

## **Benefit from B-Lymphocyte Depletion Using the Anti-CD20 Antibody Rituximab in Chronic Fatigue Syndrome. A Double-Blind and Placebo-Controlled Study**

PLoS One. 2011; 6(10): e26358. Published online 2011 October 19. PMID: PMC3198463  
doi: 10.1371/journal.pone.0026358

Copyright Fluge et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Øystein Fluge,<sup>1\*</sup> Ove Bruland,<sup>1,2</sup> Kristin Risa,<sup>1</sup> Anette Storstein,<sup>3</sup> Einar K. Kristoffersen,<sup>4</sup> Dipak Sapkota,<sup>1</sup> Halvor Næss,<sup>3</sup> Olav Dahl,<sup>1,5</sup> Harald Nyland,<sup>3</sup> and Olav Mella<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology and Medical Physics, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

<sup>2</sup>Department of Medical Genetics and Molecular Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

<sup>3</sup>Department of Neurology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

<sup>4</sup>Department of Immunology and Transfusion Medicine, Haukeland University Hospital, and The Gade Institute, University of Bergen, Bergen, Norway

<sup>5</sup>Institute of Internal Medicine, Section of Oncology, University of Bergen, Bergen, Norway

Markus Reindl, Editor

Innsbruck Medical University, Austria

\* E-mail: oystein.fluge@gmail.com

Conceived and designed the experiments: ØF OM. Performed the experiments: ØF OM OB KR DS AS EK HN. Analyzed the data: ØF OB KR DS EK OM. Contributed reagents/materials/analysis tools: ØF OM OB HN EK OD. Wrote the paper: ØF OM. Revised the manuscript: ØF OB KR DS AS EK H.Næss OD H.Nyland OM.

Received June 28, 2011; Accepted September 25, 2011.

**Beneficio del agotamiento de los B-linfocitos utilizando el Rituximab de anticuerpo Anti-CD20 en la enfermedad del Síndrome de Fatiga Crónica. Un estudio de doble ciego y controlados con Placebo**

Copyright Fluge et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons, sin restricciones de permisos de uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que se acreditan el autor y la fuente original.

Øystein Fluge, 1 Ove Bruland, 1, 2 de Kristin de Risa, 1 Anette Storstein, 3 k. Einar Kristoffersen, 4 Dipak Sapkota, 1 Halvor Næss, 3 Olav Dahl, 1, 5 Harald Nyland, 3 y Olav Mella1, 5

- 1- Department de Oncología y física médica, Hospital Universitario Haukeland, Bergen, Noruega
- 2- Department de genética médica y Medicina Molecular, Hospital Universitario Haukeland, Bergen, Noruega
- 3- Department de neurología, Hospital Universitario Haukeland, Bergen, Noruega
- 4- Departamento de Inmunología y medicina de la transfusión, Haukeland University Hospital y el Instituto de Gade, Universidad de Bergen, Bergen, Noruega
- 5- Institute de medicina interna, sección de Oncología, Universidad de Bergen, Bergen, Noruega

Markus Reindl, Editor

Universidad de Medicina de Innsbruck, Austria

Correo electrónico: oystein.fluge@gmail.com

Concebió y diseñó los experimentos: ØF OM. Realizaron los experimentos: ØF OM OB KR DS AS EK HN. Analizaron los datos: ØF OB KR DS EK om. Contribuyeron con herramientas de reagents/materiales/analisis: ØF OM OB HN EK OD. Escribió el libro: ØF om. Revisaron el manuscrito: om ØF OB KR DS AS EK H.Næss OD H.Nyland.

Recibido el 28 de junio de 2011; Aceptado el 25 de septiembre de 2011.

Otras Secciones ▼

Resumen

Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Debate

Información de soporte

Referencias

## **Abstract**

### **Background**

Chronic fatigue syndrome (CFS) is a disease of unknown aetiology. Major CFS symptom

relief during cancer chemotherapy in a patient with synchronous CFS and lymphoma spurred a pilot study of B-lymphocyte depletion using the anti-CD20 antibody Rituximab, which demonstrated significant clinical response in three CFS patients.

## **Extracto**

### **Contexto**

El Síndrome de fatiga crónica (SFC) es una enfermedad de etiología desconocida. Un gran alivio de los síntomas del SFC durante la quimioterapia contra el cáncer en un paciente con SFC sincrónica y linfoma estimuló un estudio piloto de agotamiento de los B-linfocitos utilizando el anticuerpo anti-CD20 Rituximab, lo que demostró una importante respuesta clínica en tres pacientes de SFC.

### **Methods and Findings**

In this double-blind, placebo-controlled phase II study (NCT00848692), 30 CFS patients were randomised to either Rituximab 500 mg/m<sup>2</sup> or saline, given twice two weeks apart, with follow-up for 12 months. Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) was not detected in any of the patients.

The responses generally affected all CFS symptoms. Major or moderate overall response, defined as lasting improvements in self-reported Fatigue score during follow-up, was seen in 10 out of 15 patients (67%) in the Rituximab group and in two out of 15 patients (13%) in the Placebo group ( $p = 0.003$ ). Mean response duration within the follow-up period for the 10 responders to Rituximab was 25 weeks (range 8–44). Four Rituximab patients had clinical response durations past the study period. General linear models for repeated measures of Fatigue scores during follow-up showed a significant interaction between time and intervention group ( $p = 0.018$  for self-reported, and  $p = 0.024$  for physician-assessed), with differences between the Rituximab and Placebo groups between 6–10 months after intervention. The primary end-point, defined as effect on self-reported Fatigue score 3 months after intervention, was negative. There were no serious adverse events. Two patients in the Rituximab group with pre-existing psoriasis experienced moderate psoriasis worsenin

### **Métodos y resultados**

En este estudio de doble ciego, controlados con placebo en su fase II (NCT00848692), 30 pacientes de SFC fueron asignados al azar a Rituximab 500 mgm<sup>2</sup> o solución salina, dada dos veces cada dos semanas, con seguimiento durante 12 meses. No se detectaron virus

relacionados con el virus Xenotropic murino leucemia (XMRV) en ninguno de los pacientes.

Las respuestas generalmente afectaron a todos los síntomas del SFC. Se constató una respuesta global importante o moderada, definida como mejoras duraderas en la calificación de fatiga comunicada durante el seguimiento, en 10 de los 15 pacientes (67%) en el grupo de Rituximab y en dos de los 15 pacientes (13%) en el grupo con Placebo ( $p = 0,003$ ). La duración media de la respuesta dentro del período de seguimiento para los 10 pacientes que respondieron al tratamiento de Rituximab fue de 25 semanas (rango 8–44).

Cuatro pacientes con Rituximab tuvieron una respuesta clínica pasado el período de estudio. Modelos lineales generales para medidas repetidas de puntajes de fatiga durante el seguimiento mostraban una interacción significativa entre el grupo de intervención y el tiempo ( $p = 0.018$  para autoreconocidos y  $p = 0.024$  para los de comprobación médica), con las diferencias entre los grupos de Rituximab y Placebo entre 6 a 10 meses después de la intervención. El punto final principal, definido como efecto sobre autoevaluados de fatiga 3 meses después de la intervención, fue negativo. No hubo ningún evento adverso grave. Dos pacientes en el grupo de Rituximab con psoriasis preexistente experimentaron un empeoramiento moderado de la psoriasis.

## **Conclusion**

The delayed responses starting from 2–7 months after Rituximab treatment, in spite of rapid B-cell depletion, suggests that CFS is an autoimmune disease and may be consistent with the gradual elimination of autoantibodies preceding clinical responses. The present findings will impact future research efforts in CFS.

## **Conclusión**

Las respuestas con retrasos que empiezan a partir de 2 a 7 meses después del tratamiento de Rituximab, a pesar del rápido agotamiento de las células B, sugieren que **el SFC es una enfermedad autoinmune y puede estar en concordancia con la eliminación gradual de autoanticuerpos que preceden a respuestas clínicas**. Las presentes conclusiones afectarán a los esfuerzos de investigación futura en SFC.

Trial registration

ClinicalTrials.gov NCT00848692

Other Sections ▼

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Supporting Information

References

## **Introduction**

Chronic fatigue syndrome (CFS)/Myalgic encephalomyelitis (ME) is an illness of unknown aetiology. CFS is characterized by unexplained severe fatigue, excessive post-exercise exhaustion and malaise, sleep disturbances, cognitive impairment, sensory hypersensitivity, muscle and joint pain, headache, bowel symptoms, flu-like episodes and severe impairment of daily functioning. CFS is a major public health problem, with extensive family and public costs for medication, nursing and disability [1], [2]. The prevalence estimates vary up to 1%, but is probably 0.1–0.2% of the population using strict diagnostic criteria [3]. There is at present no established interventional drug treatment for CFS. However, infections frequently precede the outbreak of symptoms and studies point at the immune system being chronically activated [1].

## **Registro de prueba**

### **Introducción**

El Síndrome de Fatiga Crónica o Encefalomiелitis Miálgica (SFC) es una enfermedad de etiología desconocida. El SFC se caracteriza por fatiga severa inexplicable, excesivo agotamiento después del ejercicio y malestar general, trastornos del sueño, deterioro cognitivo, hipersensibilidad sensorial, muscular y dolor en las articulaciones, cefaleas, síntomas intestinales, episodios semejantes a la gripe y grave deterioro del funcionamiento diario. SFC es un problema importante de salud pública, extensivo a la familia y gastos públicos para medicinas, enfermería y discapacidad (1), (2). Las estimaciones de prevalencia varían hasta el 1%, pero probablemente es del 0.1–0.2% de la población mediante estrictos criterios de diagnóstico (3). No hay en la actualidad ningún tratamiento intervencionista establecido para el SFC. Sin embargo, las infecciones frecuentemente preceden a la aparición de síntomas y hay estudios que apuntan al sistema inmunológico que está crónicamente activo (1).

### **Materials and Methods**

The present line of investigation was initiated after we observed a patient with CFS who experienced unexpected and marked recovery of CFS symptoms lasting for five months during and after cytotoxic chemotherapy for Hodgkin's disease. We recently published the first pilot case series describing clinical activity from B-lymphocyte depletion using the anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab in three CFS patients [4]. These observations suggest that B-cells play a significant role in the ongoing clinical features of CFS, and provide clues to possible aetiological mechanisms. To pursue these clues, we performed a randomised, double-blind and placebo-controlled phase II study using Rituximab or saline,

in 30 CFS patients.

### **Materiales and Métodos**

La actual línea de investigación se inició después de que observamos a un paciente con SFC que experimentó una recuperación notable e inesperada de los síntomas del SFC que se prolongaron 5 meses durante y después de la quimioterapia citotóxica para la enfermedad de Hodgkins. Recientemente hemos publicado la primera serie de un caso piloto que describe la actividad clínica de agotamiento de los B-linfocitos utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab en tres pacientes de SFC (4). Estas observaciones sugieren que las células B desempeñan un papel importante en las características clínicas en curso del SFC y proporcionan pistas sobre posibles mecanismos etiológicos. Para perseguir estos indicios, se realizó de manera aleatoria un estudio en fase II, de doble ciego y controlados con placebo y utilizando Rituximab o solución salina, en 30 pacientes del SFC.

Other Sections ▼

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Supporting Information

References

Materials and Methods

### **Ethics**

The study, including amendment, was approved by the Regional Ethical Committee in Norway, no 200800657-9/MRO/400, and by the National Medicines Agency. All patients gave written consent to participate in the study.

Study design, pre-treatment evaluation, and randomisation

This study (KTS-1-2008, EudraCT no. 2007-007973-22, ClinicalTrials.gov NCT00848692) was a single centre, randomised, double-blind, and placebo-controlled phase II trial comprising 30 patients with chronic fatigue syndrome (CFS). The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information (Protocol S1 and Checklist S1). The main aim was to evaluate the use of B-cell depletion with the anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab for CFS symptom relief, during 12 months follow-up. The inclusion criteria were: a diagnosis of CFS by a neurologist, according to the Fukuda 1994 criteria [5], age 18–65 years, and written informed consent.

## **Ética**

El estudio, incluida la enmienda, fue aprobado por el Comité Regional de ética en Noruega, nº 200800657-9MRO400 y por la Agencia Nacional de medicamentos. Todos los pacientes dieron consentimiento por escrito para participar en el estudio.

### **Asignación al azar, diseño del estudio y evaluación pretratamiento**

Este estudio (KTS-1-2008, EudraCT nº 2007-007973-22, ClinicalTrials.gov NCT00848692) fue realizado en un único centro y se trata de un ensayo en fase II, aleatorio, doble ciego y controlados con placebo que comprende a 30 pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC). El Protocolo para este juicio y la lista de comprobación CONSORT que la avala, están disponibles como información de apoyo (Protocolo S1 y S1 Checklist). El principal objetivo fue evaluar el agotamiento por el uso de las células B con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab para alivio de los síntomas del SFC, durante 12 meses de seguimiento. Los criterios de inclusión fueron: un diagnóstico de SFC por un neurólogo, según los criterios de Fukuda de 1994 (5), edad 18–65 años y consentimiento escrito.

Exclusion criteria were: fatigue not fulfilling CFS criteria, previous malignant disease (except basal cell carcinoma and cervical dysplasia), previous long-term immunosuppressive treatment, previous Rituximab treatment, endogenous depression, lack of ability to adhere to protocol, or evidence of on-going infection.

Los criterios de exclusión fueron: fatiga que no cumple los criterios de SFC, anterior enfermedad maligna (excepto carcinoma basocelular y displasia cervical), previo tratamiento inmunosupresor a largo plazo, tratamiento previo de Rituximab, depresión endógena, falta de capacidad para adherirse al Protocolo, o evidencia de infección en curso.

The primary end-point was effect on CFS symptoms (self-reported and physician-assessed) three months after intervention. The secondary endpoints were effects on CFS symptoms (self-reported and physician-assessed) at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months after intervention, and assessment of toxicity during 12 months follow-up. Overall clinical response was also recorded. In November 2008, an amendment was submitted to the Regional Ethical Committee (approved January 2009), with addition to the initial protocol of secondary endpoints at 8 and 10 months after inclusion. This amendment was based on observation of patient 3 in our pilot case series, who had a major clinical response occurring late after Rituximab intervention [4]. The sample size was estimated based on the initial case series [4], showing response in three out of three consecutive patients, presuming an overall response rate (ORR) of at least 60%, and one or two responders among 15 placebo patients.

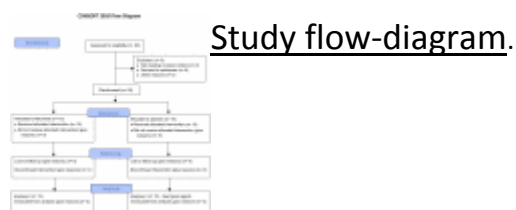
El objetivo primario fue el efecto sobre los síntomas SFC (autocomunicados y evaluados por el médico) tres meses después de la intervención. Los puntos finales secundarios fueron los efectos sobre los síntomas del SFC (autoreconocidos y evaluados por el médico) en 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses después de la intervención y la evaluación de la toxicidad durante 12 meses de seguimiento. En general, la respuesta clínica también fue registrada.

En noviembre de 2008, el Comité Regional de ética (aprobado en enero de 2009), presentó una enmienda con la adición del Protocolo inicial de extremos secundarios a los 8 y 10 meses después de la inclusión. Esta enmienda se basó en la observación del paciente 3 en nuestra serie del caso piloto, quien tuvo una importante respuesta clínica bastante después de la intervención de Rituximab (4). Se estimó que el tamaño de la muestra estaba basado en la serie inicial del caso (4), mostrando la respuesta en tres de los tres pacientes consecutivos, que suponía una tasa de respuesta global (ORR) de al menos el 60%, y uno o dos que respondieron al tratamiento entre los 15 pacientes con placebo.

Most of the participants were recruited from patients referred to Department of Neurology, Haukeland University Hospital, which is a tertiary referral centre. After examining the patient hospital files from approximately 60 patients, 36 patients who after a telephone interview still seemed to fulfil the inclusion criteria were invited to a new thorough assessment at the Department of Oncology, Haukeland University Hospital (ØF and OM). Six out of these 36 patients chose not to participate (Figure 1).

La mayoría de los participantes fueron reclutados de entre los pacientes derivados al departamento de neurología, Hospital Universitario Haukeland, que es un centro de referencia terciario. Después de examinar los archivos hospitalarios de aproximadamente 60 pacientes, 36 pacientes que, después de una entrevista telefónica, todavía parecían cumplir los criterios de inclusión, fueron invitados a una nueva evaluación exhaustiva en el departamento de Oncología, Hospital Universitario de Haukeland (ØF y OM). Seis de estos 36 pacientes decidieron no participar (figura 1).

Figure 1



The pre-treatment evaluation included standard laboratory tests (haematological, liver function, renal function), HCG to exclude pregnancy in fertile women, endocrine assessment (thyroid, adrenal, prolactin), serology for virus (EBV, CMV, HSV, VZV, Enterovirus, Parvovirus B19, adenovirus), immunophenotyping of peripheral blood lymphocyte subsets, common autoantibodies, serum immunoglobulins (IgG, IgM, IgA) with IgG subclasses. MRI of the brain had been performed in all patients. Further diagnostic tests were performed if the pre-treatment evaluation including a thorough clinical examination revealed any relevant abnormality that could explain the severe fatigue experienced by the patients.

The 30 patients were randomly allocated to either treatment with Rituximab or placebo using saline. The randomisation was performed prior to study start by the Pharmacy at Haukeland University Hospital, using a simple (unrestricted) method without blocking. The



inclusion period was from June 2008 until June 2009, and the follow-up lasted until June 2010.

Figura 1

### **Estudio del diagrama de flujo.**

La evaluación del pretratamiento incluye pruebas de laboratorio estándar (hematológico, función hepática, función renal), HCG para excluir el embarazo en mujeres fértiles, evaluación endocrina (prolactina suprarrenales, tiroides,), serología para virus (VEB, CMV, HSV, VZV, adenovirus Enterovirus, Parvovirus B19,), Inmunofenotipaje de subconjuntos de linfocitos de sangre periférica, autoanticuerpos comunes, inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) de suero con subclases de IgG. MRI del cerebro había sido interpretada en todos los pacientes. Además se realizaron pruebas de diagnóstico si la evaluación pretratamiento que incluía un exhaustivo examen clínico revelaba cualquier anomalía relevante que pudiera explicar la severa fatiga experimentada por los pacientes.

Los 30 pacientes fueron asignados al azar a cualquier tratamiento con Rituximab o placebo con solución salina. La asignación al azar fue realizada antes del inicio del estudio por la farmacia del Hospital Universitario Haukeland, utilizando un método sencillo (ilimitado) sin bloquear. El período de inclusión fue desde junio de 2008 hasta junio de 2009, y el seguimiento duró hasta junio de 2010.

According to protocol, four months after the last patient entered the study (end of October, 2009), the patient files and code for intervention, Rituximab versus placebo, were inspected by one of the authors (OD, who did not have patient contact). Based upon his assessment, a decision was made to prolong the blinding until the last included patient had finished eight months follow-up (end of February 2010), at which time 19 patients had finished 10 months follow-up, and 13 patients had finished the complete 12 months observation period. The patients were blinded for group allocation until the end of follow-up (at least 12 months, up to 20 months).

De acuerdo al Protocolo, las cuatro meses después de que el último paciente entró en el estudio (finales de octubre de 2009), los expedientes de los pacientes y código de intervención, Rituximab versus placebo, fueron inspeccionados por uno de los autores (OD, que no tenía contacto con los pacientes). Basándose en su evaluación, se tomó la decisión de prolongar el proceso ciego hasta que el último paciente incluido hubiese terminado los ocho meses de seguimiento (finales de febrero de 2010), en cuyo momento 19 pacientes habían terminado 10 meses de seguimiento y 13 pacientes habían terminado el período de observación completa de 12 meses. Los pacientes fueron asignados a ciegas en grupos hasta el final del seguimiento (al menos 12 meses, hasta 20 meses).

### **Treatment schedule, symptom registration, and follow-up**

The patients were in-hospital at the Department of Oncology for one night when given

the intervention. The infusion bags had double plastic covers to avoid content identification by nurse or patient. Rituximab 500 mg/m<sup>2</sup> (maximum 1000 mg), diluted in saline to a concentration of 2 mg/ml, or an equal volume of saline, were given twice two weeks apart, with nurse surveillance and according to local guidelines used for treating B-cell lymphomas. No additional Rituximab infusions, or other intervention, were given during follow-up. All patients were given oral cetirizine 10 mg, paracetamol 1 g, and dexamethasone 8 mg prior to infusion.

### **Plan de tratamiento, registro de síntoma y seguimiento**

Los pacientes estuvieron ingresados en el departamento de Oncología del hospital durante la noche de la intervención. Las bolsas de infusión tenían dobles cubiertas de plásticos para evitar la identificación del contenido por parte de las enfermeras o los pacientes. Rituximab 500 mg/m<sup>2</sup> (máximo 1000 mg), diluido en solución salina en una concentración de 2 mg/ml, o un volumen igual de solución salina, fueron administradas dos veces cada dos semanas, con vigilancia de enfermeras y con arreglo a directrices locales utilizadas para el tratamiento de linfomas de células B. No se les dió infusiones adicionales de Rituximab u otra intervención durante el seguimiento. Todos los pacientes recibieron dexametasona 8 mg, oral cetirizina 10 mg y paracetamol 1 g. antes de la infusión.

### **CFS symptom scoring**

Before intervention, the patients assessed their CFS disease status the last three months and recorded their symptoms according to a visual analogue scale (1–10, 1: no symptom, 10: very severe symptom) (Figure S1). During follow-up, the patients recorded overall change in each symptom the preceding two weeks, as compared to baseline (Figure S2). The visual analogue scale (0–6) for the follow-up scheme was: 0: Major worsening; 1: Moderate worsening; 2: Slight worsening; 3: No change; 4: Slight improvement; 5: Moderate improvement; 6: Major improvement, similar to a Clinical Global Impression Scale used previously in CFS [6]. The patients were assessed at the outpatient clinic pre-treatment, and at 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 months follow-up. A separate scheme for physician-assessed symptom change was used, with the same scale (0–6) and recorded at all visits (Figure S3). Pre-treatment, and once every month until 10 months follow-up, the patients recorded the SF-36 short form scheme (Norwegian translation), which is a general health-related quality of life questionnaire also assessing eight subdimensions, such as e.g. physical function, bodily pain, social function and mental health. Before treatment, and at 4 months follow-up, the patients were in addition assessed by a neurologist. Patients still in clinical response were followed also after the study period of 12 months.

### **Baremación de los síntomas del SFC**

Antes de la intervención, los pacientes evaluaron su condición de enfermedad del SFC durante los últimos tres meses y anotaron sus síntomas con arreglo a una escala analógica visual del 1 al 10 (1: ningún síntoma / 10: síntoma muy grave) (figura S1). Durante el

seguimiento, los pacientes anotaron un cambio general en cada síntoma con respecto a las dos semanas anteriores, en comparación con la línea de base (figura S2). La escala analógica visual (De 0 a 6) para el esquema de seguimiento fue: 0: importante empeoramiento; 1: Moderado deterioro; 2: Leve empeoramiento; 3: Ningún cambio; 4: Leve mejoría; 5: Moderada mejora; 6: Importante mejoría, similar a una escala de impresión global clínica utilizado previamente en el SFC (6). Los pacientes fueron evaluados en el pretratamiento de clínica para pacientes ambulatorios y en 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de seguimiento. Se utilizó un esquema diferente para cambios de síntomas evaluados por médicos, con la misma escala (0-6) y anotados en todas las visitas (figura S3). Durante el tratamiento previo y una vez cada mes hasta 10 meses de seguimiento, los pacientes anotaron el esquema abreviado de SF-36 (traducción del noruego), que es un cuestionario general de calidad de vida con relación a la salud y que también evalúa ocho subdimensiones, como por ejemplo, la función física, el dolor corporal, la función social y la salud mental. Antes del tratamiento y durante 4 meses de seguimiento, los pacientes fueron evaluados además por un neurólogo. A los pacientes todavía en respuesta clínica se les hizo además un seguimiento después del período de estudio de 12 meses.

## **Response definitions and statistical analyses**

From the self-reported symptoms recorded every second week (Figure S2, scale 0–6), a Fatigue score was calculated as the mean of the four symptoms: Fatigue, Post-exertional exhaustion, Need for rest, Daily functioning. The Pain score was calculated as the mean of the two pain symptoms assessed to be characteristic for the patient (if pre-treatment level  $\geq 5$ , among Muscle pain, Joint pain, Headache, Cutaneous pain). The Cognitive score was the mean of the three symptoms: Concentration ability, Memory disturbance, Mental tiredness. The “Other symptoms score” was derived from the mean of the two symptoms assessed as characteristic for the patient's CFS disease, among those with the highest self-reported pre-treatment level. Also, the patient's self-reported overall interpretation of their CFS disease was recorded (“CFS overall score”). The Fatigue score, Pain score, Cognitive score, “CFS overall score”, and “Other symptoms score”, were plotted every second week, for each patient in separate diagrams.

## **Definiciones de respuesta y análisis estadísticos**

A partir de los síntomas comunicados que se anotaron cada segunda semana (figura S2, escala 0-6), se calculó una puntuación de fatiga como la media de los cuatro síntomas: fatiga, agotamiento Post-exertional, necesidad de descanso, funcionamiento diario. La puntuación de dolor se calculó como la media de los dos síntomas de dolor evaluada como característica del paciente (Si el nivel del pretratamiento era  $\geq 5$  entre el dolor de músculos, el dolor de articulación, el dolor de cabeza y el dolor cutáneo). La puntuación cognitiva fue la media de los tres síntomas: capacidad de concentración, trastornos de memoria y Fatiga Mental. La "calificación de otros síntomas" se deriva de la media de los dos síntomas evaluados como características de la enfermedad SFC del paciente, entre los que tienen el nivel más alto de pretratamiento comunicado. Además, se anotó la

interpretación global de la enfermedad SFC comunicada por el paciente ("puntuación total del SFC"). La puntuación de fatiga, puntuación de dolor y puntuación cognitiva: "puntuación de la SFC" y "la Puntuación de otros síntomas": fueron trazados cada dos semanas para cada paciente en diagramas separados.

The main response was defined from the Fatigue score. A major response was defined as a Fatigue score  $\geq 4.5$  for at least six consecutive weeks, also demanding recordings of some fatigue symptoms as major improvement (value 6) during the response period. A moderate response was recorded as Fatigue score  $\geq 4.5$  for at least six consecutive weeks, but without recordings of fatigue symptoms as major improvement during the response period. The ORR included both major and moderate responses. The Chi-square test of proportions was used to compare the ORR between the Rituximab and Placebo groups. Improvements in Fatigue score with duration less than six weeks were not recorded as significant responses, neither were major improvements in Cognitive, Pain or "Other symptoms" score unless followed by a significant improvement in Fatigue score.

La principal respuesta fue definida a partir de la puntuación de fatiga. Una gran respuesta se definió como  $\geq 4.5$  de puntuación de fatiga durante al menos seis semanas consecutivas, exigiendo también anotaciones de algunos síntomas de fatiga como importante mejora (valor 6) durante el periodo de respuesta. Una respuesta moderada fue registrada como puntuación de fatiga  $\geq 4.5$  durante al menos seis semanas consecutivas, pero sin anotaciones de síntomas de fatiga como importante mejora durante el período de respuesta. El ORR incluyó respuestas importantes y moderadas. La prueba "chi-cuadrado" de proporciones se utilizó para comparar la ORR entre los grupos Rituximab y Placebo. Las mejoras en la puntuación de fatiga con duración de menos de seis semanas no se registraron como respuestas significativas, tampoco fue importante la puntuación de mejoras cognitivas, dolor u "Otros síntomas" salvo que fuesen seguidas de una mejora significativa en la puntuación de fatiga.

The self-reported Fatigue scores with means for each time interval during follow-up (i.e. 16–24 weeks), and physician-assessed Fatigue scores, were plotted. The differences in distribution of Fatigue scores for the consecutive time intervals during follow-up, between the Rituximab and Placebo groups, were compared using General Linear Model (GLM) for repeated measures. Separate analyses for self-reported and physician-assessed Fatigue scores were made. Five time intervals (with mean Fatigue scores in each) were included in the analyses, and Greenhouse-Geisser adjustments were made due to significant Mauchly's tests for sphericity. Main effects for time, for the interaction between time and intervention group, and for the overall difference between groups (Rituximab versus Placebo) were assessed. In addition, the estimates for differences in Fatigue score between groups at the five time intervals during follow-up, each level compared to baseline, were generated from the GLM analyses for the interaction time by intervention group (as tests of within-subjects contrasts).

Se trazaron las puntuaciones de fatiga comunicados por los pacientes con medias para cada intervalo de tiempo durante el seguimiento (es decir, 16–24 semanas) y las puntuaciones de fatiga evaluadas por el médico. Las diferencias en la distribución de

puntuaciones de fatiga para los intervalos de tiempo consecutivos durante el seguimiento, entre los grupos Rituximab y Placebo, se compararon mediante el modelo lineal General (GLM) para medidas repetidas. Se realizaron análisis separados para las puntuaciones de fatiga comunicadas por los pacientes y las evaluadas por el médico. En los análisis se incluyeron cinco intervalos de tiempo (con puntuaciones medias de fatiga en cada uno), y se hicieron ajustes de efecto invernadero-Geisser debido a importantes pruebas de Mauchly de forma esférica. Se evaluaron los efectos principales cada vez, para la interacción entre el grupo de intervención y el tiempo y para la diferencia global entre grupos (Rituximab versus Placebo). Además, las estimaciones de las diferencias en puntuación de la fatiga entre los grupos en los cinco intervalos de tiempo durante el seguimiento, cada nivel en comparación con la línea de base, se generaron a partir del análisis GLM durante el tiempo de interacción por grupo de intervención (como pruebas de contrastes dentro de los sujetos).

The response durations were defined as the time interval, during 12 months follow-up, with continuous Fatigue score  $\geq 4.0$  and including the periods of major or moderate responses. The analyses of SF-36 short forms, with physical health summary score, mental health summary score, and scores for the eight SF-36 subdimensions, were generated from a standardised syntax file for each patient before treatment and monthly until 10 months follow-up. The changes in SF-36 scores, compared to baseline, were calculated for each patient during follow-up. For the Rituximab and Placebo groups, the mean baseline SF-36 scores, and the mean values for maximum changes in SF-36 scores during follow-up, were compared using t-tests for independent samples. The statistical analyses were performed using SPSS for Macintosh, version 19.

Las duración de las respuestas se definen como el intervalo de tiempo, durante 12 meses de seguimiento, con  $\geq 4.0$  de puntuación de fatiga continua e incluyendo los períodos de respuestas moderados o graves. Los análisis de formas cortas de SF-36, con puntuación de salud física, puntuación de salud mental y resultados de los ocho subdimensiones SF-36, se generaron desde un archivo de sintaxis estandarizada para cada paciente antes del tratamiento y mensualmente hasta 10 meses de seguimiento. Los cambios en las puntuaciones de SF-36, en comparación con la línea de base, se calcularon para cada paciente durante el seguimiento. Para los grupos de Rituximab y Placebo las puntuaciones medias instantánea SF-36 y los valores medios para los cambios máximos en las puntuaciones de SF-36 durante el seguimiento, se compararon mediante las pruebas de "t" para muestras independientes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante SPSS para Macintosh, versión 19.

## **Patient characteristics**

Between June 2008 and June 2009, 30 patients were randomised. The demographic data and CFS disease characteristics are shown in Table 1. The mean age was 37.3 years (80% female) in the Rituximab group, and 31.5 years (60% female) in the Placebo group. The mean CFS disease duration was 5.1 years in the Rituximab group and 8.1 years in the Placebo group, with maximum disease durations of 13 and 18 years, respectively. A clear or possible clinical infection preceding CFS onset could be identified in 73% and 67% of

the patients in the Rituximab and Placebo groups, respectively (Table 1). The frequencies of previous autoimmune diseases for patients and first-degree relatives are also shown (Table 1). The baseline symptom scores were derived from the baseline scheme (Figure S1, scale 1–10) as explained, and are shown in Table 2. The levels of baseline self-reported Fatigue score, Cognitive score, Pain score, “Other symptoms” score, and “CFS overall” score, were similar in the Rituximab and Placebo groups. Generally, the patients reported a relatively high level of distress for the different symptom scores, while one patient in the Placebo group reported almost no pain (score 1.3), and one patient in the Placebo group reported only mild cognitive symptoms (score 4.0) (Table 2).

## **Características del paciente**

Entre junio de 2008 y junio de 2009, se asignaron al azar 30 pacientes. En la tabla 1 se muestran los datos demográficos y las características de la enfermedad SFC. La edad promedio fue de 37,3 años (80 mujeres) en el grupo de Rituximab y 31,5 años (60 mujeres) en el grupo Placebo. La duración media de la enfermedad SFC fue 5.1 años en el grupo de Rituximab y 8,1 años en el grupo Placebo, con una duración máxima de la enfermedad de 13 a 18 años, respectivamente. Se pudo identificar una infección clínica clara o posible anterior a la aparición del SFC en 73 y 67 de los pacientes en los grupos Rituximab y Placebo, respectivamente (cuadro 1). También se muestra la frecuencia de anteriores enfermedades autoinmunes en pacientes y familiares de primer grado (tabla 1). Las puntuaciones de los síntomas b de la línea base se derivaban del esquema básico (figura S1, escala 1-10) como se ha explicado y se muestran en la tabla 2. La puntuación de los niveles de fatiga básicos autoreconocidos, la puntuación cognitiva, la puntuación de dolor, la puntuación de "Otros síntomas" y la puntuación del "SFC general", fueron similares en los grupos Rituximab y Placebo. Generalmente, los pacientes informaron de un nivel relativamente alto de angustia en la puntuación de los síntomas diferentes, mientras que un paciente en el grupo Placebo no informó de casi ningún dolor (puntuación 1.3), y un paciente en el grupo Placebo anotó sólo síntomas cognitivos leves (puntuación 4.0) (tabla 2).

	Rituximab group n = 15	Placebo group n = 15	P-value <sup>a</sup>
Age, mean (SD)	37.3 years (11.5)	31.5 years (11.4)	0.18
Women, number (%)	12 (80%)	9 (60%)	0.43
CFS disease duration, mean (range)	5.1 years (1.0–13.0)	8.1 years (0.7–18.0)	0.09
Infection before CFS onset	Defined <sup>b</sup>	8	8
	Possible	3	2
	No infection	4	5
Clinical course prior study <sup>c</sup>	Stable	9	12

Table 1

Demographic and CFS disease characteristics for patients in the Rituximab and Placebo groups.

	Rituximab group n = 15	Placebo group n = 15	P-value <sup>a</sup>
Fatigue score <sup>b</sup> , mean (range)	8.1 (7.0–9.0)	7.9 (6.0–9.3)	0.51
Cognitive score	7.7 (5.0–9.7)	7.2 (4.0–9.3)	0.31
Pain score	6.5 (4.0–9.3)	6.2 (1.3–9.0)	0.62
“Other symptoms” score	7.8 (5.5–10.0)	7.9 (5.0–10.0)	0.62
“CFS overall” score	8.3 (7.0–10.0)	7.9 (6.0–10.0)	0.29
RNase L genotype <sup>c</sup>	482 Q/Q	5	6
	482 Q/R	10	7

Table 2

Baseline self-reported symptom scores, RNase L genotype, and XMRV status, for patients in the Rituximab and Placebo groups.

Tabla 1

Características demográficas de los pacientes de la enfermedad SFC en los grupos Rituximab y Placebo.

Tabla 2

Puntuaciones de los síntomas básicos reconocidos por los pacientes, el genotipo de RNasa L y el estado XMRV, en los pacientes de los grupos Rituximab y Placebo.

## **B-lymphocytes**

Lymphocyte subpopulations, including CD19 positive B cells, were determined in EDTA anticoagulated blood samples before treatment, and during all follow-up visits (2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 months). Immunophenotyping of lymphocyte subpopulations was performed using the BD Multitest 6-color TBNK kit with BD Trucount Tubes for relative and absolute concentration determination (BD Biosciences). The samples were prepared according to the manufacturers instructions and immediately analysed on a BD Canto II flowcytometer (BD Biosciences). These data were not made available to the clinical researchers before the end of the study.

## **Linfocitos B**

Subpoblaciones de linfocitos, incluyendo los linfocitos CD19 positivos, se determinaron en muestras de sangre con anticoagulante EDTA antes del tratamiento y durante todas las visitas de seguimiento (2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 meses). El Inmunofenotipado de las subpoblaciones de linfocitos se realizó utilizando el kit TBNK de Multitest BD 6 colores con BD Trucount tubos con una determinación de concentración absoluta y relativa (BD Biosciences). Las muestras fueron preparadas con arreglo a las instrucciones del fabricante y analizadas inmediatamente en un citómetro de flujo de BD Canto II (BD Biosciences). Estos datos no estuvieron disponibles para los investigadores clínicos antes del final del estudio.

## **Quantitative PCR and PCR for XMRV and MLV, RNase L genotyping**

For details of DNA and RNA purification, cDNA synthesis, Quantitative PCR for XMRV detection, XMRV and MLV PCR, Viral amplification, and RNase L genotyping, see Text S1 and Table S1.

Other Sections ▼

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Supporting Information

References

## **Cuantitativa PCR y PCR para XMRV y MLV, genotipaje de RNasa L**

Para obtener detalles de purificación de ADN y ARN, síntesis de cDNA, PCR cuantitativa para detección XMRV, XMRV y MLV PCR, amplificación Viral y genotipaje de RNasa L, consulte texto S1 y S1 de tabla.

Otras Secciones ▼

Resumen

Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Debate

Información de soporte

Referencias

## **Results**

### **Clinical responses**

Overall response was recorded from the self-reported Fatigue scores, defined as lasting improvements for at least six consecutive weeks, independent on when the responses occurred during follow-up. A major response was detected in nine patients in the Rituximab group, and in one patient in the Placebo group ( $p = 0.002$ ). One patient in the each group achieved a moderate response, giving an total ORR of 10 patients in the Rituximab group (67%, 95%CI 41%–85%) and two patients in the Placebo group (13%, 95%CI 4%–38%),  $p = 0.003$  (Table 3).

	Rituximab group n = 15	Placebo group n = 15	P-value <sup>a</sup>	
Clinical responses <sup>b</sup>	Major	9 (60%)	1 (7%)	0.002
	Moderate	1 (7%)	1 (7%)	
	Overall	10 (67%)	2 (13%)	
95% CI	(41%–85%)	(4%–38%)		
Response duration <sup>c</sup> weeks, mean (range)	25 (9–44) n = 10	41 (16–48) n = 2		

Table 3

Clinical responses in the Rituximab and Placebo groups, and response durations for patients with significant responses, derived from self-reported Fatigue scores during 12 months follow-up.

The effect of intervention was assessed by studying the interaction effect between time and intervention group, from GLM for repeated measures of self-reported Fatigue score.



There was a significant interaction time by intervention group in favour of the Rituximab group ( $p = 0.018$ ), and an overall difference between groups ( $p = 0.045$ ) (Figure 2, panels A and B, Table S2). Similarly, in GLM for repeated measures of physician-assessed Fatigue score, the interaction time by intervention group ( $p = 0.024$ ) and the overall difference between groups ( $p = 0.021$ ) were both significant in favour of the Rituximab group (Figure 2, panels C and D, Table S2).

## **Resultados**

### **Respuestas clínicas**

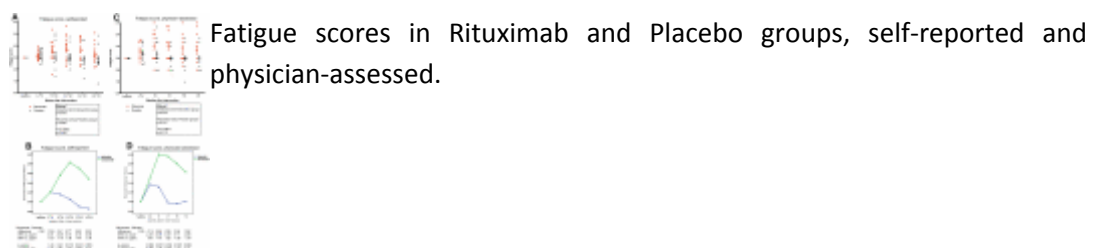
Se recogió una respuesta global de las puntuaciones de fatiga comunicadas, definidas como duraderas mejoras durante al menos seis semanas consecutivas, independientes de cuándo las respuestas se produjeron durante el seguimiento. Se detectó una gran respuesta en nueve pacientes en el grupo de Rituximab y en un paciente del grupo Placebo ( $p 0,002$ ). Un paciente en cada grupo logró una respuesta moderada, dando un total ORR de 10 pacientes en el grupo de Rituximab (67%, 95%CI 41%–85%) y dos pacientes en el grupo Placebo (13%, 95%CI 4%–38%),  $p 0,003$  (tabla 3).

#### **Tabla 3**

Las respuestas clínicas en los grupos de Rituximab y Placebo y la duración de las respuestas de los pacientes con respuestas significativas, derivan de las puntuaciones comunicadas de fatiga durante 12 meses de seguimiento.

El efecto de la intervención fue evaluado estudiando el efecto de la interacción entre el grupo de intervención y el tiempo, a partir del GLM (Modelo General Lineal) en medidas repetidas de las puntuaciones de fatiga comunicadas por los pacientes. Hubo un tiempo de interacción significativa según el grupo intervenido en favor del grupo Rituximab ( $p 0.018$ ) y una diferencia general entre grupos ( $p 0.045$ ) (figura 2, paneles A y B, tabla S2). Asimismo, en GLM para medidas repetidas de la puntuación de fatiga evaluada por el médico, el tiempo de interacción según el grupo intervenido ( $p 0.024$ ) y la diferencia global entre grupos ( $p 0.021$ ) ambos fueron significativas en favor del grupo Rituximab (figura 2, paneles C y D, tabla S2).

Figure 2



From the GLM tests of within-subjects contrasts for the interaction time by intervention group, with estimates for differences in Fatigue score between groups at the specific time intervals, there was no difference in self-reported Fatigue scores between the Rituximab and Placebo groups at the predetermined primary endpoint three months after intervention neither from self-reported nor from physician-assessed symptom scores (Figure 2, panels A–D). The differences in Fatigue scores between intervention groups were most evident between 6–10 months after intervention (Figure 2, panels A–D), i.e. corresponding to secondary endpoints of the study.

The response durations within 12 months follow-up are shown in Table 3, with mean duration 25 weeks (range 8–44) for the 10 responders in the Rituximab group. Interestingly, four patients in the Rituximab group, and one patient in the Placebo group, had response durations beyond the study period of 12 months, i.e. still Fatigue score  $\geq 4$  at 12 months. At the time of submission of this manuscript, two patients in the Rituximab group, and one patient in the Placebo group, have lasting major responses for all CFS-related symptoms without signs of relapse, 32, 30, and 23 months after intervention, respectively.

## Figura 2

### Puntuaciones de fatiga en grupos con Rituximab y Placebo, autoreconocidos y evaluados por el médico.

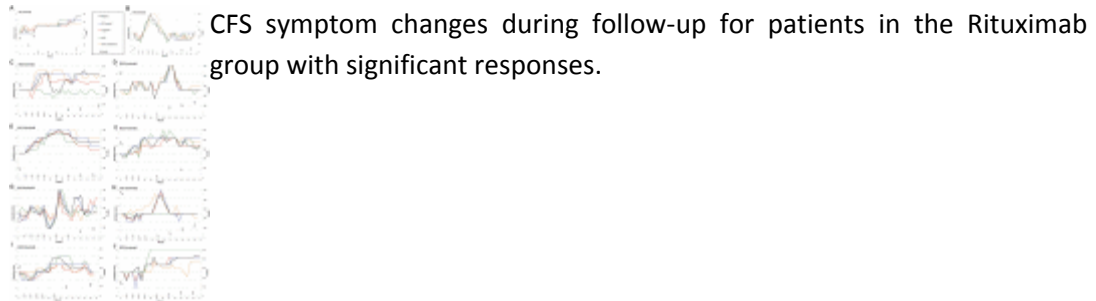
A partir de las pruebas GLM de contrastes internos de los individuos para el tiempo de interacción por grupo de intervención, con estimaciones de las diferencias en la puntuación de fatiga entre grupos en los intervalos de tiempo específicos, no hubo diferencia en las puntuaciones de fatiga comunicadas entre los grupos Rituximab y Placebo en el punto final primario predeterminado tres meses después de la intervención ni en las puntuaciones autoreconocidas ni en los síntomas evaluados por el médico (figura 2 paneles A–D). Las diferencias en las puntuaciones de fatiga entre los grupos de intervención fueron más evidentes en los 6 meses después de la intervención (figura 2, paneles A–D), es decir, correspondiente a los extremos secundarios del estudio.

La duración de las respuestas dentro de los 12 meses de seguimiento se muestra en la tabla 3, con una duración media de 25 semanas (rango 8–44) para los 10 pacientes que respondieron en el grupo de Rituximab. Curiosamente, hubo cuatro pacientes en el grupo de Rituximab y un paciente en el grupo Placebo, que tuvieron una duración de respuesta más allá del período de estudio de 12 meses, es decir, todavía puntuación de fatiga  $\geq 4$  en 12 meses. En el momento de la presentación de este manuscrito, dos pacientes en el grupo de Rituximab y un paciente en el grupo Placebo, tienen respuestas importantes y duraderas para todos los síntomas relacionados con el SFC sin signos de recaída, 23, 30 y 32 meses después de la intervención, respectivamente.

The self-reported symptoms scores were plotted every second week for each patient. These data are shown for the 10 responders in the Rituximab group (Figure 3, panels A–J),

and for the two patients with significant improvement in the Placebo group (Figure S4, panels A–B). These charts show that symptoms in all the four main categories tend to follow each other in time. Also included in these plots are the B-cell numbers during follow-up.

Figure 3



The SF-36 short form, registering health related quality of life, was filled-in by the patients at baseline and every four weeks during follow-up. Two patients in the Rituximab group did not fill in baseline SF-36 form and were excluded from these analyses, one with a major response and one with no response during follow-up. The patients reported a low baseline “physical health summary score”, with a mean value of 24 in the Rituximab and 26 in the Placebo group (scale 0–100, lower value denotes worse symptoms), while the baseline “mental health summary score” was higher with a mean value of 46 in both groups (Table 4). There were no differences in baseline levels for the different SF-36 subdimensions, except for “general health”, which was lower in the Rituximab group than in the Placebo group (Table 4). During follow-up, the maximum changes in SF-36 scores (as compared to the baseline level) were significantly different in favour of the Rituximab group, for “physical health summary score” ( $p = 0.039$ ), and the subdimensions “physical function” ( $p = 0.014$ ) and “bodily pain” ( $p = 0.005$ ), while there were trends for difference for “general health” ( $p = 0.081$ ) and “social function” ( $p = 0.081$ ). There were no differences in maximum changes (compared to baseline) during follow-up between the Rituximab and Placebo groups, for instance for the subdimensions “role emotional” ( $p = 0.44$ ) or “mental health” ( $p = 0.81$ ) (Table 4).

Las puntuaciones de los síntomas comunicados fueron trazadas cada dos semanas para cada paciente. Estos datos se refieren a los 10 pacientes que respondieron en el grupo de Rituximab (figura 3, paneles A–J) y los dos pacientes con una mejoría significativa en el grupo Placebo (figura S4, paneles A–B). Estos gráficos muestran que los síntomas en las cuatro categorías principales tienden a seguirse en el tiempo. También se incluyen en estos campos los números de células B durante el seguimiento.

**Figura 3**

**Los cambios de los síntomas del SFC durante el seguimiento de los pacientes dentro del grupo de Rituximab con respuestas significativas.**

El formulario abreviado del SF-36, registro de salud relacionado con la calidad de vida, fue rellenado por los pacientes en la línea de base y cada cuatro semanas durante el seguimiento. Dos pacientes en el grupo de Rituximab no rellenaron de forma instantánea el SF-36 y fueron excluidos de estos análisis, uno con una respuesta importante y otro sin respuesta durante el seguimiento. Los pacientes dieron un baja puntuación de "salud física" básica, con un valor medio de 24 en el grupo con Rituximab y 26 en el grupo Placebo (escala de 0 a 100, un menor valor denota unos síntomas peores), mientras que la puntuación de "salud mental" básica fue superior con un valor medio de 46 en ambos grupos (tabla 4). No hubo diferencias en los niveles de referencia para las diferentes subdimensiones del SF-36, excepto en cuanto a la "salud general", que fue menor en el grupo de Rituximab que en el grupo Placebo (tabla 4). Durante el seguimiento, los máximos cambios en las calificaciones de SF-36 (en comparación con el nivel de referencia) fueron significativamente diferentes en favor del grupo Rituximab, "puntuación de salud física" (p 0.039) y las subdimensiones "función física" (p 0.014) y "dolor corporal" (p 0.005), mientras que hubo tendencias a diferenciar "salud general" (p 0.081) y "función social" (p 0.081). No hubo diferencias en cambios máximos (frente a los de línea de base) durante el seguimiento entre los grupos Rituximab y Placebo, por ejemplo, para las subdimensiones "papel emocional" (p 0,44) o "salud mental" (p 0,81) (cuadro 4).

		Rituximab group n = 13 <sup>b</sup>	Placebo group n = 15	p-value <sup>a</sup>
Physical health summary score	baseline, mean (SD)	24 (5)	26 (6)	0.41
	max change <sup>c</sup> , mean (SD)	54% (46)	20% (17)	0.039
Mental health summary score	baseline, mean (SD)	46 (11)	46 (8)	0.99
	max change, mean (SD)	9% (5)	5% (3)	0.84
Physical function	baseline, mean (SD)	34 (8)	35 (7)	0.71
	max change	39% (33)	11% (22)	0.014

Table 4

**SF-36 scores, baseline levels (0–100) and maximum changes (%) during follow-up, for patients in the Rituximab and Placebo groups.**

In spite of written and verbal information to avoid pregnancy, one patient was pregnant after 28 weeks follow-up. The randomisation code for this patient was then revealed. She was allocated to the placebo group and was withdrawn from further follow-up registration after 28 weeks. One patient decided to withdraw from the study after 42 weeks follow-up to start alternative therapy. This patient proved also to be allocated to the placebo group.

**Tabla 4**

**Puntuaciones del SF36, niveles de referencia (de 0 a 100) y cambios máximos (%) durante el seguimiento de los pacientes en los grupos Rituximab y Placebo.**

A pesar de la información verbal y por escrita para evitar el embarazo, una paciente estaba embarazada después del seguimiento de 28 semanas. Entonces fue revelado el código de asignación al azar para esta paciente. Ella fue asignada al grupo de placebo y fue retirada del registro de seguimiento posterior después de 28 semanas. Un paciente

decidió retirarse del estudio después de 42 semanas de seguimiento para iniciar una terapia alternativa. Este paciente resultó también ser asignado al grupo de placebo.

#### Adverse effects

Infusion-related complaints and side-effects during 12 months follow-up are listed in Table 5. There were no serious adverse events or major toxicity. The complaints during infusion or the following day were mild and also reported by the placebo patients (five in the Rituximab group and four in the Placebo group). Two patients in each group reported slight worsening of CFS the first two months after intervention (Table 5). Two patients in the Rituximab group reported feeling uneasy and sleepless from 2–7 and 6–8 months, respectively, synchronous with a clear clinical response. Two patients in the Rituximab group with pre-existing psoriasis experienced moderate psoriasis worsening from two months after intervention, in both preceding a clinical response of CFS. One patient in the Rituximab group had a five years history of major CFS symptoms, and reported some lower back pain and episodes of balanitis from 5–7 months, synchronous with improvement of his CFS-related muscle pain and headache and with improving fatigue and cognitive function. His low back pain disappeared, and after the 12 month study period his CFS symptoms have resolved further and he is at present back in full-time work 30 months after intervention.

#### Efectos adversos

Las quejas relacionadas con la infusión y efectos secundarios durante 12 meses de seguimiento se muestran en la tabla 5. No hubo eventos adversos graves ni toxicidad importante. Las quejas durante la infusión o al día siguiente fueron leves y también denunciados por los pacientes con placebo (cinco en el grupo de Rituximab) y cuatro en el grupo Placebo. Dos pacientes en cada grupo informaron de un leve empeoramiento de SFC los dos primeros meses después de la intervención (tabla 5). Dos pacientes en el grupo de Rituximab informaron sentirse incómodos y con desvelos de 2 a 7 y de 6 a 8 meses respectivamente, sincronizados con una clara respuesta clínica. Dos pacientes en el grupo de Rituximab con psoriasis preexistente experimentaron empeoramiento de la psoriasis moderada dos meses después de la intervención, en los dos anteriores hubo una respuesta clínica de SFC. Un paciente en el grupo de Rituximab tenía un historial de cinco años de los principales síntomas del SFC e informó de algún dolor de la parte baja de la espalda y episodios de balanitis de 5 meses, simultáneos a una mejora de su dolor muscular relacionada con el SFC y dolor de cabeza y una mejora de la función cognitiva y la fatiga. Desapareció su dolor lumbar y después del período de estudio de 12 meses se han resuelto aún más sus síntomas de SFC y ha vuelto al trabajo a tiempo completo 30 meses después de la intervención.

	Rituximab group n = 15	Placebo group n = 15
Infusion-related complaints		
Palpitations	1 (7%)	1 (7%)
Slight itching	2 (13%)	0
Nausea	0	1
Discomfort	2 (13%)	2 (13%)
Slight CFS worsening the first two months	2 (13%)	2 (13%)
Irregular menstrual bleeding the first two months	1 (7%)	0
Feeling uneasy and sleepless	0-8	1 (7%)

Table 5

**Infusion-related complaints during or the first 24 hours after infusion, and side-effects during 12 months follow-up, in the Rituximab and Placebo groups.**

There were some uncomplicated upper airways infections and lower urinary tract infections during follow-up, evenly distributed between the two groups. There were two hospitalisations during the study period within 12 months follow-up, one in the Rituximab group due to abdominal pain where a laparoscopy showed a corpus luteum cyst interpreted as a normal finding, and one in the Placebo group due to a myocardial infarction.

**Tabla 5**

**Las quejas relacionadas con la toma o en las primeras 24 horas después de la infusión y los efectos secundarios durante los 12 meses de seguimiento, en los grupos Rituximab y Placebo.**

Hubo algunas infecciones de las vías respiratorias superiores sin complicaciones y las infecciones del tracto urinario inferior durante el seguimiento, distribuidas equitativamente entre los dos grupos. Hubo dos hospitalizaciones durante el período de estudio dentro de los 12 meses de seguimiento, uno en el grupo de Rituximab debido a un dolor abdominal donde una laparoscopia mostró un quiste de cuerpo lúteo interpretado como un hallazgo normal y uno en el grupo Placebo debido a un infarto de miocardio.

**XMRV**

In this study, XMRV could not be detected in any of the 30 patients, using four Taqman quantitative PCR setups, and four nested PCR approaches (Text S1 and Table S1), and using both genomic DNA and cDNA from baseline blood samples as templates. When performing coculture of patient lymphocytes with LNCaP prostate cancer cells for biological amplification prior to PCR, XMRV was not detected in any sample. The positive control was readily amplified in all setups, and both sensitivity and specificity of the Taqman assays proved to be high, detecting 5–15 viral copies per vial with dilution series of the plasmid **spiked** in normal genomic DNA background (data not shown). For details on analyses, see Supporting information.

**RNase L**

Results from genotyping of the RNase L Q462R variant are shown in Table 2. Two patients in the Placebo group had the 462 R/R genotype. The distribution of the Q/Q, Q/R, and R/R alleles was close to that expected in the general population.

**XMRV**

En este estudio, no se pudo detectar XMRV en ninguno de los 30 pacientes, utilizando cuatro configuraciones PCR cuantitativas Taqman y cuatro enfoques PCR anidados (texto S1 y S1 de la tabla) y utilizando tanto ADN genómico y cDNA de muestras de sangre de referencia como plantillas. Al realizar un cultivo de los linfocitos de pacientes con células de cáncer de próstata de Du145 para una amplificación biológica anterior a la PCR, no fue detectado XMRV en ninguna muestra. El control positivo fue amplificado fácilmente en todas las configuraciones, y la sensibilidad y la especificidad de los ensayos de Taqman resultaron ser altos, detectando de 5 a 15 copias virales por vial con series de dilución del plásmido diluido en un fondo normal de ADN genómico (datos no mostrados). Para obtener detalles sobre los análisis, ver información de apoyo.

### **RNasa L**

Los resultados del genotipo de la variante RNasa L Q462R se muestran en la tabla 2. Dos pacientes en el grupo Placebo tenían el genotipo RR 462. La distribución de los alelos QQ, QR y RR estaba cerca de la esperada en la población general.

### **B-lymphocytes**

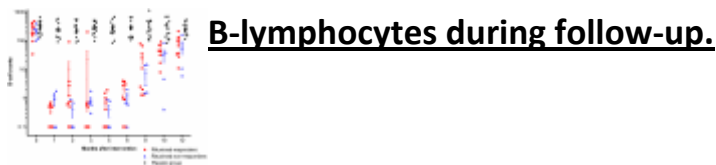
Results from immunophenotyping with B-cell counts, for patients in the Rituximab group (responders and non-responders) and the Placebo group, from baseline and at all visits at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 months, are shown in Figure 4. At baseline, three out of 30 patients had a B-cell count below the normal range (110–449×10<sup>6</sup>/L). All patients in the Rituximab group were B-cell depleted at one month after the intervention, except for one patient in which B-cells were not adequately depleted until four months after intervention (Figure 4). During follow-up, there were no differences in B-cell levels between patients in the Rituximab group achieving a response (n = 10), and those with no significant response (n = 5) (Figure 4). Many patients treated with Rituximab were not completely B-cell depleted, with values in the range 0–4 (×10<sup>6</sup>/L) (Figure 4). After two infusions of Rituximab two weeks apart, the B-cell levels started to increase from 4–8 months after intervention, and four out of 15 patients had regained B-cell counts in the normal range at the end of follow-up at 12 months. We also performed Taqman qPCR for the B-cell specific CD19 molecule, normalised according to β-actin mRNA, at baseline and during follow-up at 4, 6 and 8 months. These data confirmed the B-cell depletion in Rituximab-treated patients but could not separate the Rituximab responders and non-responders (data not shown).

### **Linfocitos B**

Los resultados del Inmunofenotipado con recuentos de células B, para los pacientes en el grupo de Rituximab (los que respondieron y los que no) y para los pacientes del grupo de Placebo, desde la línea de base y en todas las visitas en 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 meses, se muestran en la figura 4. En la línea de base, tres de 30 pacientes tuvieron un recuento de células B por debajo del rango normal (110–449 × L 106). Todos los pacientes en el grupo de Rituximab mostraron las células b agotadas en un mes después de la intervención, salvo un paciente en el que las células b no se agotaron suficientemente hasta cuatro

meses después de la intervención (figura 4). Durante el seguimiento, no hubo diferencias en los niveles de células b entre pacientes del grupo de Rituximab que lograron una respuesta (n=10) y los que no tuvieron ninguna respuesta significativa (n=5) (figura 4). Muchos pacientes tratados con Rituximab no se quedaron completamente agotados de células B, con valores en el rango 0-4 ( $\times L 106$ ) (figura 4). Después de dos tomas de Rituximab en dos semanas, los niveles de células b comenzaron a aumentar de 4 a 8 meses después de la intervención, y cuatro de 15 pacientes habían recuperado recuentos de células b en el rango normal al final del seguimiento de 12 meses. También realizamos Taqman qPCR para la molécula de CD19 específica de células B, normalizada según  $\beta$ -actina MARN, en la línea de base y durante el seguimiento de 4, 6 y 8 meses. Estos datos confirman el agotamiento de células b en pacientes tratados con Rituximab pero no se pudo separar a los que repondieron al Rituximab de los que no (datos no mostrados).

Figure 4



Other Sections ▼

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Supporting Information

References

## **Discussion**

In this double-blind and placebo-controlled study, treatment with Rituximab (two infusions two weeks apart) was associated with a significant overall clinical response during 12 months follow-up, as compared to placebo using saline. The ORRs were 67% in the Rituximab group and 13% in the Placebo group.

From GLM for repeated measures, there were significant interactions between time and intervention group in favour of the Rituximab group both for self-reported and physician-assessed Fatigue scores. The differences were most evident corresponding to secondary endpoints between 6 and 10 months after intervention. However, at the predetermined primary endpoint, defined as effect on CFS symptoms (Fatigue score) at three months



after intervention, there was no difference between the groups.

The change in Fatigue scores was chosen as the main criterion for clinical response because this is a key symptom defining the CFS disease. However, with few exceptions, the different symptoms scores (Fatigue, Cognitive, Pain, "Other symptoms", "CFS overall") followed each other during responses and relapses, indicating that a central mechanism for the symptom maintenance is influenced by the B-cell depletion treatment.

## **Debate**

En este estudio doble ciego y controlados con placebo, el tratamiento con Rituximab (dos tomas cada dos semanas) se asoció con una significativa respuesta clínica general durante 12 meses de seguimiento, en comparación con placebo de solución salina. Los ORRs fueron 67 en el grupo de Rituximab y 13 en el grupo Placebo.

De GLM para medidas repetidas, hubo importantes interacciones entre tiempo y grupo de intervención en favor del grupo Rituximab tanto en las puntuaciones de fatiga comunicadas como en las evaluadas por el médico. Las diferencias más evidentes fueron las correspondientes a los extremos secundarios entre 6 y 10 meses después de la intervención. Sin embargo, en el extremo principal predeterminado, definido como el efecto sobre los síntomas de SFC (puntaje de fatiga) en tres meses después de la intervención, no hubo diferencias entre los grupos.

El cambio en las puntuaciones de fatiga fue elegido como el criterio principal para una respuesta clínica porque éste es un síntoma clave de definición de la enfermedad SFC. Sin embargo, con pocas excepciones, las puntuaciones de los diferentes síntomas (fatiga, cognitiva, dolor, "Otros síntomas", "SFC general") se siguieron unos a otros durante las respuestas y recaídas, indicando que un mecanismo central para el mantenimiento del síntoma está influenciado por el tratamiento del agotamiento de las células b.

For the 10 Rituximab responders, the response durations varied from 8–44 weeks (within the 12 month study period). These responses were considered to have a significant impact on symptom improvement and quality of life by the patients, by their families, and by the treating physicians. Importantly, four patients in the Rituximab group and one in the Placebo group had response durations beyond 12 months. When submitting this manuscript, two patients in the Rituximab group and one in the Placebo group have lasting major responses with no signs of relapse and are back in full-time work. Two of these patients (one in each group) had the shortest disease durations, 1.0 and 0.7 years, respectively, and in both CFS was preceded by Epstein-Barr infection. These two lasting responses may be examples of spontaneous recovery [7]. The third "long-time responder" with no later relapse had a 5-year history with major CFS symptoms before entering the study.

This study with the primary endpoint at three months after intervention was designed when we had very limited experience with B-cell depletion in CFS, having observed only two pilot patients, both with an early response pattern. In the pilot case series [4] the third patient had major response occurring from 5 ½ until 9 months after intervention,

and with an almost identical response and relapse pattern after her second Rituximab treatment. In the present study, only one out of 10 responders in the Rituximab group had an “early” response pattern with the major response starting from 2 months, while the remaining nine responded later, starting to improve from between 3–7 months after treatment.

Para los 10 pacientes que respondieron a Rituximab, las duración de respuesta variaba de 8 a 44 semanas (dentro del período de estudio de 12 meses). Estas respuestas se consideraron que tenían un impacto significativo en la mejora de los síntomas y calidad de vida por parte de los pacientes, sus familias y los médicos que les trataban. Lo importante es que cuatro pacientes en el grupo de Rituximab y uno en el grupo Placebo tuvieron una duración de respuesta más allá de 12 meses. Al presentar este manuscrito, dos pacientes en el grupo de Rituximab y uno en el grupo Placebo tienen importantes respuestas duraderas sin signos de recaída y están de regreso en el trabajo a tiempo completo. Dos de estos pacientes (uno en cada grupo) tenían la duración de enfermedad más cortas, 0.7 y 1.0 años, respectivamente y en ambos el SFC fue precedido por infección de Epstein-Barr. Estas dos respuestas duraderas pueden ser ejemplos de recuperación espontánea (7). El tercer paciente con un historial de la enfermedad más antigua y que no sufrió ninguna recaída posterior tenía un historial de 5 años con síntomas importantes del SFC antes de entrar en el estudio.

Este estudio con el extremo principal de tres meses después de la intervención fue diseñado cuando teníamos muy poca experiencia sobre el agotamiento de los linfocitos b en el SFC, habiendo observado sólo dos pacientes pilotos, ambos con un patrón de respuesta temprana. En la serie de casos pilotos (4) el tercer paciente tuvo una respuesta importante que tuvo lugar desde el 5 ½ hasta 9 meses después de la intervención y con una respuesta y patrón de recaída casi idénticos después de su segundo tratamiento con Rituximab. En el presente estudio, sólo uno de los 10 pacientes que respondieron en el grupo de Rituximab tuvieron un patrón de respuesta “temprano” con una respuesta importante a partir de los 2 meses, mientras que los restantes nueve respondieron después, comenzando a mejorar a partir de entre los 3 y 7 meses después del tratamiento.

The SF-36 short form analyses before intervention confirmed a low quality of life particularly for the dimensions related to physical health, while the subdimensions “mental health” and “role emotional” showed higher baseline values. In support for the overall clinical response data, SF-36 analyses during follow-up demonstrated significant differences in favour of the Rituximab group in maximum changes compared to baseline level, for several subdimensions related to physical health, such as “physical health summary score”, “physical function” and “bodily pain”. There were no significant differences between the groups in maximum changes for in the subdimensions “mental health” or “role emotional”. These results support the assumption that CFS is not primarily a mental health disease.

Los análisis breves del SF-36 antes de la intervención confirmaron una baja calidad de vida, especialmente para las dimensiones relacionadas con la salud física, mientras que el

subdimensiones "salud mental" y "rol emocional" mostraron los valores más altos de línea de base. En apoyo a los datos de respuesta clínica general, los análisis del SF-36 durante el seguimiento demostraron diferencias significativas en favor del grupo Rituximab en máximos cambios con respecto al nivel básico para varias subdimensiones relacionadas con la salud física, tales como "puntaje de salud física", "función física" y "dolor corporal". No hubo diferencias significativas entre los grupos de máximos cambios en las subdimensiones "salud mental" o "rol emocional". Estos resultados apoyan la hipótesis de que el CFS no es principalmente una enfermedad de salud mental.

The lack of specific markers of disease and the fact that the CFS diagnosis is controversial imply that the level of diagnostic accuracy and adherence to international criteria are likely to be variable. In this study, patients have been recruited from a tertiary referral centre and were re-evaluated by the researchers, using the Fukuda criteria for inclusion. Retrospectively, we checked the 30 patients according to the Clinical Working Case Definition ("Canadian criteria") [8]. Two patients in the placebo group did not fulfil these criteria, and it could therefore be argued that they might not have CFS. One of these had almost no pain, and one had only slight cognitive symptoms and also reported marked mood disturbances. The latter patient reported major improvement after intervention with saline and was recorded as one of the two responders in the Placebo group. Generally, the patients reported a high level of disease-related symptoms prior to entering the study, with major impact on daily life and ability to participate in family and social activities. Most of the patients had a long CFS disease duration, also with a stable or worsening clinical course the last year before study entry.

La falta de marcadores específicos de la enfermedad y el hecho de que el diagnóstico del SFC es controvertido implica que el nivel de precisión de diagnóstico y adhesión a los criterios internacionales suelen ser variables. En este estudio, los pacientes han sido contratados desde un centro de referencia terciario y fueron reevaluados por los investigadores, utilizando los criterios de Fukuda para su inclusión. Retrospectivamente, comprobamos los 30 pacientes de acuerdo a la Definición del Caso de Trabajo Clínico ("criterios canadienses") (8). Dos pacientes en el grupo placebo no cumplían con estos criterios y, por lo tanto, podría argumentarse que no pudieran tener SFC. Uno de ellos no tenía casi ningún dolor, y uno tenía sólo leves síntomas cognitivos y también informó de marcados cambios de humor. El último paciente informó de una importante mejoría después de la intervención con solución salina y fue registrado como uno de los dos equipos de respuesta en el grupo Placebo. Generalmente, los pacientes informaron de un alto nivel de síntomas relacionados con la enfermedad antes de entrar en el estudio, con gran impacto en la vida cotidiana y la capacidad para participar en actividades sociales y de familia. La mayoría de los pacientes tuvieron una larga duración de la enfermedad SFC, también con un curso clínico estable o empeoramiento el año pasado antes del ingreso al estudio.

A limitation of this study is the lack of predetermined exact definitions of clinical response with respect to duration and extent of improvement. Limited experience with the clinical course of CFS after B-cell depletion when designing the protocol, with erroneous estimation of time frame for the clinical responses, is a main reason why the primary end-

point is negative. Therefore, even though this is a randomised, double-blind and placebo-controlled study, there are also exploratory elements with respect to response characterization.

Even when interpreting the results with caution, there are obvious differences between the two groups in favour of the Rituximab group, from the significant interactions time by intervention group and also from difference in ORR. Thus, we have shown that in a subset of CFS patients, Rituximab treatment with subsequent B-cell depletion results in major responses of CFS related symptoms, with responses starting to occur between 2 and 7 months after intervention, and with response durations of 2–15 months and in addition two patients with no relapse. Five patients in the Rituximab group did not achieve a significant response during follow-up. Whether their CFS pathogenesis are unrelated to B-lymphocytes, or whether they could achieve a clinical response through prolonged B-cell depletion with Rituximab maintenance therapy is at present unknown.

Una limitación de este estudio es la falta de definiciones exactas predeterminadas de respuesta clínica con respecto a la duración y el grado de mejora. Una experiencia limitada en el curso clínico del SFC después del agotamiento de los linfocitos b al diseñar el Protocolo, con estimación errónea de los plazos para las respuestas clínicas, es una razón principal por la que el punto principal es negativo. Por lo tanto, a pesar de que se trata de un estudio aleatorio, doble ciego y controlado con placebo, también hay elementos exploratorios con respecto a la caracterización de la respuesta.

Incluso al interpretar los resultados con cautela, hay diferencias obvias entre los dos grupos en favor del grupo Rituximab, desde el momento de las interacciones significativas por el grupo de intervención y también de la diferencia de ORR. Así, hemos demostrado que en un subconjunto de pacientes del SFC, el tratamiento con Rituximab con posteriores resultados de agotamiento de células b en importantes respuestas de síntomas relacionados con el SFC, con respuestas que comienzan a producirse entre 2 y 7 meses después de la intervención y con una duración de respuesta de meses y además con dos pacientes sin ninguna recaída. Cinco pacientes en el grupo de Rituximab no lograron una respuesta significativa durante el seguimiento. Se desconoce en este momento si sus agentes patógenos del SFC no están relacionados con los linfocitos B, o si podría lograr una respuesta clínica a través de un agotamiento prolongado de las células b con terapia de mantenimiento Rituximab.

The associations between B-cell depletion and clinical responses, and the time frames for clinical responses delayed 2–7 months after the initial and rapid B-cell depletion, indicate that CFS may be an autoimmune disease, often preceded by an infection, and targeting specific parts of the nervous system. We speculate that the responses occurring late after intervention could be explained by the elimination of disease-associated autoantibodies, while the early response pattern could be related to interaction of B-cells with T-cells in antigen presentation, as suggested in systemic lupus erythematosus [9]. Work is in progress in our laboratory to elucidate the localization and nature of a putative target for an autoimmune process.

The high rate of CFS in women compared to men is a suggestion of an underlying

autoimmune process. On-going autoimmune phenomena in CFS have been discussed [10] perhaps triggered by infections through molecular mimicry, through structural similarity between a pathogen component and self-structures [11]. Several autoantibodies have been reported in CFS, but their pathogenic roles have not been established, for a review see [10]. In the present study, 23% of the patients had a previous known autoimmune disease, and 40% had first-degree relatives with an autoimmune disease. However, there were low frequencies of positive known common autoantibodies, none had elevated anti-nuclear antibodies, and two had elevated anti-thyroid peroxidase antibodies (data not shown). A possible or established clinical infection before CFS onset was identified in 21 out of 30 patients included (70%).

La asociación entre el agotamiento de células b y las respuestas clínicas, y los plazos para las respuestas clínicas retrasados de 2 a 7 meses después de la disminución de células b inicial y rápida, indican que el **SFC puede ser una enfermedad autoinmune, a menudo precedida por una infección y que tiene como objetivo partes específicas del sistema nervioso**. Especulamos que las respuestas que ocurren bastante después de la intervención podrían explicarse por la eliminación de los autoanticuerpos asociados a la enfermedad, mientras que el patrón de respuesta temprana puede estar relacionado a la interacción de las células b con las células t en la presentación de antígeno, como se sugiere en el lupus eritematoso sistémico (9). Se está trabajando en nuestro laboratorio para dilucidar la localización y la naturaleza de un supuesto destino para un proceso autoinmune.

La alta tasa del SFC en mujeres en comparación a los hombres es una sugerencia de un proceso autoinmune subyacente. Se han estudiado fenómenos autoinmunes continuos del SFC (10) quizás provocados por infecciones a través de mimetismo molecular, a través de la similitud estructural entre un componente del agente patógeno y las autoestructuras (11). Se ha informado de varios autoanticuerpos en el SFC, pero no se han establecido sus roles patógenos, para una revisión véase (10). En el presente estudio, 23 de los pacientes tenían una enfermedad autoinmune conocida anterior y 40 tenían parientes de primer grados con una enfermedad autoinmune. Sin embargo, hubo bajas frecuencias de positivos conocidos autoanticuerpos comunes, ninguno tenía elevados anticuerpos antinucleares y dos tenían elevados anticuerpos **anti-thyroid peroxidasa** (datos no mostrados). **Una infección clínica posible o establecida antes de la aparición del SFC fue identificada en 21 de los 30 pacientes incluidos (70%).**

A recent study of cytokine patterns in CFS showed attenuated Th1 and Th17 immune responses, while there was high Th2 marker expression [12]. A Th2 profile with increase in the numbers of CD4+ and CD8+ T cells secreting IL-4 following polyclonal stimulation, including in resting cells, was demonstrated in CFS patients [13].

There are limited data on the role of B-lymphocytes in CFS. One study of gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicated that B cells might be altered in CFS [14]. Our pilot case series [4] suggested that B-cell depletion was associated with clinical improvement in CFS patients. B-cell targeting therapy has been increasingly used for diverse autoimmune diseases in later years [15]. The monoclonal anti-CD20 antibody

Rituximab has been the major B-cell depleting agent so far. The B-cells have multiple immune functions, the main ones being antibody production, antigen presentation and regulation of the function and activity of other immune cells, i.e. T-regulatory cells, NK cells and macrophages [16]. Thus, the total effects of B-cell depletion on the immune system are likely to be complex and time-dependent.

Un reciente estudio de patrones de citoquinas en el SFC mostró respuestas inmunes atenuadas de Th1 y Th17, mientras que hubo una alta expresión del marcador Th2 12. Se demostró en pacientes CFS 13 un perfil Th2 con aumento del número de células CD4 y CD8 T que segregan IL-4 tras estimulación policlonal, incluyendo las células de reposo,.

Existen datos limitados sobre el papel de los linfocitos b en el SFC. Un estudio de la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica indica que las células b pueden estar alteradas en el SFC (14). Nuestra serie de casos piloto (4) sugirió que **el agotamiento de células b se asociaba con la mejoría clínica en pacientes del SFC**. La terapia de orientación de células b ha sido cada vez más usada para diversas enfermedades autoinmunes en los últimos años (15). El anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab ha sido el principal agente de agotamiento de células b hasta ahora. **Los linfocitos b tienen múltiples funciones inmunitarias, las principales son la producción de anticuerpos, la presentación de antígeno y la regulación de la función y la actividad de otras células inmunes, es decir, las células T reguladoras, las células NK y los macrófagos** (16). Así, los efectos totales de agotamiento de los linfocitos b sobre el sistema inmunológico suelen ser complejos y dependientes del tiempo.

In Stiff Person Syndrome, which is a rare autoimmune disease in the central nervous system with autoantibodies targeting glutamic acid decarboxylase (GAD65), the humoral autoimmune response was shown to consist of a Rituximab-sensitive part rapidly cleared after treatment, and a Rituximab-resistant part from long-lived and persistent plasma cells acting as a reservoir for secretion of autoantibodies. This may be one mechanism for lack of effect from B-cell depletion therapy [17].

An alternative explanation for the observed clinical improvement from B-cell depletion could be elimination or reduction of B-lymphotrophic viruses such as cytomegalovirus (CMV) or Epstein-Barr virus (EBV). A recent study [18] showed clinical benefit from long-term valganciclovir or valganciclovir treatment in a subset of CFS patients with evidence of active on-going herpes virus infections, also shown in a previous small study of 12 patients with elevated antibodies to EBV or human herpes virus 6 (HHV-6) [19]. We find the delayed clinical responses after B-cell depletion, that we observed in the majority of responders, difficult to explain from a viral elimination mechanism. In our opinion, this response pattern is more compatible with the gradual elimination of an autoantibody, perhaps by preferential elimination of short-lived pre-plasma cells. Although poorly understood, immune system alterations seen in stress-related diseases such as post-traumatic stress disorder could also be relevant for the effects of B-cell depletion seen in CFS [20].

En el “síndrome de persona rígida”, que es una rara enfermedad autoinmune en el sistema nervioso central con autoanticuerpos contra la descarboxilasa de ácido glutámico

(GAD65), la respuesta humoral autoinmune se demostró que consiste en una parte sensible de Rituximab que desaparece rápidamente después del tratamiento y una parte de Rituximab resistente procedente de células de plasma de larga duración y persistentes que actúan como reserva de secreción de autoanticuerpos. Esto puede ser un mecanismo para la falta de efectividad de la terapia frente al agotamiento de las células b (17).

Una explicación alternativa de la mejoría clínica observada a partir del agotamiento de los linfocitos b podría ser la eliminación o reducción de los virus B-linfotróficos tales como citomegalovirus (CMV), Epstein - Barr virus (EBV). Un estudio reciente (18) mostró beneficios clínicos del tratamiento a largo plazo de valaciclovir o valganciclovir en un subconjunto de pacientes del SFC con evidencia de infecciones virales de herpes activo que se mantenía y que también se muestra en un breve estudio anterior de 12 pacientes con anticuerpos elevados a EBV o virus del herpes humano 6 (HHV-6) (19). Encontramos las respuestas clínicas retardadas tras el agotamiento de los linfocitos B que hemos observado en la mayoría de los pacientes que respondieron, difíciles de explicar en un mecanismo de eliminación viral. En nuestra opinión, este patrón de respuesta es más compatible con la eliminación gradual de un anticuerpo, quizás por eliminación preferencial de células pre-plasma corta. Aunque mal entendido, **las alteraciones del sistema inmunológico en enfermedades relacionadas con el estrés como trastorno por estrés postraumático también podrían ser relevantes para los efectos del agotamiento de células b visto en el SFC (20).**

In this study there were no serious adverse events. Two hospitalisations (one in each group) during follow-up were not perceived to be caused by the intervention. There were no serious infections. Two patients in the Rituximab group (both responders) had a slight to moderate worsening of pre-existing psoriasis, which could be a direct side-effect from the intervention. Two patients in the Rituximab group (also responders) felt uneasy and sleepless while improving in CFS symptoms. These symptoms are not usual side effects from treatment of B-cell lymphomas and may be related to the effects of B-cell depletion on the underlying CFS disease rather than direct side-effects from Rituximab. The infusion-related complaints were generally mild and reported both from the Rituximab and Placebo groups. Interestingly, no side-effects during follow-up were reported from the five non-responders in the Rituximab group.

Current use of Rituximab in autoimmune diseases has been discussed [21], and a recent review on the safety in rheumatoid arthritis concluded that Rituximab is well tolerated with no increasing rate of serious infections [22]. Even if serious side-effects including reactivation of viral infections such as hepatitis B are very rare, they may appear [23]. A study reviewing progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) cases in patients treated with Rituximab, from available databases including the Food and Drug Administration, the manufacturer, physicians, and including a literature review from 1997–2008, identified 52 patients with lymphoproliferative disorders and five patients with autoimmune diseases [24]. All had received either chemotherapy or other immunosuppressive treatment in addition to Rituximab, and to our knowledge PML has not been reported in patients receiving Rituximab monotherapy. The absolute risk of PML is difficult to estimate, but is very low.

En este estudio no hubo ningún evento adverso grave. Dos hospitalizaciones (uno en cada grupo) durante el seguimiento no fueron percibidas como que fueran causadas por la intervención. No hubo ninguna infección grave. Dos pacientes en el grupo de Rituximab (ambos “respondedores”) tuvieron un ligero empeoramiento moderado de psoriasis preexistente, que podría ser un efecto secundario directo de la intervención. Dos pacientes en el grupo de Rituximab (también “respondedores”) sintieron incomodidad y desvelo mientras mejoraban los síntomas del SFC. Estos síntomas no son habituales efectos secundarios del tratamiento de linfomas de células b y pueden estar relacionados con los efectos del agotamiento de los linfocitos b en la enfermedad subyacente del SFC más que directos efectos secundarios de Rituximab. Las quejas relacionadas con la toma fueron generalmente leves y se informaron tanto desde los grupos Rituximab como del Placebo. Curiosamente, los efectos secundarios durante el seguimiento no se informaron por parte de los cinco no respondedores en el grupo de Rituximab.

Se ha discutido el uso actual de Rituximab en enfermedades autoinmunes (21), y una revisión reciente sobre la seguridad en la artritis reumatoide llegó a la conclusión de que Rituximab es bien tolerado sin ningún aumento de la tasa de infecciones graves (22). Incluso aunque puedan aparecer graves efectos secundarios incluyendo reactivación de infecciones virales como la hepatitis b, son muy raros (23). Un estudio que revisó casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML) en pacientes tratados con Rituximab, desde bases de datos disponibles incluyendo la Food and Drug Administration, el fabricante, los médicos e incluso una revisión de la literatura de 1997–2008, identificaron 52 pacientes con trastornos linfoproliferativos y cinco pacientes con enfermedades autoinmunes (24). Todos habían recibido quimioterapia u otros tratamientos inmunosupresores además de Rituximab y, que nosotros sepamos, no se ha informado que haya PML en los pacientes que recibieron monoterapia con Rituximab. El riesgo absoluto de PML es difícil de estimar, pero es muy bajo.

Although B-cell depletion has a major impact on the immune system, it can be argued that the persistent and often devastating symptoms of CFS and the very low quality of life in many sufferers justify the use of Rituximab in carefully evaluated CFS patients.

There has been an intense focus on XMRV as a possible causal gammaretroviral infection in CFS patients since the first report in October 2009 [25]. One later study demonstrated presence of closely related MLV in CFS patients [26]. However, several other studies have not been able to reproduce these findings and reported no evidence for XMRV infection in CFS, as examples [27]–[30]. We have not been able to demonstrate XMRV or MLV infection in any of the 30 patients included in this study, despite multiple different approaches including four different highly sensitive Taqman qPCR and four nested PCR approaches, and using both genomic DNA and cDNA as templates. We also performed coculture of patient peripheral blood mononuclear cells with LNCaP prostate cancer cells for biological virus amplification prior to PCR, also with no XMRV positive cases.

In conclusion, we have shown that B-lymphocyte depletion with the monoclonal anti-CD20 antibody Rituximab, two infusions two weeks apart, is associated with significant,



though generally transient clinical responses, with CFS symptom improvement in two thirds of the included patients. No major toxicity was observed in 12 months follow-up. Even though this study is small, it is a randomised, double-blind, and placebo-controlled study showing significant differences in favour of the Rituximab group, and with general improvement of all CFS symptoms. Thus, we believe that B-cell depletion targets a central player in the pathogenesis of the CFS disease, directly or indirectly. Whether this mechanism applies to specific subsets of CFS patients or the group as a whole is a subject for further research. While this study can be interpreted as preliminary, being the first to describe the treatment principle in CFS except for our pilot case series [4], we believe the results are best compatible with an autoimmune disease mechanism and that the presented findings may have a major impact on the direction of biomedical research in CFS. Based on new pilot patient experiences, we have now started two new open-label phase-II studies investigating Rituximab treatment with two infusions two weeks apart (as in the present study) followed by maintenance Rituximab infusions at 3, 6, 10 and 15 months, to further explore this treatment principle in CFS (ClinicalTrials.gov, NCT01156909 and NCT01156922). The present study may be interpreted as a “proof of principle”. The next studies will indicate to what extent the patients actually over time may recover through B-cell depletion treatment.

**Aunque el agotamiento de los linfocitos b tiene un gran impacto sobre el sistema inmunológico, puede decirse que los síntomas persistentes y a menudo devastadores del SFC y la calidad de vida muy baja en muchos enfermos justifican el uso de Rituximab en pacientes del SFC cuidadosamente evaluados.**

Ha habido un enfoque intenso en XMRV como una posible gammaretroviral causal de infección en pacientes SFC desde el primer informe del 25 de octubre de 2009. Un estudio posterior demostró la presencia de MLV estrechamente relacionada en pacientes del SFC (26). Sin embargo, varios otros estudios no han sido capaces de reproducir estos hallazgos y **no han informado de ninguna evidencia de infección de XMRV en SFC**, como ejemplos (27)–(30). No hemos podido demostrar infección XMRV o MLV en ninguno de los 30 pacientes incluidos en este estudio, a pesar de múltiples enfoques diferentes, incluyendo cuatro diferentes altamente sensibles Taqman qPCR y cuatro enfoques PCR anidados y usando ADN genómico y cDNA como plantillas. También realizamos cocultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con células de cáncer de próstata de LNCaP para la amplificación de un virus biológico anterior a la PCR, sin ningún caso positivo de XMRV tampoco.

**En conclusión, hemos demostrado que el agotamiento de B-linfocitos con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab, dos tomas con dos semanas de diferencia, está asociado con respuestas clínicas significativas, aunque generalmente transitorias, con mejoría de síntomas del SFC en dos tercios de los pacientes incluidos.** No se observó toxicidad importante en 12 meses de seguimiento. A pesar de que este estudio es pequeño, es un estudio aleatorio, doble ciego y controlados con placebo que muestran diferencias significativas en favor del grupo Rituximab y con la mejora general de todos los síntomas del SFC. Por lo tanto, creemos que el agotamiento de células b juega un papel central en la patogenia de la enfermedad SFC, directa o indirectamente. Si este

mecanismo se aplica a subconjuntos específicos de los pacientes del SFC o al grupo como un todo, es un tema para futuras investigaciones. Mientras que este estudio puede ser interpretado como preliminar, siendo el primero en describir el principio del tratamiento en SFC excepto nuestra serie de caso piloto (4), consideramos que los resultados son más compatibles con un mecanismo de enfermedad autoinmune y que los hallazgos presentados pueden tener un impacto importante sobre la dirección de la investigación biomédica en SFC. Basados en nuevas experiencias pilotos de pacientes, ahora hemos comenzado dos nuevos estudios de etiqueta-abierta en fase II que investigan el tratamiento con Rituximab con dos tomas con dos semanas de diferencia (como en el presente estudio) seguidos de tomas de Rituximab de mantenimiento en 3, 6, 10 y 15 meses, para seguir explorando este principio de tratamiento del SFC (ClinicalTrials.gov, NCT01156909 y NCT01156922). El presente estudio puede ser interpretado como una "prueba de principio". **Los próximos estudios indicarán en qué medida los pacientes con el tiempo pueden recuperarse realmente mediante el tratamiento contra el agotamiento de las células b.**

#### Other Sections ▼

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Supporting Information

References

Supporting Information

Text S1

Materials and Methods (DNA and RNA purification, and cDNA synthesis. Quantitative PCR for XMRV detection. XMRV and MLV PCR. Viral amplification. RNase L Genotyping).

(PDF)

[Click here for additional data file.\(89K, pdf\)](#)

#### **Figure S1**

Scheme for patient's self-reported baseline CFS symptoms. Before intervention, the patients assessed their CFS disease and recorded their symptoms the last three months according to a visual analogue, scale 1–10 (1: no symptom; 5: moderate symptom; 10: very severe symptom).

(TIF)

[Click here for additional data file.\(360K, tif\)](#)

### **Figure S2**

Scheme for patient's self-reported CFS symptom change during follow-up. During 12 months follow-up, the patients recorded symptom changes the preceding two weeks, as compared to baseline. The visual analogue scale for the follow-up scheme was 0–6 (0: Major worsening; 1: Moderate worsening; 2: Slight worsening; 3: No change; 4: Slight improvement; 5: Moderate improvement; 6: Major improvement).

(TIF)

[Click here for additional data file.\(426K, tif\)](#)

### **Figure S3**

Scheme for physician-assessed CFS symptoms, at baseline and during follow-up. The patients were assessed at the outpatient clinic before intervention, and at 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 months follow-up. The physicians assessed the patients CFS disease and recorded the symptoms according to visual analogue scales. Before intervention, the scale was 1–10 (1: no symptom; 5: moderate symptom; 10: very severe symptom). During 12 months follow-up, the physicians assessed patients symptom changes as compared to baseline, scale 0–6 (0: Major worsening; 1: Moderate worsening; 2: Slight worsening; 3: No change; 4: Slight improvement; 5: Moderate improvement; 6: Major improvement).

(TIF)

[Click here for additional data file.\(373K, tif\)](#)

### **Figure S4**

CFS symptom changes during follow-up, for the two patients in the Placebo group with significant improvement. In panels A and B, changes in Fatigue score (black), Cognitive score (red), Pain score (green), “Other symptoms” score (orange), and “CFS overall” score (blue), during 12 months follow-up are shown for the two patients in the Placebo group with significant improvement. The scales on Y-axes were 0–6 (0: Major worsening; 1: Moderate worsening; 2: Slight worsening; 3: No change; 4: Slight improvement; 5: Moderate improvement; 6: Major improvement). Also shown are the B-cell numbers from immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells during follow-up ( $\times 10^6/L$ ).

(TIF)

[Click here for additional data file.\(199K, tif\)](#)

[Resumen](#)

[Introducción](#)

Materiales y métodos

Resultados

Debate

Información de soporte

Referencias

Información de soporte

### **Texto S1**

Materiales y métodos (purificación de ADN y ARN y síntesis de cDNA. PCR cuantitativa para la detección de XMRV. XMRV y MLV PCR. Amplificación viral. Genotipaje de RNasa L).

(PDF)

Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.(Pdf, 89 K)

### **Figura S1**

Esquema de los síntomas del SFC del paciente autocomunicados según referencia. Antes de la intervención, los pacientes evaluaron su enfermedad del SFC y se registraron sus síntomas durante los últimos tres meses según una simulación visual, según una escala de 1-10 (1: ningún síntoma; 5: síntoma moderado; 10: síntoma muy grave).

(TIF)

Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.(360 K, tif)

### **Figura S2**

Esquema de los cambios en los síntomas del paciente del SFC autocomunicados durante el seguimiento. Durante 12 meses de seguimiento, los pacientes registraron cambios en los síntomas durante las anteriores dos semanas, en comparación con la línea de base. La escala de simulación visual para el esquema de seguimiento fue 0-6 (0: importante empeoramiento; 1: empeoramiento moderado; 2: leve empeoramiento; 3: ningún cambio; 4: leve mejoría; 5: mejora moderada; 6: mejora los principales).

(TIF)

Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.(Tif, 426 K)

### **Figura S3**

Esquema de los síntomas del SFC evaluados por el médico, en la línea de referencia y durante el seguimiento.

Los pacientes fueron evaluados en un ambulatorio antes de intervención y en 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de seguimiento. Los médicos evaluaron la enfermedad de los pacientes del SFC y registraron los síntomas según escalas analógicas visuales. Antes de la intervención, la escala era 1-10 (1: ningún síntoma; 5: síntoma moderado; 10: síntoma muy grave). Durante los 12 meses de seguimiento, los médicos evaluaron los cambios en los síntomas de los pacientes en comparación con la línea de referencia, escala 0-6 (0: importante empeoramiento; 1: empeoramiento moderado; 2: leve empeoramiento; 3: ningún cambio; 4: leve mejoría; 5: mejora moderada; 6: mejora los principales).

(TIF)

[Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.](#)(373 K, tif)

#### **Figura S4**

Cambios de los síntomas del SFC durante el seguimiento, para los dos pacientes del grupo Placebo con una mejoría significativa.

En los paneles A y B se muestran las puntuaciones, referentes a los dos pacientes en el grupo Placebo con una mejoría significativa, de los cambios en la fatiga (negro), puntuación sobre la capacidad cognitiva (rojo), puntuación del dolor (verde), la puntuación de "Otros síntomas"(naranja), y la puntuación del "SFC general"(azul), durante 12 meses de seguimiento. Las escalas de los ejes-Y fueron 0-6 (0: importante empeoramiento; 1: empeoramiento moderado; 2: leve empeoramiento; 3: ningún cambio; 4: leve mejoría; 5: mejora moderada; 6: mejora importante). Asimismo, figuran el número de células b a partir del Inmunofenotipado de las células sanguíneas periféricas de mononucleares durante el seguimiento ( $\times L 106$ ).

(TIF)

[Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.](#)(Tif, 199 K)

#### **Table S1**

Primers and probes for detection of Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and MLV-related virus.

(PDF)

[Click here for additional data file.](#)(94K, pdf)

#### **Table S2**

Effects of intervention group (Rituximab versus Placebo) on Fatigue score during 12 months follow-up, using General Linear Model for repeated measures, with separate analyses for self-reported and physician-assessed symptoms.

(DOC)

[Click here for additional data file.\(52K, doc\)](#)

Protocol S1

Trial Protocol.

(PDF)

[Click here for additional data file.\(848K, pdf\)](#)

Checklist S1

CONSORT Checklist.

(PDF)

[Click here for additional data file.\(680K, pdf\)](#)

Acknowledgments

The authors thank nurse Helle Øvrebø, the staff at the Lymphoma section, and at the outpatient clinic, Department of Oncology, Haukeland University Hospital. We are grateful to the patients who volunteered for the study.

Footnotes

Competing Interests: Haukeland University Hospital has patents and pending patent applications on the issue of B-cell depletion therapy for chronic fatigue syndrome. Family members of WO2009083602 A1 are pending, as well as granted US 12/348024. The two authors ØF and OM are named as inventors in these applications. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

Funding: The work received financial support from Helse Vest grant no 911557, and also from the legacy of Torstein Hereid. These funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### **Tabla S1**

Manuales y pruebas para la detección de virus relacionados con el virus Xenotrópico murino leucemia (XMRV) y virus relacionados con MLV y fulminantes.

(PDF)

[Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.\(Pdf, 94 K\)](#)

### **Tabla S2**

Efectos del grupo de intervención (Rituximab versus Placebo) sobre la puntuación de fatiga durante los 12 meses de seguimiento, mediante el Modelo Lineal General para medidas repetidas, con análisis separados para los síntomas autoinformados y los

evaluados por el médico.

(DOC)

[Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.52 K \(doc\)](#)

### **Protocolo S1**

**Protocolo de prueba.**

(PDF)

[Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.\(848 K, pdf\)](#)

Lista de comprobación S1

Lista de comprobación de CONSORTE.

(PDF)

[Haga clic aquí para el archivo de datos adicionales.\(680 K, pdf\)](#)

## **Agradecimientos**

Los autores dan las a la enfermera Helle Øvrebø, al personal de la sección de linfomas y del ambulatorio y al departamento de Oncología del Hospital Universitario de Haukeland. Estamos agradecidos a los pacientes que se ofrecieron como voluntarios para el estudio.

### **Notas a pie de texto**

Intereses contrapuestos: Haukeland University Hospital tiene patentes y espera las solicitudes de patente sobre la cuestión de la terapia de células b agotamiento para el síndrome de fatiga crónica. Miembros de la familia de WO2009083602 A1 están pendientes, así como también son beneficiarios de U.S. 12348024. Los dos autores ØF y OM son nombrados como inventores en estas solicitudes. Esto no altera la adhesión de los autores a todas las políticas PLoS ONE en el intercambio de datos y materiales.

**Financiación:** El trabajo recibió apoyo financiero de la beca Helse Vest nº 911557 y también del legado de Torstein Hereid. Estos donantes no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, recopilación y análisis de datos, en la decisión de publicar o en la preparación del manuscrito.

