical development phase and demonstrated promising results in phase I/II clinical trials (extensively reviewed by Willekens and Cools).<sup>12</sup> Given the fact that dendritic cells (DC) play a key role in controlling the immune response by steering the outcome of antigen presentation to T cells, the use of tolerance-inducing or tolerogenic dendritic cells (tolDC) may provide prospect for the treatment of MS.<sup>16-20</sup> Recently, we demonstrated the potential of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  to generate tolDC from MS patients.<sup>21-23</sup> Indeed, vitamin  $D_3$ -treated tolDC from MS patients display a maturation-resistant phenotype, that is, they maintain their low expression levels of costimulatory molecules

(CD80, CD83 and CD86) and anti-inflammatory cytokine profile, even following rechallenge with an inflammatory stimulus such as lipopolysaccharide. Furthermore, tolDC from MS patients are capable of inducing stable and antigen-specific T cell hyporesponsiveness. After *in vitro* stimulation with myelin-derived peptide-pulsed vitamin  $D_3$ -treated tolDC, T cells were unresponsive to the myelin peptides used, while retaining their capacity to respond to an unrelated antigen. Moreover, T cell hyporesponsiveness was robust, as T cells were not reactivated after rechallenge with immunostimulatory DC.<sup>21-23</sup>

Also *in vivo*, the administration of bone marrow-derived vitamin  $D_3$ -treated tolDC pulsed with MOG<sub>40-55</sub> has been shown to induce antigen-specific T cell tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS. Mice treated with MOG<sub>40-55</sub>-pulsed bone marrow-derived vitamin  $D_3$ -treated tolDC before disease induction showed reduced incidence of the disease. Furthermore, when the treatment was used therapeutically in mice already showing clinical signs of the disease, the severity of the disease was significantly reduced.<sup>24</sup> However, repetitive injections of tolDC were necessary for a prolonged clinical effect in EAE. In this context, cryopreserved MOG<sub>40-55</sub>-pulsed tolDC demonstrated similar clinical benefit compared with fresh tolDC, underlining the therapeutic potential and clinical applicability of cryopreserved tolDC.<sup>21,25</sup>

Recently, a number of phase I studies investigating the safety and feasibility of tolDC therapy for autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, type I diabetes or Crohn's disease were completed (table 1).<sup>18</sup> The first results are highly encouraging since none of the trials found safety concerns related to tolDC administration in these patients. TolDC were well tolerated and autoimmunity was not exacerbated in the patients treated.<sup>26-29</sup> Nevertheless, numerous questions remain, and the efficacy of antigen-specific tolDC therapy may depend on many factors, of which the route of administration is among the most important. When considering the route of delivery of DC, one needs to take into account that different routes lead to different sites of accumulation of the vaccinated DC. In most clinical studies to date, *ex vivo* generated DC were injected either intravenously, intradermally or subcutaneously. In humans, migration of DC towards the secondary lymph nodes is superior after intradermal injection compared with after subcutaneous injection of DC,<sup>30-32</sup> whereas migration of intravenously injected DC has not been monitored so far. Direct delivery of DC to lymph nodes via intranodal injection showed promising results in therapies using immunostimulatory DC in cancer,<sup>33,34</sup> but has not been evaluated for tolDC. It was demonstrated that brain-derived antigens can be drained from the interstitial or cerebrospinal fluid via the *lamina cribrosa* and nasal mucosa to the cervical lymph nodes, indicating that the cervical lymph nodes could be one of the first stations for the antigenic presentation at the peripheral level.<sup>35,36</sup> Hence, we hypothesize that intranodal injection of tolDC directly interferes with

## 10.1. Artículo:

“Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”



Open access

**Table 1** Overview of clinical trials using toIDC as therapeutic intervention in autoimmune diseases

Reference	Indication	Study design	Number of patients	Cell product and control condition	Dose	Administration mode	Primary outcome measure	Results	Immunological effects
Zubizarreta <i>et al</i> <sup>4</sup> 2019	MS and NMO	open-label, dose-escalation, phase Ib	8MS and 4 NMO	autologous toIDC loaded with either myelin peptides or AQP4	50x10 <sup>6</sup> , 100x10 <sup>6</sup> , 150x10 <sup>6</sup> , and 300x10 <sup>6</sup> toIDC in total, separated in three independent doses administered every 2 weeks	intravenous	safety and tolerability	well tolerated no serious adverse events	↑ IL-10 production in peptide-stimulated PBMCs and ↑ in the frequency of Tr1
Bell <i>et al</i> <sup>28</sup> 2017	Inflammatory arthritis	unblinded, dose-escalation, randomised, phase I	9	autologous toIDC loaded with autologous synovial fluid as a source of autoantigens	1x10 <sup>6</sup> , 3x10 <sup>6</sup> or 10x10 <sup>6</sup> toIDC arthroscopically vs saline only	intra-articular	flare of disease in the target knee within 5 days of treatment	no target knee flares within 5 days of treatment	no consistent immunomodulatory effects in peripheral blood
Benham <i>et al</i> <sup>27</sup> 2015	Rheumatoid arthritis	open-label, controlled, phase I	34	autologous DCs modified with a nuclear factor kappaB (NF-kappaB) inhibitor exposed to four citrullinated peptide antigens, designated “Rheumatovax.”	a low dose of 1x10 <sup>6</sup> DCs and a high dose of 5x10 <sup>6</sup>	intradermal	safety	mild adverse events	↑ in effector T cells and an ↑ ratio of regulatory to effector T cells; ↓ in serum interleukin-15 (IL-15), IL-29, CX3CL1, and CXCL11; ↓ T cell IL-6 responses to vimentin <sub>447-455</sub> -Cit450 relative to controls
Jauregui-Amézaga <i>et al</i> <sup>29</sup> 2015	Crohn's disease	open-label, dose-escalation, phase I	9	autologous toIDC	first three cohorts: a single injection of 2x10 <sup>6</sup> , 5 x 10 <sup>6</sup> or 10 x 10 <sup>6</sup> toIDC; last three cohorts: 3 bi-weekly injections (same dose escalation schedule)	intra-peritoneal	safety	no adverse effects	
Giannoukakis <i>et al</i> <sup>26</sup> 2011	Diabetes type 1	randomised, double-blind, phase I	10	autologous unmanipulated dendritic cells or toIDC	10x10 <sup>6</sup> cells once every 2 weeks for a total of four administrations	intradermal	safety	no adverse effects	↑ in the frequency of peripheral B220+CD11c- B cells

CXCL, Chemokine Ligand; DC, dendritic cells; IL, Interleukin; MS, multiple sclerosis; NMO, neuromyelitis optica; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell; toIDC, tolerogenic dendritic cells; Tr1, Regulatory T-cell type.

## 10.1. Artículo:

### “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

#### Open access



the antigen presentation and consequently, the stimulation and proliferation of autoreactive T cells. Furthermore, this route of administration omits the need for the migration requirements of the tolDC, thereby potentially enhancing the efficacy of the vaccine. Although intranodal injection is more complex, requiring ultrasound guidance, this technique is part of the daily practice at the endocrinology or radiology department of most reference hospitals.

Until now, there are no available data showing superiority of one route over others for the administration of peptide-loaded tolDC. Here, we will compare intradermal injection to intranodal injection. Only the direct comparison of these different routes of administration in two dose-escalation studies will allow us to determine if both routes are equally safe.

In conclusion, our objectives are to evaluate safety, clinical feasibility and the immunological consequences of peptide-loaded tolDC administered intranodal or intradermal in MS patients in two clinical trials. Harmonisation of the procedures for clinical, MRI as well as immune-monitoring will enable us to compare results between trials of which the study protocols will be discussed in detail here.

#### METHODS AND ANALYSIS

##### Study design

Two open-label, dose-escalation phase I clinical trials, MS-tolDC and TOLERVIT-MS, are designed in a coordinated and comprehensive manner and run simultaneously in Belgium (Antwerp University Hospital, Edegem) and Spain (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona), respectively. Patient recruitment started mid-2017 and is anticipated to end in 2020.

##### Primary objectives

To evaluate the safety of administering tolDC, the occurrence and severity of adverse events (AE) will be recorded. To assess feasibility, successful production of tolDC according to good manufacturing practices (GMP) starting from a leukapheresis procedure will be assessed.

##### Secondary objectives

Preliminary efficacy measures, including clinical outcomes and brain MRI, will be evaluated. In addition, whole blood lymphocyte phenotyping and cytokine profiling will be assessed before and after completion of the vaccination cycle, as well as the ability of tolDC to suppress pathogenic T cell responses. For this, myelin-specific T cell reactivity will be determined before and after completion of the vaccination cycle. All secondary objectives contribute to determination of proof of principle.

##### Patient reported outcome measurements

Multiple Sclerosis Quality of Life-54<sup>37</sup> will be evaluated to detect changes in general and disease-specific quality of life.

##### Patient and public involvement

This study was inspired by the unmet need of finding a cure for MS, which is a key priority recognised by

both patients and neurologists.<sup>38</sup> While patients were not involved in the design of the clinical trial, they are involved in the conduct of the study. In fact, in order to spread awareness and information about the clinical trials and its results beyond the research community with the public as a whole, a stakeholder committee was installed consisting of experts from major interest groups including members of the Flemish, Belgian and Spanish MS societies as well as Flemish and Spanish MS patients. This stakeholder committee will accompany the clinical trials from the start to the end. It has several aims: (i) to keep the stakeholder informed, (ii) to ensure that their views are considered, (iii) to challenge the project by the identification of potential emerging needs and (iv) to play an active part in the dissemination and the use of the project's results.

##### Study population

###### Eligibility and enrolment

Patients with active relapsing-remitting and active progressive MS, diagnosed according to most recent McDonald criteria,<sup>39,40</sup> and who are not eligible for or do not want to be treated with currently available DMT, will be recruited. Patients are included after written informed consent and enrolled in the study when the inclusion and exclusion criteria are met (table 2).

###### Determination of sample size and dose-escalation procedure

The studies will be conducted according to a ‘best of five’ design,<sup>41</sup> an alternative of the traditional 3+3 design in that one additional patient is added when one or even two dose-limiting toxicities (DLT) are observed among the first three patients. Another patient is added when two DLT are observed among four treated patients. Dose escalation is allowed if DLT are observed among none of three, one of four or two of five patients, but the trial will terminate if three or more DLT are observed. A DLT is defined as a serious adverse event (SAE) that is attributable to the study cells administered, or of which the severity prevents further escalation. Dose escalation decisions will be made after all subjects in the cohort have completed at least 3 months of follow-up and when the results of the safety and tolerability analyses of the preceding dose regimen are satisfactory in the judgement of the investigators and the independent Data Safety Monitoring Board (DSMB).

An overview of the dose escalation is provided in table 3. Altogether, each phase I study is intended to accrue a total number of 9–15 evaluable patients.

##### Study medication

Generation of tolDC will be carried out according to the principles and guidelines of GMP laid down in Directive 2003/94/EC. TolDC production will be performed in the GMP facilities of the Center for Cell Therapy and Regenerative Medicine of the Antwerp University Hospital (Belgium) and of the Cell Therapy Area of the Clínica Universidad de Navarra (Spain).

## 10.1. Artículo:

### “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”



Open access

**Table 2** Inclusion and exclusion criteria. All the inclusion criteria must be fulfilled. The presence of any of the exclusion criteria shall exclude the patient

Inclusion criteria	Exclusion criteria
MS according to most recent McDonald criteria	Previous use of immunosuppressive or cytostatic treatment, including mitoxantrone, cladribine, alemtuzumab or bone marrow transplantation or stem cell transplantation at any time prior to enrolment
Age 18–60 years	Treatment with fingolimod or natalizumab or dimethylfumarate in the past 12 weeks or teriflunomide within the past 15 weeks or ocrelizumab/rituximab within the past 6 months prior to the first administration
EDSS of 0–6.5 inclusive	Pregnancy or planning pregnancy in the next 12 months and breast feeding
First signs or symptoms at least 3 months prior to enrolment in the study	Drug or alcohol abuse
Active MS (relapsing and/or progressive): one relapse in the past year and/or at least one enhancing lesion on brain MRI in the past year; at least one new or enlarging T2 lesion in comparison with a reference scan from maximum 1 year before	Inability to undergo MRI assessments
Normal peripheral B-cell count after treatment with ocrelizumab	
No evidence of relapse for at least 30 days prior to start of screening and throughout during the screening phase	History of or actual signs of immunodeficiency or malignancies
Positive T cell reactivity response to a mix of seven myelin-derived peptides	Concurrent clinically relevant cardiac, immunological, pulmonary, neurological, renal or other major disease
Able to sign informed consent and comply with the protocol assessments	Active or chronic infection (hepatitis B or C, HIV, syphilis or tuberculosis)
No wish to be treated with currently available DMT	Splenectomy
Appropriate venous access and *adequate cervical lymph nodes on ultrasound mapping	
Use of adequate contraceptive measures. Women of childbearing potential can only be included in the study following use of adequate contraceptive measures. Accepted methods of contraception include use of hormonal contraceptives (oral, intravaginal, intrauterine or transdermal), intrauterine devices, sterilisation or postmenopausal status, use of condoms with spermicide.	
*Only in TOLERVIT-MS.	
DMT, disease-modifying treatments; EDSS, Expanded Disability Status Scale; MRI, Magnetic Resonance Imaging; MS, multiple sclerosis.	

Clinical-grade autologous tolDC will be prepared from a leukapheresis. CD14<sup>+</sup> monocytes will be cultured in GMP-grade cell culture medium supplemented with 2%

human AB serum, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, interleukin (IL)-4 and 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. At day 4, tolDC will be stimulated using an inflammatory cytokine cocktail, consisting of tumour necrosis factor- $\alpha$ , prostaglandin E<sub>2</sub> and IL-1 $\beta$ . At day 6, tolDC will be harvested, loaded with seven myelin antigens (MBP<sub>13-32</sub>, MBP<sub>111-129</sub>, MBP<sub>154-170</sub>, PLP<sub>139-154</sub>, MOG<sub>1-20</sub>, MOG<sub>35-55</sub> and MBP<sub>83-99</sub>), and cryopreserved at -196°C. Separate aliquots of the cell product will be prepared for quality control and quality assurance. This includes (i) sterility testing, (ii) cell count, (iii) viability, (iv) flow cytometric phenotyping and (v) induction of T cell hyporesponsiveness in an allogeneic mixed leucocyte reaction.

#### Trial intervention: tolDC administration

In this study, six vaccine doses will be administered to each participant according to the following immunisation schedule: a total of six vaccine doses (V), with V<sub>1-4</sub>

**Table 3** Outline of the cell doses and patient numbers, per phase I clinical trial, in the dose escalation cohorts for intradermal and intranodal administration of tolDC

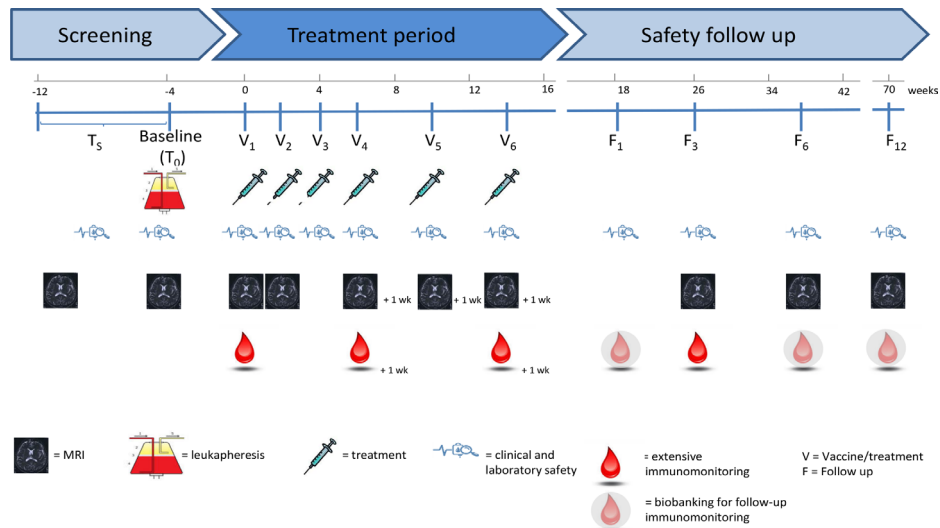
Cohort	Treatment regimen	Patient numbers
1	6 i.d./i.n. injections of 5 $\times$ 10 <sup>6</sup> tolDC	N=3 (+1+1)
2	6 i.d./i.n. injections of 10 $\times$ 10 <sup>6</sup> tolDC	N=3 (+1+1)
3	6 i.d./i.n. injections of 15 $\times$ 10 <sup>6</sup> tolDC	N=3 (+1+1)

N, number; i.d., intradermal; i.n., intranodal; tolDC, tolerogenic dendritic cells.

## 10.1. Artículo:

“Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

Open access



**Figure 1** Study design. Treatment will start at V<sub>1</sub>, approximately 4 weeks after the leukapheresis. Patients will receive additional injections on week +2 (V<sub>2</sub>), week +4 (V<sub>3</sub>), week +6 (V<sub>4</sub>), week +10 (V<sub>5</sub>) and week +14 (V<sub>6</sub>). Patients will have follow up visits one month, and 3, 6 and 12 months following the last study treatment.

at biweekly ( $\pm 3$  days) intervals and V<sub>5-6</sub> at monthly intervals ( $\pm 3$  days). A complete overview of the study design is depicted in figure 1. Detailed assessments per visit are shown in table 4.

In Belgium (MS-toIDC), toIDC vaccination occurs through intradermal injection at five alternating sites (100  $\mu$ L/site) in the posterior neck region to ensure lymphatic drainage to superficial and deep cervical lymph nodes (5–10 cm from the cervical lymph nodes). In addition, in Spain (TOLERVIT-MS), an expert physician will inject toIDC directly in the cervical lymph nodes under echographic guidance. If the patient's anatomical conditions do not allow it (eg, small lymph nodes), the vaccine will be distributed in more nodes (max. 500  $\mu$ L/node).

### Primary outcome measures

#### Safety

To evaluate the safety of administered toIDC, occurrence of AE will be recorded using clinical outcome measures, that is, physical (skin, pain and adenopathies) and neurological examination (relapses and worsening disability) and non-clinical outcome measures, that is, brain MRI, biochemical and haematological safety. The frequent MRI monitoring will allow us to monitor the safety of toIDC in MS patients objectively by measuring T1-enhancing lesions and new and/or enlarging T2 lesions. In this way, unexpected disease activity can be detected timely. The severity of AE will be defined according to the WHO toxicity grading scale. The relationship of an AE to the investigational product will be determined by the neurologists and the independent DSMB on the basis of their clinical judgement.

A proportion of the patients may experience MS relapses during the study. A relapse is defined as a new or worsening neurological symptom that occurs in the absence of fever or infection, occurs at least 30 days following the onset of a previous relapse, persists for at least 24 hours and includes an increase in Expanded Disability Status Scale (EDSS) score<sup>42</sup> from the previous assessment matching one of the following: (i) an increase of  $\geq 1$  on the total scale score; or (ii) an increase of  $\geq 2$  points on one of the appropriate Functional System Scores (FSS) or (iii) an increase of  $>1$  point on two or more of the appropriate FSS. Patients will be instructed to notify their neurologist as soon as possible but within 72 hours the latest and will be examined within 7 days of onset of the symptoms. In case of an MS relapse, a course of high-dose steroids can be administered at the discretion of the treating neurologist.

Study treatment must be discontinued for a given patient if the investigator determines that continuing would result in a significant risk for that patient. In case of terminating the study treatment, patients will still be monitored for safety issues for the duration of the study.

#### Feasibility

To evaluate the feasibility, successful production of toIDC after leukapheresis will be evaluated. This includes the production of sufficient numbers of toIDC and compliance of the final investigational product to the prespecified release criteria following cryopreservation.

### Secondary outcome measures

#### Clinical evaluation

The following clinical and laboratory assessments will be performed during a complete physical examination:





## 10.1. Artículo:

### “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

Open access



vital signs, ECG, routine blood and urine samples, urine pregnancy test in female patients of reproductive potential and serological screening tests, according to the study schedule (figure 1 and table 4). Concurrent drug use or new AE will be reviewed and recorded.

EDSS is based on a standardised neurological examination and measures impairments in eight functional systems, including vision, brainstem, pyramidal, cerebellar, sensory, bowel and bladder, mental (cerebral) and ambulation. It has been used for over 20 years as a clinical outcome measure of MS disease progression and consists of a 10-point scale of disease severity ranging from 0, that is, no disability, to 10, that is, death from MS.<sup>42</sup> All neurologists involved in patient evaluation will be EDSS training certified.

EDSS will be supplemented by three well-known, quantitative, continuous tests that evaluate ambulation (walking speed by the timed 25 foot walk test or T25FW, arm dexterity and function by the 9 Hole Peg Test or 9-HPT, and cognition by the Symbol Digit Modalities Test or SDMT).

The effect on disability progression will be characterised by reporting the proportion of patients who are free from disease progression. For this, disability will be assessed based on a sustained clinically relevant change seen in any one of the disability assessments: EDSS, T25FW, SDMT or the 9-HPT. Disease progression is defined by: 3-month sustained increase from baseline in the EDSS score (1 point in patients with baseline EDSS score 0 to 5.0; 0.5 point in patients with baseline EDSS score of 5.5–6.5) or 3-month sustained increase of at least 20% from baseline in the time taken to complete the T25FW or 3-month sustained increase of at least 20% from baseline in the time taken to complete the 9-HPT. Percent change from baseline after treatment in SDMT score will also be recorded.

#### MRI acquisition and evaluation

MRI is the current gold standard for non-clinical monitoring of MS, and MRI-derived markers have been established as standard outcome measures to monitor the treatment response in various MS clinical trials. MRI will be performed on the same 3T scanner throughout the study. The MRI protocol includes a 3PLANE scout, 3D T1-weighted image pregadolinium and postgadolinium (Dotarem, 20 mL) administration (voxel resolution 0.9×0.9×0.9, TR2300.0, TE2.29, TI 900.0) and a 3D FLAIR image (voxel resolution 0.4×0.4×0.9, TR5000.0, TE387.0, TI1800.0). The quantification of number of T2 lesions, T2 lesion load, number and volume of Gd-enhancing lesions, based on 3D FLAIR images and 3D T1-weighted images, is completely automatic avoiding inter-rater or intra-rater variability. The lesions are quantified within different brain regions. Disease activity or progression on MRI will be evaluated by pretreatment versus ongoing and post-treatment: (i) change in mean number of enhancing lesions; (ii) change in number of T1 Gd-enhancing and/or new or enlarging T2 lesions; (iii) percent change in T2

lesion load and (iv) percent change in brain volume. In order to compare MRI outcome measures from different studies, a standardised acquisition is guaranteed by (i) a uniform MRI protocol, (ii) the use of standard operating procedures for image acquisition and upload and (iii) training of local MRI operators and study coordinators for acquisition and upload.

#### Immune-monitoring

To evaluate therapy-related changes in the immune cell profile, peripheral blood (10×10 mL heparin tubes) will be sampled according to the time points depicted in figure 1 and table 3, and analysed by multiparameter flow cytometry prior to, during and after vaccination. In an attempt to cover the main leucocyte subsets of peripheral blood, the following subsets and their activation status will be enumerated in whole blood samples: CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations, B cell subsets, natural killer (NK) cells, NKT cells and myeloid cells. Myelin-specific T cell reactivity will be determined before, during and after completion of administration of tolDC. For this, responsiveness of T cells to myelin antigens will be investigated. As a control, the responsiveness of T cells to unrelated antigens, for example, cytomegalovirus or tetanus toxoid, will be addressed. In doing so, we will be able to assess *ex vivo* the potential risk of inducing opportunistic infections by administering tolDC to MS patients. Finally, patient materials from the studies will be specifically biobanked. We envisage to maximally performing batch measurements and centralised immune monitoring analysis as soon as a dose cohort has reached 3 months follow-up of all patients. For this, extensive immune cell profiling as well as cytokine production of T cells will be analysed by multiparameter flow cytometry. Using lineage-specific as well as activation markers, proportions and activation status of the different immune cell subsets will be determined. Besides, antibody titers and memory B cell analysis will be performed.

#### Patient reported outcome measurements

MS QOL-54<sup>37</sup> will be evaluated to detect changes in general and disease-specific quality of life.

#### Data management and monitoring

Adequate and accurate patient records will be kept enabling the appropriate and required documentation of the study and subsequent verification of the collected data. All data are completed in the electronic case report form for each patient enrolled in this study, including patients who did not start with the investigational treatment. A central data manager affiliated to a clinical research organisation will perform source data verification. In doing so, study compliance will be monitored, thereby assuring the protection of the rights, safety and well-being of study subjects.

#### Analysis

Given the design of the study (phase I) and its specific primary end point (safety), no confirmatory statistical

## 10.1. Artículo:

### “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”



Open access

testing will be performed. P-values will be calculated but interpreted with caution. Study investigations will be exploratory and conclusions will be based on the complete set of patient evidence.

Analyses of safety variables will be performed with the safety population (all the patients treated with at least one dose of the cell product) by available data only analysis. For demographic and safety analysis, that is, the incidence of AE, laboratory values and changes in vital signs, descriptive statistics will be calculated including frequencies for categorical variables and mean and SD, or median and IQR for quantitative parameters. In brief, EDSS and other repeatedly measured variables will be analysed by means of Mixed Models for Repeated Measurements. In case model assumptions are violated (eg, non-Gaussian errors) or when dealing with ordinal efficacy variables, alternative methods (including non-parametric methods and ordinal regression methods for repeated measurements) will be used. The percentage of patients with 1-point in EDSS improvement will be estimated using a binomial regression model including the treatment and the baseline EDSS. The remainder of variables will be analysed according to the appropriate statistical test:  $\chi^2$  or Fisher's exact test to compare categorical variables, the dependent or independent t-test for continuous Gaussian-distributed variables and the Wilcoxon or Mann-Whitney test for ordinal and non-Gaussian continuous data. The significance level alpha will be set at 0.05 for two-tailed analysis. Variables to assess the analysis of secondary and tertiary outcome measures will be performed with per protocol population. Continuous variables as a minimum will be described by number of total and non-missing observations (n) and the appropriate location-scale statistics including arithmetic mean, SD, minimum, median, Q1–Q3 and maximum. Categorical variables will be presented using the number of non-missing observations (n) or the number of patients in the population (N) as applicable and percentages (%). Two-sided 95% (exact) CI will be provided when relevant.

#### Patient protection

The study will be conducted in agreement with either the Declaration of Helsinki or the laws and regulations of the country, whichever provides the greatest protection of the patient. In the Belgian context, the Law of 7 May 2004 ('Wet van 7 mei 2004 inzake experimenten op de menselijke persoon') applies. The study will be conducted in agreement with the ICH Harmonised Tripartite Guideline for Good Clinical Practice.

#### Informed consent

All patients will be informed of the aim of the study, the possible AE, the procedures and possible hazards to which he/she will be exposed. They will be informed as to the strict confidentiality of their patient data, but that their medical records may be reviewed for trial purposes by authorised individuals other than their treating physician.

#### Dissemination

The results of the clinical trials will be published in a peer-reviewed journal. In addition, the results will be presented at scientific conferences and to patient associations. In particular for Spanish patient associations, dissemination of results will be handled by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices whose content is written in layman's terms. On completion of the trial and after publication of the study results, data requests can be submitted to the researchers.

#### DISCUSSION

Although the first phase I clinical trials have demonstrated promising results with regard to safety of administering tolDC in other autoimmune diseases, numerous questions remain concerning which dose, treatment schedule or route of administration is best with regard to safety, efficacy and related costs of treatment with tolDC. In this collaborative effort, each patient will receive six repetitive injections of 5, 10 or 15×10<sup>6</sup> autologous myelin-derived peptide mix-loaded tolDC, intradermal or intranodal, that is, four administrations once every 2 weeks and two administrations once every 4 weeks. Previously, others evaluated the safety of intravenous administration of tolerogenic DC in MS and neuromyelitis optica patients (table 1).<sup>43 44</sup> In the current study, harmonisation of clinical, MRI and immunological evaluations of the patients will enable us to compare results between two phase I clinical trials evaluating the safety and feasibility of autologous tolDC administration in patients with active MS. To our knowledge, this will be the first time that different routes of administration are set side by side for a cell therapy product.

In conclusion, our protocols envisage to restore tolerance to predefined myelin-peptide antigens using peptide-loaded tolDC. From the results of these two phase I clinical studies, the optimal dose and administration route will be selected for future phase II trials investigating the efficacy of this patient-tailored treatment in MS.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Department of Neurology, University Hospital Antwerp, Edegem, Belgium

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hematology, Vaccine & Infectious Disease Institute (VAXINFECTIO), University of Antwerp Faculty of Medicine and Health Sciences, Wilrijk, Belgium

<sup>3</sup>Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurosciences, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>4</sup>Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>5</sup>Division of Immunology, LCMN, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol and Research Institute, Badalona, Spain

<sup>6</sup>Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>7</sup>Center for Cell Therapy and Regenerative Medicine, University Hospital Antwerp, Edegem, Belgium

<sup>8</sup>Department of Radiology, University Hospital Antwerp, Edegem, Belgium

<sup>9</sup>Icometrix NV, Leuven, Belgium

<sup>10</sup>C-Clear Partners, Mortsel, Belgium

<sup>11</sup>Department of Nephrology, University Hospital Antwerp, Edegem, Belgium

<sup>12</sup>Haematology-Cell Therapy Area, clinica universidad de navarra, Pamplona, Spain

## 10.1. Artículo:

# “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”

### Open access



<sup>13</sup>Immunology and Immunotherapy Department, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

<sup>14</sup>Program of Haematology-Oncology, CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

<sup>15</sup>Lygature, Utrecht, The Netherlands

<sup>16</sup>Department of Neurology, University Hospital Munster, Munster, Germany

<sup>17</sup>Department of Neurology, University of Munster, Munster, Germany

<sup>18</sup>Department of Immunopathology, Sanquin Research, Amsterdam, The Netherlands

<sup>19</sup>Landsteiner Laboratory, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

<sup>20</sup>Clinical Research Polyvalent Unit, Clinical Trial Unit-Spanish Clinical Research Network, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute, Badalona, Spain

<sup>21</sup>Department of Pharmacology, Therapeutic and Toxicology, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>22</sup>Institut de Diagnòstic per la Imatge, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>23</sup>Interuniversity Institute for Biostatistics and statistical Bioinformatics (I-BioStat), Universiteit Hasselt, Hasselt, Belgium

<sup>24</sup>Centre for Health Economic Research and Modelling Infectious Diseases, Vaccine & Infectious Disease Institute (VAXINFECTIO) & Center for Statistics, University of Antwerp Faculty of Medicine and Health Sciences, Wilrijk, Belgium

**Acknowledgements** We thank all the patients who contributed to the preclinical research by donating samples. Our gratitude goes to Marleen Breuls, MS nurse and to the study nurses of the Neurology Department of the Antwerp University Hospital, Linda Wagemakers, Caroline Vinck and Maren Wyckmans as well as Sandra Vidal, study nurse at Clinical Trial Unit in Research Foundation Germans Trias i Pujol-IGTP. We thank the Spanish Clinical Research Network-SCReN for the support on Pharmacovigilance and Case Report Form implementation for the study. We thank also Jorge Luis Reverter, at Endocrinology Department at Hospital Germans Trias i Pujol for the treatment administration. We thank the patients (MDB and PAM) and Belgian and Spanish MS patient organisations (Christiane Tihon, Luc de Groot, Leyre Avellanà) as well as the experts (Ed Geissler, Antonio Ucelli, David Wraith, Catharien Hilkens, Tom Bosschaerts) for their participation in the stakeholder committee. We thank the external scientific advisory board (Ed Geissler, Antonio Ucelli, David Wraith, Catharien Hilkens) and the data safety monitoring board members (Christian Sindic, Ludo Vanopdenbosch, Joan Albert Arnaiz) for their contributions.

**Collaborators** RESTORE Consortium collaborators: Naomi Ooms (Center for Cell Therapy and Regenerative Medicine, Antwerp, Belgium); Dirk Smeets (Icometrix, Leuven, Belgium), Leone Bock, Denis Groot, Wim-Jan Koot, Janwillem Boiten, Jorg Janssen, Sjaak Peelen (Lygature, Utrecht, The Netherlands); A. Turksma, R. Vanlier, T. Rispens, D. DiBlasi, Iris Claessen (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands); M. Puig-Domingo, Laia Lagunas Vila, David Basanta Pons (Germans Trias i Pujol Research Institute, Badalona, Spain); Itziar Astiasarán, Javier Mata Rodríguez (University of Navarra, Spain); Antje Albring, Jana Arnholdt (University of Munster, Germany)

**Contributors** BW, ZB, CRT, EMC, WVH and NC conceived and designed the study. WPL, GN, MDL, GA, AR, MC, IW and NC participated in logistical planning of the study. BW and SPR wrote the initial draft of the manuscript. BW, SPR, CRT, MJM, IW, EMC and NC wrote and reviewed the manuscript. NH provided the statistical support for the sample size estimates and the design of the statistical analysis. BW, SPR, MJM, JD, WPL, GN, MDL, IW, PC, PP, WVH, AR, TB, GA, MC, JNB, ATS, BQS, ALDC, SI, FP, AK, HV, CCG, HW, SMVH, ATB, AMB, AMV, NH, ZB, EMC, NC and CRT made significant contributions to the development and conceptualisation of the protocol, reviewed the draft versions of this paper and have read and approved the final manuscript.

**Funding** This work was supported by positive discussion through the A FACTT network (Cost Action BM1305: [www.afactt.eu](http://www.afactt.eu)). COST is supported by the EU Framework Program Horizon 2020. This RESTORE project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement number 779316. Further support was provided by an applied biomedical research project of the Institute for the Promotion of Innovation by Science and Technology in Flanders (IWT-TBM 140191), by projects P111/02416, P114/01175, P116/01737 and PT13/0002/0038 (Platform for Clinical Research and Clinical Trial Units, Spanish Clinical Research Network, SCReN), integrated in the Plan Nacional de I+D+i and co-supported by the Health Institute Carlos III - Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and project 07/2410 Fundació La Marató de TV3. Furthermore, the authors received research funding from Sanofi Genzyme,

Belgium. Judith Derdelinckx holds a PhD fellowship from the Research Foundation Flanders (FWO). Dr Presas-Rodríguez is a neurologist who has received a grant of Hospital Germans Trias i Pujol ('Germans Trias Talents 2016-2018') to work on this project. Dr Willekens is a neurologist at the Antwerp University Hospital supported by a research fellowship (2016-2018) of the University of Antwerp to work on this project and she currently holds a clinical PhD fellowship from the Research Foundation Flanders (FWO 1701919N). Spanish Patient association 'Treballe de Vida' (Associació d'Afectats d'Esclerosi Múltiple del Barcelonès Nord i Maresme) and patient Ana M<sup>a</sup> Calvo Marsal have donated funding to the Hospital Germans Trias i Pujol MS Unit.

**Competing interests** CCG received speaker honoraria and travel expenses for attending meeting from Genzyme, Novartis Pharma GmbH, and Bayer Health Care. Her work is funded by the German Ministry for Education and Research (BMBF; 01G11603A) and the German Research Foundation (DFG; GR3946/3-1 and SFB128 A09). HW receives honoraria for acting as a member of Scientific Advisory Boards and as consultant for Biogen, Evgen, MedDay Pharmaceuticals, Merck Serono, Novartis, Roche Pharma AG, Sanofi-Genzyme, as well as speaker honoraria and travel support from Alexion, Biogen, Cognomed, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Gemeinnützige Hertie-Stiftung, Merck Serono, Novartis, Roche Pharma AG, Sanofi-Genzyme, TEVA, and WebMD Global. Prof. Wiendl is acting as a paid consultant for Abbvie, Actelion, Biogen, IGES, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, and the Swiss Multiple Sclerosis Society. His research is funded by the German Ministry for Education and Research (BMBF; 01F11601E, 01G11603A, and 01G11603D), Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG; SFB128 A09, A10, Z02, V and SFB1009 A03), Else Kröner Fresenius Foundation, Fresenius Foundation, Hertie Foundation, NRW Ministry of Education and Research, Interdisciplinary Center for Clinical Studies (IZKF) Muenster and RE Children's Foundation, Biogen GmbH, GlaxoSmithKline GmbH, Roche Pharma AG, Sanofi-Genzyme. The institution of BW receives honoraria for acting as a member of Scientific Advisory Boards for Biogen, Merck Serono, Roche, Sanofi-Genzyme, Novartis and speaker honoraria and travel support from Biogen, Merck Serono, Roche, Sanofi-Genzyme, Novartis, TEVA. CRT receives honoraria for acting as a member of Scientific Advisory Boards for Biogen, and Merck Serono, and speaker honoraria or travel support from Biogen, Merck Serono, Roche, Sanofi-Genzyme and Novartis. SPR receives speaker honoraria or travel support from Biogen, Merck Serono, Roche, Sanofi-Genzyme and Novartis. PP is a medical advisory board member of Icometrix NV. The other authors report no conflict of interest.

**Patient and public involvement statement** See methods and analysis section

**Patient consent for publication** Not required.

**Ethics approval** Ethics approval was obtained for both phase I clinical trials. The study protocol was approved by the Federal Agency for Medicines and Health Products (FAMHP, Belgium), the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (Spain), the Ethics Committee of the Antwerp University Hospital (Belgium) and the Ethics Committees of Hospital Germans Trias i Pujol and Clínica Universidad de Navarra.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 Unported (CC BY 4.0) license, which permits others to copy, redistribute, remix, transform and build upon this work for any purpose, provided the original work is properly cited, a link to the licence is given, and indication of whether changes were made. See: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## REFERENCES

1. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, *et al*. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014;83:278–86.
2. Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, *et al*. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:67–75.
3. Cree BAC, Gourraud P-A, Oksenberg JR, *et al*. Long-Term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol* 2016;80:499–510.
4. Scolding N, Barnes D, Cader S, *et al*. Association of British neurologists: revised (2015) guidelines for prescribing disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *Pract Neurol* 2015;15:273–9.
5. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2015;15:545–58.

## 10.1. Artículo:

### “Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonized study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration”



Open access

6. Grigoriadis N, van Pesch V, Pesch van V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol* 2015;22(11):3–13.
7. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, et al. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83–99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 2000;6:1167–75.
8. Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, et al. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004;172:3893–904.
9. Wallström E, Khademi M, Andersson M, et al. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 1998;28:3329–35.
10. Grau-López L, Raich D, Ramo-Tello C, et al. Specific T-cell proliferation to myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2011;18:1101–4.
11. Van Brussel I, Lee WP, Rombouts M, et al. Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: can the unattainable DREAM turn into reality? *Autoimmun Rev* 2014;13:138–50.
12. Willekens B, Cools N. Beyond the magic bullet: current progress of therapeutic vaccination in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2018;32:401–10.
13. Gonsette RE. Self-Tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 2012;112:133–40.
14. Lutterotti A, Martin R. Antigen-Specific tolerization approaches in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2014;23:9–20.
15. Gross CC, Jonuleit H, Wiendl H. Fulfilling the DREAM: tolerogenic dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2012;42:569–72.
16. Berneman Z, Lee W, Willekens B, et al. Towards the clinical use of tolerogenic dendritic cells in multiple sclerosis by applying the immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on dendritic cells to promote induction of T cell hyporesponsiveness to Myelin-Derived antigens. *Cytotherapy* 2016;18:S95–S96.
17. Multiple Sclerosis Journal. *Using cells to cure disease: tolerogenic dendritic cells for the treatment of MS*. London, England: Sage Publications, 2016.
18. Ten Brinke A, Hilkens CMU, Cools N, et al. Clinical use of tolerogenic dendritic Cells-Harmonization approach in European collaborative effort. *Mediators Inflamm* 2015;2015:471719–8.
19. Nuyts AH, Lee WP, Bashir-Dar R, et al. Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis. *key players for new cellular immunotherapies? Multiple sclerosis* 2013;19:995–1002.
20. Flórez-Grau G, Zubizarreta I, Cabezón R, et al. Tolerogenic dendritic cells as a promising antigen-specific therapy in the treatment of multiple sclerosis and neuromyelitis optica from preclinical to clinical trials. *Front Immunol* 2018;9:1169.
21. Lee W-P, Willekens B, Cras P, et al. Immunomodulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on Dendritic Cells Promote Induction of T Cell Hyporesponsiveness to Myelin-Derived Antigens. *J Immunol Res* 2016;2016:1–16.
22. Raich-Regué D, Grau-López L, Naranjo-Gómez M, et al. Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* 2012;42:771–82.
23. Naranjo-Gómez M, Raich-Regué D, Oñate C, et al. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med* 2011;9:89.
24. Mansilla MJ, Sellès-Moreno C, Fàbregas-Puig S, et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci Ther* 2015;21:222–30.
25. Mansilla MJ, Conterras-Cardone R, Navarro-Barriuso J, et al. Cryopreserved vitamin D<sub>3</sub>-tolerogenic dendritic cells pulsed with autoantigens as a potential therapy for multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation* 2016;13:113.
26. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, et al. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2011;34:2026–32.
27. Benham H, Nel HJ, Law SC, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med* 2015;7:290ra87.
28. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:227–34.
29. Jauregui-Amezaga A, Cabezón R, Ramírez-Morros A, et al. Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *ECCOJC* 2015;9:1071–8.
30. De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer research* 2003;63:12–17.
31. Ridolfi R, Riccobon A, Galassi R, et al. Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients. *J Transl Med* 2004;2:27.
32. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, et al. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer research* 1999;59:56–8.
33. Lesterhuis WJ, de Vries IJM, Schreiber G, et al. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2011;17:5725–35.
34. de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 2005;23:1407–13.
35. Sun B-L, Wang L-hua, Yang T, et al. Lymphatic drainage system of the brain: a novel target for intervention of neurological diseases. *Prog Neurobiol* 2018;163:164:118–43.
36. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015;523:337–41.
37. Vickrey BG, Hays RD, Harooni R, et al. A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Qual Life Res* 1995;4:187–206.
38. Rieckmann P, Centonze D, Elovaara I, et al. Unmet needs, burden of treatment, and patient engagement in multiple sclerosis: a combined perspective from the MS in the 21st century steering group. *Mult Scler Relat Disord* 2018;19:153–60.
39. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292–302.
40. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018;17:162–73.
41. Le Tourneau C, Lee JJ, Siu LL. Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:708–20.
42. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–52.
43. Nafarrate IZ, Florez G, Vila G, et al. Phase 1B clinical trial with antigen-specific tolerogenic dendritic in multiple sclerosis and neuromyelitis optica: safety and immunological effects (P2.330). *Neurology* 2017;88(16 Supplement):P2.330.
44. Zubizarreta I, Flórez-Grau G, Vila G, et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1B trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:8463–70.

## 10.2.

### Batería de test neurológicos funcionales

TOLERVIT-MS



Spanish  
Clinical  
Research  
Network

#### 9-HOLE PEG TEST Y 25-FOOT WALK TEST

<b>Centro:</b> Hospital Universitari Germans Trias i Pujol	<b>Código de Protocolo:</b> TOLERVIT-MS
<b>Investigador Principal:</b> Dra. Cristina Ramo	<b>Promotor:</b> Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol

CÓDIGO DE PACIENTE		Nº VISITA / FECHA	

#### 9-HOLE PEG TEST

MANO DOMINANTE:

MANO NO DOMINANTE:

1er intento:	seg	1er intento:	seg
2º intento:	seg	2º intento:	seg

¿Alguna incidencia durante la prueba?

.....

#### 25-FOOT WALK TEST

1er intento:	seg
2º intento:	seg

¿Alguna incidencia durante la prueba?

.....

Nombre de la persona que realiza los test:

# 10.2.

## Batería de test neurológicos funcionales

TOLERVIT-MS



### Test de Símbolos y Dígitos -SDMT test

<b>Centro:</b> Hospital Universitari Germans Trias i Pujol	<b>Código de Protocolo:</b> TOLERVIT-MS
<b>Investigador Principal:</b> Dra. Cristina Ramo	<b>Promotor:</b> Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol

<b>CÓDIGO DE PACIENTE</b>		<b>Nº VISITA / FECHA</b>	
---------------------------	--	--------------------------	--

**FORMULARIO 1  
EXPLICACIÓN**

>	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
1	2	3	4	5	6	7	8	9	

∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
∩	>	∩	∩	>	∩	∩	∩	>	∩	∩	∩	∩	∩	∩
∩	∩	+	∩	∩	+	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
∩	∩	∩	∩	>	∩	∩	∩	>	+	∩	∩	∩	∩	∩
∩	∩	∩	∩	∩	>	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
∩	∩	+	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
∩	∩	∩	>	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

---

# Cuestionario de Calidad de Vida específico de Esclerosis Múltiple MSQOL-54

---

**Versión española de MSQOL-54 © 1995, University of California, Los Angeles, adaptada por M. Aymerich y cols 2006.**

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

**Por favor conteste las siguientes preguntas. Algunas preguntas pueden parecerse a otras pero cada una es diferente.**

**Tómese el tiempo necesario para leer cada pregunta, y marque con una  la casilla que mejor describa su respuesta.**

*¡Gracias por contestar a estas preguntas!*

1. En general, usted diría que su salud es:

<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
Excelente	Muy buena	Buena	Regular	Mala

2. ¿Cómo diría usted que es su salud actual, comparada con la de hace un año?

Mucho mejor ahora que hace un año	Algo mejor ahora que hace un año	Más o menos igual que hace un año	Algo peor ahora que hace un año	Mucho peor ahora que hace un año
<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>



## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto?

ACTIVIDADES	Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No, no me limita nada
	Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No, no me limita nada
3. <u>Esfuerzos intensos</u> , tales como correr, levantar objetos pesados, o participar en deportes agotadores	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
4. <u>Esfuerzos moderados</u> , como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de 1 hora	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
5. Coger o llevar la bolsa de la compra	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
6. Subir <u>varios</u> pisos por la escalera	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
7. Subir <u>un sólo</u> piso por la escalera	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
8. Agacharse o arrodillarse	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
9. Caminar <u>un kilómetro o más</u>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
10. Caminar varios centenares de metros	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
11. Caminar unos 100 metros	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
12. Bañarse o vestirse por sí mismo	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

13-16. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física?

	<b>Siempre</b>	<b>Casi siempre</b>	<b>Algunas veces</b>	<b>Sólo alguna vez</b>	<b>Nunca</b>
13. ¿Tuvo que <u>reducir el tiempo</u> dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5
14. ¿Hizo <u>menos</u> de lo que hubiera querido hacer?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5
15. ¿Tuvo que <u>dejar de hacer algunas tareas</u> en su trabajo o en sus actividades cotidianas?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5
16. ¿Tuvo <u>dificultad</u> para hacer su trabajo o sus actividades cotidianas (por ejemplo, le costó más de lo normal)?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5

17-19. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido o nervioso)?

	<b>Siempre</b>	<b>Casi siempre</b>	<b>Algunas veces</b>	<b>Sólo alguna vez</b>	<b>Nunca</b>
17. ¿Tuvo que <u>reducir el tiempo</u> dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas, <u>por algún problema emocional</u> ?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5
18. ¿Hizo <u>menos</u> de lo que hubiera querido hacer, por algún <u>problema emocional</u> ?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5
19. ¿Hizo su trabajo o sus actividades cotidianas <u>menos cuidadosamente</u> que de costumbre, <u>por algún problema emocional</u> ?	Siempre <input type="checkbox"/> 1	Casi siempre <input type="checkbox"/> 2	Algunas veces <input type="checkbox"/> 3	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> 4	Nunca <input type="checkbox"/> 5

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

20. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto su salud física o los problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales habituales con la familia, los amigos, los vecinos u otras personas?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

#### Dolor

21. ¿Tuvo dolor en alguna parte del cuerpo durante las 4 últimas semanas?

No, ninguno	Sí, muy poco	Sí, un poco	Sí, moderado	Sí, mucho	Sí, muchísimo
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6

22. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

23-32. Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las 4 últimas semanas. En cada pregunta responda lo que se parezca más a cómo se ha sentido usted. Durante las últimas 4 semanas ¿ con qué frecuencia...

	<b>Siempre</b>	<b>Casi siempre</b>	<b>Algunas veces</b>	<b>Sólo alguna vez</b>	<b>Nunca</b>
23. se sintió lleno de vitalidad?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
24. estuvo muy nervioso?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
25. se sintió tan bajo de moral que nada podía animarle?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
26. se sintió calmado y tranquilo?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
27. tuvo mucha energía?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
28. se sintió desanimado y deprimido?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
29. se sintió agotado?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
30. se sintió feliz?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
31. se sintió cansado?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
32. se sintió descansado al despertarse por la mañana?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

33. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

Siempre <sub>1</sub>      Casi siempre <sub>2</sub>      Algunas veces <sub>3</sub>      Sólo alguna vez <sub>4</sub>      Nunca <sub>5</sub>

#### SALUD EN GENERAL

34-37. Por favor, diga si le parece CIERTA o FALSA cada una de las siguientes frases:

	<b>Totalmente cierta</b>	<b>Bastante cierta</b>	<b>No lo sé</b>	<b>Bastante falsa</b>	<b>Totalmente falsa</b>
34. Creo que me pongo enfermo más fácilmente que otras personas	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
35. Estoy tan sano como cualquiera	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
36. Creo que mi salud va a empeorar	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>
37. Mi salud es excelente	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

#### PREOCUPACIÓN POR LOS PROBLEMAS DE SALUD

38-41. Durante las 4 últimas semanas, ¿Cuántas veces...

	<b>Siempre</b>	<b>Casi siempre</b>	<b>Muchas veces</b>	<b>Algunas veces</b>	<b>Sólo alguna vez</b>	<b>Nunca</b>
38. estuvo desanimado por sus problemas de salud?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>
39. se sintió frustrado por su salud?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>
40. fue su salud una preocupación en su vida?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>
41. se sintió agobiado por sus problemas de salud?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>

#### FUNCIÓN COGNITIVA

42-45. Durante las 4 últimas semanas, ¿Cuántas veces...

	<b>Siempre</b>	<b>Casi siempre</b>	<b>Muchas veces</b>	<b>Algunas veces</b>	<b>Sólo alguna vez</b>	<b>Nunca</b>
42. le costó concentrarse y pensar?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>
43. le costó mantener la atención en una actividad durante mucho tiempo?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>
44. tuvo problemas de memoria?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>
45. notaron otras personas, como familiares o amigos, que tiene problemas de memoria o concentración?	Siempre <input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	Casi siempre <input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	Muchas veces <input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	Algunas veces <input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	Sólo alguna vez <input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	Nunca <input type="checkbox"/> <sub>6</sub>

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

#### FUNCIÓN SEXUAL

46-49. Las preguntas que siguen se refieren a su función sexual y su satisfacción con ésta. Por favor, conteste con la mayor exactitud posible refiriéndose sólo a las 4 últimas semanas.

Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto fue para usted un problema cada uno de los siguientes aspectos?

<b>HOMBRE</b>	<b>Nada problemático</b>	<b>Un poco problemático</b>	<b>Bastante problemático</b>	<b>Muy problemático</b>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
46. Falta de interés sexual	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
47. Dificultad para conseguir o mantener la erección	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
48. Dificultad para tener un orgasmo	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
49. Capacidad para satisfacer sexualmente a su pareja	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>

<b>MUJER</b>	<b>Nada problemático</b>	<b>Un poco problemático</b>	<b>Bastante problemático</b>	<b>Muy problemático</b>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
46. Falta de interés sexual	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
47. Tener una lubricación vaginal insuficiente	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
48. Dificultad para tener un orgasmo	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>
	Nada problemático	Un poco problemático	Bastante problemático	Muy problemático
49. Capacidad para satisfacer sexualmente a su pareja	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>

## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

50. En general, durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto estuvo satisfecho con su función sexual?

Muy satisfecho	Algo satisfecho	Ni satisfecho ni insatisfecho	Algo insatisfecho	Muy insatisfecho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

51. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto problemas intestinales (estreñimiento, etc.) o urinarios han dificultado sus actividades sociales habituales con familiares, amigos, vecinos u otras personas?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

52. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha limitado para disfrutar de la vida?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5



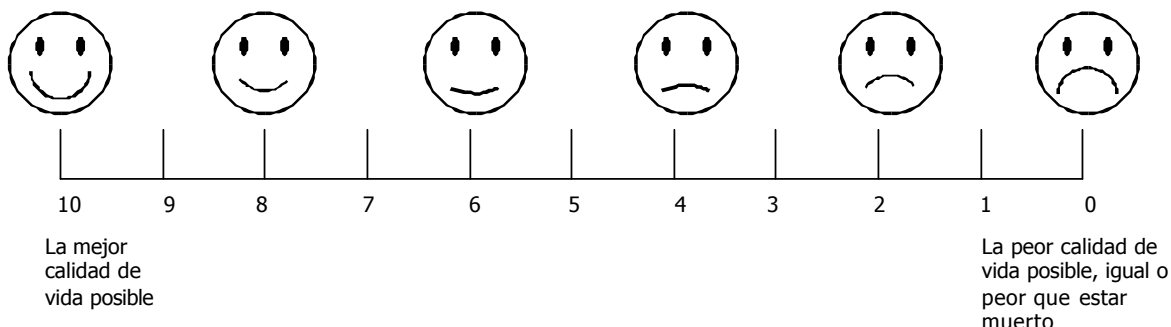
## 10.3.

### Cuestionario MSQoL-54

#### CALIDAD DE VIDA

53. En general, ¿cómo valoraría usted su calidad de vida?

Marque un número en la escala siguiente:



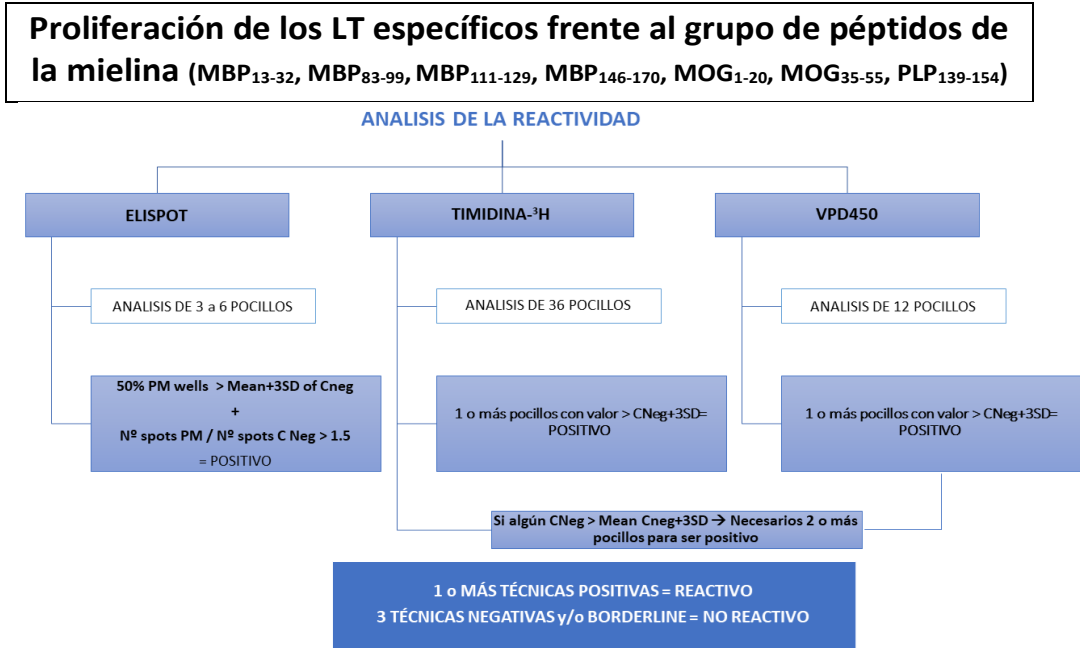
54. ¿Cuál de las siguientes opciones describe mejor cómo se siente con su vida en general?

			A veces satisfecho y a veces insatisfecho	En general satisfecho		
Horrible	Infeliz	En general insatisfecho			Contento	Encantado
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7

# 10.4

## Registro del análisis de proliferaciones linfocitarias

Ficha Registro de Resultados



ID paciente:

Visita:

Fecha:

Responsable técnico:

ELISPOT		TIMIDINA- <sup>3</sup> H	VPD450
With IL2/IL7	% Pept. reactive wells = Nº spots Pept / Nº spots C Neg =	Nº Pocillos con Valor > CN+3SD =	Nº Pocillos con Valor > CN+3SD =
Without IL2/IL7	% Pept. reactive wells = Nº spots Pept / Nº spots C Neg =	<b>REACTIVO</b> <b>BORDERLINE</b> <b>NO REACTIVO</b>	<b>REACTIVO</b> <b>BORDERLINE</b> <b>NO REACTIVO</b>
<b>REACTIVO / NO REACTIVO</b>			

**RESULTADO REACTIVIDAD:**

Reactivo frente a péptidos de la mielina:  Sí /  No

Comentarios:

Firma:

## 10.5.

### Panel de subpoblaciones linfocitarias

#### Panel de subpoblaciones linfocitarias

Linfocitos T	C4+CD8-	Naïve: CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> Central memory: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> Effector memory: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> Th1 CM: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD194 <sup>-</sup> CD196 <sup>-</sup> CD183 <sup>+</sup> Th2: CM CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD194 <sup>+</sup> CD196 <sup>-</sup> CD183 <sup>-</sup> Th17 CM: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD194 <sup>+</sup> CD196 <sup>+</sup> CD183 <sup>-</sup> Th17.1 CM: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD194 <sup>-</sup> CD196 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> Th1 EM: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD194 <sup>-</sup> CD196 <sup>-</sup> CD183 <sup>+</sup> Th2: EM CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD194 <sup>+</sup> CD196 <sup>-</sup> CD183 <sup>-</sup> Th17 EM: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD194 <sup>+</sup> CD196 <sup>+</sup> CD183 <sup>-</sup> Th17.1 EM: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD194 <sup>-</sup> CD196 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>
	CD8+CD4-	Naïve: CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> Central memory: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> Effector memory: CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> TEMRA: CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> CTL: CD57 <sup>+</sup>
	Th folicular	Th1-like: CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CXCR5 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup> Th2-like: CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CXCR5 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR6 <sup>-</sup> Th17-like: CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CXCR5 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR6 <sup>+</sup>
Linfocitos B	CD19+CD20+	Activation: CD80 <sup>+</sup> Naïve: CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> Class-switch memory: CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>-</sup> IgG <sup>+</sup> Marginal zone like memory: CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgM-only memory: CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup> CD21 <sup>-</sup> : IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> CD21 <sup>-</sup> Transitional: IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD24 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> Regulatory: CD27 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD38 <sup>high</sup>
Células dendríticas	CD3-CD19-CD56-HLA-DR+CD14-	CD1c <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> cDC CD141 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> cDC CD303 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> pDC CD1c <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> SLAN <sup>+</sup> SLanDC
Monocitos	FSC <sup>high</sup> SSC <sup>high</sup> CD14+HLA-DR+	CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>-</sup> CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup>
Células NK	CD3-CD56+	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>high</sup> CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>dim/-</sup>
Células NKT	CD3+CD56+	