

CONFIDENCIAL

SINOPSIS INFORME CLÍNICO CMM/EM/2008

ENSAYO CLÍNICO MULTICÉNTRICO FASE I/II ALEATORIZADO Y CONTROLADO CON PLACEBO, PARA EVALUACIÓN DE SEGURIDAD Y FACTIBILIDAD DE LA TERAPIA CON DOS DOSIS DISTINTAS DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES AUTÓLOGAS DE TEJIDO ADIPOSEO (CETMAD) EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE SECUNDARIAMENTE PROGRESIVA, QUE NO RESPONDEN ADECUADAMENTE A LOS TRATAMIENTOS REGISTRADOS

Versión 2 del 10 de julio de 2020

TABLA DE CONTENIDO:

TABLA DE CONTENIDO:	2
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
A. INFORMACIÓN SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO:	7
1. Identificación del ensayo clínico	7
2. Identificadores	7
3. Promotor	7
4. Datos pediátricos	7
5. Datos del informe.....	7
6. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO	8
6.1 Medicamentos en Investigación	8
6.2 Patología de estudio	8
6.3 Diseño del ensayo	8
6.4 Investigador Principal	8
6.5 Antecedentes científicos y justificación.....	9
6.6 Objetivos del ensayo clínico.....	10
6.7. Plan de desarrollo del ensayo clínico.....	10
6.8 Metodos estadísticos	11
7. POBLACIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO	13
B. DISPOSICIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO	14
1. SELECCIÓN.....	14
Criterios de inclusión:	15
Criterios de exclusión:.....	15
Criterios de retirada del tratamiento o de la evaluación:.....	15
2. Aleatorización.....	16
3. Enmascaramiento.....	18
C. CARACTERÍSTICAS BASALES.....	18
D. CRITERIOS DE VALORACIÓN.....	21
Evaluación de la seguridad.....	21
Criterio de Valoración nº 1: Seguridad durante el procedimiento	21
Criterio de Valoración nº 2: Seguridad durante el seguimiento	21
Evaluación de la factibilidad e indicios de eficacia.....	22
Criterio de Valoración nº 3: Número de brotes	24
Criterio de Valoración nº 4: Progresión	24
Criterio de Valoración nº 5: Cambios en la Resonancia Magnética	25

Criterio de Valoración nº 6: Variables neurofisiológicas.....	25
Cambios en los Potenciales Evocados.....	25
Criterio de Valoración nº 7: Cambios en la Tomografía óptica de coherencia (OCT)	26
Criterio de Valoración nº 8: Evaluación neuropsicológica	26
Criterio de Valoración nº 9: Escalas de calidad de vida	26
Criterio de Valoración nº 10: Inmunología – medidas repetidas	27
Criterio de Valoración nº 10: hematología-bioquímica – medidas repetidas	28
Valoración de la eficacia. Conclusiones.....	28
E. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS.....	29
1.- Información sobre acontecimientos adversos	29
2.- Codificación y Notificación de acontecimientos adversos	31
3. Acontecimientos adversos graves	34
4.- Acontecimientos adversos no graves.....	34
Valoración de la seguridad. Conclusiones	35
F. INFORMACIÓN ADICIONAL	35
1.- Modificaciones globales sustanciales	35
2.- Interrupciones globales y reanudaciones	35
3.- Limitaciones, valorando las fuentes de sesgos potenciales e imprecisiones y advertencias.....	35
4.- Declaración del solicitante respecto a la exactitud de la información presentada.....	36
Referencias	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cronograma del Ensayo Clínico.....	11
Tabla 2. Datos demográficos y signos vitales	20
Tabla 3. Historia de Esclerosis Múltiple -Síntomas de comienzo.....	20
Tabla 4. Cambios en las variables de eficacia a los 12 meses del tratamiento.....	23
Tabla 5. Análisis de citoquinas- TGF-B	27
Tabla 6. Análisis de citoquinas-IL23	28
Tabla 7. Acontecimientos Adversos durante el ensayo.....	29
Tabla 8. Acontecimientos Adversos por grupo. Codificación MedDRA	31
Tabla 9. Acontecimientos Adversos Graves.....	34

CONFIDENCIAL

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Disposición de sujetos de estudio.....	14
Figura 2. Resultado de la distribución aleatoria de la población de estudio.....	17
Figura 3. Resultado de la distribución aleatoria de la población de estudio por centros	17
Figura 4. Distribución de la población por sexos	19
Figura 5. Síntomas de comienzo de la enfermedad en función a los grupos de tratamiento	21
Figura 6. Puntuación escala EDSS total.....	24
Figura 7. Análisis de citoquinas- TGF-B.....	27
Figura 8. Análisis de citoquinas-IL23.....	28
Figura 9. Acontecimientos Adversos No graves. Frecuencia	35

CONFIDENCIAL

LISTA DE ABREVIATURAS

AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
BM	Bone Marrow
BRB	Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Test in Multiple Sclerosis de Rao
CABIMER	Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CeTMAD	Células Troncales Mesenquimales Autólogas de Tejido Adiposo
CMM	Células Madre Mesenquimales
CRD	Cuaderno de recogida de datos
CT	Células troncales
EDSS	Puntuación en la escala ampliada de Kurtzke (en inglés: Expanded Disability Status Scale)
EM	Esclerosis Múltiple
EMPP	Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva
EMRR	Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
EMSP	Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
EPAS	Evoked Potentials Abnormality Store. (Escala Global Paramétrica de puntuación)
IATA	Iniciativa Andaluza de Terapias Avanzadas
ICH	International Conference on Harmonisation
LCR	Líquido Cefalorraquideo
MSC	Células Troncales Mesenquimales (<i>del inglés mesenchymal stem cells</i>)
MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
PAE	Plan de Análisis Estadístico
PASAT	Paced auditory serial test
PE	Potenciales Evocados
PEA	Potenciales Evocados Acústicos
PEC	Potenciales Evocados Cognitivos
PEM	Potenciales Evocados Motores
PESS	Potenciales Evocados Somatosensitivos
PEV	Potenciales Evocados Visuales
PFR	Espirometría Básica con Test de Difusión
RM	Resonancia Magnética
SNC	Sistema nervioso central
TOC	Tomografía Óptica de Coherencia

A. INFORMACIÓN SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO:

1. Identificación del ensayo clínico

Título: Ensayo clínico multicéntrico fase I/II aleatorizado y controlado con placebo, para evaluación de seguridad y factibilidad de la terapia con dos dosis distintas de Células Mesenquimales Troncales Autólogas de Tejido Adiposo (CeTMAD) en pacientes con Esclerosis Múltiple Secundariamente Progresiva, que no responden adecuadamente a los tratamientos registrados.

2. Identificadores

Código del Protocolo: CMM/EM/2008

EudraCT: 2008-004015-35

3. Promotor

Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas (antes Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas) a través de la Fundación Progreso y Salud (FPS).

Datos de contacto:

- Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas (antes Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas).
Junta de Andalucía
Parque Científico y Tecnológico Cartuja, Calle Américo Vespucio, 15, 41092 Sevilla
Tel.: (+34) 955 89 01 24- (+34) 955 04 83 66 Fax: (+34) 955 267 002
www.juntadeandalucia.es/terapiasavanzadas

4. Datos pediátricos

El ensayo clínico no permitió la inclusión de pacientes pediátricos.

5. Datos del informe

El presente documento se elabora tras la finalización del ensayo clínico en cuestión y la realización del correspondiente análisis estadístico final.

Fecha de inicio del ensayo:

Fecha de inclusión del primer paciente en el ensayo: 30/12/2009.

Fecha de finalización del ensayo:

Fecha de la última visita del último paciente en el ensayo: 28/06/2011.

El presente documento constituye el **Anexo 1** del Informe clínico global del ensayo.

Persona responsable del informe clínico

Rosario Mata: Coordinadora Médica y de Asuntos Regulatorios. Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas. Email: rosario.mata@juntadeandalucia.es. Teléfono: 955048366.

6. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO

6.1 Medicamentos en Investigación

- Fármaco experimental: Células Mesenquimales Troncales Adultas Autólogas de Tejido Adiposo expandidas (CETMAD), en dos diferentes dosis:
 - 1×10^6 células / kg de peso paciente
 - 4×10^6 células / kg de peso paciente

Comparador: Placebo

Fármaco experimental:

La terapia celular, células mesenquimales autólogas de tejido adiposo, considerada como medicamento, y objeto de este ensayo clínico, consiste en una suspensión de células mesenquimales autólogas de tejido adiposo que se obtienen mediante un procedimiento de expansión en condiciones GMP (del inglés *Good Manufacturing Practice*).

El procedimiento de obtención de tejido adiposo de cada paciente por lipectomía abdominal, material de partida para la preparación del Medicamento experimental, fue el utilizado en la práctica habitual en los centros participantes para este tipo de cirugía. Tras la extracción, se procedió al envío del tejido al laboratorio de CABIMER en condiciones de refrigeración (entre 2-8°C) en un kit de transporte con un registrador de temperatura continuo.

La composición de la suspensión de células mesenquimales autólogas de tejido adiposo fue la siguiente:

Sustancia activa:

- Células mesenquimales troncales adultas autólogas de tejido adiposo expandidas

Excipientes:

- Solución de Ringer lactada
- 2,5% de glucosa
- 1% albúmina.

Comparador:

Composición del placebo:

- Solución de Ringer lactada
- 2,5% de glucosa
- 1% albúmina.

Los medicamentos en investigación se administraron por vía intraarterial y en una única infusión (1 día).

6.2 Patología de estudio

Pacientes con Esclerosis Múltiple Secundariamente Progresiva.

6.3 Diseño del ensayo

Estudio fase I/II, prospectivo, multicéntrico, triple ciego, aleatorizado, controlado con placebo y con dos grupos experimentales de tratamiento.

6.4 Investigador Principal

- Dr. Óscar Fernández Fernández. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. Email: oscar.fernandez.sspa@gmail.com
- Dr. Guillermo Izquierdo Ayuso. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. Email: gia@us.es

6.5 Antecedentes científicos y justificación

La **esclerosis múltiple**, la enfermedad neurológica crónica más frecuente e invalidante en adultos jóvenes, se presenta en personas susceptibles genéticamente, sobre las que actuaría un factor ambiental desconocido, originando una respuesta inmune alterada dirigida contra antígenos de la mielina del sistema nervioso central que da lugar a una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa. Existen dos formas principales de la enfermedad: la más frecuente, forma **remite recurrente**, debuta con brotes y su fisiopatología es fundamentalmente inflamatoria, y la **secundaria progresiva**, que se desarrolla desde la primera. Una tercera forma, **primariamente progresiva**, con un curso progresivo desde el comienzo, se presenta con una frecuencia sensiblemente inferior. Recientemente, se han producido grandes avances en el tratamiento de las EMRR, con un amplio rango de tratamientos que se dirigen fundamentalmente al componente inflamatorio de la enfermedad (Lassmann, van Horssen, & Mahad, 2012, Sorensen, 2014). Sin embargo, se han hecho pocos progresos en los casos de EMSP, cuya fisiopatología apunta más a un componente neurodegenerativo (Fernández et al, 2005, Compston & Coles, 2008). Aunque el interferon β es indicado para las formas SP con actividad, su eficacia no es llamativa (Mantia et al, 2013). Mitoxantrona en cambio parece tener un mayor impacto, aunque con problemas de toxicidad a largo plazo (Cohen & Mikol, 2004 Hartung et al, 2001). Consecuentemente, hay una considerable proporción de pacientes en esta segunda etapa, esencialmente neurodegenerativa, en los que las terapias, con un perfil fundamentalmente antiinflamatorio fracasan, y la actividad clínica y de RM se mantiene.

En la EM la remielinización espontánea normal sigue produciéndose, pero es muy limitada y disminuye con la progresión de la enfermedad. El fracaso de la remielinización puede deberse a una falta de migración o reclutamiento de los precursores de los oligodendrocitos endógenos, al fracaso en la diferenciación de estos precursores a oligodendrocitos remielinizantes o a la existencia de un ambiente de señalización desregulado. Las estrategias de reemplazo celular para promover la reparación en las enfermedades neurodegenerativas son áreas muy prometedoras de investigación. El trasplante de células troncales ha demostrado su seguridad y un alto grado de eficacia en una amplia variedad de indicaciones (Segers & Lee, 2008, Politis & Lindvall, 2012, Glat & Offen, 2013, De la Portilla et al, 2013, Panés. et al, 2016, Fisher et al, 2016, Chen et al., 2015, Jiang, Zhang, & Teng, 2016, El-Badawy & El-Badri, 2016), demostrando su efectividad en numerosos modelos experimentales. En el caso de la EM, los efectos paracrinos de estas células sobre el SNC y la capacidad de estimular el proceso endógeno axonal y la reparación de la mielina pueden ser beneficiosos (Ucelli, Moretta, & Pistoia, 2004, Payne, Siatskas, Barnard, & C.A. Bernard, 2011). La capacidad de estimular la reparación endógena del SNC demostrada por las células troncales en modelos animales de EM (Bai et al, 2009), ha animado a los investigadores a testar estos efectos en el ser humano (Slavin, Kurkalli & Karussis, 2008), y ha dado lugar a una serie de estudios con la administración intravenosa o intratecal de células mesenquimales de médula ósea (Mohyeddin et al, 2007, Odinak et al, 2011, Yamout et al, 2010, Bonab et al, 2012). De especial interés es un estudio exploratorio de pacientes con EMSP con afectación de vías ópticas, en los que se confirma la seguridad del tratamiento y se detecta una mejora fisiológica, estructural y funcional de los endpoints visuales (Connick et al, 2012).

En consecuencia, el tratamiento con CT mesenquimales autólogas en la EM debería plantearse en términos de sus propiedades inmunomoduladoras, su hipotética capacidad de regeneración de neuronas, células gliales u oligodendrocitos y, por último, la posibilidad de conseguir *estimular el proceso endógeno axonal y la reparación de la mielina*, así como *los efectos paracrinos sobre el SNC*. En cuanto al efecto inmunomodulador, es de destacar el papel demostrado del tratamiento con CT mesenquimales en la enfermedad de injerto frente a huésped (Le Blanc, et al. 2004, 2008, Frank and Sayegh 2004).

Por otro lado, el tejido adiposo es una estupefanda fuente de células mesenquimales, a pesar de lo cual, con la excepción de un informe de 3 pacientes tratados la fracción vascular estromal (células obtenidas de muestras de grasa no expandida), y otros dos pequeños estudios, su potencial como una fuente de células troncales no había sido explorado antes del presente ensayo (Riordan et al, 2009, Ra et al, 2011 & Stepien et al, 2016).

En consecuencia, se planteó la necesidad de valorar la seguridad y la factibilidad del uso de células troncales mesenquimales autólogas de tejido adiposo administradas por vía intravenosa en pacientes con EMSP, iniciándose con el presente ensayo la fase clínica de investigación de los resultados (seguridad y eficacia) del tratamiento con CT mesenquimales autólogas de la EMSP. Se diseñó un ensayo clínico fase I/II, controlado y aleatorizado, triple ciego, en 30 pacientes, con 2 dosis de células mesenquimales obtenidas de tejido graso, monitorizado con una escala de efectos adversos, variables clínicas, analítica general e inmunológica, resonancia magnética, potenciales evocados, tomografía óptica de coherencia, pruebas neuropsicológicas y escalas de calidad de vida.

El ensayo clínico objeto del presente informe fue planteado sobre la hipótesis de que las Células Troncales Mesenquimales podrían tener un efecto beneficioso sobre la evolución de la EMSP a través de sus propiedades

inmunomoduladoras, y su capacidad de diferenciación en precursores de oligodendrocitos, favoreciendo la remielinización de axones.

6.6 Objetivos del ensayo clínico

6.6.1 Objetivo Principal

Evaluar la seguridad y factibilidad de dos dosis de células mesenquimales troncales autólogas administradas por vía intravenosa frente a placebo en pacientes con EM de curso clínico secundariamente progresivo.

6.6.2 Objetivos Secundarios

1. Seguridad:

Evaluar la seguridad de dos dosis de células mesenquimales troncales autólogas administradas por vía intravenosa frente a placebo en pacientes con EM de curso clínico secundariamente progresivo, medida a través de la incidencia de los acontecimientos adversos registrados desde el inicio del ensayo y durante los 12 meses de seguimiento tras la infusión del medicamento/placebo.

2. Factibilidad:

Evaluar la factibilidad del uso de células mesenquimales troncales autólogas (dos dosis diferentes), administradas por vía intravenosa, frente al placebo en el tratamiento de pacientes con EM de curso clínico secundariamente progresivo.

El término factibilidad se equipara en el presente ensayo clínico a indicios de eficacia, es decir, encontrar alguna mejoría clínicamente relevante, en base a las variables clínicas (brotes y progresión medida con las escalas EDSS y MSFC) y paraclínicas (resonancia magnética, potenciales evocados, tomografía óptica de coherencia, pruebas neuropsicológicas y escalas de calidad de vida) definidas en el protocolo, siempre y cuando no sea necesario la interrupción del estudio basándonos en criterios seguridad (acontecimiento adverso grave relacionado con la infusión en 1/3 de los pacientes o mortalidad relacionada con el procedimiento del ensayo en ≥ 1 paciente).

3. Efecto Inmunomodulador:

Evaluar el efecto inmunomodulador de dos dosis de células troncales mesenquimales autólogas frente a placebo, administradas por vía intravenosa en pacientes con EM de curso clínico secundariamente progresivo, medido en subpoblaciones celulares (linfocitos T CD4+ y CD8+), citocinas de perfil proinflamatorio (TNF α y IFN γ) y antiinflamatorio (TGF- β), y citocinas críticas enfermedades autoinmunes (IL-6 e IL23). Asimismo, se procede al análisis funcional de la respuesta inmune en PBMC y la actividad funcional de células CD4+CD25+CD27 o Actividad CD4+CD25+FoxP3.

6.7. Plan de desarrollo del ensayo clínico

6.7.1 Diseño del ensayo

Se diseñó un ensayo clínico fase I/II, prospectivo, multicéntrico, triple ciego, aleatorizado y controlado con placebo y con dos grupos experimentales de tratamiento frente a placebo.

- 1) Brazo 1 - Grupo Control: placebo
- 2) Brazo 2 - Grupo Experimental 1: suspensión de células mesenquimales troncales en una única dosis de 1×10^6 células/kg de paciente por vía i.v.
- 3) Brazo 3 - Grupo Experimental 2: suspensión de células mesenquimales troncales (en la solución descrita para el grupo control) en una única dosis de 4×10^6 células/kg de paciente por vía i.v.

6.7.2 Cronograma

Según el diseño del ensayo, el paciente debía acudir al menos a 10 visitas durante todo el ensayo. La primera era de selección (V1), realizándose la extracción de tejido adiposo hasta aproximadamente un mes de la inclusión del paciente en el estudio o coincidiendo con la visita de selección. La segunda visita correspondía a la infusión del medicamento en investigación (V2). Las visitas 3, 4 y 5 eran programadas a las 24 horas, 8 y 30 días de la infusión. En la visita 8, a los 6 meses de la infusión, se planificaba la realización de una RMN de seguimiento, así como en la visita 10 (12 meses post-infusión).

Tabla 1. Cronograma del Ensayo Clínico

	Visita 1 Pre-inclusión	Visita 2 +4 sem.	Visita 3 + 1 día	Visita 4 + 8 días	Visita 5 + 30 días	Visita 6 + 60 días	Visita 7 + 90 días	Visita 8 + 6º mes	Visita 9 9º mes	Visita 10 12º mes
Historia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Exploración general	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Exploración neurológica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Brotos	X		X	X	X	X	X	X	X	X
EDSS	X				X	X	X	X	X	X
MSFC	X				X	X	X	X	X	X
Análisis general	X	X			X	X	X	X	X	X
Análisis inmunológica	X						X	X	X	X
Análisis Funcional de respuesta inmune	X					X		X		X
LCR	X				X					X
ECG	X						X			X
RX Tórax	X						X			X
PFR	X						X			X
Criterios inclusión	X	X								
Criterios exclusión	X	X								
Obtención tejido adiposo	X									
Autotrasplante CeTMAd		X								
EA (Escala OMS)			X	X	X	X	X	X	X	X
PE	X							X		X
TOC	X							X		X
RM convencional	X							X		X
TM	X							X		X
ERM	X							X		X
BRB-N	X							X		X
WAIS-III	X							X		X
SF-36	X							X		X
MusiQoL	X							X		X
EQ-5D	X							X		X
Test de embarazo		X								

PFR: Espirometría básica con test de difusión. Criterios de inclusión: Addendum. Criterios de exclusión: Addendum. Obtención tejido adiposo: Técnica desarrollada en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) donde se han desarrollado las células troncales mesenquimales de tejido adiposo CeTMAd. EA: Efectos Adversos según la escala de la Organización Mundial de la Salud. LCR: Líquido Cefalorraquídeo. EDSS: Expanded Disability Status Scale. MSFC: Multiple Sclerosis Functional Composite. PE: Potenciales evocados (visuales, auditivos, somatosensitivos, motores, cognitivos). TOC: Tomografía Óptica de Coherencia. RM: Resonancia Magnética. TM: Transferencia de Magnetización. ERM: Espectroscopía por Resonancia Magnética. BRB-N: Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Test for MS. WAIS-III: Wechsler Adult Intelligence Scale. SF-36: MOS-SF-36. MusiQoL: Multiple Sclerosis Quality of Life Scale. EQ-5D: EuroQoL-5.

*El estudio finaliza a los 12 meses de seguimiento pero dado que estos pacientes se ven de forma rutinaria en consulta de los centros participantes en el estudio, se recopilarán datos a los 24 meses para obtener información adicional de seguridad y factibilidad a medio plazo con un protocolo predeterminado.

6.8 Métodos estadísticos

El análisis de los resultados se realizó según lo descrito en el *Plan de Análisis estadístico* Versión 1.0 del 5 de marzo de 2014 (Apéndice 16.1.9 del Informe clínico). Este plan de análisis estadístico diseñado, amplió el apartado de análisis estadístico del protocolo del ensayo clínico en cuanto a que define lo que se entiende por factibilidad del estudio, se especifican los análisis descriptivos y exploratorios de eficacia que se van a realizar en función del grupo de asignación del paciente y el análisis ANOVA sobre las medidas repetidas.

Se realizó un análisis descriptivo de la población por intención de tratar (que es la misma que la de seguridad) y de la población por protocolo de todas las variables demográficas, así como de los datos clínicos considerados como basales y previos al tratamiento. Se presentaron estratificados en base a las siguientes consideraciones:

- Comparación de los 3 grupos de tratamiento:** CeTMAd (dosis de 1×10^6 células/kg de paciente) vs CeTMAd (dosis de 4×10^6 células/kg de paciente) vs placebo.
- Grupo Exp1 vs placebo:** CeTMAd (dosis de 1×10^6 células/kg de paciente) vs placebo
- Grupo Exp2 vs placebo:** CeTMAd (dosis de 4×10^6 células/kg de paciente) vs placebo
- Experimental vs placebo:** CeTMAd vs placebo.

Las variables cualitativas se expresaron mediante frecuencias absolutas y porcentajes, mientras que las variables cuantitativas se presentaron a través de la media, mediana, desviación típica, intervalo de confianza, máximo, mínimo y número de observaciones.

6.8.1 Descripción de las poblaciones de análisis:

Se definieron tres poblaciones para este estudio:

Población de Seguridad: se incluyeron todos los pacientes que habían sido tratados (terapia celular o placebo).

Población por Intención de tratar: se incluyeron a todos los pacientes aleatorizados, cumplieran o no los criterios de selección, que fueron tratados (terapia celular o placebo).

Población por Protocolo: formada por aquellos pacientes que, estando incluidos en el ensayo clínico, habían sido tratados (terapia celular o placebo), cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión y se disponía

de la **evaluación de la RMN** tanto en el día 0 como al menos a los 6/12 meses de seguimiento, sin haber presentado criterios de retirada del ensayo ni haberse producido ninguna desviación mayor durante el ensayo.

6.8.2 Análisis descriptivo:

El análisis descriptivo se realizó en función del tipo de variables:

Variables cualitativas: se describieron mediante tablas de frecuencias (frecuencia, porcentaje, porcentaje válido y porcentaje acumulado).

Variables cuantitativas: se describieron mediante tablas donde se recogieron la media, mediana, máximo, mínimo, intervalo de confianza y desviación estándar de las variables y su representación mediante box-plot.

Y en base a una clasificación inicial:

Grupo experimental 1 [Dosis de 1×10^6 células/kg de paciente]

Grupo experimental 2 [Dosis de 4×10^6 células/kg de paciente]

Grupo placebo

6.8.3 Análisis de factibilidad o indicios de eficacia:

A efectos del análisis se equiparó el concepto de factibilidad al de indicios de eficacia. Se incluyeron en el análisis a todos los pacientes aleatorizados, cumplieran o no los criterios de selección, que habían sido tratados (terapia celular o placebo) y de los que se disponía de la evaluación de RMN del día 0 y al menos una posterior de seguimiento.

Las variables principales de indicios de eficacia se han analizado de la siguiente manera:

Variables clínicas:

La evaluación del **nº de brotes**, a través de los parámetros cuantitativos obtenidos.

La evaluación de la **Progresión**. Esta variable iba a ser cuantificada inicialmente mediante dos escalas, EDSS y MSCF para valorar la discapacidad en la esclerosis múltiple. MSCF está compuesta por 3 pruebas: prueba 7,5 metros, prueba de los 9 palitos y PASAT. Sin embargo, dificultades para la realización de la escala MSCF completa, dado el estado evolutivo de los pacientes, llevó a decidir a los investigadores la evaluación exclusivamente mediante la escala PASAT, representativa también del estado cognitivo. Se presentó de manera descriptiva con un intervalo de confianza del 95%.

Variables paraclínicas:

- **Resonancia magnética.** El análisis de las imágenes se ha realizado de forma centralizada en el Hospital Regional Carlos Haya de Málaga por un técnico especialista formado para tal efecto. Se pretende cuantificar el nº y volumen total de las lesiones detectadas.
- **Potenciales evocados:** Para cada modalidad se generó una variable cuantitativa ordinal generada con la suma de ambos lados para los PEV y los PEAT (0-6), y para cada lado para los PES y PEM (0-12). La escala general "EPAS Total" combinada va de 0 a 36, donde los valores más elevados representan mayor afectación de los potenciales evocados.
- **Tomografía óptica de coherencia:** el cálculo de la media para ambos ojos del parámetro "Grosor Capa Fibras Nerviosas de la Retina" (CFNR).
- **Pruebas neuropsicológicas: Batería BRB y escala de inteligencia de Wechsler para adultos.**
- **Escalas de calidad de vida:** como medida de calidad de vida se han usado 3 cuestionarios de calidad de vida: escalas SF-36, Euroqol-5D, MusiQol.

6.8.4 Imputación de los valores missing:

Se contempló en el PAE la imputación de los valores missing para cada una de las variables en el análisis por intención de tratar. Se siguió de manera general la siguiente regla de imputación: arrastrar el último valor disponible. En el caso de la exploración neuropsicológica, un valor no ausente en cada uno de sus parámetros debe tomarse como "0".

6.8.5 Análisis de Seguridad:

Se realizó para la población de seguridad. Se calculó el número y porcentaje de pacientes que abandonaron el estudio debido a acontecimientos adversos, de pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso, los acontecimientos adversos más frecuentes y de pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso grave. Se calculó además el intervalo de confianza del 95%.

6.8.6 Codificaciones:

Acontecimientos Adversos Graves y No Graves: Diccionario MedDRA versión 16.1 con niveles SOC y PT (IATA).

Medicación Concomitante: Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Clasificación System (IATA).

6.6.8 Paquete estadístico:

Para el análisis de datos se usó el paquete estadístico SPSS versión 18.0.

6.6.9 Determinación del tamaño de la muestra:

No se ha efectuado cálculo del tamaño del muestral. Al tratarse de un ensayo Fase I/II, y dado que no existen estudios previos que determinen la seguridad y la factibilidad del tratamiento de la EM con células troncales autólogas obtenidas de tejido adiposo y tratarse por tanto de un **estudio exploratorio**, se ha incluido un número bajo de pacientes, de acuerdo con la disponibilidad de producción de células troncales, pero suficiente para obtener datos orientativos de dosis-efecto que permitan el cálculo de tamaño muestral para un futuro estudio de eficacia si los resultados del presente estudio lo permiten.

7. POBLACIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO

La población estaba constituida por pacientes con EM secundariamente progresiva y fracaso terapéutico, de ambos sexos y con una edad igual o superior a 18 años, y que cumplieran los criterios de selección que se detallarán más adelante. Se incluyeron (firmaron el consentimiento), 34 pacientes en los 2 centros participantes hasta alcanzar un número total de 30 evaluables según la definición de la población por intención de tratar.

Las variables edad, sexo, media de tiempo de evolución de la enfermedad medido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la fecha del consentimiento informado no mostraron diferencias significativas entre los grupos. En relación a la variable sexo, la población en estudio estuvo representada por un mayor número de mujeres, acorde con la diferente incidencia de la enfermedad por sexo recogida en la literatura (Apéndice 16.2.4a del informe clínico). El 70% de la población eran mujeres, con un rango de edad entre 29 y 61 años.

Cuatro de los 34 pacientes que firmaron el consentimiento fueron retirados prematuramente del ensayo por presentar un cariotipo anómalo en el tejido adiposo extraído previo a la infusión, lo que desaconsejaba el procesamiento del tejido adiposo para la infusión del medicamento.

B. DISPOSICIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO

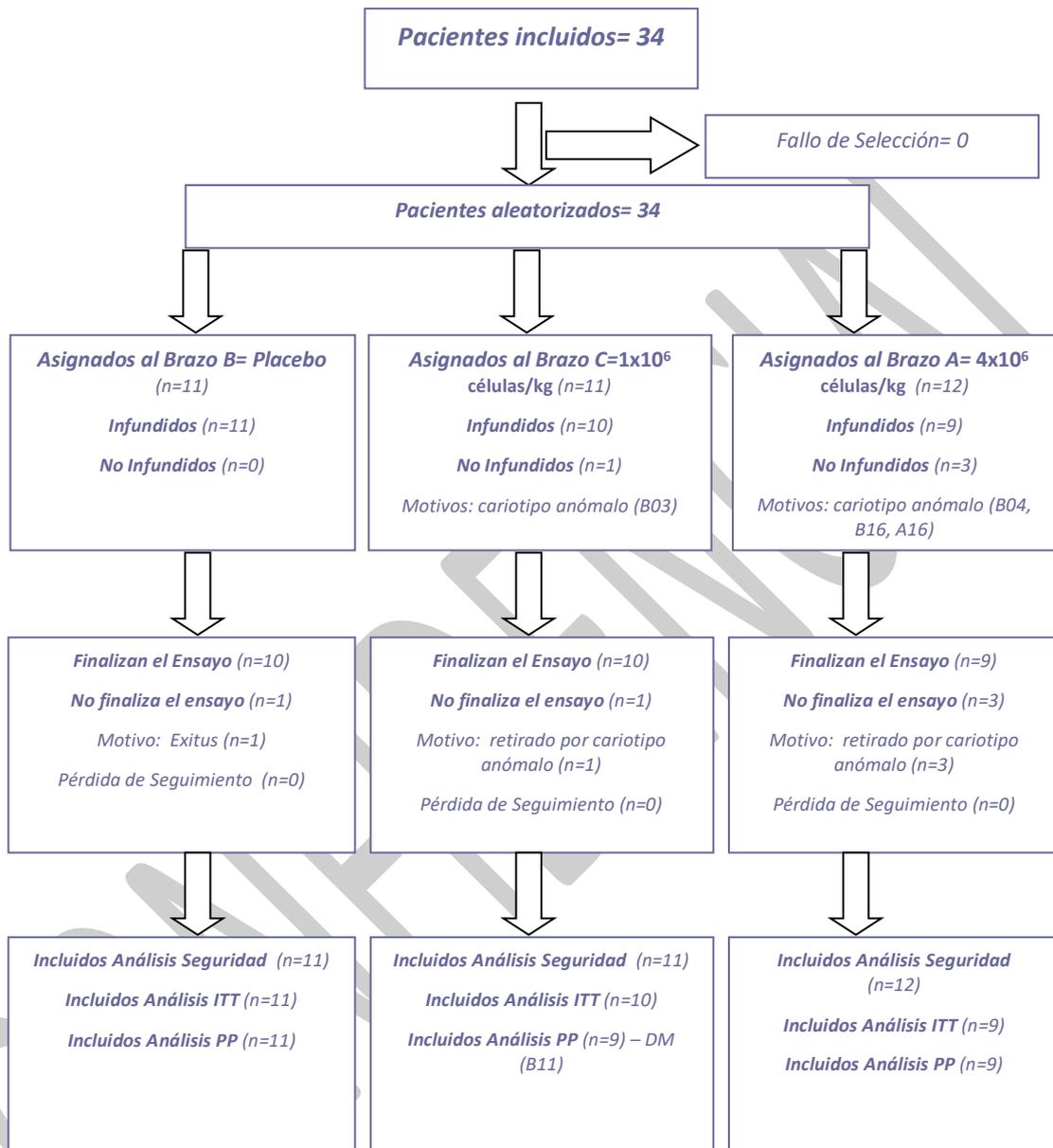


Figura 1. Disposición de sujetos de estudio

1. SELECCIÓN

Los pacientes fueron seleccionados en las consultas de neurologías de los 2 hospitales participantes y tras la firma del consentimiento informado (Apéndice 16.1.3 del Informe Clínico), se sometieron a las pruebas necesarias para confirmar el cumplimiento de los criterios de selección.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes de ambos sexos de edad ≥ 18 años.
2. Pacientes diagnosticados de Esclerosis Múltiple (EM) clínicamente definida (criterios de Poser y McDonald)
3. Pacientes con EM secundariamente progresiva, con EDSS $\geq 5,5$ y ≤ 9
4. Pacientes con fracaso terapéutico definido por: no respondedor a las terapias empleadas (inmunomoduladores-inmunosupresores) y que presenten actividad en forma de 1 brote en el último año o progresión de 0,5 puntos en la escala EDSS
5. Pacientes que no hayan presentado brotes en el mes previo a la inclusión, ni recibido tratamiento esteroideo en el mes previo a la inclusión.
6. Pacientes que otorguen su consentimiento por escrito para la participación en el estudio.

Criterios de exclusión:

1. Existencia de procesos intercurrentes que puedan previsiblemente alterar las medidas de las variables previstas: Patología hepática, renal, cardíaca, etc, y patología psiquiátrica u ocular (glaucoma-se realizará medición de presión intraocular previa a la realización de la TCO, cataratas).
2. Portador de marcapasos o implantes metálicos (p.ej. prótesis) que impida realización de RM.
3. Negativa a firmar el consentimiento informado por escrito.
4. Imposibilidad prevista para obtener una biopsia de al menos 30 g de tejido adiposo limpio.
5. Infección por VIH, Hepatitis B o Hepatitis C.
6. Haber padecido o sufrir actualmente una neoplasia maligna.
7. Haber estado en tratamiento con cualquier fármaco en investigación o haberse sometido a cualquier procedimiento experimental en los 3 meses previos al inicio del estudio.
8. Índice de masa corporal > 40 Kg/m².
9. Paciente que hayan sido tratados con medicación concomitante prohibida durante el mes anterior a la inclusión en el estudio.
10. Embarazo o lactancia
11. Paciente que haya participado en los últimos 3 meses en otro ensayo clínico.

Criterios de retirada del tratamiento o de la evaluación:

Basándonos en las directrices del protocolo, los pacientes debían interrumpir el ensayo clínico si ocurría al menos una de las siguientes situaciones:

- Obtener una cantidad insuficiente (<30 g) de tejido adiposo.
- En caso de no alcanzar la concentración final óptima de la suspensión celular el investigador decidiría sobre su administración, aunque el paciente quedaría excluido del análisis de factibilidad/seguridad, previa puesta en conocimiento del paciente y autorización del mismo para dicho procedimiento.
- Presencia de acontecimiento adverso grave anterior a la infusión de las células mesenquimales.
- Condiciones clínicas del paciente que impidan su continuidad.
- Toxicidad grado IV en la escala de efectos adversos de la OMS.

- Cualquier criterio del Comité de Seguridad que indique la finalización del estudio por motivos de seguridad.

Además, los sujetos podían ser retirados del estudio por las siguientes razones:

- Cuando el paciente no coopere o no cumpla los requerimientos del estudio.
- Cuando el investigador considere que la salud del paciente está comprometida debido a reacciones adversas, enfermedades concomitantes o cualquier otra circunstancia que se presente durante el estudio.
- Acontecimiento(s) adverso(s).
- Valor(es) anómalo(s) de laboratorio.
- Resultado(s) anómalo(s) de los procedimientos de las pruebas.
- Violación del protocolo.
- Retirada del consentimiento por parte del paciente.
- Pérdida de seguimiento del paciente.

Según la buena práctica clínica, a todos los pacientes que hubiesen abandonado prematuramente el estudio se les debía recomendar un tratamiento alternativo. Si la retirada era debida a un acontecimiento adverso significativo, además, los pacientes debían ser controlados por el investigador hasta la finalización adecuada, es decir, hasta que desapareciese el acontecimiento adverso o hasta que se determine que es permanente.

Adicionalmente, y siguiendo las recomendaciones de las guidelines de cultivo de terapia celular de la EMA, a todas las muestras que son procesadas en sala GMP de CABIMER para fabricar el medicamento del ensayo clínico se les ha realizado una prueba de cariotipado para confirmar, antes de la liberación del medicamento, de la presencia o no de alguna anomalía.

Los resultados de las pruebas de cariotipado fueron normales a excepción de las de los siguientes pacientes, lo que supuso su **retirada del ensayo** previo a la infusión de terapia celular: **Muestra EC02 A16, Muestra EC02 B03, Muestra EC02 B04, Muestra EC02 B16.**

2. Aleatorización

Los pacientes que cumplían los criterios de elegibilidad y habían manifestado su conformidad con la participación en el ensayo mediante la firma del consentimiento informado, fueron aleatorizados bien al grupo placebo o bien a cualquiera de los dos grupos experimentales en los que la dosis de CeTMAd a administrar fue de 1×10^6 células/kg de paciente y 4×10^6 células/kg de paciente:

- 1) Brazo 1 - Grupo Control: pacientes que han recibido como medicación de estudio sustancia placebo en las mismas condiciones que los grupos experimentales.
- 2) Brazo 2 - Grupo Experimental 1: pacientes que han recibido como medicación de estudio una suspensión de células troncales mesenquimales (en la solución descrita para el grupo control) en una única dosis de 1×10^6 células/kg
- 3) Brazo 3 - Grupo Experimental 2: pacientes que han recibido como medicación de estudio una suspensión de células troncales mesenquimales (en la solución descrita para el grupo control) en una única dosis de 4×10^6 células/kg

La aleatorización se ha diseñado en bloques de tres, atendiendo a los brazos del estudio. Los tratamientos del estudio se han asignado usando una aleatorización central equilibrada, secuencial, con un factor de estratificación: centro. Para alcanzar un equilibrio aproximado de tratamiento dentro de cada estrato se ha usado una pauta de aleatorización en bloques de 3 pacientes con asignación 2:1.

La población a estudiar estuvo constituida por un total de 34 pacientes diagnosticados de EM secundaria progresiva que estaban en situación de fracaso terapéutico, aunque, como se ha mencionado, 4 de ellos fueron retirados prematuramente del ensayo por presentar un cariotipo anómalo en el tejido adiposo extraído. En el grupo experimental se preveía incluir un total de 20 pacientes divididos en 2 niveles de dosis, es decir 10 pacientes en el grupo de dosis baja, y 10 en el de dosis altas y otros 10 restantes irán al grupo control. Finalmente, los grupos han quedado distribuidos de la siguiente forma: 10 en el grupo de 1×10^6 células/kg, 9 en el grupo de 4×10^6 células/kg, y 11 pacientes en el grupo control (Figuras 2 y 3). La figura 4 recoge la distribución de la población de estudio por centros.

La descripción del método de asignación de pacientes se recoge en el **Apéndice 16.1.7 del Informe clínico.**

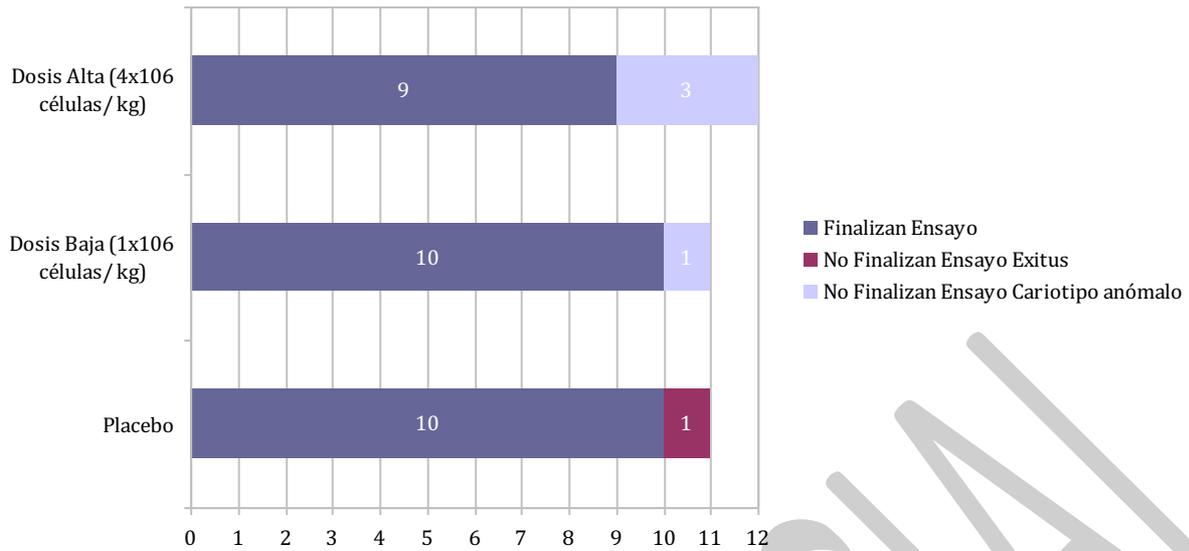


Figura 2. Resultado de la distribución aleatoria de la población de estudio

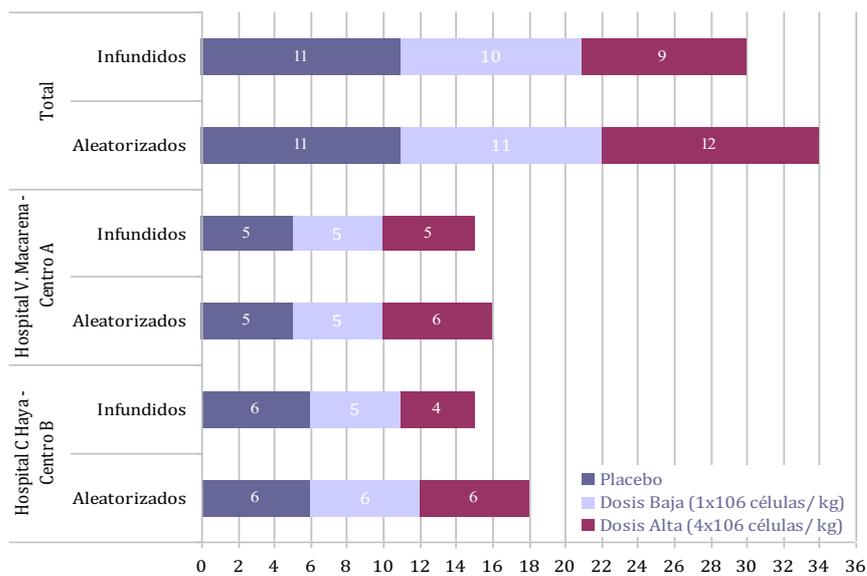


Figura 3. Resultado de la distribución aleatoria de la población de estudio por centros

3. Enmascaramiento

A cada paciente que se ha incluido en el estudio le correspondió un número de paciente y según el listado de aleatorización fue asignado a grupo control o a uno de los dos grupos experimentales del estudio. Se trata de un estudio triple ciego, con respecto al tratamiento administrado a los pacientes; donde ni el paciente ni los investigadores conocen si el paciente recibe placebo o tratamiento, ni la dosis administrada. El responsable de analizar los datos estadísticos también desconocía la dosis de cada resultado.

Se han seguido los siguientes métodos para mantener el enmascaramiento tanto para pacientes, investigadores y para las personas encargadas del análisis estadístico de resultados:

- 1) Se ha realizado extracción de tejido adiposo tanto al grupo control como a los grupos experimentales.
- 2) Se ha llevado a cabo una codificación oculta de células autólogas trasplantadas o placebo tanto para investigadores como para pacientes y personas encargadas del análisis estadístico de resultados.
- 3) La aleatorización de los pacientes se realizó de forma centralizada en el CABIMER. La asignación de cada paciente a cada brazo del estudio se ha guardado en un sobre perfectamente cerrado e identificado para cada paciente en donde se ha incluido, aparte de la codificación, las instrucciones con el procedimiento a seguir en el caso de que hubiera sido necesario desvelar el ciego. Estos sobres se han adjuntado con la medicación del estudio y se han guardado en el archivo del investigador en el apartado correspondiente a medicación del estudio.
- 4) Ninguno de los responsables del ensayo ha tenido acceso a la lista de códigos de tratamientos asignados a los pacientes, excepto las personas autorizadas, que han sido responsables de supervisar todos los aspectos de seguridad del estudio.
- 6) El envasado de los medicamentos para su envío y administración fue realizado en jeringas opacas para evitar la identificación del contenido.

Durante el desarrollo del ensayo no se produjo ninguna circunstancia que obligara a la ruptura del enmascaramiento, siendo realizado únicamente tras la finalización del análisis estadístico.

C. CARACTERÍSTICAS BASALES

El número de pacientes incluidos en este análisis, según la definición de población por intención de tratar, fue de 30. Once (11) pacientes fueron asignados al grupo control, 10 al grupo de dosis más baja (1×10^6 células/ kg peso paciente) y 9 a la dosis más alta (4×10^6 células/ kg peso paciente).

Además del análisis descriptivo de cada uno de los parámetros que describían la muestra, se realizó una valoración entre grupos. Los grupos fueron homogéneos respecto a las variables: edad, media de tiempo de evolución de la enfermedad medido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la fecha del consentimiento informado, medidas basales de las constantes vitales, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y tensión arterial, no observándose diferencias significativas entre los grupos en ninguna de estas variables (Tabla 2) (Apéndice 16.2.4a del Informe clínico).

En relación a la variable sexo, la población en estudio estuvo representada por un mayor número de mujeres, acorde con la diferente incidencia de la enfermedad por sexo recogida en la literatura (Apéndice 16.2.4a del Informe clínico). El 70% de la población eran mujeres, con un rango de edad entre 29 y 61 años (Figura 4).

Igualmente se ha analizado en tiempo basal la homogeneidad de las poblaciones respecto a cada uno de los parámetros del estudio inmunológicos estudiados: subpoblaciones celulares (linfocitos T CD4+ y CD8+), citocinas de perfil proinflamatorio (TNF α y IFN γ) y antiinflamatorio (TGF- β), citocinas críticas en enfermedades autoinmunes (IL-6 e IL23), así mismo, se procede al análisis funcional de la respuesta inmune en PBMC y la actividad funcional de células CD4+CD25+CD27 o Actividad CD4+CD25+FoxP3, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Otras mediciones basales, como las de espirometría básica, Tomografía de Coherencia Óptica, y los diferentes parámetros de potenciales evocados visuales, acústicos, somosensitivos del nervio medio, tibial y potenciales evocados de miembros superiores e inferiores y cognitivos, o los sistemas funcionales valorados según la escala EDSS, no mostraron diferencias significativas entre los grupos en los valores medios de la puntuación en el momento de la inclusión, ni cuando se midieron los 7 sistemas funcionales individuales; función visual (en su versión convertida), piramidal, cerebelosa, tronco cerebral, sensitiva, intestinal/vesical (convertida) y cerebral/cognitiva.

Por el contrario, en los parámetros basales analizados en el LCR, se observaron diferencias significativas entre los grupos, tanto para índice IgG (Tibblig-Link), como para la secreción intratecal IgG expresada en %, por lo que los cambios posteriores sobre estos parámetros deberán ser analizados teniendo en cuenta este hecho.

A todos los pacientes incluidos en el ensayo se les entregó el Cuestionario de Calidad de Vida para valorar su situación basal antes de ser infundidos. De los 36 ítems del cuestionario se obtenían dos puntuaciones globales, “Componente físico” y “Componente Mental”, sin estar diseñado para la obtención de un índice global. Se observó una diferencia significativa basal en las respuestas al Cuestionario de Calidad de Vida SF36, en la media obtenida sobre el componente físico, siendo mayor en el grupo placebo, aunque con un valor de p de 0,042, por lo que no debería ser considerado concluyente. Sin embargo, en relación al componente mental del SF36, al Cuestionario EQ-5D, o el Cuestionario MusiQoL, así como a la exploración neuropsicológica o los resultados de la RMN, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

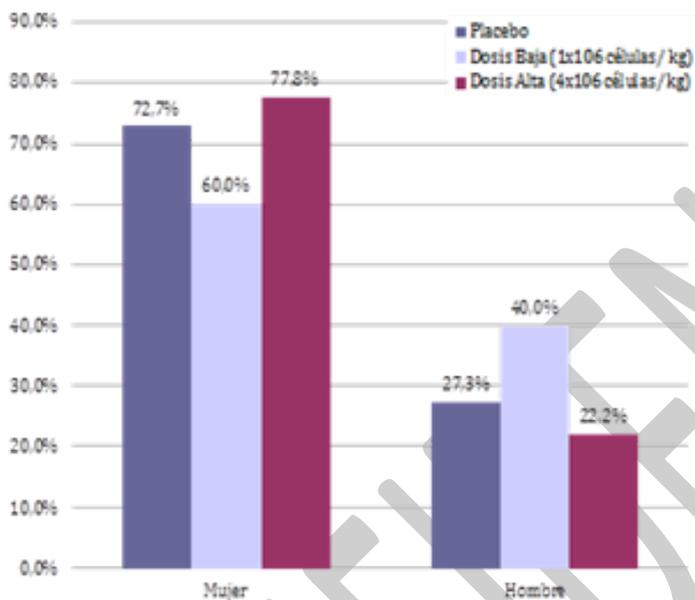


Figura 4. Distribución de la población por sexos

La media de edad de los pacientes asignados al grupo placebo era de 46,3 años (SD=8,9, IC 95% 40,4-52,3), de 44,8 años (SD=8,0, IC 95% 39,1-50,5) en el de dosis más baja y de 47,8 años (SD=9,7, IC 95% 40,3-55,2) en el grupo de dosis más alta de terapia celular, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la variable edad entre los 3 grupos de tratamiento (p=0,771).

Tabla 2. Datos demográficos y signos vitales

Variable	Grupo	N	Media	IC95. min	IC95. max	DT	Min	Max	p. valor
Edad (años)	Placebo	11	46,3	40,4	52,3	8,9	31,4	62,0	0,771
	Dosis baja	10	44,8	39,1	50,5	8,0	31,4	57,5	
	Dosis alta	9	47,8	40,3	55,2	9,7	28,9	61,4	
Tiempo de evolución (años)	Placebo	11	18,9	14,0	23,8	7,3	8,0	30,0	0,502
	Dosis baja	10	15,4	11,0	19,8	6,1	8,0	25,0	
	Dosis alta	9	18,7	12,0	25,3	8,7	8,0	38,0	
Peso (kg)	Placebo	11	63,9	58,3	69,5	8,3	50,0	75,0	0,318
	Dosis baja	10	69,3	61,8	76,8	10,5	56,0	86,0	
	Dosis alta	9	64,2	58,6	69,7	7,2	56,0	80,0	
Altura (cms)	Placebo	11	164,4	160,2	168,5	6,2	150,0	173,0	0,916
	Dosis baja	10	165,7	158,9	172,5	9,5	155,0	175,0	
	Dosis alta	9	165,4	159,8	171,1	7,4	154,0	180,0	
Frecuencia Cardíaca (lpm)	Placebo	11	76,5	69,7	83,4	10,2	64,0	90,0	0,999
	Dosis baja	10	74,6	71,7	77,5	4,1	69,0	81,0	
	Dosis alta	9	75,9	68,8	83,0	9,3	63,0	90,0	
Frecuencia Respiratoria (rmp)	Placebo	11	17,9	16,6	19,2	2,0	15,0	20,0	0,893
	Dosis baja	10	18,0	16,7	19,3	1,8	15,0	20,0	
	Dosis alta	9	17,6	15,6	19,6	2,6	14,0	20,0	
PAS (mmHg)	Placebo	11	119,5	109,6	129,3	14,6	90,0	135,0	0,396
	Dosis baja	10	118,7	111,0	126,4	10,7	100,0	130,0	
	Dosis alta	9	125,6	119,1	132,1	8,5	110,0	135,0	
PAD (mmHg)	Placebo	11	69,3	62,4	76,2	10,3	60,0	85,0	0,562
	Dosis baja	10	73,1	68,2	78,0	6,8	65,0	85,0	
	Dosis alta	9	71,2	66,6	75,8	6,0	60,0	80,0	

Los antecedentes médicos no relacionados con la patología de estudio no mostraron características que pudieran interferir con las variables resultados que se analizaron en el ensayo (Apéndice 16.2.4b).

En cuanto a los aspectos específicos de la patología en estudio:

La historia médica previa de la Esclerosis Múltiple, la mayoría de los pacientes habían presentado 1 ó ninguna recidiva en los 2 años previos, sólo 2 pacientes (7%) habían sufrido más de 2, no teniendo este dato significación estadística.

El rango de duración de la enfermedad en el momento de su inclusión en el ensayo fue de 8 a 38 años. La media de tiempo de evolución de la enfermedad, medido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la fecha del consentimiento informado fue de 18,9 años (SD=7,3, IC95% 14,0-23,8) en el grupo placebo, frente a 15,4 años (SD=6,1, IC95% 11,0-19,8) a la dosis más baja y 18,7 años (SD=8,7, IC95%12-25,3) en la dosis más alta. Estas diferencias en el tiempo de evolución entre los 3 grupos no fueron estadísticamente significativas (p=0,502).

La presentación de los síntomas en el momento del diagnóstico fue mayoritariamente monofocal (83%, 25 de los 30 pacientes), siendo sólo en el 16,6% (5 casos) de instauración multifocal para la totalidad de la muestra, no existiendo diferencias estadísticamente entre los grupos (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3. Historia de Esclerosis Múltiple -Síntomas de comienzo

Variable	Grupo	N	%
Síntomas Comienzo EM (Monofocal/Multifocal)	Placebo	11 (10/1)	90,9/9,1
	Dosis baja	10 (7/3)	70,0/30,0
	Dosis alta	9 (8/1)	88,9/11,1

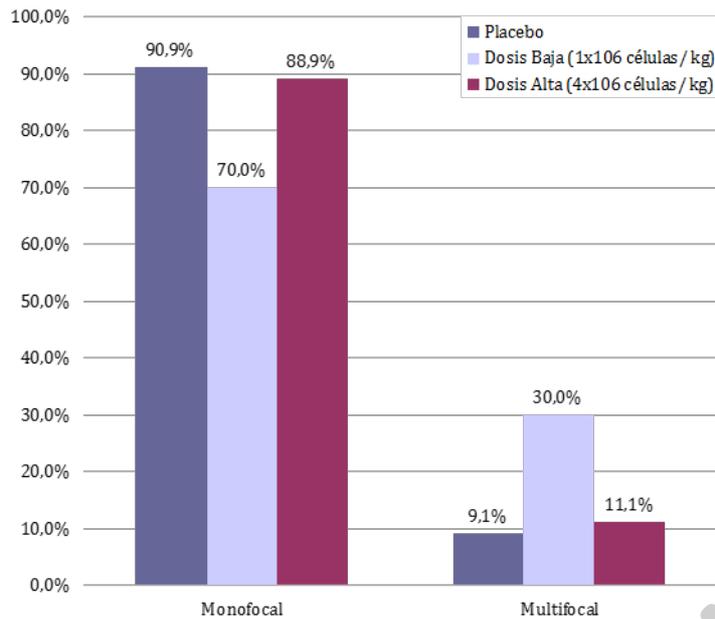


Figura 5. Síntomas de comienzo de la enfermedad en función a los grupos de tratamiento

En el grupo placebo y de dosis más alta, la presentación de los síntomas fue piramidal y sensitivo, mientras que en el grupo de dosis más baja fue mayoritariamente piramidal y visual.

Para un mayor nivel de detalle sobre esta descriptiva, ver el Apéndice 16.2.4 del informe clínico.

D. CRITERIOS DE VALORACIÓN.

Se trató de un ensayo fase I/II para valorar la seguridad y la factibilidad del uso de células mesenquimales troncales autólogas de tejido adiposo, en el que, por lo tanto, los criterios de valoración fundamentales fueron los destinados a detectar cualquier problema de seguridad que pudiera producirse. El término factibilidad se refiere en este ensayo a indicios de eficacia, es decir, la detección de alguna mejoría clínicamente relevante, en base a las variables clínicas (brotes y progresión medida con las escalas EDSS) y paraclínicas (resonancia magnética, potenciales evocados, estudio del LCR, tomografía óptica de coherencia, pruebas neuropsicológicas y escalas de calidad de vida) definidas en el protocolo.

El efecto de las dos dosis de tratamiento frente al placebo se analizó por t test para medidas pareadas, test no paramétricos y ANOVA para medidas repetidas para las variables clínicas y paraclínicas medidas en tiempo basal y a los 6 y 12 meses.

Evaluación de la seguridad

Criterio de Valoración nº 1: Seguridad durante el procedimiento

Se evaluaron las posibles complicaciones derivadas del procedimiento en las primeras 24 horas, y 8 días tras la administración del medicamento/placebo.

Criterio de Valoración nº 2: Seguridad durante el seguimiento

Con el fin de conocer la aparición de eventos tardíos que de forma definitiva o probable pudieran estar relacionados con la terapia celular/placebo, los pacientes fueron evaluados al 1, 2, 3, 6, 9 y 12 meses

Análisis

El Análisis de seguridad se realizó para la población por seguridad definida como:

Población de Seguridad: Incluye a todos los pacientes que recibieron tratamiento (terapia celular o placebo). Se han incluido en el análisis de seguridad **30 pacientes** (de los 34 que firmaron el consentimiento informado), excluyendo para este análisis a los pacientes B03, B04, B16 y A16, ya que se identificó un cariotipo anómalo en el análisis realizado al medicamento en preparación durante su fase de cultivo, siendo retirados del ensayo clínico previo a la infusión del tratamiento.

- Se calculó el número y porcentaje de pacientes que abandonaron el estudio debido a acontecimientos adversos, los pacientes que experimentaron al menos un acontecimiento adverso, los acontecimientos adversos más frecuentes y los pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso grave (AAG). Se calculó para un intervalo de confianza del 95%.
- Se ha estudiado si existen diferencias estadísticamente significativas en el número de AAG entre los casos y los controles y entre las distintas dosis de medicamento entre sí.
- Es importante destacar que no se han considerado como acontecimientos adversos empeoramientos en la sintomatología relacionada con la EM, salvo los eventos descritos como “brotos”.

Los resultados de seguridad se recogen en el Apartado E del presente informe.

Evaluación de la factibilidad e indicios de eficacia.

Se llevó a cabo un análisis por evaluación de medidas repetidas. Este tipo de evaluación de medidas repetidas nos va a permitir evaluar el patrón de cambio de los sujetos a través del tiempo en función de los tratamientos.

Estos aspectos fueron evaluados a través de variables clínicas, analíticas y paraclínicas según se detalla a continuación.

Un resumen de los datos basales y de los resultados tras 12 meses de seguimiento se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Cambios en las variables de eficacia a los 12 meses del tratamiento

		Placebo				Low dose				High dose				p.F	p.kw
		Baseline	Final	Outcome (12 months)	p.within	Baseline	Final	Outcome (12 months)	p.within	Baseline	Final	Outcome (12 months)	p.within		
EDSS	EDSS	7.64±0.31	7.55±0.35	-0.09±0.17	0.606	7.50±0.24	7.75±0.24	0.25±0.09	0.019*	7.78±0.16	8.06±0.41	0.28±0.52	0.610	0.577	0.209
MRI	MRI T1 number of lesions	62.18±7.18	63.78±8.44	1.22±0.68	0.110	46.40±9.45	46.60±9.46	0.20±0.81	0.811	40.56±6.70	39.89±6.74	-0.67±0.71	0.373	0.195	0.104
	MRI T1 area (cm ²)	197.17±71.85	97.61±18.16	0.34±1.08	0.763	111.51±35.26	119.25±34.89	7.74±5.17	0.169	94.78±34.99	93.85±33.76	-0.93±1.43	0.535	0.144	0.333
	MRI T1GAD number of lesions	0.82±0.37	1.40±0.63	0.50±0.63	0.450	0.70±0.52	0.60±0.42	-0.10±0.25	0.694	2.00±1.09	1.25±0.87	-0.75±0.72	0.333	0.269	0.623
	MRI T1GAD area (cm ²)	0.01±0.00	0.01±0.01	0.00±0.01	0.488	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.02	0.551	0.02±0.01	0.01±0.01	-0.01±0.01	0.299	0.479	0.918
	MRI T2 number of lesions	159.00±24.79	166.90±26.40	-1.30±2.79	0.653	152.40±16.62	154.90±15.37	2.50±2.67	0.373	140.75±13.34	143.25±13.27	2.50±1.82	0.212	0.441	0.635
	MRI T2 area (cm ²)	440.71±130.06	387.90±129.33	16.42±9.72	0.125	298.95±67.02	307.61±69.24	8.66±5.16	0.128	296.70±57.61	320.48±61.56	23.78±19.49	0.257	0.665	0.784
	MRI normalized cerebral volume (cm ³)	1420.59±24.17	1439.96±17.90	-5.10±7.09	0.492	1483.74±26.73	1460.21±34.06	-23.53±11.79	0.077	1449.17±32.65	1437.78±30.59	-11.40±19.77	0.582	0.558	0.235
	MRI non normalized cerebral volume (cm ³)	1062.93±37.94	1090.30±35.63	-11.84±7.28	0.142	1112.66±28.93	1082.87±34.89	-29.79±11.92	0.034*	1036.82±58.53	1042.54±55.95	5.73±24.10	0.819	0.231	0.276
	MTR	MTR	18.10±0.51	16.47±0.51	-1.21±0.62	0.082	18.30±0.49	16.29±0.41	-2.00±0.62	0.010*	19.06±0.78	17.04±0.34	-2.02±0.86	0.050	0.599
Evoked potentials	VEP p100 Latency (ms)	134.45±11.91	143.72±6.70	18.00±15.21	0.271	164.82±12.11	164.23±9.64	-0.58±13.63	0.967	156.49±9.63	136.51±13.98	-13.48±14.77	0.397	0.310	0.163
	VEP amplitude (µV)	4.02±0.88	4.04±0.74	-0.71±0.71	0.350	3.26±0.78	2.82±1.02	-0.44±0.74	0.567	4.31±1.30	2.91±0.87	-2.41±0.78	0.021*	0.147	0.211
	BAEP I-V Interval (ms)	3.86±0.12	3.97±0.17	0.03±0.17	0.849	4.46±0.19	4.22±0.16	-0.24±0.25	0.363	4.26±0.15	4.16±0.11	0.04±0.15	0.785	0.505	0.871
	BAEP V/I amplitude	37.62±14.54	27.58±16.19	3.26±11.26	0.779	38.36±16.82	32.67±15.38	-5.69±17.83	0.757	25.50±12.49	10.51±10.63	-16.06±15.70	0.353	0.694	0.664
	Median nerve SEP (N13-N20) (ms)	12.82±1.14	12.42±0.97	-0.76±1.21	0.544	24.71±10.50	14.23±0.68	-10.49±10.64	0.350	17.57±5.85	11.35±1.65	-6.76±6.88	0.363	0.599	0.897
	Tibial nerve SEP (N22-P39) (ms)	43.62±2.64	34.84±1.57	-8.42±2.56	0.009*	44.38±1.61	35.61±2.09	-8.76±2.88	0.014*	45.74±1.60	34.06±1.95	-11.24±2.41	0.003*	0.732	0.602
	MEP superior CCT (ms)	48.25±11.26	26.19±5.35	-20.11±10.02	0.076	44.48±12.70	28.33±6.08	-16.15±10.55	0.160	51.76±15.61	22.32±4.17	-30.90±16.72	0.114	0.670	0.736
	MEP inferior CCT (ms)	72.70±5.73	43.11±2.28	-28.68±6.96	0.003*	75.92±6.30	40.74±3.58	-35.18±4.82	<0.001*	75.07±7.25	45.48±1.21	-27.64±9.76	0.030*	0.675	0.901
	P300 Latency (ms)	380.14±32.04	404.40±30.35	42.24±46.39	0.404	332.20±21.48	369.18±27.13	22.13±11.44	0.125	373.92±21.61	374.65±23.10	-4.22±12.93	0.765	0.595	0.256
EPAS	EPAS	24.27±1.36	24.30±1.10	-0.10±1.57	0.951	23.70±1.99	25.60±1.37	1.90±1.07	0.110	22.78±1.32	23.43±1.22	1.43±1.00	0.201	0.467	0.457
OCT	Optic coherence tomography RNFL (µm)	70.95±6.11	74.50±3.40	-1.06±2.97	0.731	72.00±5.23	70.19±5.27	-1.94±3.56	0.603	67.56±5.27	70.64±3.05	-1.79±2.19	0.447	0.972	0.739
Cognition and QoL	PASAT	36.50±8.09	40.67±6.57	4.17±1.86	0.076	30.17±4.37	29.20±4.22	-2.60±2.41	0.342	31.00±7.10	32.75±11.86	0.25±3.24	0.943	0.102	0.110
	QoL (EQ5D)	45.91±8.27	47.22±6.44	-4.44±7.78	0.583	47.03±9.25	44.50±6.96	-2.53±6.95	0.724	50.00±7.76	45.62±6.96	1.88±6.62	0.785	0.810	0.737

Criterio de Valoración nº 3: Número de brotes

Definidos como la aparición de síntomas neurológicos nuevos o el empeoramiento de alguno/s previo/s, que aparece al menos 30 días después del inicio del brote previo, que persiste al menos 24 horas, y que se acompaña de cambios objetivos en la exploración neurológica (definidos de acuerdo con McDonald).

Análisis

Únicamente se registraron dos brotes de la enfermedad, 1 en el grupo de dosis más baja y 1 en el grupo de dosis más alta y ninguno entre los pacientes asignados al grupo control.

Criterio de Valoración nº 4: Progresión

La progresión se cuantificó a través de la escala ampliada de Kurtzke (EDSS), que mide la afectación de 7 sistemas funcionales empleando como medida de progresión los cambios en la "Puntuación escala EDSS total".

Inicialmente, el protocolo describía que la evaluación de la Progresión iba a ser cuantificada mediante dos escalas, EDSS y MSCF. MSCF está compuesta por 3 pruebas: prueba 7,5 metros, prueba de los 9 palitos y PASAT. Sin embargo, dificultades para la realización de la escala MSCF completa, dado el estado evolutivo de los pacientes, llevó a decidir a los investigadores la evaluación exclusivamente mediante la escala PASAT, representativa también del estado cognitivo. Se presentó de manera descriptiva con un intervalo de confianza del 95%.

Análisis

Los pacientes fueron incluidos en el ensayo si el resultado de su valoración clínica, a través de la escala EDSS tenía una puntuación basal entre 5,5 y 9 en el momento de la firma del consentimiento informado, como una medida del grado de afectación de la enfermedad en el momento basal.

A lo largo del seguimiento no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros de EDSS, fuese cual fuese el grupo que analizamos ($p > 0,05$) (Tablas 4 y 5, y Fig. 6).

Tabla 5. Puntuación escala EDSS total

Puntuación escala EDSS total

Group	Basal	+ 30 días	6 meses	12 meses				
Dosis alta	7.78±0.27	7.61±0.27	7.72±0.27	8.06±0.27	0.401	Time	0.168	0.183
Placebo	7.55±0.24	7.55±0.24	7.59±0.24	7.55±0.24	0.992	grupo:Tim	0.726	---
Dosis baja	7.50±0.26	7.45±0.26	7.55±0.26	7.75±0.26	0.783			
p.group	1.000	1.000	1.000	1.000				

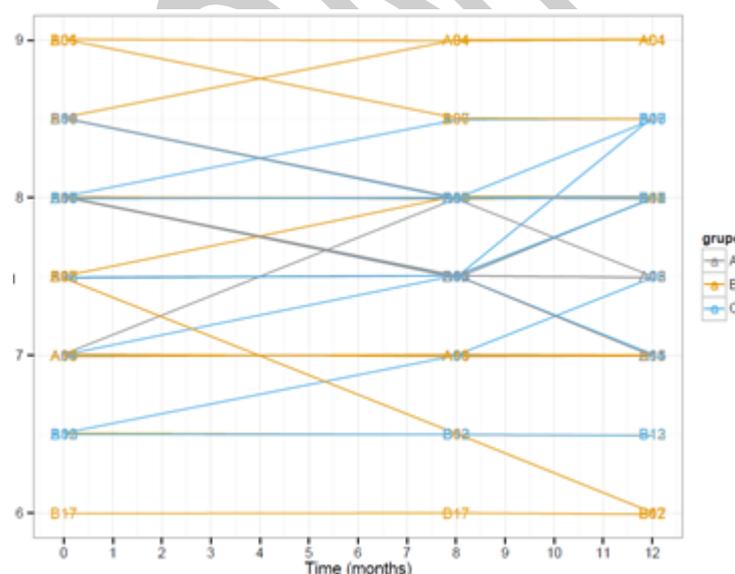


Figura 6. Puntuación escala EDSS total

Criterio de Valoración nº 5: Cambios en la Resonancia Magnética

A través de la RMN, se pretendió cuantificar el nº y volumen total de las lesiones detectadas:

- Nº/volumen lesiones en T2
- Nº/volumen lesiones en T1 (agujeros negros)
- Nº/volumen lesiones en T1 con Gadolinio (lesiones activas)
- Volumen cerebral
- Transferencia de magnetización, variable cuantitativa

Como se ha mencionado, en el análisis de los parámetros basales de RMN, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre sus medias.

Cuando analizamos el número de lesiones activas, las lesiones en T1 captadoras de Gadolinio, vemos que el valor medio fue más alto en el grupo de dosis alta (2.00 ± 1.09), comparado con los otros grupos ($0,82 \pm 1,17$ en el grupo placebo y $0,70 \pm 1,57$ en el de dosis baja). En términos de volumen expresado en mm³ de las lesiones en T1 con Gadolinio (lesiones activas) ocurre algo similar, ya que en el grupo placebo el valor fue menor: 63,34 (SD=103,4; IC95% -6,3-132,82) frente a la media en el grupo de intervención de mayor dosis, 510,36 (SD=1008,76; IC95% -265,04-1285,76).

Sin embargo, las diferencias observadas entre los grupos se debieron a la gran dispersión entre los valores de los pacientes en el grupo de dosis alta, en el que uno de ellos presentó 16 lesiones activas, frente a 5 y 3 como valor máximo en los otros dos grupos, por lo que estas diferencias no tuvieron significación estadística una vez excluido este paciente del análisis.

A lo largo del seguimiento, no se observaron cambios significativos en el seguimiento, aunque un paciente tenía en la basal 16 lesiones activas.

Por lo tanto, globalmente, no es posible concluir que haya una reducción del número o volumen de las lesiones activas, captadoras de Gadolinio a lo largo del seguimiento en ninguno de los grupos, ni que existan diferencias entre los 3 grupos analizados.

Se observó una disminución en el volumen cerebral no normalizado y en la variable transferencia de magnetización, en el grupo de dosis baja, siendo esta diferencia significativa entre el valor basal y a los 12 meses en el t-test pareado. Sin embargo, cuando se compararon los 3 grupos entre ellos, las diferencias no fueron significativas.

Criterio de Valoración nº 6: Variables neurofisiológicas.

Cambios en los Potenciales Evocados

Se trata de una escala global paramétrica de puntuación, generada de la combinación de varios potenciales evocados: EPAS (del inglés "Evoked Potentials Abnormality Store"): para cada modalidad se generó una variable cuantitativa ordinal (0 = normal, 1 = latencia incrementada, 2 = latencia incrementada con cambios morfológicos/disminución de amplitud, 3 = ausencia de algún componente principal del potencial evocado) generada con la suma de ambos lados para los PEV y los PEAT (0-6), y para cada lado para los PES y PEM (0-12). La escala general combinada va de 0 a 36, donde los valores más elevados representan mayor afectación de los potenciales evocados.

- Potenciales evocados visuales (PEV): latencia P100: variable cuantitativa (ms); amplitud N75-P100: Variable cuantitativa (μ V)
- Potenciales evocados acústicos (PEAT): intervalo I-V: variable cuantitativa (ms); amplitud I/V variable cuantitativa (μ V).
- Potenciales evocados somatosensitivos (PESS) n. mediano: latencia N20: variable cuantitativa (ms); amplitud p14-N20 variable cuantitativa (μ V); tiempo de conducción central N13-N20, variable cuantitativa (ms).
- Potenciales evocados somatosensitivos (PESS) n. tibial: latencia P39, variable cuantitativa (ms); amplitud P30-P39 variable cuantitativa (μ V); tiempo de conducción central N22-P39, variable cuantitativa (ms).
- Potenciales evocados motores (PEM) de miembros superiores e inferiores: tiempo de conducción central al músculo abductor del primer dedo y al tibial anterior, variable cuantitativa (ms).

- Potencial evocado cognitivo (PEC) P-300: latencia, variable cuantitativa (ms) y amplitud, variable cuantitativa (μV).

Análisis

Como se ha comentado, en la evaluación basal, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en los potenciales evocados.

Se observaron algunas diferencias sin significación estadística entre el grupo placebo y los grupos de tratamiento tras 12 meses del tratamiento (Tabla 4):

- El tiempo de conducción central del PESS n. tibial (N22-P39) y el tiempo de conducción central para los PEM para las piernas, mostraron una disminución significativa del periodo de latencia tanto en el grupo placebo como en los grupos de tratamiento a los 12 meses, pero estas diferencias no fueron significativas al comparar los resultados del grupo placebo y los grupos de tratamiento.
- Los PEV y los PES en el nervio mediano (N13-N20), también mostraron una tendencia a la estabilización o mejora en el periodo de latencia con el tiempo en los grupos de tratamiento, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística ni a lo largo del tiempo ni entre los grupos.

Líquido cefaloraquídeo

No se observaron cambios significativos en el valor medio de cada uno de los parámetros obtenidos (Índice IgG e IgM, por Tibbling-Link y Secreción Intratecal IgG), a lo largo de la evolución en ninguno de los grupos ($p>0,05$). Los valores basales del Índice IgG y Secreción Intratecal IgG mostraron diferencias basales entre los grupos, que se mantuvieron en el seguimiento a 30 días.

Criterio de Valoración nº 7: Cambios en la Tomografía óptica de coherencia (OCT)

Con Criterio cuantitativo se realizó el cálculo de la media para ambos ojos del parámetro “Grosor Capa Fibras Nerviosas de la Retina” (CFNR).

Según el diseño del ensayo, se realizó la medida de OTC expresado en μm para cada uno de los ojos de manera independiente. Se ha presentado el valor medio entre ambas medidas (cuando fue posible realizarla clínicamente), o el valor unitario del que fue posible medir. No se ha realizado en este caso ningún otro tipo de imputación sobre los datos.

No se observó que el valor medio de cada uno de los parámetros de OTC cambiara con el tiempo en ninguno de los grupos analizados ($p>0,05$), ni se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Criterio de Valoración nº 8: Evaluación neuropsicológica

Se emplearon pruebas neuropsicológicas: Batería BRB y escala de inteligencia de Wechsler para adultos (WAIS III). Se trata de escalas que miden la disfunción cognitiva con un criterio cualitativo. La batería BRB es una variable cuantitativa medida por la puntuación compuesta en cada uno de los siguientes subtest:

- Selective reminding test (SRT)
- Symbol Digit Modalities Test (SDMT)
- Prueba de Evocación Categorial
- Paced Auditory S [PASAT]

Las pruebas neuropsicológicas se han facilitado por escrito a los pacientes que las realizaron en presencia de un neuropsicólogo que ha utilizado las herramientas de apoyo imprescindibles, como un magnetófono en el PASAT.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las pruebas.

Criterio de Valoración nº 9: Escalas de calidad de vida

Como medida de calidad de vida se han usado 3 cuestionarios de calidad de vida: escalas SF-36, Euroqol-5D, MusiQol. Han sido completadas por los pacientes bajo supervisión de un neuropsicólogo o por un familiar o una persona afín al paciente que transmita en el cuestionario de forma literal las impresiones del paciente.

No se observó que el valor medio de cada uno de los ítems de los Cuestionarios de Calidad de Vida SF-36, MusiQoL, o el valor medio del total del cuestionario EQ-5D, cambiara con el tiempo en ninguno de los grupos analizados ($p > 0,05$).

Criterio de Valoración nº 10: Inmunología – medidas repetidas

Se realizó evaluación de Medidas Repetidas para las variables inmunológicas: subpoblaciones celulares (linfocitos T CD4+ y CD8+), citocinas de perfil proinflamatorio (TNF α y IFN γ) y antiinflamatorio (TGF- β), y citocinas críticas enfermedades autoinmunes (IL-6 e IL23). Asimismo, se procedió al análisis funcional de la respuesta inmune en PBMC y la actividad funcional de células CD4+CD25+CD27 o Actividad CD4+CD25+FoxP3, lo que permitió evaluar el patrón de cambio de los sujetos a través del tiempo en función de los tratamientos. No se observó que el valor medio de cada uno de los parámetros de inmunología cambiara con el tiempo en ninguno de los grupos analizados ($p > 0,05$). Sólo, en el caso del parámetro de citoquina TGF- β e IL23, se observaron diferencias con discreta significación estadística, aumentando con el tiempo, desde su momento basal, a los 3, 6 y 12 meses. Estos datos son difícilmente interpretables dada la variabilidad entre sujetos.

Tabla 6. Análisis de citoquinas- TGF-B

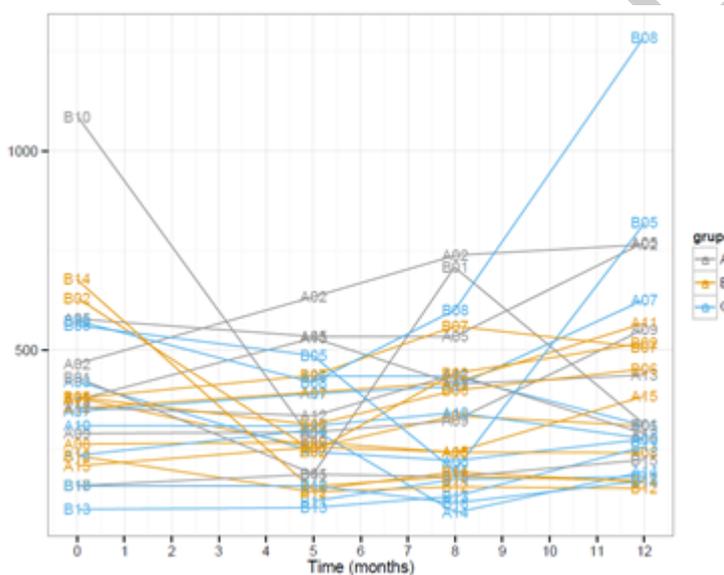


Figura 7. Análisis de citoquinas- TGF-B

Tabla 7. Análisis de citoquinas-IL23

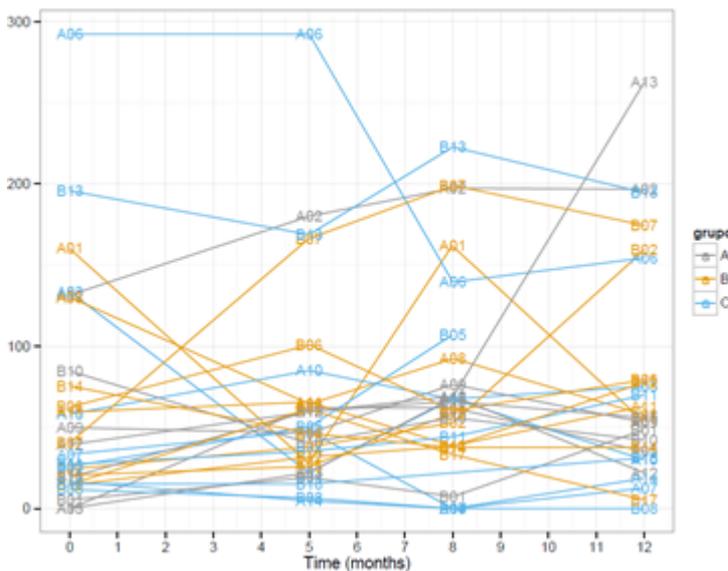


Figura 8. Análisis de citoquinas-IL23

Criterio de Valoración nº 10: hematología-bioquímica – medidas repetidas

Igualmente se realizó evaluación de Medidas Repetidas, lo que permitió evaluar el patrón de cambio de los sujetos a través del tiempo en función de los tratamientos. Los únicos parámetros que mostraron cambios significativos a lo largo del seguimiento fueron:

Colesterol y creatinina. En el grupo de dosis más baja, el valor medio disminuye con el tiempo y este cambio parece ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Valor de linfocitos. En el grupo de dosis más alta, el valor aumenta con el tiempo y este cambio parece ser estadísticamente significativo ($p = 0,006$)

Valoración de la eficacia. Conclusiones

En términos de eficacia, tal como se discutirá en el apartado F.3 del presente informe, los datos del presente ensayo clínico difícilmente nos podrían llevar a conclusiones claras sobre el uso de las células mesenquimales de tejido adiposo autólogo, dado lo avanzado de la patología estudiada, y el tamaño muestral, entre otros aspectos. Sin embargo, entre los parámetros analizados, el estudio de los potenciales evocados muestra una tendencia positiva en la eficacia del tratamiento, con diferencias entre el grupo placebo y los grupos de tratamiento a los 12 meses de seguimiento, aunque sin alcanzar significación estadística.

Así, el tiempo de conducción central del PESS tibial (N22-P39) y el tiempo de conducción central para los PEM para las piernas, mostraron una disminución significativa del periodo de latencia tanto en el grupo placebo como en los grupos de tratamiento a los 12 meses, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar el grupo placebo con los grupos de tratamiento.

Los potenciales evocados visuales y somatosensoriales del nervio mediano (N13-20) también mostraron una tendencia a la estabilización o a la reducción de los periodos de latencia a lo largo del tiempo en los grupos de tratamiento, aunque de nuevo, no se alcanzó significación estadística.

Otros parámetros, como los observados en el análisis del LCR, las OCT o los cuestionarios de calidad de vida, no mostraron cambios significativos.

E. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

El Análisis de seguridad se realizó para la población por seguridad tal como se describe en el apartado 6.8.1 de este informe.

- Se calculó el número y porcentaje de pacientes que abandonaron el estudio debido a acontecimientos adversos, los pacientes que experimentaron al menos un acontecimiento adverso, los acontecimientos adversos más frecuentes y los pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso grave (AAG). Se calculó para un intervalo de confianza del 95%.
- Se ha estudiado si existen diferencias estadísticamente significativas en el número de AAG entre los casos y los controles y entre las distintas dosis de medicamento entre sí.
- Es importante destacar que no se han considerado como acontecimientos adversos empeoramientos en la sintomatología relacionada con la EM, salvo los eventos descritos como “brotes”.

La información de seguridad ampliada se presenta en el **Anexo 16. 2. 1** del Informe Clínico completo.

Variables de seguridad:

La seguridad se evaluó a dos niveles:

- Seguridad durante el procedimiento: se evaluaron las posibles complicaciones derivadas del procedimiento en las primeras 24 horas tras la administración de células.
- Seguridad a 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses, con el fin de conocer la aparición de eventos que de forma definitiva o probable pudieran estar relacionados con la terapia celular.

1.- Información sobre acontecimientos adversos

Se ha registrado un total de 70 acontecimientos adversos a lo largo del ensayo, en 22 de los 34 pacientes (67%).

Los acontecimientos adversos más frecuentes fueron: infecciones urinarias, infecciones respiratorias y anemia (Tabla 5).

Para este ensayo, no se han incluido como acontecimientos adversos, las situaciones médicas consideradas como empeoramientos en la sintomatología relacionada con la EM, salvo los eventos descritos como “brotes”.

Tabla 8. Acontecimientos Adversos durante el ensayo

	Placebo (n=11)	Low Dose (n=11)	High Dose (n=12)	Active Treatment (n=23)
AAs				
Pacientes con AAs	8 (73%)	5 (45%)	9 (75%)	14 (61%)
Número de AAs	27	8	35	43
AAs más frecuentes				
Pacientes con Infección Urinaria	3 (27%)	2 (18%)	1 (8%)	3 (13%)
Pacientes con Infección Respiratoria	3 (27%)	0	1 (8%)	1 (4%)
Pacientes con Anemia	2 (18%)	1 (9%)	2 (17%)	3 (13%)
Causalidad de los AAs				
Improbable	27	8	32	40
Probable	0	0	2	2
Posible	0	0	1	1
AAGs				
Pacientes con AAGs	3 (27%) ^a	0	1 (8%)	1 (4%) ^b

^a Atragantamiento, infección respiratoria, infección urinaria; ^b infección urinaria

Acontecimientos adversos expresados por temporalidad:

Del total de acontecimientos adversos (70), 10 (14,29%) se representaron previos a la infusión, 17 (24,29%) se registraron en el periodo desde la infusión hasta un periodo de 30 días después de la misma. Por último, 42 (60,00%), fueron acontecimientos adversos presentados durante el periodo de seguimiento (después de 30 días de la infusión hasta 12 meses de seguimiento).

CONFIDENCIAL

2.- Codificación y Notificación de acontecimientos adversos

La información extraída de la base de datos del ensayo se codificó según la terminología del Diccionario MedDRA versión 16.1 con niveles SOC, HLGT, HLT, PT, LLT con el objetivo de homogenizar los términos y hacer posible el análisis (La información completa se recoge en el Apéndice 16.2.7 – Acontecimientos Adversos, del Informe Clínico).

Tabla 9. Acontecimientos Adversos por grupo. Codificación MedDRA

GRUPO A			GRUPO B			GRUPO C		
PAC	AAL_ACON_ADV	LLT	PAC	AAL_ACON_ADV	LLT	PAC	AAL_ACON_ADV	LLT
A02	DISLIPEMIA	Dislipidemia 10058108	A01	FEBRICULA	Febrícula 10065377	A03	ANEMIA FERROPENICA	Anemia ferropénica 10022972
A02	INFECCION GINGIVAL	Infección gingival 10058802	A01	CUADRO FEBRIL	Reacción febril 10016289	A07	PERIARTRITIS ESCAPULO- HUMERAL	Periartritis escapulohumeral 10049618
A02	CUADRO FEBRIL	Reacción febril 10016289	A01	NEUMONIA BASAL DERECHA	Neumonía 10035664	A10	ISQUEMIA ARTERIAL PIE DERECHO	Isquemia arterial visceral 10047503
A02	CATARRO	Catarro 10007774	A01	TRISTEZA	Sensación de tristeza 10016364	A14	ITU	Infección del tracto urinario 10021872
A02	GASTROENTERITIS	Gastroenteritis 10017888	A01	ATRAGANTAMIENTO	Atragantamiento con la lengua 10043983	A14	ULCERA POR PRESION PIE DERECHO	Úlcera por presión durante el decúbito 10036651
A05	INFECCION DE ORINA LEVE	Infección urinaria 10046544	A01	ANEMIA MICROCITICA HIPOCROMA	Anemia microcítica 10002066	A14	BROTE	Brote de esclerosis múltiple 10070426
A05	ALERGIA A CODEINA	Alergia específica (a fármaco) 10041423	A01	ANEMIA FERROPENICA	Anemia ferropénica 10022972	B08	INFECCION ORINA DE REPETICION	Infección recurrente del tracto urinario 10038140
A09	SOMNOLENCIA LEVE	Somnolencia 10041349	A01	ESCARAS	Costra (escara) 10051814	B18	FEBRICULA	Febrícula 10065377
A09	ALARGAMIENTO TIEMPO DE COAGULACION (INR=4,7)	Tiempo de coagulación alargado 10009683	A01	DERMATITIS SEBORREICA	Dermatitis seborreica 10012489	8	8	8
A09	SINCOPE LEVE	Síncope 10042772	A01	ANEMIA FERROPENICA	Anemia ferropénica 10022972			
A09	DOLOR EN LIPOMA RODILLA IZQUIERDA	Lipoma 10024612	A04	INFECCION RESPIRATORIA LEVE	Infección respiratoria 10021863			
A09	CATARRO DE VIAS ALTAS	Catarro 10007774	A04	INFECCION RESPIRATORIA LEVE	Infección respiratoria 10021863			
A09	DESCOMPENSACION DE LA COAGULACION (INR=6)	Tiempo de coagulación alargado 10009683	A04	INFECCION RESPIRATORIA MODERADA	Infección respiratoria 10021863			

A09	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544	A04	INFECCION RESPIRATORIA	Infección respiratoria 10021863
A09	VIBRACION DE OJOS POR FALTA DE POTASIO	Trastorno no especificado de los movimientos de los ojos 10045785	A04	INFECCION RESPIRATORIA (EXITUS)	Infección respiratoria 10021863
A09	AUMENTO ESPASTICIDAD	Empeoramiento de la espasticidad muscular 10028336	A08	ITU DE REPETICION	Infección recurrente del tracto urinario 10038140
A09	ANEMIA FERROPENICA	Anemia ferropénica 10022972	A08	INFECCION RESPIRATORIA DE VIAS ALTAS	Infección respiratoria alta 10046300
A12	INFECCION ORINA	Infección urinaria 10046544	A11	ITU	Infección del tracto urinario 10021872
A12	INFECCION ORINA	Infección urinaria 10046544	A11	CEFALEA POSTPUNCION	Cefalea postpunción espinal 10036240
A12	EDEMOS MALEOLARES	Edema del maléolo 10052380	A11	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544
A12	COLELITIASIS	Colelitiasis 10008629	A11	DIARREA POR CIPROFLOXACINO	Diarrea asociada a antibióticos 10055956
A12	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544	A15	CUADRO CATARRAL	Síndrome catarral común 10010107
A13	FEBRICULA VESPERTINA	Febrícula 10065377	B06	ESTREÑIMIENTO LEVE	Estreñimiento 10010774
A13	FEBRICULA LEVE	Febrícula 10065377	B06	INFECCION ORINA	Infección urinaria 10046544
A13	ULCERA DE DECUBITO	Úlcera de decúbito 10004196	B07	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544
A13	EDEMOS MALEOLARES EN MMII	Edema del maléolo 10052380	B07	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544
A13	EDEMOS MALEOLARES MMII	Edema del maléolo 10052380	B14	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544
B01	FLEBITIS ANTEBRAZO DERECHO	Flebitis en miembro superior 10048449	27	27	27
B09	INFECCION URINARIA	Infección urinaria 10046544			
B09	ANEMIA MACROCITICA	Anemia macrocítica 10002064			
B09	BROTE	Brote de esclerosis múltiple 10070426			

B10	VOMITOS TRAS INTERVENCION QUIRURGICA (DERMOLIPECTOMIA)	Vómitos posquirúrgicos 10036274
B10	INFECCION RESPIRATORIA	Infección respiratoria 10021863
B15	PICO FEBRIL AISLADO	Picos de fiebre 10041523
B15	CATARRO VIAS ALTAS	Catarro 10007774
35	35	35

CONFIDENCIAL

3. Acontecimientos adversos graves

Reacciones Adversas Graves e Inesperadas (RAGIs): Ningún paciente presentó Reacción Adversa Grave e Inesperada (RAGI) alguna durante el periodo de tratamiento o de seguimiento.

Acontecimientos Adversos Graves (AAGs): Se notificaron 4 acontecimientos adversos graves. De ellos, 3 ocurrieron en el grupo control y 1 en el grupo de dosis más alta (Tabla 7).

Tabla 10. Acontecimientos Adversos Graves

Pac	Gr	Término de Acontecimiento Adverso según IP	Descriptiva AAG	Motivo AAG	Desenlace	Relación
B09	A	INFECCION URINARIA (Infección urinaria 10046544)	<i>En la semana previa al ingreso, el paciente presenta mayor dificultad para la micción, que se hace más intensa durante los últimos días previos al ingreso programado para la infusión. Se practica sondaje urinario, evacuándose más de 1000cc. Se solicita analítica de orina, sedimento, urocultivo, hemocultivo y se pauta tratamiento antibiótico. Los días siguiente continúa con febrícula de hasta 37,8°C con mayor tendencia al sueño de lo habitual y menos reactivo por lo que se amplía estudio con TAC y RMN de cráneo, RX y TC tórax, ECG y punción lumbar. Dado a los hallazgos en RMN se inicia tratamiento con inmunoglobulinas y esteroideos intravenosos. Tras el inicio del tratamiento el paciente comienza a mejorar considerablemente, comenzando a estar en alerta y orientado en espacio, tiempo y persona, permitiendo retirar el sondaje. El investigador lo considera como un brote de EM unido a un ITUs de repetición. Vejiga hiperrefléxica.</i>	<i>Prolongación de la hospitalización de un ingreso programado</i>	Recuperado sin secuelas	Improbable
A01	B	ATRAGANTAMIENTO (Atragantamiento con la lengua 10043983)	<i>Presenta disfagia a sólidos y líquidos de larga evolución como síntoma de la EM que empeora a principios de septiembre. El 14/9/2010, mientras comía sufre un cuadro de atragantamiento con parada respiratoria. La familia avisa a los servicios de urgencias que le aspiran el alimento y le realizan maniobras de resucitación cardiopulmonar básica, que fueron eficaces, por lo que se estima que estuvo en situación de anoxia algo menos de 10 minutos. La paciente fue trasladada al hospital. El investigador lo considera relacionado con su patología de base.</i>	<i>Ingreso Hospitalario y la vida de la paciente ha estado en peligro</i>	Recuperado sin secuelas	Improbable
A04	B	INFECCION RESPIRATORIA (Infección respiratoria 10021863)	<i>Paciente con repetidas infecciones respiratorias desde el comienzo del ensayo. Siempre han sido considerados como leve-moderada durante el 2010, hasta que, a comienzos del 2011, la consideran grave porque la paciente fallece finalmente el 16/2/11. El investigador considera que la causa es la propia evolución de la enfermedad, por una complicación que es la infección respiratoria.</i>	Exitus	Exitus	Improbable
B07	B	INFECCION URINARIA (Infección urinaria 10046544)	<i>Durante su estancia en planta para la realización de pruebas complementarias al ensayo previo a infusión, el paciente presenta hematuria. Se extraen hemocultivos y urocultivos y se inicia antibioterapia. Pese a que el paciente fue dado de alta 28/5/2010 por su mejoría clínica, el 9/6/2010 se obtienen los resultados del cultivo y es resistente al antibiótico que estaba recibiendo, por lo tanto, se le cambia tratamiento. La fecha en que el investigador considera el evento resuelto es el 6/7/2010.</i>	<i>Prolongación de la hospitalización de un ingreso programado</i>	Recuperado sin secuelas	Improbable

4.- Acontecimientos adversos no graves

Sesenta y seis de los 70 acontecimientos adversos que se produjeron a lo largo del ensayo, fueron No graves. De ellos, 24 eventos fueron en el grupo placebo, 8 en el grupo de dosis baja y 34 en el de dosis alta.

22 pacientes de los 34 pacientes (66,71%) presentaron al menos un acontecimiento adverso.

Los acontecimientos adversos más frecuentes fueron: infecciones urinarias, infecciones respiratorias y anemia. Únicamente se registraron dos brotes de la enfermedad, 1 en el grupo de dosis más baja y 1 en el grupo de dosis más alta y ningún paciente asignado al grupo control.

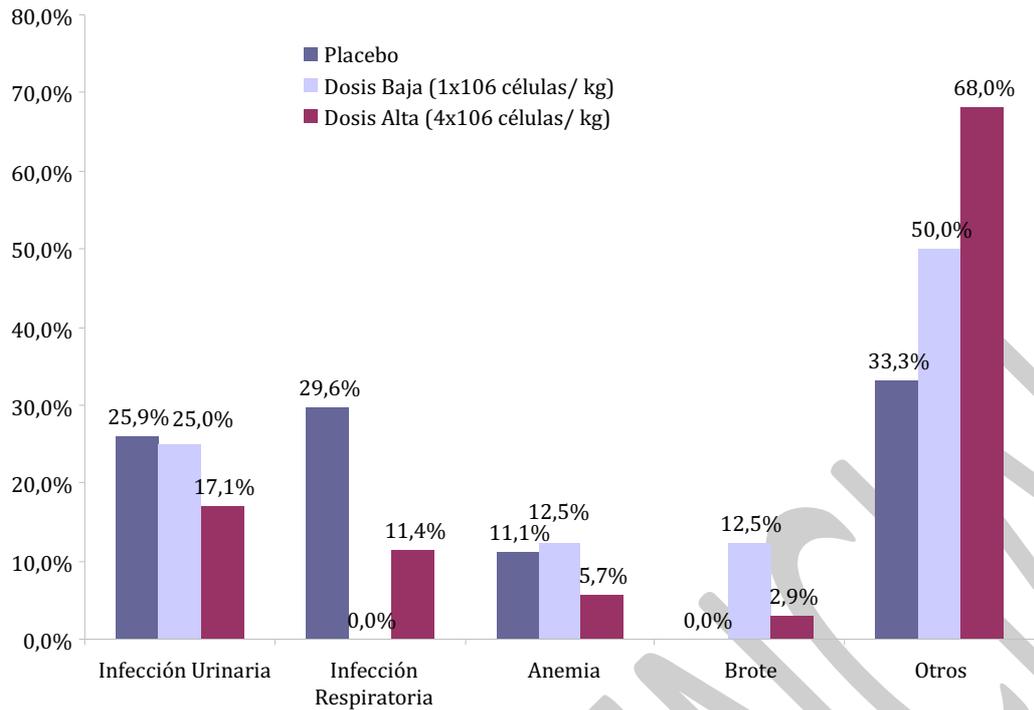


Figura 9. Acontecimientos Adversos No graves. Frecuencia

Valoración de la seguridad. Conclusiones

Los datos obtenidos permiten concluir que el uso de las células mesenquimales procedentes de tejido adiposo de origen autólogo, en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple secundariamente progresiva, administrado por vía intraarterial, tiene un buen perfil de seguridad.

El patrón de Eventos Adversos registrados es compatible con lo esperado dada la enfermedad de base y lo avanzado de su evolución. Aunque 4 de los Acontecimientos notificados fueron considerados Graves, ninguno de ellos fue considerado Reacción Adversa Grave e Inesperada, es decir no tuvieron ni con el procedimiento de infusión ni con el medicamento en estudio durante el periodo de tratamiento o de seguimiento.

F. INFORMACIÓN ADICIONAL

1.- Modificaciones globales sustanciales

Aunque se realizaron 2 enmiendas al protocolo inicial, ninguna de ellas supuso modificaciones sustanciales.

2.- Interrupciones globales y reanudaciones

No se produjeron

3.- Limitaciones, valorando las fuentes de sesgos potenciales e imprecisiones y advertencias

Esperar grandes cambios como medida de la efectividad probablemente no es un planteamiento realista en los estudios que incluyen pacientes con EM en fases muy avanzada, el periodo más neurodegenerativo, donde cambios positivos

mínimos pueden indicar un efecto beneficioso. En el presente ensayo la puntuación el EDSS basal media de los pacientes fue superior a 7.5, mientras que los pacientes incluidos en otros estudios con mejores resultados, como el de Connick y cols., tenían un EDSS basal de 6.1, lo que supone que los pacientes de nuestro estudio tenían una enfermedad más avanzada, y por lo tanto las imágenes de RM, los potenciales evocados, y la tomografía de coherencia óptica, eran ya parámetros con mucha afectación en el momento basal: elevado número de lesiones basales en las imágenes de la RM, potenciales evocados muy bajos o no registrables, o un adelgazamiento muy marcado de la capa retiniana.

En enfermedades tan graves como la estudiada aquí, en la que el beneficio máximo es muy limitado (efecto “ceiling”), la diferencia entre el tratamiento experimental y el grupo control puede estar reducida o incluso eliminada por el efecto de ser observado al participar en un ensayo clínico (efecto “Hawthorne”), afectando a la capacidad de los investigadores para determinar la diferencia entre los grupos. Tememos que este sea el caso de nuestros posibles marcadores de tratamiento, por lo que estos factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar estos resultados.

Aunque varios estudios han utilizado células mesenquimales de médula ósea, muy pocos han investigado el uso mesenquimales procedentes de tejido adiposo en pacientes con EM. En vista de la falta de datos sólidos sobre los efectos del tratamiento, no podemos hacer afirmaciones sobre los méritos relativos de las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo o de médula ósea. En principio, ambas son células madre pluripotentes que pueden sufrir diferenciación neural, pero sus fenotipos inmunológicos difieren, por lo que sus propiedades inmunomoduladoras también pueden variar.

En conclusión, el presente estudio demuestra que la infusión de CetMAd es un procedimiento seguro y factible en pacientes con EMSP. Se observó algún indicio de eficacia mediante el uso de resonancia magnética y potenciales evocados, aunque se necesitarían estudios más grandes para investigar el beneficio terapéutico potencial de la técnica siendo recomendable que esta investigación se llevara a cabo en una población de pacientes en fase menos avanzada de la enfermedad, donde los sesgos descritos pudieran ser evitados o compensados en el diseño del estudio.

4.- Declaración del solicitante respecto a la exactitud de la información presentada

El promotor del ensayo clínico objeto del presente informe, la Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas, a través de la Fundación Progreso y Salud, declara que ha monitorizado el 100% de la información incluida en los Cuadernos de Recogida de Datos cotejando la misma con los documentos fuente correspondientes, y declara que la información presentada es exacta.

Referencias

- Bai L, Lennon DP, Eaton V, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009;57:1192-1203.
- Bonab MM, Sahraian MA, Aghsaie A, et al. Autologous mesenchymal stem cell therapy in progressive multiple sclerosis: an open label study. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7:407-414.
- Chen X, Wang C, Yin J, Xu J, Wei J, Zhang Y. Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10:e0136991.
- Cohen BA, Mikol DD. Mitoxantrone treatment of multiple sclerosis: safety considerations. *Neurology*. 2004;63(12 Suppl 6):S28-S32.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372:1502-1517.
- Connick P, Kolappan M, Crawley C, et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 2012;11:150-156.
- De la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28:313-323.
- El-Badawy A, El-Badri N. Clinical Efficacy of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11:e0151938.
- Fernández O, Fernández V, Guerrero M (eds). Epidemiología. Patogenia. Clínica. Tratamiento. Esclerosis múltiple 2ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid 2005
- Fisher SA, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;12:CD007888
- Frank M.H. and Sayegh M.H. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1411-1412.
- Glat MJ, Offen D. Cell and gene therapy in Alzheimer's disease. *Stem Cells Dev*. 2013;22:1490-1496.
- Hartung H-P, Gonsette R, König N, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2002;360:2018-2025.
- Jiang X, Zhang H, Teng M. Effectiveness of Autologous Stem Cell Therapy for the Treatment of Lower Extremity Ulcers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e2716.
- Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8:647-656.
- Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363:1439-1441.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroidresistant severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-86.
- Mantia LL, Vacchi L, Rovaris M, et al. Interferon β for secondary progressive multiple sclerosis: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:420-426.
- Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, et al. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iran J Immunol IJI*. 2007;4:50-57.
- Odinak MM, Bisaga GN, Novitskiĭ AV, et al. [Transplantation of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2011;111:72-6.

- Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double blind controlled trial. *Lancet*. 2016;388:1281-90.
- Payne N, Siatskas C, Barnard A, Bernard CCA. The prospect of stem cells as multi-faceted purveyors of immune modulation, repair and regeneration in multiple sclerosis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011;6:50-62.
- Politis M, Lindvall O. Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med*. 2012;10:1.
- Ra JC, Kang SK, Shin IS, et al. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2011 Oct 21;9:181 Ra 2011
- Riordan NH, Ichim TE, Min W-P, et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med*. 2009;7:29.24.
- Segers VFM, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451:937-942.
- Slavin S, Kurkalli BGS, Karussis D. The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008;110:943-946.
- Sorensen PS. New management algorithms in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2014;27:246-259.
- Stepien A, Dabrowska NL, Maciagowska M, et al. Clinical Application of Autologous Adipose Stem Cells in Patients with Multiple Sclerosis: Preliminary Results. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5302120.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:726-736.
- Yamout B, Hourani R, Salti H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neuroimmunol*. 2010;227:185-189.