

REXGENERO



Línea de Tecnología farmacéutica y Ciencias del Medicamento

**DESARROLLO FARMACÉUTICO DE UN MEDICAMENTO DE
TERAPIAS AVANZADAS (ATMPs) BASADO EN EL MODELO DE
CALIDAD DESDE EL DISEÑO (QbD)**

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor

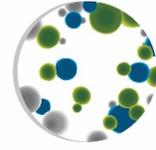
Autor:

José Carlos Sanjuán Giménez

Director:

Enrique Villegas Martínez

Sevilla 2022



REXGENERO

Dr. **Enrique Villegas Martínez**, Director del departamento de Producción y Desarrollo de proceso de Rexgenero S.L.

Certifica que:

El trabajo de investigación presentado por **José Carlos Sanjuán Giménez** titulado “**Desarrollo farmacéutico de un medicamento de terapias avanzadas (ATMPs) basado en el modelo de calidad desde el diseño (QbD)**” ha sido realizado bajo su supervisión y dirección en el departamento de Producción y Desarrollo de Proceso de Rexgenero S.L. y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para ser defendido ante un tribunal con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firma el presente informe en Sevilla a 22 de Abril de 2022.

VºBº del director del trabajo.

Enrique Villegas Martínez

LISTADO DE PUBLICACIONES

Sanjuan-Gimenez, J. C., Morales, M. L., Carranza-Garcia, I., del Pino-Zumaquero, A., Hernández-Ruiz, L., & Villegas, E. (2021). Development and qualification of a representative scale-down model of automated Ficoll-based processing of a cell-based therapeutic according to quality by design principles. *Cytotherapy*, 23(10), 953-959.

AGRADECIMIENTOS

Lo que comenzó siendo una posibilidad, ha acabado convirtiéndose en una realidad. Después de tantas horas, días y meses de esfuerzo, es el momento de expresar mi gratitud a aquellas personas que han contribuido, de una manera u otra a que este proyecto se convierta en una tesis.

Mi primer reconocimiento es, sin duda, hacia los pacientes que se han prestado a participar en este ensayo clínico. Gracias por creer en la ciencia, y sobre todo por depositar vuestras esperanzas en este tratamiento.

Gracias a mi director de tesis Enrique, a su compañera de viaje Esther y a su pequeña Lara. Gracias por abrirme las puertas de tu casa y de tu familia en todo momento y hacerme sentir como uno más de ella. Gracias por tu confianza a lo largo de todo este proceso por enseñarme a observar, escuchar, ser paciente y pelear por aquello que quiero. Gracias por apostar por mi hasta el final y sobre todo por ser mi amigo.

Gracias a los grandes profesionales que conforman el equipo de laboratorio con en el que he vivido tantas cosas. Por vuestra paciencia, por vuestros consejos, correcciones y colaboración y sobre todo por las risas y el buen ambiente. Isa, Maca, Alberto, Sofía, Cristina, Paco, Cristina y Jesús no olvidaré las horas compartidas con vosotros en la sala blanca o en el laboratorio de QC frente al citómetro. Gracias por enseñarme algo nuevo cada día, por arrancarme una sonrisa hasta en los días más duros y hacer que de una manera u otra todo cobrara sentido de nuevo. Gracias por vuestro empeño y dedicación y mirar siempre hacia delante para seguir avanzando cada día.

Gracias a mi familia, a mis padres por creer en mi y apoyarme durante todos estos años, a mi hermana y mis sobrinos por darme tanto cariño y gracias a ti Mar por respetarme y entenderme por ese buen humor y ver siempre el vaso medio lleno incluso cuando todo se vuelve más complicado. Gracias por esa sonrisa maravillosa, por tantos años y por todo lo que nos queda por disfrutar juntos.

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | Medicamentos de terapias avanzadas | 2 |
| 1.1.1 | Límites entre las categorías de medicamentos de terapias avanzadas..... | 9 |
| 1.1.2 | Medicamentos de terapias avanzadas y terapias basadas en células | 9 |
| 1.1.3 | REX-001 definición y marco legislativo como medicamento de terapias avanzadas | 10 |
| 1.2 | Diabetes mellitus..... | 11 |
| 1.2.1 | Enfermedad arterial periférica en pacientes diabéticos | 14 |
| 1.2.2 | Isquémica crónica que amenaza la extremidad..... | 17 |
| 1.2.3 | Tratamiento convencional de la isquemia crónica que amenaza la extremidad..... | 20 |
| 1.2.4 | Terapias regenerativas para el tratamiento de la CLTI..... | 23 |
| 1.2.5 | Tratamiento con REX-001..... | 29 |
| 1.3 | Desarrollo clínico de REX-001..... | 31 |
| 1.3.1 | Ensayo clínico fase I/IIa..... | 31 |
| 1.3.2 | Ensayo clínico fase IIb | 33 |
| 1.3.3 | Ensayo clínico fase III..... | 34 |
| 1.4 | Desarrollo farmacéutico para un medicamento de terapias avanzadas..... | 34 |
| II. | OBJETIVOS | 40 |
| III. | METODOLOGÍA..... | 44 |
| 3.1 | Modelo de desarrollo basado en la calidad desde el diseño..... | 44 |
| 3.1.1 | Definición y concepto | 44 |
| 3.1.2 | Elementos del modelo de desarrollo farmacéutico | 44 |
| 3.1.3 | Perfil de calidad objetivo del producto..... | 45 |
| 3.1.4 | Atributos de calidad críticos..... | 46 |
| 3.1.5 | Diseño de proceso y caracterización para la definir los parámetros críticos..... | 47 |
| 3.1.6 | Estrategia de control y mejora continua | 48 |
| 3.2 | Proceso de fabricación de REX-001 durante el ensayo clínico fase III..... | 48 |
| 3.2.1 | Filtración del material de partida..... | 50 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.2.2 | Reducción de volumen del material de partida..... | 50 |
| 3.2.3 | Gradiente de densidad con Ficoll y lavado celular..... | 50 |
| 3.2.4 | Filtración..... | 51 |
| 3.2.5 | Centrifugación..... | 51 |
| 3.2.6 | Formulación..... | 51 |
| 3.2.7 | Acondicionamiento final y almacenamiento del producto terminado..... | 52 |
| 3.3 | Desarrollo de un modelo escalado para el gradiente de densidad con Ficoll..... | 52 |
| 3.4 | Desarrollo de las etapas de centrifugación y formulación del principio activo..... | 54 |
| 3.5 | Descripción de los métodos analíticos..... | 55 |
| 3.5.1 | Contaje celular..... | 56 |
| 3.5.2 | Citometría de flujo..... | 56 |
| 3.6 | Análisis estadístico..... | 57 |
| IV. | RESULTADOS..... | 61 |
| 4.1 | Definición del perfil y atributos de calidad de REX-001..... | 61 |
| 4.2 | Caracterización del material de partida..... | 64 |
| 4.2.1 | Variabilidad en volumen y contenido celular del SM..... | 64 |
| 4.2.2 | Variabilidad en la composición del SM..... | 65 |
| 4.3 | Caracterización del proceso de producción del principio activo..... | 65 |
| 4.3.1 | Estudio de la etapa de reducción de volumen..... | 66 |
| 4.3.2 | Estudio de la etapa de gradiente de densidad con Ficoll y lavado celular..... | 70 |
| 4.4 | Caracterización del proceso de producción del producto terminado..... | 84 |
| 4.4.1 | Estudio de la etapa de centrifugación y formulación..... | 85 |
| 4.4.2 | Estudio de la automatización y cerrado de la etapa de centrifugación y formulación utilizando el procesador celular..... | 88 |
| V. | DISCUSIÓN..... | 97 |
| VI. | CONCLUSIONES..... | 107 |
| VII. | BIBLIOGRAFÍA..... | 109 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | | |
|----------------|---|---|
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D | 7-aminoactinomicina D |
| ABI | Ankle brachial index | Índice tobillo-brazo |
| ACD-A | Sodium citrate anticoagulant Solution | Solución de citrato dextrosa anticoagulante A |
| AEMPS | Spanish agency of medicines and medical devices | Agencia española del medicamento y productos sanitarios |
| AP | Ankle pressure | Presión arterial del tobillo |
| ATMPs | Advanced therapy medicinal products | Medicamentos de terapias avanzadas |
| BC | Buffy coat | Capa leucocitaria |
| BM | Bone marrow | Médula ósea |
| BSC | Biological safety cabinet | Cabina de seguridad biológica |
| CAT | Committee for Advanced Therapies | Comité de terapias avanzadas |
| CLIPS | Critical leg ischaemia prevention study | Estudio de la isquemia crítica de la extremidad |
| CLTI | Chronic limb-threatening ischemia | Isquemia crónica que amenaza la extremidad |
| CPPs | Critical process parameters | Parámetros críticos del proceso |
| CQAs | Critical quality attributes | Atributos críticos de calidad |
| DP | Drug product | Producto farmacológico |
| DS | Drug substance | Principio activo |
| EMA | European medicines agency | Agencia europea del medicamento |
| EPC | Endothelial progenitor cell | Célula endotelial progenitora |
| EU | European Union | Unión Europea |
| FDA | U.S. Food and drug administration | Administración de medicamentos y alimentos estadounidense |
| FGF | Fibroblast growth factor | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| GCPs | Good clinical practice | Buenas prácticas clínicas |
| GMPs | Good manufacturing practice | Normas de correcta de fabricación |
| GRA | Granulocyte | Granulocito |
| HCT | Haematocrit | Hematocrito |
| HGF | Hepatocyte growth factor | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| HIF-1 α | Hypoxia-inducible factor 1-alpha | Factor 1-alfa inducible por hipoxia |
| HSA | Human albumin serum | Albumina sérica humana |
| HSC | Hematopoietic stem cell | Célula madre hematopoyética |
| ICH | International conference on harmonization | Conferencia Internacional sobre armonización |

| | | |
|-------------------|------------------------------------|---|
| LEAD | Lower extremity artery disease | Enfermedad de las arterias de las extremidades inferiores |
| LYM | Lymphocyte | Linfocito |
| MNC | Mononuclear cell | Célula mononucleada |
| MON | Monocyte | Monocito |
| MSC | Mesenchymal stem cell | Célula madre mesenquimal |
| PAD | Peripheral arterial disease | Enfermedad arterial periférica |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline | Tampón fosfato salino |
| PLT | Platelet | Plaqueta |
| PPI | Process performance indicator | Indicador de proceso |
| QbD | Quality by design | Calidad desde el diseño |
| QTPP | Quality target product profile | Perfil de calidad objetivo del producto |
| RBC | Red blood cell | Eritrocito |
| SM | Starting material | Material de partida |
| TCPO ₂ | Transcutaneous oximetry test | Presión de oxígeno transcutáneo |
| TP | Toe blood pressure | Presión arterial del pie |
| TPP | Target Product Profile | Perfil objetivo del producto |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| WBC | White blood cell | Leucocito |
| WHO | World health attribution | Organización mundial de la salud |

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos de terapia avanzada (ATMPs) representan un cambio de paradigma en la atención médica gracias a su gran capacidad para prevenir y tratar enfermedades crónicas, para las que a menudo no existe tratamiento. Sin embargo, todo este potencial no puede ser demostrado sin la tecnología adecuada que asegure la reproducibilidad de los procesos de producción de alta calidad a gran escala y con un coste accesible (Dwarshuis, Parratt, Santiago-Miranda, & Roy, 2017).

Como para cualquier otro medicamento la aprobación de un ATMP para su uso en pacientes por las agencias regulatorias, como la Agencia Europea del medicamento (EMA) o la Administración de alimentos y medicamentos norteamericana (FDA), está supeditada a demostrar seguridad y eficacia en las diferentes fases de ensayos clínicos.

La gran diferencia de estas terapias con respecto a la producción clásica en la industria farmacéutica es que estos medicamentos son "entidades vivas" lo que conlleva una variabilidad inherente para cada proceso de fabricación. Otros aspectos como la escasa existencia de especialidades terapéuticas de referencia junto con la dificultad para definir en algunos casos el mecanismo de acción del fármaco, sus propiedades o atributos de calidad medibles o los parámetros del proceso de su producción que aseguren la calidad y reproducibilidad de estos productos dificultan enormemente la fabricación a mayor escala y por tanto su acceso al mercado. De esta manera, se hace imprescindible la labor de desarrollo farmacéutico de los ATMPs para trasladar la innovación de estos medicamentos desde los estudios clínicos hasta la consecución de la aprobación por parte de las agencias regulatorias para que su acceso y uso sea lo más amplio posible.

La aplicación de modelos de desarrollo como son los principios de calidad desde el diseño (QbD) permiten la optimización de los procesos y la mejora de la producción de los ATMPs abordando una gran variedad de desafíos técnicos como la automatización que asegura la repetitividad de los complejos procedimientos de fabricación. Estos avances junto con regímenes regulatorios más flexibles aumentarán la accesibilidad de estos productos a la oferta terapéutica lo cual es fundamental para dar respuestas a enfermedades hasta ahora sin posibilidad de tratamiento.

1.1 Medicamentos de terapias avanzadas

Los ATMPs son un campo de innovación terapéutica que crece rápidamente y que comprende a productos biológicos complejos que en la mayoría de los casos requieren amplios y arduos ensayos preclínicos y clínicos.

Los principales retos que se deben abordar en este tipo de medicamentos son la definición de una actividad farmacológica clara, una composición del medicamento concisa, un mecanismo de acción concreto y una farmacocinética o toxicidad reconocibles junto con la dificultad añadida de la variabilidad intrínseca de los materiales de partida.

Estos medicamentos presentan características que los diferencian claramente de los fármacos clásicos obtenidos por síntesis química y también de aquellos considerados como productos biológicos o biotecnológicos, como son las vacunas o los anticuerpos monoclonales. Estas diferencias hacen que tanto por su utilización clínica como por sus aspectos regulatorios se enmarquen en una categoría diferente (Figura 1).

Los ATMPs son aquellos fármacos destinados a uso humano que se basan en genes, tejidos o células. (European Parliament and the Council of the European Union, 2007)

Se clasifican en 4 grupos principales:

- Terapia génica

Se identifica el concepto de terapia génica como la inserción, alteración o eliminación de genes en una célula individual o tejido para tratar una enfermedad, incluidos trastornos genéticos, cáncer o enfermedades crónicas.

Son aquellos medicamentos que poseen las siguientes características (European Commission, 2009):

- Contienen como sustancia activa un ácido nucleico recombinante para ser administrados en seres humanos con la misión de regular, reparar, substituir, añadir o eliminar una secuencia genética.
- Su efecto terapéutico, profiláctico o de diagnóstico está relacionado directamente con la secuencia de del ácido nucleico recombinante o con el producto genético resultante de la expresión de esta secuencia.

INTRODUCCIÓN

- Terapia de células somáticas

Una de las formas más sencillas de definir la terapia celular es "el uso de células para tratar una enfermedad" (Vives & Carmona, 2015). Esta descripción incluye cualquier tipo de célula independientemente de su origen o grado de diferenciación.

Se considera medicamento de terapia de células somáticas aquellos que cumplen las siguientes características (European Commission, 2009):

- Contienen células o tejidos y que han sido manipulados sustancialmente para cambiar sus características biológicas o células o tejidos y que no están destinados a ser utilizados para las mismas funciones esenciales en el cuerpo humano.

No se considerarán sustanciales aquellas manipulaciones de corte, molienda, centrifugación, maceración en soluciones antibióticas o antimicrobianas, esterilización, irradiación, separación celular, concentración o purificación, filtrado, liofilización, congelación, criopreservación, vitrificación.

Se pueden usar para curar, diagnosticar o prevenir enfermedades gracias a sus propiedades farmacológicas, inmunológicas o metabólicas.

- Ingeniería tisular

Estos son aquellos que contienen células o tejidos que han sido modificados para que puedan usarse para reparar, regenerar o reemplazar el tejido humano.

Las células o tejidos se considerarán "ingeniería tisular" si cumplen al menos una de las siguientes condiciones (European Parliament and the Council of the European Union, 2007):

- Las células o tejidos que han sido sometidos a una sustancial manipulación, de modo que las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales relevantes para la regeneración, reparación o reemplazo previsto se han logrado.
- Las células o tejidos que no estén destinados a ser utilizados para misma función o funciones esenciales en el receptor que en el donante.

Aquellos productos que consisten exclusivamente en células o tejidos no viables no deben ser incluidos en esta definición.

INTRODUCCIÓN

- ATMPs combinados

Consisten en uno de los tres tipos de terapias mencionados junto con uno o más dispositivos médicos como parte integral del producto.

La parte celular o de tejido debe contener células o tejidos viables. En el caso de que contengan células o tejidos no viables, éstos deben responder en el cuerpo humano desarrollando la actividad principal respecto al dispositivo médico.

Un dispositivo médico es un instrumento, aparato, o cualquier otro tipo de artículo destinado para su uso humano y que tiene como propósito diagnosticar, prevenir, monitorizar, tratar o aliviar una enfermedad pero que no logra su acción por medios farmacológicos, inmunológicos o metabólicos (Iglesias-Lopez, Agustí, Obach, & Vallano, 2019).

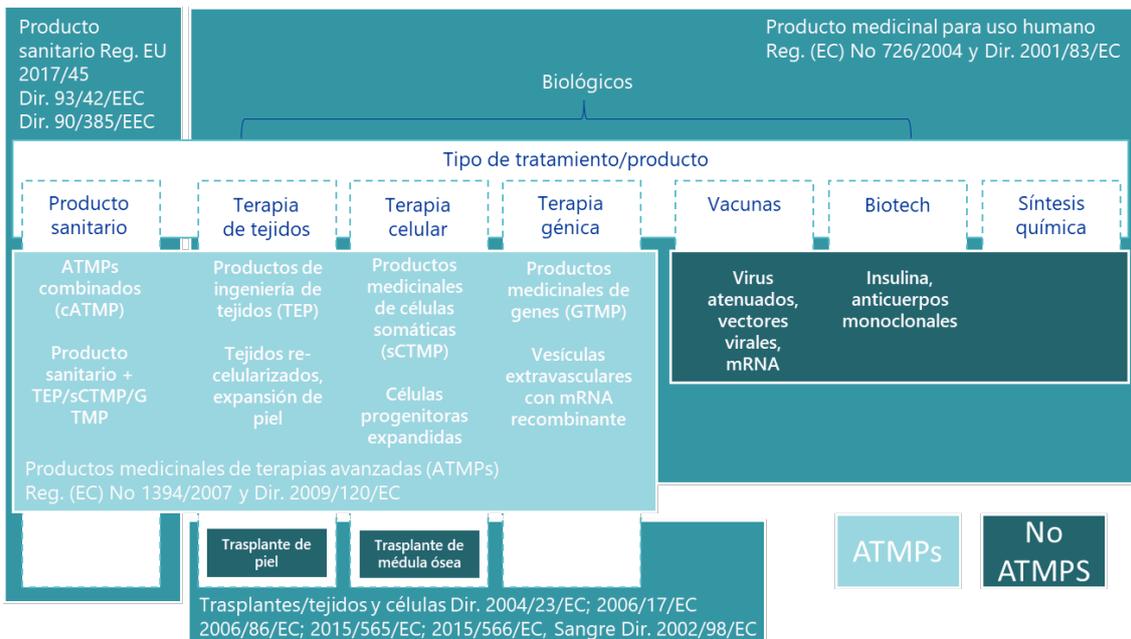


Figura 1. Marco regulatorio legal para los ATMPs en la Unión Europea (EU).

Este tipo de terapias además se dividen en alogénicas, autólogas y xenogénicas atendiendo al origen del material biológico utilizado para el tratamiento de los pacientes (Mason & Dunnill, 2009). Así pues, un producto alogénico es aquel que se obtiene a partir de un donante y utilizado para el tratamiento de múltiples pacientes, autólogo se refiere a aquel producto en el que se utiliza el material del propio paciente para su tratamiento y xenogénico cuando proviene de otra especie.

INTRODUCCIÓN

Entre los años 2009 y 2017 en Europa se realizaron unos 500 ensayos clínicos con ATMPs. Hasta el año 2016, los ensayos de terapia de células supusieron un 53,6 %, los de ingeniería de tejidos un 22,8%, los de terapia génica 22,4% y los combinados un 1,2%. (Ten Ham, et al., 2018). A nivel mundial, en lo que respecta al estudio de los ATMPs, el área terapéutica más predominante fue el cáncer (31,7%) seguido de las enfermedades cardiovasculares (14,8%) y musculoesqueléticas (10,0%). El 63% de los estudios clínicos de cáncer se desarrollaron con terapia génica, mientras que el 35,9% de ellos con terapia celular. Por el contrario, el 95,5% de los ensayos clínicos del área cardiovascular y el 96,4% de los de enfermedades musculoesqueléticas se basaron en ATMPs de ingeniería tisular.

Desde la aprobación del primer ATMP en 2009, 13 productos han obtenido una autorización de comercialización por la EMA. Una descripción general de estos los productos se presentan en la Tabla 1 (Eder & Wild, 2019). A final de agosto de 2018, cuatro ATMPs con licencia se habían retirado del mercado **Provenge**[®] (Sipuleucel-T), **Maci**[®], **Glybera**[®], **ChondroCelect**[®]. Actualmente hay nueve 9 ATMPs disponibles dentro de la Unión Europea. Las terapias génicas **Luxturna**[®], **Imlygic**[®], **Strimvelis**[®] y **Zalmoxis**[®] y las terapias celulares **Holoclax**[®], **Spherox**[®] y **Alofisel**[®]. En agosto de 2018, la EMA aprobó las dos primeras autorizaciones de comercialización para medicamentos de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR), **Kymriah**[®] (Tisagenlecleucel) y **Yescarta**[®] (Axicabtageneclisumab). Ambas sustancias pertenecen a una nueva generación de inmunoterapias individualizadas contra el cáncer basadas en la modificación de las células inmunitarias de los pacientes para el tratamiento del cáncer.

Tabla 1. Descripción general de los ATMPs con autorización de comercialización hasta 2019, adaptado de (Eder & Wild, 2019).

| Nombre | Titular de la autorización | Indicación | Fecha de aprobación |
|-----------------------|-----------------------------------|--|----------------------------|
| Yescarta [®] | Kite Pharma | Linfoma de células B | 08/2018 |
| Kymriah [®] | Novartis | ALL, DLBCL | 08/2018 |
| Luxturna [®] | Novartis | Distrofia retiniana asociada a la mutación RPE65 bialélica, en adultos y niños con pérdida de visión o ceguera | 11/2018 |
| Alofisel [®] | TiGenix | Fístulas perianales en la enfermedad de Crohn | 03/2018 |

INTRODUCCIÓN

| | | | |
|----------------|----------|---|---------|
| Spherox® | CO.DON | Defectos del cartílago en la articulación de la rodilla. | 05/2017 |
| Zalmoxis® | MolMed | Trasplante de células madre en el cáncer de sangre de alto riesgo | 06/2016 |
| Strimvelis® | GSK | ADA-SCID | 04/2015 |
| Imlygic® | Amgen | Melanoma | 09/2015 |
| Holoclar® | Chiesi | Deficiencia severa de células madre limbares en el ojo | 03/2015 |
| Provenge® | Dendreon | Cáncer de próstata metastásico | 10/2013 |
| Maci® | Vericel | Defectos del cartílago en la articulación de la rodilla. | 07/2013 |
| Glybera® | Uniqure | Deficiencia de lipoproteína lipasa | 11/2012 |
| ChondroCelect® | TiGenix | Defectos del cartílago en las articulaciones | 11/2009 |

ALL: Leucemia linfoblástica aguda; DLBCL: Linfoma difuso de células B grandes; ADA-SCID: Inmunodeficiencia combinada grave de adenosina desaminasa.



Figura 2. Descripción general de los ATMP con autorización de comercialización hasta 2019, adaptado de (Seimetz, Heller, & Richter, 2019).

En el año 2020 estaba previsto el lanzamiento de cinco nuevos ATMPs al mercado, pero aún no han sido aprobados (Tabla 2). **LentiGlobin™** es una terapia génica potencial para la corrección de la talasemia dependiente de transfusiones y la anemia de células falciformes (Schneiderman, et al., 2020). **LentiD™** es otra terapia genética para el tratamiento de la adrenoleucodistrofia cerebral

INTRODUCCIÓN

infantil, una enfermedad genética que causa daño progresivo al cerebro (Duncan, et al., 2018). El producto terapéutico celular **Habeo™** es una inyección de células regenerativas derivadas del tejido adiposo para tratar la afectación de las manos en la esclerosis sistémica (Ilic, 2018). **Neocart®** es un implante de tejido autólogo a base de condrocitos (Anderson, et al., 2017). **ATIR101** es un producto inmunoterapéutico a base de células que contiene leucocitos enriquecidos con linfocitos T. El producto está destinado a restaurar los niveles de linfocitos en pacientes sometidos a un trasplante de médula ósea (Roy, et al., 2020).

Tabla 2. ATMP en proceso de autorización de comercialización, a adaptado de (Eder & Wild, 2019).

| Producto | Desarrollador | Indicación | Estado regulatorio |
|--------------|-------------------------|---|--------------------|
| LentiGlobin™ | BlueBird Bio | β-talasemia dependiente de transfusiones, anemia de células falciformes | Fase III |
| Habeo™ | Cytori Therapeutics | Disfunción de la mano por esclerodermia | No aplicable |
| Lenti-D™ | BlueBird Bio | Adrenoleucodistrofia cerebral | Fase II/III |
| Neocart® | Histogenics corporation | Reparación de cartílago | Fase III |
| ATIR101 | Kiadis Pharma | AML, ALL o síndrome mielodisplásico | Fase III |
| JCAR 017 | Celgene | DLBCL | Fase III |
| bb2121 | Celgene | Mieloma múltiple | Fase III |
| Tab-cel™ | Atara Biotherapeutics | Trastorno linfoproliferativo postrasplante asociado al Epstein-Barr virus | Fase III |
| Lenadogene | GenSight | Pérdida de visión por neuropatía | Fase III |
| nolparvovec | Biologics SA | óptica hereditaria de Leber | Fase III |
| Multistem | Athersys | Accidente cerebrovascular isquémico | Fase III |
| PLX-PAD | Pluristem therapeutics | Isquemia crónica que amenaza la extremidad | Fase III |

AML: Leucemia mieloide aguda; ALL: Leucemia linfoblástica aguda; DLBCL: Linfoma difuso de células B grandes.

INTRODUCCIÓN

Otros ATMPs con lanzamiento previsto después de 2020 también se indican en Tabla 2. Dos terapias adicionales de células T-CAR se encuentran actualmente en un ensayo clínico de fase III.

JCAR017 (lisocabtagene maraleucel, liso-cel) es un tratamiento para el linfoma no Hodgkin agresivo de células B (Abramson, et al., 2018) y el **bb2121** está destinado a tratar el mieloma múltiple (Raje, et al., 2019). **Tab-cel™** es una inmunoterapia de células T alogénica para tratar el trastorno linfoproliferativo postrasplante asociado al virus de Epstein Barr y otros tumores asociados a este virus (Prockop, et al., 2020). **Lenadogene nolparvovec** (GS-010) es una terapia génica para el tratamiento de la neuropatía óptica hereditaria de Leber, un trastorno genético que conduce a una pérdida rápida de la visión central bilateral (Vignal-Clermont, et al., 2021). **Multistem®** es un producto de terapia celular disponible para el tratamiento de múltiples enfermedades actualmente existe un ensayo clínico de fase III para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico y un fase II para colitis ulcerosa. Además, se han completado los estudios de fase I para el infarto agudo de miocardio y la enfermedad de injerto contra huésped (Bellington, et al., 2019). El **PLX-PAD** es un ATMP de células placentarias expandidas, que son células estromales similares a las mesenquimales las cuales secretan las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que facilitan la regeneración de los tejidos (Norgren, et al., 2019). Desafortunadamente, en diciembre de 2020 el estudio clínico fase III para **PLX-PAD** ha sido concluido ya que el análisis intermedio de los datos obtenidos indicaba que era poco probable que el medicamento cumpliera con los criterios para valorar su eficacia.

Desde mayo de 2004 a junio de 2019, la Agencia española del medicamento y productos sanitarios (AEMPS) recibió 331 solicitudes de ensayos clínicos para ATMPs en investigación, lo que representa el 2,9% del número total de solicitudes de ensayos clínicos en ese período. El estado de estas solicitudes en julio de 2019 era: 290 autorizadas, 14 rechazadas, 19 retiradas y 8 en evaluación. España participa en aproximadamente un 23% de los ensayos clínicos para ATMPs en investigación autorizados en Europa. La mayoría de estos estudios clínicos de ATMPs en investigación son de fases iniciales, fase I y fase II. Los de fase II representa el 80,3% de todos los autorizados durante el período de estudio. Los sponsors no comerciales se centran más en estas fases iniciales y se caracterizan por ser ensayos de carácter nacional y unicéntricos. En contraposición los sponsors comerciales realizan la mayoría de los ensayos fase, III y IV. Esto se debe en gran medida a las dificultades logísticas para organizar los estudios clínicos en fase tardía ya que en estas fases se involucra a cientos o miles de pacientes lo cual requiere la participación de muchos y diferentes investigadores de distintos lugares y países. Si bien esto es cierto, cabe señalar que los resultados de los estudios académicos iniciales son el fundamento para el posterior desarrollo de los productos a comercializar (Estevez Alamo, et al., 2019).

INTRODUCCIÓN

1.1.1 Límites entre las categorías de medicamentos de terapias avanzadas

Según las definiciones proporcionadas anteriormente cabe la posibilidad de que algunos productos puedan encajar en diferentes categorías, por este motivo la regulación (European Parliament and the Council of the European Union, 2007) clarifica así:

- Un producto cuya definición pueda ser terapia de células somática, ingeniería tisular, o terapia génica debe ser considerado como terapia génica.
- Para un producto el cual pueda definirse como terapia de células somáticas o de ingeniería de tejidos, ha de ser considerado como un producto de ingeniería de tejidos.

La regulación establece que cada solicitante que desarrolla un producto basado en genes, células o tejidos debe solicitar a la Agencia Europea del Medicamento (EMA) si el producto en cuestión pertenece a una categoría o a otra.

Este dictamen para categorizar el producto corresponde al Comité de Terapias Avanzadas (CAT) de la EMA.

1.1.2 Medicamentos de terapias avanzadas y terapias basadas en células

En la EU existe una clara diferenciación entre ATMPs y aquellos productos basados en células y regulados por otro marco legal como el de los trasplantes de órganos o la manipulación de sangre y sus derivados (Figura 1) (Iglesias-Lopez, Agustí, Obach, & Vallano, 2019).

Los ATMPs difieren de los productos basados en células en al menos en una de las siguientes características:

- Contienen ácido nucleico recombinante destinado a tener un efecto terapéutico mediante la regulación de una secuencia genética o mediante la introducción/modificación de una secuencia genética.
- Contienen células que se tomaron del donante/paciente y se modificaron para que se considere que ya no son las mismas que las células del donante antes de ser devueltas al paciente.
- Contienen células que han sido tomadas del donante/paciente y devueltas al paciente para lo que se considera una función diferente.

1.1.3 REX-001 definición y marco legislativo como medicamento de terapias avanzadas

Como se ha mencionado anteriormente los ATMPs de ingeniería tisular son aquellos que contienen células o tejidos que han sido modificados para que puedan usarse para reparar, regenerar o reemplazar el tejido humano.

La práctica clínica ha demostrado que la médula ósea (BM) contiene poderosas y multipotentes células progenitoras capaces por un lado de diferenciarse en distintos tipos de células y por otro de secretar un amplio espectro de moléculas activas que generan microambientes inmunomoduladores y regenerativos que favorecen la reparación de los tejidos dañados (Caplan, 2007).

Gracias a estas cualidades que presenta la materia prima para la fabricación de REX-001 deriva la gran capacidad de reparación tisular de esta terapia.

REX-001 es un medicamento de ingeniería tisular, autólogo derivado de BM y cuyo uso previsto es el tratamiento de la isquemia crónica que amenaza la extremidad (CLTI) en pacientes con diabetes mellitus para conseguir la regeneración de los vasos sanguíneos.

Es un producto mínimamente manipulado cuya fabricación consiste en diferentes pasos de separación celular destinados al enriquecimiento de las células MNCs y las células progenitoras CD34⁺. mediante la eliminación de glóbulos rojos (RBCs) y la reducción del porcentaje de granulocitos (GRAs) y plaquetas (PLTs).

Según la definición de ingeniería tisular de la directiva europea 2001/83 sobre terapias avanzadas REX-001 estaría fuera de este marco regulatorio debido a que las células no son sometidas a una manipulación sustancial durante el proceso de fabricación.

Sin embargo, el CAT de la EMA consideró que el hecho de que su acción esté basada en la regeneración tisular y que las células extraídas del paciente son de nuevo infundidas para una función diferente a la que tenían inicialmente dictaminó que sí se podía clasificar como un ATMP de ingeniería tisular (EMA/CAT/451233/2015).

1.2 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus se define clínicamente como un conjunto de trastornos metabólicos cuya característica principal es la presencia de concentraciones elevadas de glucosa en sangre de manera persistente o crónica, ya sea por un defecto en la producción de insulina, una resistencia a la acción de ésta para utilizar la glucosa por parte de las células, un aumento en la producción de glucosa o a una combinación de estas causas (American Diabetes Association, 2014). Además de esto se acompaña de anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) en 2014 el 8,5 % de los adultos mayores de 18 años padecían diabetes. En 2012 esta enfermedad fue la causa directa de 1,6 millones de muertes y en 2016 los altos niveles de glucosa en sangre fueron causa de otros 2,2 millones de muertes.

Aunque la diabetes es una enfermedad endocrina que provoca un estado metabólico anormal, también se asocia con la aparición de complicaciones a nivel vascular causando disfunción arterial, produciendo una alteración de la actividad de diferentes tipos de células, incluyendo las células del endotelio, las células del músculo liso y las plaquetas (PLTs).

La alteración puede afectar a los vasos sanguíneos pequeños (microvasculares) como los de la retina, riñones o sistema nervioso y a los vasos de tamaño medio o gran calibre (macrovasculares) causando enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares o en las arterias periféricas y siendo susceptibles de la aparición del fenómeno fisiopatológico conocido como aterosclerosis.

La aterosclerosis es considerada un proceso inflamatorio que afecta a los vasos de tamaño medio o de gran calibre que provoca el endurecimiento de las arterias (Lahoz & Mostaza, 2007) y el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, y que pasa por 3 fases diferentes: lesión, progresión de la lesión y complicación de la placa.

La hiperglicemia altera la síntesis de óxido nítrico mediada por la capa de células que forma el endotelio (Verma & Anderson, 2001) produciendo además de vasoconstricción la adherencia de los monocitos circulantes al propio endotelio y modificando la permeabilidad de éste. Estos monocitos migrados desde el torrente sanguíneo se diferencian en macrófagos en el tejido subendotelial y expresan una gran cantidad de receptores en su superficie con capacidad para absorber los lípidos presentes como consecuencia de la dislipidemia causada por la alteración de la homeostasis de la glucosa, convirtiéndose así en células espumosas (Figura 3).

Muchas de estas células espumosas mueren tras este proceso, liberando todos los componentes intracelulares como lípidos, citoquinas, etc. Los restos celulares son a su vez degradados por más

INTRODUCCIÓN

macrófagos lo que provoca una saturación y muerte incontrolada de estas células (Koga & Aikawa, 2012).

La liberación de factores de crecimiento y citoquinas induce además la migración de las células del músculo liso desde la túnica media hacia la íntima, donde formaran parte de los componentes de la matriz extracelular, contribuyendo así a la formación de la capa fibrosa.

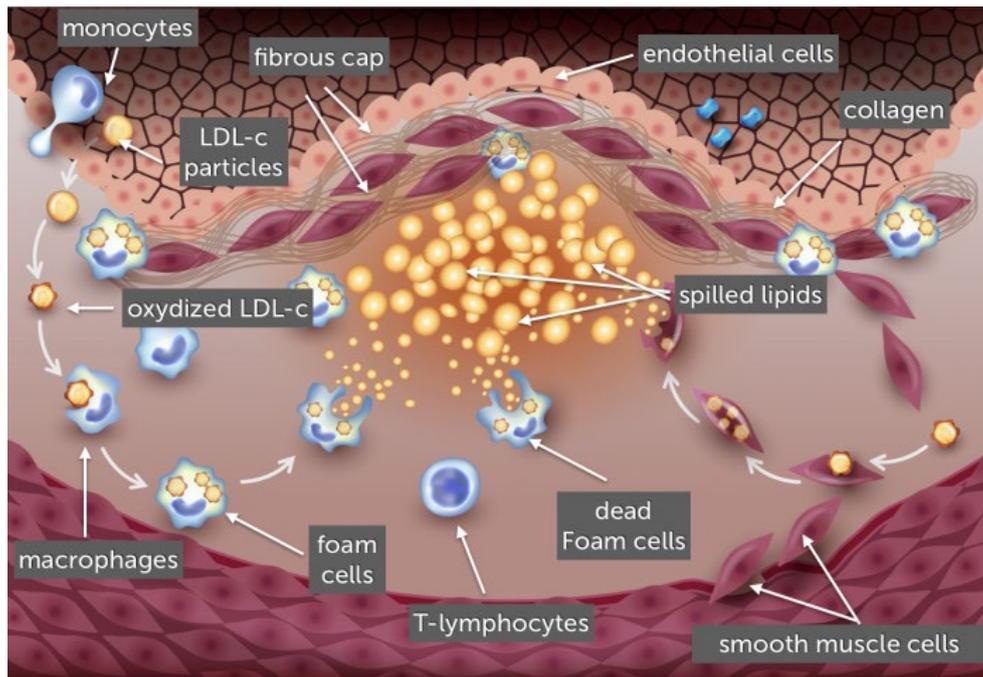


Figura 3. Fisiopatología de la aterosclerosis y formación de la placa de ateroma. Adaptado de (Shutterstock, 2021).

La disfunción endotelial permite que las partículas de LDL entren en la íntima a través del endotelio al igual que los monocitos convirtiéndose en macrófagos que atrapan a estos lípidos y se convierten en células espumosas. Estas células espumosas mueren y liberan su contenido de nuevo, atrayendo a su vez a más macrófagos y repitiéndose el proceso descrito dando lugar a lo que se denomina núcleo lipídico. La presencia de ciertas citoquinas promueve la migración de las células musculares desde la túnica media hacia la íntima las cuales se depositan debajo del endotelio formando una capa fibrosa que dar lugar a un engrosamiento del vaso sanguíneo.

La aterosclerosis generalmente se complica mediante la fisura, la erosión o la rotura de la placa (Figura 4). Las células endoteliales secretan metaloproteinasas que descomponen el colágeno presente en la capa fibrosa del ateroma (Beckman, Creager, & Libby, 2002) generando una inestabilidad mecánica que conduce a la ruptura de la placa y a la formación de trombos (Uemura, et al., 2001).

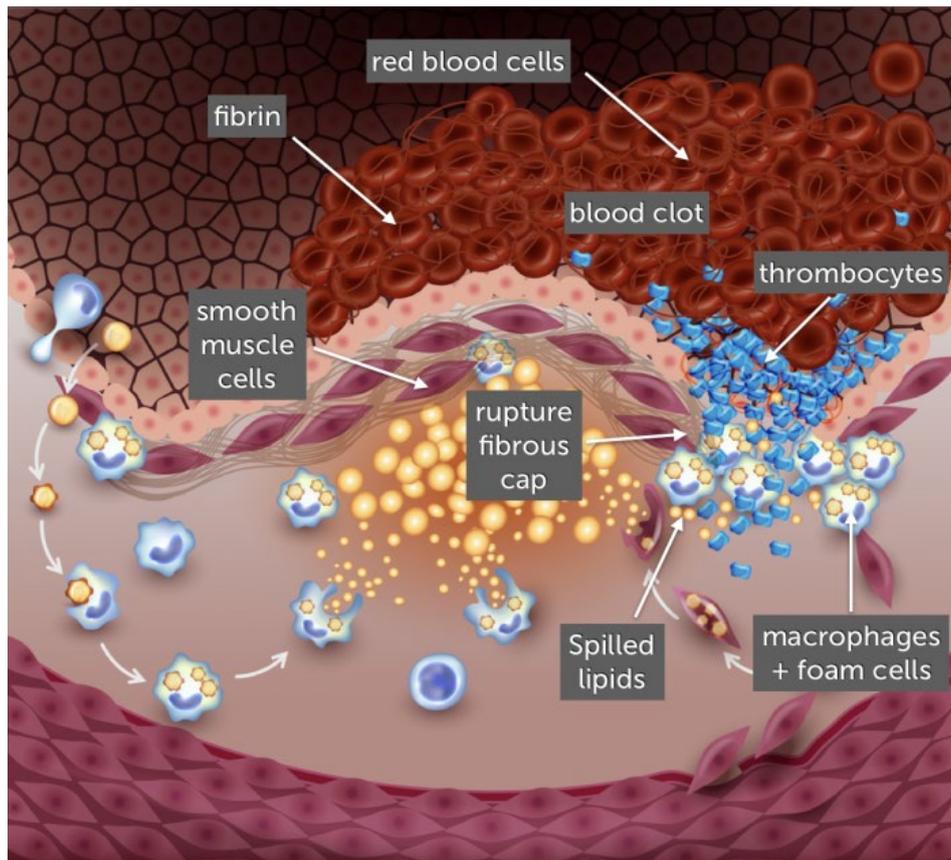


Figura 4. Trombosis causada por la ruptura de la placa. Adaptado de (Shutterstock, 2021).

La ruptura de la placa provoca la aparición de un trombo debido al contacto de la sangre circulante con los elementos constitutivos del interior de la placa, entre los que hay algunos altamente trombogénicos. La reparación de la placa con tejido fibroso da lugar al crecimiento de ésta provocando una estenosis en la luz del vaso.

Las plaquetas desempeñan un rol importante en la formación del trombo gracias a su capacidad adhesión y agregación en el sitio de la lesión secretando componentes que conducen la coagulación sanguínea. incrementando así el riesgo de eventos cardiovasculares por el bloqueo de la circulación (Vinik, Erbas, Park, Nolan, & Pittenger, 2001).

La recomposición de la fisura de la placa de ateroma, con tejido fibroso principalmente, produce un crecimiento de ésta disminuyendo la luz del vaso y reduciendo el flujo sanguíneo dando lugar a la aparición de isquemia o necrosis por la falta de aporte de oxígeno a los tejidos circundantes (Bentzon, Otsuka, Virmani, & Falk, 2014).

1.2.1 Enfermedad arterial periférica en pacientes diabéticos

El concepto de enfermedad arterial periférica (PAD) se refiere a la afección de todas aquellas arterias diferentes a las coronarias y a la aorta, y aunque comúnmente es referido a la arteriopatía de los miembros inferiores la definición más correcta para esta dolencia es enfermedad arterial de las extremidades inferiores (LEAD).

La LEAD es una manifestación muy prevalente de aterosclerosis la cual causa oclusión de las arterias en las piernas. Esta obstrucción impide el correcto flujo sanguíneo que conduce a una insuficiencia en el aporte de oxígeno provocando un daño en los tejidos y aumenta el riesgo de episodios cardiovasculares (Dolan, et al., 2002).

En el año 2010 se estimó que más de 200 millones de personas en todo el mundo padecían LEAD de los cuales 40 millones son europeos. Estos datos representaban un aumento del 23,5 % en solo una década lo cual era atribuible al envejecimiento de la población y al aumento de la prevalencia de factores de riesgo, concretamente de la diabetes mellitus (Fowkes, 2013). Generalmente aparece después de los 50 años, con un aumento exponencial después de los 65 años.

Varios estudios epidemiológicos (Jude, Oyibo, Chalmers, & Boulton, 2001) (Criqui & Aboyans, 2015) han demostrado que la severidad de esta enfermedad es mucho mayor en pacientes diabéticos que en no diabéticos lo que conlleva un peor pronóstico y una mayor mortalidad. Las evidencias epidemiológicas confirman que la prevalencia de la LEAD es 2 a 4 veces superior en individuos con diabetes (Beckman, Creager, & Libby, 2002).

La cifra real de personas con diabetes que sufren LEAD es difícil de determinar debido a que muchos de los pacientes son asintomáticos (American Diabetes Association, 2003) este factor junto con otros casos en los que aparece neuropatía periférica dificulta aún más si cabe el diagnóstico de la enfermedad.

El síntoma más común de la LEAD es la claudicación intermitente, definida como dolor, calambres en las pantorrillas muslos o glúteos que aparecen de forma reproducible al caminar y que es aliviado por el descanso (Mohler III, 2003). Además, en ciertos casos también pueden sentir dolor al estar de pie o sentados. Por estos motivos, la calidad de vida de los pacientes se ve reducida sustancialmente como resultado del dolor, la dificultad para caminar, la pérdida de independencia, el deterioro de la condición física y en última instancia depresión (Hiramoto, Teraa, de Borst, & Conte, 2018).

INTRODUCCIÓN

Para establecer el diagnóstico de la LEAD se distinguen entre métodos **no invasivos** como el índice tobillo-brazo (ABI), la medida de la presión arterial del tobillo (AP), la presión arterial del pie (TP), la presión de oxígeno transcutáneo (TcPO₂) y distintos tipos de ecografías e **invasivos** como la angiografía vascular mediante tomografía computarizada o la angiografía por resonancia magnética.

Métodos no invasivos:

- **ABI:** se considera una herramienta muy útil para el diagnóstico de la LEAD siendo además un procedimiento muy sencillo de aplicar. Se basa en el argumento de que en individuos sanos la presión sistólica de las extremidades inferiores es superior al de los brazos. Esta relación puede ser cuantificada con la ratio ABI (Figura 5).

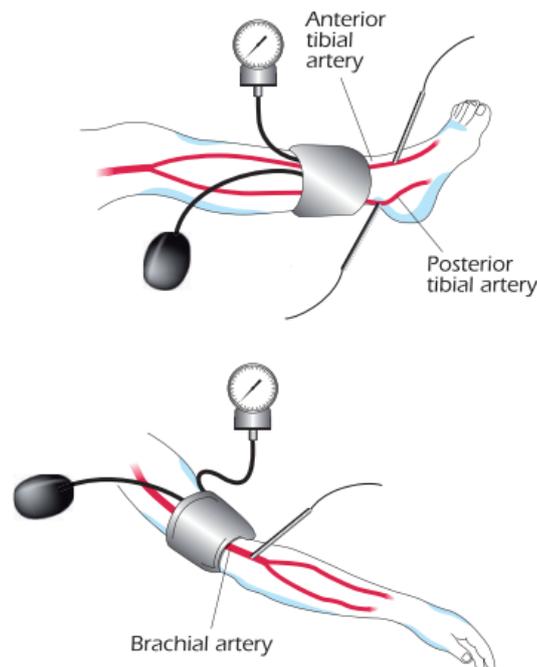


Figura 5. Medida del ABI en posición supina por encima del tobillo evitando las zonas con presencia de heridas. Tras 5 o 10 minutos de descanso la presión sistólica es medida en la arteria tibial posterior y anterior de cada pierna y en la arteria braquial de cada brazo. El ABI es calculado dividiendo la máxima presión sistólica del tobillo entre la del brazo. Adaptado de (Aboyans, et al., 2018).

Una disminución de esta proporción presagia una etapa tardía de aterosclerosis con compromiso hemodinámico atribuido a lesiones obstructivas (Criqui, et al., 2010). El umbral bajo del ABI para diagnosticar la LEAD suele ser de 0,90. Por otro lado niveles por encima de 1,40 del ABI se identifica con calcinosis (Figura 6).

INTRODUCCIÓN

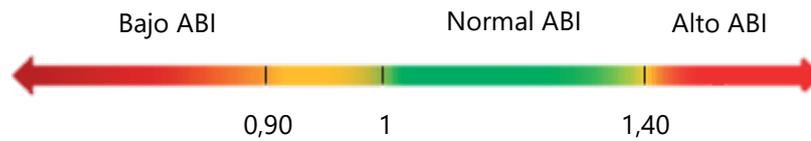


Figura 6. Límites de la ratio ABI para diagnosticar la LEAD. El riesgo de sufrir trastornos vasculares asociados a la LEAD se establece por debajo de 0,90 y por encima de 1,40. Adaptado de (Aboyans, et al., 2018).

- **Ecografía:** diferentes tipos como la ecografía en modo B o Doppler de onda pulsada, continua, color o de poder se utilizan para el diagnóstico de la LEAD y así detectar lesiones vasculares, cuantificando su extensión y severidad. Técnicas más recientes, como la imagen de flujo o la ecografía tridimensional en vivo, así como el uso de agentes de contraste para ultrasonidos, mejoran aún más diagnóstico, aunque su uso aún es limitado.

Métodos invasivos:

- **Angiografía por sustracción digital:** se considera la referencia estándar en imagen vascular para la enfermedad arterial por debajo de la rodilla y que permite conocer la extensión, la topografía de las lesiones, y si ha habido desarrollo de vasos colaterales por la oclusión arterial (Figura 7).
- **Angiografía por tomografía computarizada:** tiene un tiempo de examen corto mientras se toman imágenes de vasos y órganos de alta resolución y en 3D. Los inconvenientes incluyen la exposición a la radiación y el uso de contrastes yodados (O'sullivan, Healy, Moloney, Grace, & Walsh, 2013)
- **Angiografía por resonancia magnética:** se utiliza para la obtención de imágenes de arterias periféricas utilizando técnicas de contraste y sin contraste. Estas últimas técnicas tienen una resolución inferior lo que limita su interpretación, pero en comparación con la angiografía por tomografía no se necesita contraste de yodo.

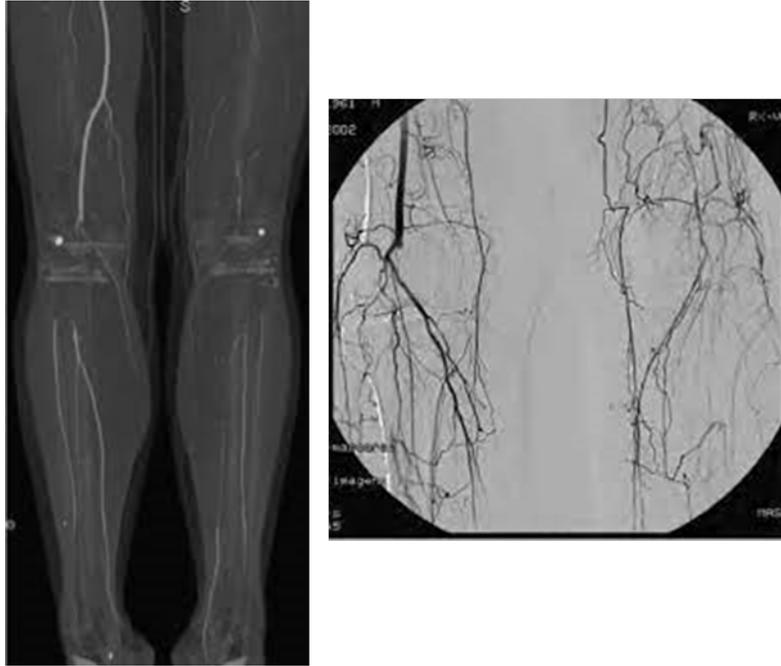


Figura 7. Angiografía por sustracción digital para la evaluación de enfermedad arterial de las extremidades inferiores. Adaptado de (Revert, Pallardó, Esteban, Jornet, & Mollá, 2006).

1.2.2 Isquémica crónica que amenaza la extremidad

La isquemia crónica que amenaza la extremidad (CLTI) es una de las manifestaciones más severas de aterosclerosis conocidas y es considerada la etapa final de la LEAD, asociándose con un alto riesgo de amputación.

La CLTI tiene una incidencia anual estimada de 220 casos por cada millón de personas en Europa o Norte América. Sin embargo, existe evidencia indirecta de estudios que analizan la progresión de la enfermedad mediante encuestas de población sobre la prevalencia y basándose en las tasas de amputación que aumentan esta cifra estableciendo aproximadamente entre 500 y 1000 nuevos casos cada año por millón de habitantes (Nehler, et al., 2014).

Se caracteriza por una crónica e inadecuada perfusión sanguínea en los miembros inferiores, apareciendo el dolor isquémico en reposo con o sin pérdida de tejido (úlceras, gangrena). Cuando están presentes las úlceras suelen ser dolorosas y se complican con inflamación e infección local. Este dolor isquémico aparece también en reposo ocurre y con mayor frecuencia por la noche cuando la extremidad no está en una posición dependiente, pero en casos graves puede ser continuo y se localiza en la parte distal del pie o en la proximidad de una úlcera isquémica o dedo gangrenoso. Todo esto provoca una substancial morbilidad y mortalidad (Norgren, et al., 2007).

INTRODUCCIÓN

Aunque se produce la activación de mecanismos compensatorios como la vasodilatación y el desarrollo de vasos colaterales para intentar preservar la circulación arterial (Coats & Wadsworth, 2005) este proceso es insuficiente para mantener la perfusión distal lo que provoca la aparición de necrosis en el tejido afectado por la falta de oxígeno y nutrientes y que desemboca en la amputación del miembro afectado e incluso la muerte si no se actúa a tiempo.

Para clasificar la enfermedad en función de la gravedad del estado del paciente durante las décadas pasadas se han utilizado distintos sistemas. Entre los cirujanos vasculares están ampliamente aceptados el uso de los sistemas de Fontaine (Novo, Coppola, & Milio, 2004) y Rutherford (Hardman, Jazaeri, Yi, Smith, & Gupta, 2014).

La clasificación de Rutherford es un sistema de estadificación clínica de uso común para categorizar a los pacientes con LEAD y CLTI y similar a la clasificación de Fontaine, pero citado con más frecuencia en las publicaciones del campo de la medicina vascular.

En 1954 René Fontaine clasificó a estos pacientes en diferentes grados según la gravedad de la enfermedad, así el grado I o más leve corresponde con un paciente asintomático y el grado IV o más grave con ulceración o gangrena.

Robert B. Rutherford junto con J. Dennis Baker establecen una nueva clasificación en 1986 la cual revisó en 1997 (Rutherford, et al., 1997) y que está correlacionada con la de Fontaine. En ella establecen cuatro grados y siete categorías, que van desde la 0 (asintomático) a la 6 (pérdida importante de tejido). Los pacientes diagnosticados con CLTI se incluyen entre las categorías 4 y 6 de Rutherford (dolor isquémico en reposo, pérdida leve de tejido y pérdida importante de tejido, respectivamente) o los grados III y IV de Fontaine (Tabla 3).

Tabla 3. Grados de Fontaine y clasificación de Rutherford. Adaptado de (Aboyans, et al., 2018).

| Clasificación de Fontaine | | | Clasificación de Rutherford | | |
|---------------------------|---------------------|---|-----------------------------|-----------|-------------------|
| Grado | Descripción clínica | Criterios objetivos | Grado | Categoría | Síntomas |
| I | Asintomático | Prueba de hiperemia reactiva o de marcha normal | 0 | 0 | Asintomático |
| II | IIa | | I | 1 | Claudicación leve |

INTRODUCCIÓN

| | | | | | | |
|-----|-----|--|--|-----|---|---|
| | | Claudicación intermitente no incapacitante | Prueba de caminata completada. AP después del ejercicio >50 mmHg, y al menos 20 mmHg en reposo | | 2 | Claudicación moderada |
| | IIb | Claudicación intermitente incapacitante | Prueba de caminata no completada. AP después del ejercicio <50 mmHg | | 3 | Claudicación severa |
| III | | Dolor isquémico en reposo | AP en reposo <50mm Hg, TP <30 mmHg o TcPO ₂ <30 mmHg | II | 4 | Dolor isquémico en reposo |
| IV | | Ulceración y/o gangrena | AP en reposo <70 mmHg, o TP <50 mm Hg, o TcPO ₂ <30 mmHg | III | 5 | Pérdida menor de tejido. Úlcera no cicatrizante. Gangrena difusa del pie, incluidos los dedos de los pies y el antepié. |
| | | | Igual que la categoría 5 | | 6 | Pérdida mayor de tejido que afecta a la parte media del pie o el talón |

AP: presión arterial del tobillo; TP: presión arterial del pie; TcPO₂: presión de oxígeno transcutáneo.

1.2.3 Tratamiento convencional de la isquemia crónica que amenaza la extremidad

No existe un tratamiento específico que actúe directamente sobre la causa que origina la enfermedad, sino más bien están destinados a la mejoría de los síntomas como aliviar el dolor, mejorar el flujo sanguíneo, desaparición de las ulceraciones y en definitiva intentar evitar la pérdida de los miembros inferiores afectados.

Las posibilidades de tratamiento para los pacientes que sufren CTLI se aborda dependiendo de la severidad en la progresión de la enfermedad distinguiéndose de manera generalizada la intervención vascular y/o el tratamiento farmacológico.

- Tratamiento quirúrgico o endovascular.

Es el tratamiento más extendido para los pacientes que sufren CLTI es la revascularización quirúrgica o endovascular (Black III, et al., 2005), aunque no en todos los casos es posible realizarla y se deben sopesar los síntomas existentes frente al riesgo del procedimiento. Se estima que más del 50% de los pacientes no son elegibles para este procedimiento y además su efecto y durabilidad puede no ser tan efectivo como cabría esperar, acabando la mayoría de los casos en amputación (Clark, Groffsky, & Soulen, 2001).

La revascularización quirúrgica con el uso de "bypass" ha sido la estrategia estándar para el tratamiento de la CLTI (Figura 8A). Dado el fácil acceso del "bypass" infra-inguinal este es el método más común utilizado para estos pacientes.

La revascularización endovascular es una operación mínimamente invasiva que permite el tratamiento de la CLTI. Las técnicas endovasculares (Figura 8B) incluyen la angioplastia en la que un balón o un "stent" da lugar a una ganancia luminal después del desplazamiento de la placa de ateroma o acteroctomía mediante el cual la placa se reduce o se elimina.

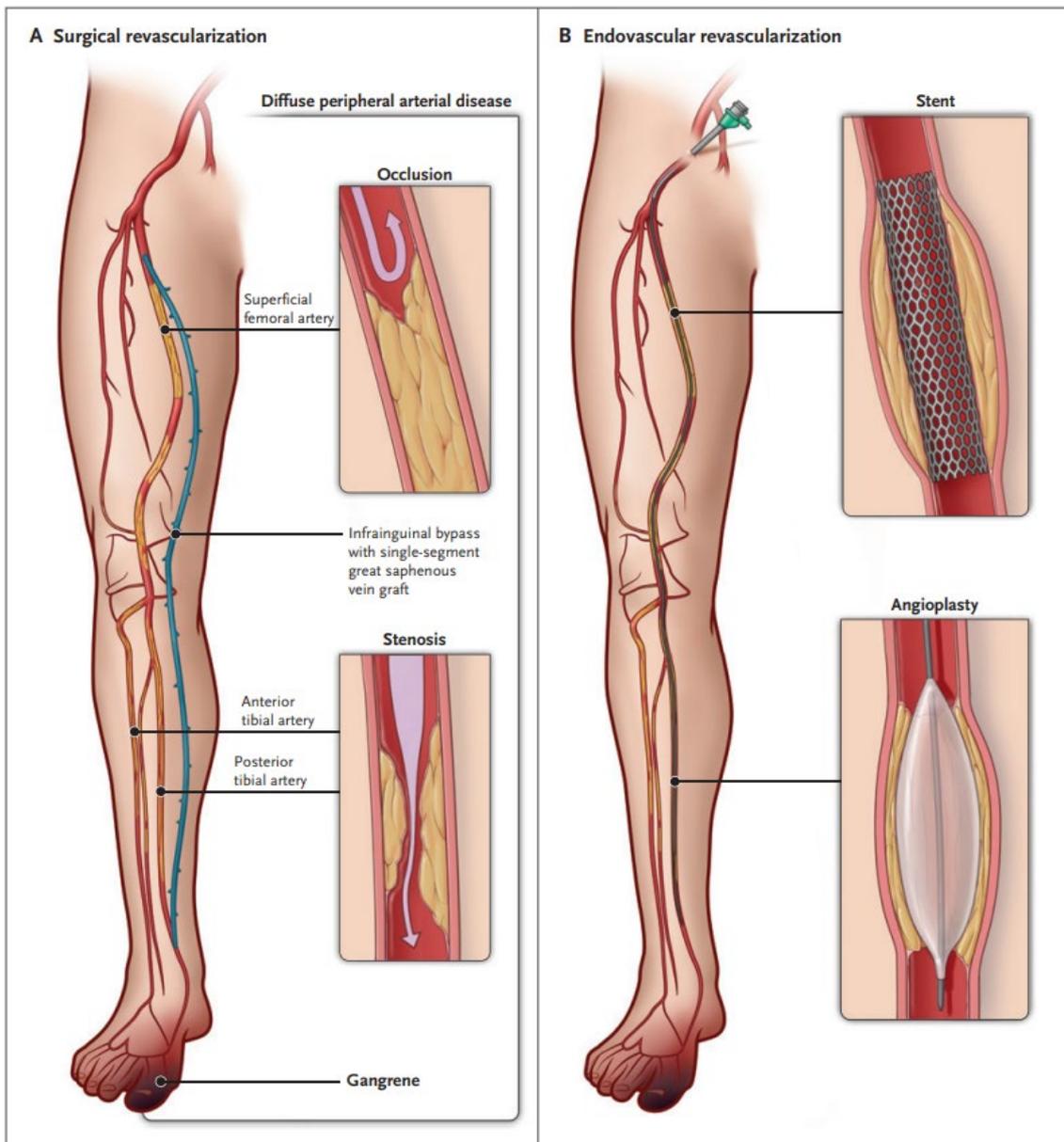


Figura 8. Técnicas de revascularización quirúrgica o endovascular. Adaptado de (Farber, 2018).

A. Extremidad con una oclusión arterial infrainguinal grave y la presencia de oclusiones y estenosis. Se muestra una derivación de la vena safena mayor para evitar estas oclusiones y estenosis. B. Despliegue de un "stent" en la arteria femoral superficial y angioplastia con balón en la arteria tibial posterior para atravesar con éxito las múltiples estenosis y oclusiones.

INTRODUCCIÓN

- Farmacoterapia

El objetivo del tratamiento con fármacos no es solo intentar salvar la extremidad afectada por la CLTI sino además reducir la aparición de episodios cardiovasculares secundarios derivados de la oclusión de los vasos sanguíneos. (Armstrong, et al., 2014).

Las distintas alternativas terapéuticas para el tratamiento farmacológico están indicadas para estadios iniciales de la enfermedad o bien asociados a la cirugía vascular.

Se utilizan fármacos antiplaquetarios como el Ácido acetil salicílico (Critical Leg Ischaemia Prevention Study (CLIPS) Group, 2007) (Baigent, et al., 2009). Sin embargo, alternativas como la Ticlopidina, el Dipyridamol o el Clopidogrel pueden ser más efectivas. Otros agentes antiplaquetarios como es el Ticagrelor (Bonaca, et al., 2016) y Vorapaxar (Sharma, y otros, 2017) han demostrado también reducir los efectos cardiovasculares.

El uso de estatinas para la disminución de los niveles de lípidos en sangre también ha sido estudiado (Aung, Maxwell, Jepson, Price, & Leng, 2007). Estos fármacos además ayudarían a reducir la inflamación crónica que padecen como consecuencia de la aterosclerosis (Libby, Ridker, & Hansson, 2009) disminuyendo los niveles de proteína C reactiva (Ridker, MacFadyen, Libby, & Glynn, 2010) involucrada en afecciones como infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, trombosis y embolias pulmonares.

Fármacos vasodilatadores como el Naftidrofurilo (Smith, Bradbury, & Fowkes, 2012), la Pentoxifilina (Lambert & Belch, 2013) y el Cilostazol (Soga, et al., 2011) se han utilizado para dar una respuesta a la estenosis o la oclusión, sin embargo el resultado de los ensayos clínicos llevados a cabo han sido poco concluyentes y no han podido demostrar suficiente evidencia para considerarse eficaces en el tratamiento de la CLTI ya que solo tienen efecto sobre el endotelio o el músculo liso vascular, sin resolver los fenómenos de arteriosclerosis, fibrosis o calcificación de los vasos sanguíneos típicamente observados en estos pacientes.

En consecuencia, se hace necesario la búsqueda de alternativas terapéuticas más efectivas a los tratamientos endovasculares y fármacos de síntesis química que sean capaces de estimular una regeneración vascular efectiva para reestablecer y aumentar el flujo sanguíneo de las zonas isquémicas en los miembros inferiores.

1.2.4 Terapias regenerativas para el tratamiento de la CLTI

El uso de terapias experimentales basadas en ATMPs ha surgido como un nuevo recurso para prevenir la amputación en pacientes sin opciones de tratamiento (Davies, 2012). Estos nuevos agentes terapéuticos tienen como objetivo principal aumentar la vascularización para así mejorar la perfusión del miembro afectado.

El incremento del suministro de sangre previene episodios isquémicos ya que mejora la vasodilatación, reduce la inflamación vascular, suprime la agregación plaquetaria y la trombosis. Además, contribuye a la restauración de la función vascular y su estructura normal incluyendo el endotelio y el músculo esquelético (Cooke & Meng, Vascular regeneration in peripheral artery disease, 2020).

La regeneración (Figura 9) incluye los procesos de angiogénesis o crecimiento vasos partir de preexistentes, la vasculogénesis gracias a la formación de nuevos vasos sanguíneos o la arteriogénesis mediante el aumento del diámetro de los vasos colaterales para facilitar el flujo de sangre (Haghighat, et al., 2019).

INTRODUCCIÓN

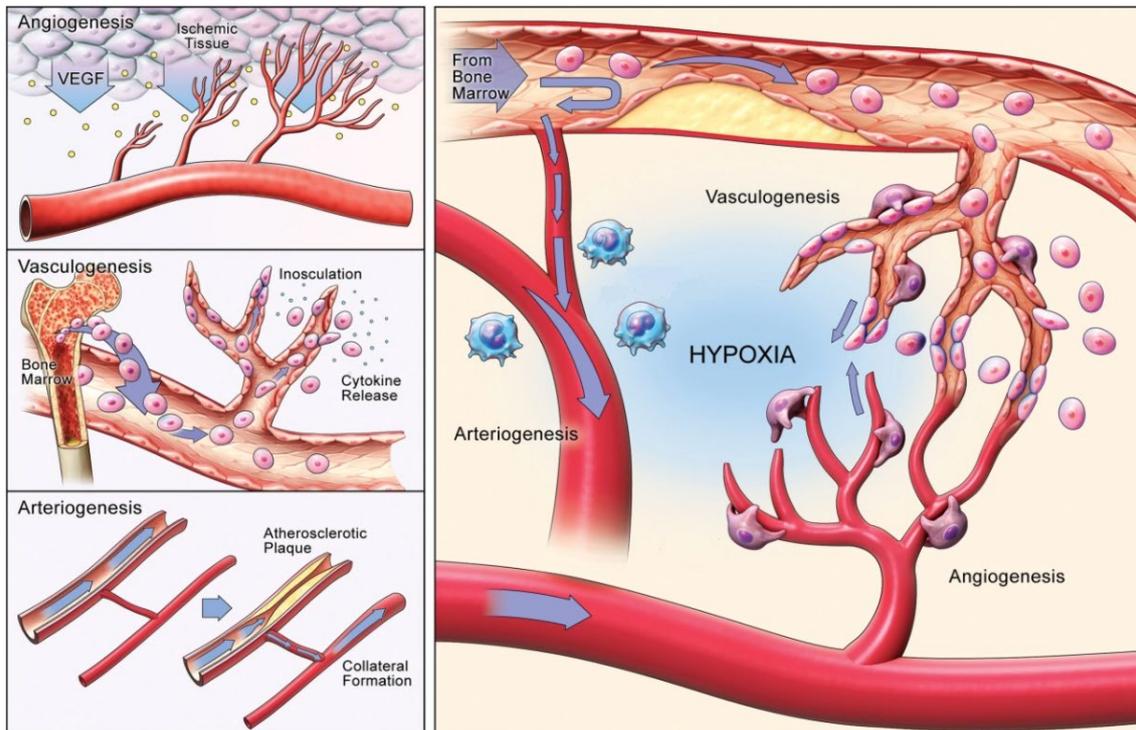


Figura 9. Mecanismos multicelulares de regeneración de vasos sanguíneos. Adaptado de (Qadura, Terenzi, Verma, Al-Omran, & Hess, 2018).

Angiogénesis o brote de nuevos vasos desde dentro de vasos preexistentes. Vasculogénesis o síntesis de novo de nuevos vasos a partir de células precursoras circulantes. Arteriogénesis o remodelación de canales colaterales preexistentes. Estos procesos requieren la coordinación de las células progenitoras y residentes en los tejidos para la regeneración de los vasos.

El sistema vascular en condiciones fisiológicas normales tiene la capacidad de compensar una isquemia mediante los mecanismos mencionados, sin embargo, en los pacientes que padecen CLTI éstos se encuentran mermados o disminuidos (Martin, Komada, & Sane, 2003).

Estos fenómenos implican la migración, proliferación y ensamblaje de células endoteliales y musculares lisas y están coordinados por varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

El presumible mecanismo de acción de la terapia regenerativa implica ya sea la diferenciación de células madre en células vasculares, y/o la inducción de expresión de factores de regeneración vascular.

INTRODUCCIÓN

- Terapia génica

Las técnicas de transferencia de genes in vivo para aplicaciones vasculares incluyen la transferencia de genes virales, la transferencia de genes liposómicos y la transferencia de ADN plasmídico.

Diversos estudios clínicos con diferentes factores de crecimiento angiogénicos han sido testados, algunos de ellos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Ensayos clínicos de productos de terapia génica para la CLTI. Adaptado de (Cooke & Losordo, 2015).

| Referencia (estudio clínico) | Producto y dosis | Ruta de administración | Criterio de inclusión | Resultados |
|--|--|---------------------------|------------------------------------|--|
| FGF | | | | |
| (Belch, et al., 2011) <i>TAMARIS</i> | Plásmido FGF-1. Inyecciones 8x0,5 mg | IM | Rutherford categoría 5-6 | Sin cambios en el ratio de amputación mayor o muerte |
| (Nikol, et al., 2008) <i>TALISMAN</i> | Plásmido FGF-1. Inyecciones 8x0,5 mg | IM | Sin opción de revascularización | Disminución de la tasa de amputaciones; sin cambios en la cicatrización de la úlceras |
| (Lederman, et al., 2002) <i>TRAFFIC</i> | Recombinante FGF-2. 30 mcg/kg dosis única o 30 mcg/kg dosis doble | IA | Rutherford categoría 2-3 | Aumento del tiempo máximo de caminata a los 90 días; sin cambios en la calidad de vida o ABI |
| VEGF | | | | |
| (Rajagopalan, et al., 2003). <i>RAVE</i> | VEG121; adenovirus. Dosis baja 4x10 ⁹ pu; dosis alta 4x10 ¹⁰ pu; 20 inyecciones | IM | Rutherford categoría 1-3 | Sin cambios en el tiempo máximo de caminata o ABI; aumento del edema periférico. |
| (Mäkinen, et al., 2002) | VEGF165; plásmido y Adenovirus. 2x10 ¹⁰ pu VEGF-Ad; o 2 | IA | Rutherford categoría 1-6 | Aumento de la vascularización en la |

INTRODUCCIÓN

| | | | | |
|---|--|----|---------------------------------|--|
| | mg/2mL VEGF plásmido | | | angiografía por sustracción digital |
| (Kusumanto, et al., 2006)) | VEGF165; plásmido 2 mg por cada dosis. 2 dosis | IM | Rutherford categoría 4-6 | Sin cambios en las tasas de amputación o dolor en reposo; mejoras en la ulceración de la piel. |
| HIF-1α | | | | |
| (Rajagopalan, et al., 2007) | HIF-1 α ; Adenovirus. Escalada de dosis; 1 \times 10 ⁸ a 2 \times 10 ¹¹ partículas virales | IM | Sin opción de revascularización | Sin amputaciones, resolución completa del dolor en reposo y curación completa de la úlcera. |
| (Creager, et al., 2011)) | HIF-1 α ; adenovirus 2 \times 10 ⁹ ; 2 \times 10 ¹⁰ ; 2 \times 10 ¹¹ partículas virales; o placebo | IM | Rutherford categoría 1-3 | Sin diferencias significativas en el tiempo máximo de caminata |
| HGF | | | | |
| (Powell, et al., 2008) <i>HGF-STAT</i>) | HGF plásmido; 0,4 mg \times 3 dosis; 4 mg \times 2 dosis; 4 mg \times 3 dosis | IM | Rutherford categoría 4-6 | Aumento de TcPO ₂ a los 6 meses en el grupo de dosis alta; sin cambios en la ratio amputación-muerte, tamaño de la úlcera, cicatrización de heridas, ABI, TBI |
| (Powell, Goodney, Mendelsohn, Moen, & Annex, 2010). <i>HGF-0205</i>) | HGF plásmido; 0.5 mg \times 3 dosis. | IM | Rutherford categoría 5-6 | Sin cambios en la cicatrización de heridas o amputación; aumento del índice TBI a los 6 meses; mejora del dolor en reposo. |
| (Shigematsu, et al., 2010) | HGF; plásmido 0.5 mg \times 2 dosis | IM | Rutherford categoría 4-5 | Reducción del tamaño de la úlcera; mayor calidad de vida; sin cambios en |

INTRODUCCIÓN

| | | | | |
|---------------------------------|--|----|------------------------------------|---|
| | | | | el dolor en reposo o ABI |
| (Henry, et al., 2011) VM202. | HGF (VM202); plásmido Aumento de dosis 2-16 mg | IM | Sin opción de revascularización | Aumento de los índices ABI y TBI; disminución del dolor |

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; HIF-1 α : factor Inducible por la Hipoxia; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; ABI: índice brazo tobillo; IA: intraarterial; IBI: índice brazo dedo; IM: intramuscular; TcPO₂: presión transcutánea de oxígeno; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.

- Terapia con células

Múltiples estudios clínicos que utilizaron células como terapia para la regeneración vascular se llevaron a cabo en la última década para el tratamiento de pacientes con CLTI (Sharma, Sinha, Pandey, & Chandrashekhara, 2019). La Tabla 5 incluye un resumen de aquellos más relevantes que incluyeron un número de pacientes mayor de 10 y que su seguimiento era mayor a 3 meses.

Estos ensayos clínicos incluyeron células madre embrionarias, de cordón umbilical y adultas, siendo más común los tratamientos derivados de médula ósea, aunque también se utilizaron células mesenquimales, de sangre periférica o incluso combinadas con el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Estos estudios incluyeron pacientes con isquemias menos severas, Categoría Rutherford 1-3, sin embargo, la mayoría se centraron en el tratamiento de pacientes clasificados como Categoría 4-6

A pesar de la evidencia sustancial de eficacia en estudios preclínicos, así como de algunos ensayos prometedores en humanos de fase I y II (Cooke & Losordo, 2015), los resultados para ensayos clínicos fase III en CLTI han sido negativos. Así que por el momento no existe ninguna terapia de ATMPs aprobada por las agencias regulatorias para el tratamiento de estos pacientes para su uso comercial.

INTRODUCCIÓN

Tabla 5. Estudios más relevantes que evalúan el rol de la terapia con células en la CLTI. Adaptado de (Sharma, Sinha, Pandey, & Chandrashekhara, 2019).

| Referencia (estudio clínico) | Tipo de células y dosis | Ruta de administración | Criterio de inclusión | Resultados |
|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|--|
| (Matoba, et al., 2008) <i>TACT</i> | 10 ⁹ BM MNCs vs. PB MNCs | 40 inyecciones IM | Rutherford categoría 4-6 | Dolor en reposo mejorado, cicatrización de úlceras. Amputación ratio no proporcionada |
| (Procházka, et al., 2010) | BM-MNCs. Dosis no especificada | 40 inyecciones IM de 1 mL. | Rutherford categoría 4-6 y úlceras en los pies | Reducción significativa de la ratio de amputación |
| (Benoit, et al., 2011) <i>BMAC</i> | 10 ⁹ BM-MNCs vs. Placebo | 40 inyecciones IM | Rutherford categoría 4-5 | Tendencia no significativa de reducción de la tasa de amputaciones frente a placebo |
| (Walter, et al., 2011) <i>PROVASA</i> | 10 ⁸ BM-MNCs una dosis o doble dosis | Inyección IA | Rutherford categoría 4-6I | Mejoría en la cicatrización de las úlceras, dolor en reposo frente a placebo. Sin diferencias en la tasa de amputaciones |
| (Powell, et al., 2012) <i>RESTORE</i> | Ixmyelocell-T BM- MSC cultivadas vs. placebo | 20 inyecciones IM | Rutherford categoría 4-6I | Mejoría tasas de mortalidad y gangrena. Sin diferencia. en tasa de amputaciones frente al placebo |
| (Ozturk, et al., 2012) | 10 ⁹ G-CSF /PB MNCs | Múltiples inyecciones IM | Pacientes diabéticos con CLTI | Mejoría del dolor en reposo y el índice ABI |
| (Teraa, et al., 2015) <i>JUVENTAS</i> | 2×10 ⁸ BM-MNCs vs placebo | Inyección IA (3 dosis cada 3 semanas) | CLTI con dolor en reposo y úlceras | No hay diferencia en la tasa de mortalidad |
| (Norgren, et al., 2019) | PLX-PAD 300×10 ⁶ células cultivadas derivadas de placenta | 30 inyecciones IM | Rutherford categoría 5 | Conclusión del ensayo diciembre 2020. No diferencias significativas frente al placebo |

ABI: índice tobillo brazo; BM-MNCs: células mononucleares derivadas de la médula ósea; BM-MSc: células mesenquimales derivadas de la médula ósea CLTI: Isquemia crónica que amenaza la extremidad; G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos; IA: Intraarterial; IM: Intramuscular; PB-MNCs: Células mononucleares de sangre periférica.

1.2.5 Tratamiento con REX-001

REX-001 es un medicamento a base de células fabricado a partir de médula ósea (Figura 10) que contiene células mieloides (granulocitos, monocitos y progenitores mieloides mixtos) células linfoides inmunes (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, y progenitores linfoides) y células madre hematopoyéticas (HSC), endoteliales (EPC), mesenquimales (MSC) implicadas en la modulación inmunitaria y la regeneración tisular.

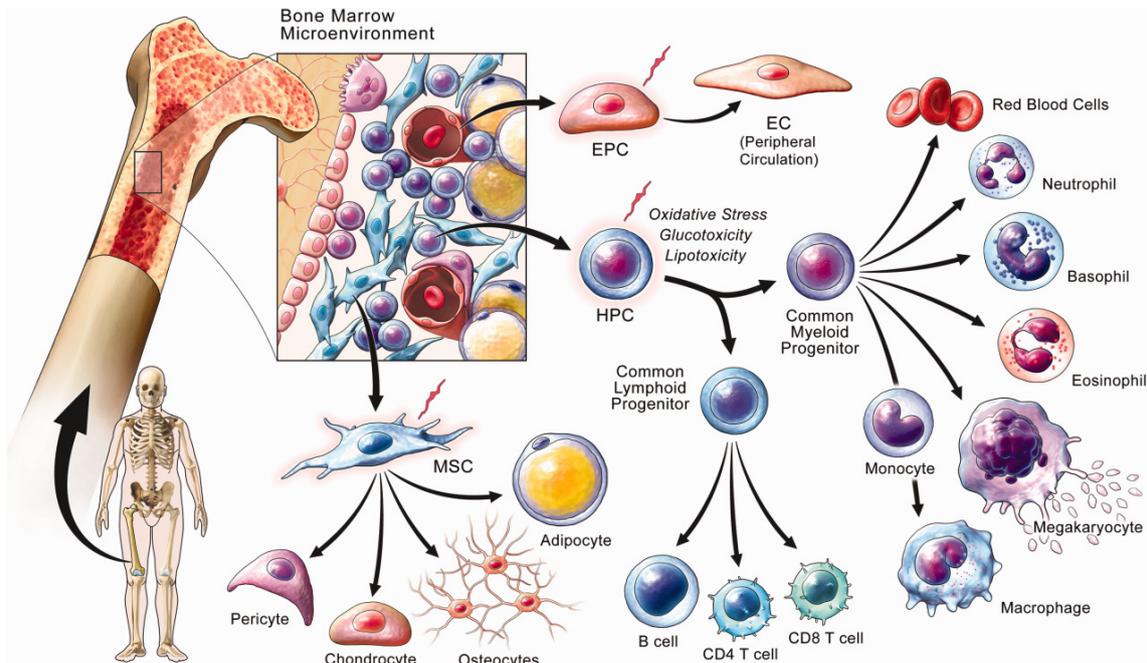


Figura 10. Células madre y progenitoras pro vasculares. Adaptado de (Qadura, Terenzi, Verma, Al-Omran, & Hess, 2018).

INTRODUCCIÓN

La médula ósea humana es un rico reservorio de células madre y progenitoras que coordinan la reparación de los vasos sanguíneos. Las células hematopoyéticas mieloides secretan señales angiocrinas que estimulan la angiogénesis. Las células endoteliales circulantes y residentes en los vasos actúan como los componentes básicos de los vasos sanguíneos y se inoculan en la pared del vaso durante la vasculogénesis. Las células estromales multipotentes (también conocidas como células madre mesenquimales) generan pericitos que envuelven los vasos y células del músculo liso que estabilizan los vasos recién formados y secretan factores tróficos que reclutan células accesorias como los macrófagos implicadas en la activación de la remodelación arteriogénica y la perfusión de los vasos colaterales.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las dos principales condiciones fisiopatológicas de los pacientes que padecen CLTI son la inflamación crónica junto con una disminución de la capacidad de los mecanismos compensatorios de regeneración vascular frente a la isquemia.

En este sentido el hecho de que REX-001 sea un producto multicelular se considera un valor añadido frente a otros tratamientos en los que solamente un solo tipo celular forma parte de su composición o aquellos basados en factores de crecimiento extracelulares, ya que gracias a esto es capaz de activar distintos procesos biológicos orientados por un lado a la resolución de los procesos inflamatorios y la cicatrización de las úlceras y por otro a la restauración del flujo sanguíneo mediante la regeneración vascular.

Además, la administración de una alta dosis de células autólogas y la infusión intraarterial mejoran su supervivencia y su retención en el tejido isquémico, de esta manera hay una mejor distribución celular y se prolonga su acción haciendo de REX-001 un medicamento muy seguro y con una gran eficacia.

1.3 Desarrollo clínico de REX-001

Los requerimientos clínicos que deben cumplir los ATMPs son los mismos que para cualquier otro tipo de medicamento para uso humano (Gálvez, Clares, Hmadcha, Ruiz, & Soria, 2013) siguiendo las mismas fases de desarrollo clínico (Figura 11) y la normativa de buenas prácticas clínicas (GCPs) (Grimes, et al., 2005).

Aunque si bien esto es cierto, existen ciertas excepciones como la que recoge el reglamento europeo (EC) 1394/2007 que permite la preparación de estos medicamentos de forma no rutinaria de acuerdo con las normas de calidad específicas, en un hospital y bajo la exclusiva responsabilidad profesional de un médico, con el fin de cumplir con una prescripción médica de un producto hecho a medida para un paciente individual.



Figura 11. Esquema del desarrollo clínico de un medicamento adaptado de (Acosta, 2016). Se muestran las principales fases de éste (preclínica, clínica y comercialización) y el tipo de evaluación clínica y de seguridad que se lleva en cada etapa.

REX-001 está siendo actualmente estudiado en el marco de un ensayo clínico fase III. Los estudios previos fase I/IIa y fase IIb también se realizaron en pacientes con diabetes mellitus afectados por la CLTI y en los que fue evaluada la seguridad y la viabilidad de la administración de este ATMP. Estos estudios comenzaron en 2007 y 2009 respectivamente.

1.3.1 Ensayo clínico fase I/IIa

Este ensayo (*ClinicalTrials.gov* NCT00872326) se desarrolló íntegramente en el Hospital Universitario Virgen Macarena en colaboración con el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) ambos en Sevilla.

Se trataron a un total de 20 pacientes sin opción de revascularización administrándose la suspensión celular de REX-001 de forma intraarterial (Ruiz-Salmeron, et al., 2011).

INTRODUCCIÓN

Para la preparación del producto celular se utilizaban 60 mL de BM la cual era diluida en 40 mL de solución salina heparinizada. Las células MNCs se obtenían tras realizar un gradiente de densidad con Ficoll, seguidamente eran lavadas, filtradas y suspendidas en 20 mL de tampón fosfato salino (PBS).

El número de células MNCs obtenidas osciló en un rango entre $113,7 \times 10^6$ y $434,5 \times 10^6$, mientras que la cantidad de células progenitoras $CD34^+$ administradas fue de $2,14 \times 10^6$ a $7,81 \times 10^6$.

Los primeros beneficios clínicos del tratamiento fue una percepción generalizada de menos dolor en las extremidades y una mejoría de la distancia caminada sin dolor. Además, los resultados mostraron que la administración intraarterial de dosis bajas de células derivadas de BM producía una amplia vascularización (Figura 12) y que suponía una disminución en el grado Rutherford-Becker y una curación casi completa de lesiones tróficas diabéticas de las extremidades inferiores.

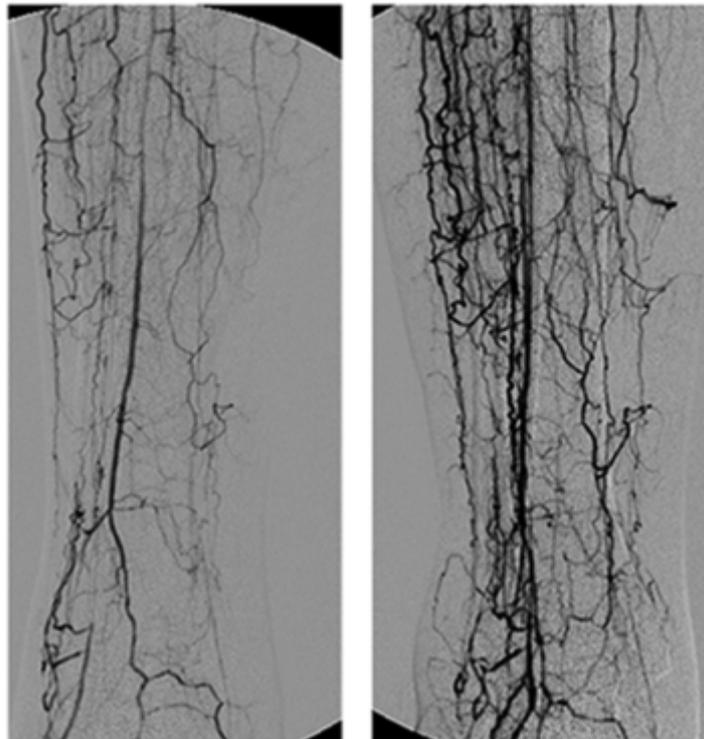


Figura 12. Evaluación angiográfica a los 3 meses de seguimiento después de la administración de las células MNCs derivadas de BM. Adaptado de (Ruiz-Salmeron, et al., 2011).

La imagen de la izquierda muestra una angiografía de la extremidad afectada antes de comenzar el tratamiento mientras que la de la derecha 3 meses después de la infusión del preparado celular en la que se puede apreciar claramente la aparición de vasos sanguíneos colaterales.

INTRODUCCIÓN

Ninguno de los pacientes presentó complicaciones clínicas durante los 12 meses de seguimiento tras la administración del medicamento, aunque 4 de ellos fallecieron por causas relacionadas con las complicaciones cardiovasculares derivadas de la enfermedad y ajenas al tratamiento con células ya que se produjeron al menos 3 meses más tarde después de la administración.

1.3.2 Ensayo clínico fase IIb

El estudio clínico fase II (*ClinicalTrials.gov* NCT00987363) se llevó a cabo en varios centros hospitalarios de Andalucía y uno de la Región de Murcia, siendo el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba el lugar de referencia.

Se incluyeron pacientes diabéticos afectados con CLTI sin opción de revascularización y que fueron clasificados según Rutherford-Becker en categoría 4 y 5. A diferencia del estudio clínico Fase I/IIa no se incluyeron pacientes de categoría 6.

El estudio aleatorizado y controlado tenía como objetivo la búsqueda de dosis adecuada. Los pacientes se asignaron al grupo control (tratamiento convencional) o bien a uno de los 3 niveles de dosis del grupo experimental (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de los de pacientes participantes en diferentes grupos durante el ensayo clínico fase IIb de REX-001 en función de la dosis administrada.

| Número de grupo | Número de pacientes | Dosis |
|-------------------|---------------------|-------------|
| Grupo 1 (control) | X | No tratados |
| Grupo 2 | X | Baja |
| Grupo 3 | X | Media |
| Grupo 4 | X | Alta |

A los 12 meses de la infusión celular intraarterial los pacientes incluidos en los grupos de tratamiento mostraron una mejoría substancial frente a los del grupo control.

REX-001 demostró una muy buena eficacia en esta fase IIb del ensayo clínico sin reportar efectos adversos atribuibles al tratamiento.

1.3.3 Ensayo clínico fase III

Tras los resultados obtenidos en las fases clínicas anteriores que indicaban que REX-001 era seguro y bien tolerado en un amplio rango de dosis, además de eficaz, se apostó por la realización de un siguiente ensayo clínico fase III.

El estudio, por recomendación de la EMA, se dividió en dos indicaciones estableciéndose un estudio para pacientes diabéticos con CLTI de Categoría 4 (*ClinicalTrials.gov NCT03111238*) y otro para pacientes Categoría 5 (*ClinicalTrials.gov NCT03174522*) según la clasificación de Rutherford-Becker.

Este ensayo comenzó en año 2017 y se está llevando a cabo en diferentes centros clínicos en 8 países europeos. Es un ensayo aleatorizado, controlado con placebo y doble ciego. Aquellos pacientes que resultan elegibles son sometidos a una intervención quirúrgica en la cual bajo anestesia general o local se extrae la BM.

Tras el proceso de producción y en menos de 48 horas reciben una sola administración intraarterial de REX-001 o un placebo equivalente.

El número de pacientes establecido y necesario para demostrar la eficacia de REX-001 en este estudio clínico fase III son 78 para Categoría 5 y 60 para Categoría 4 a los cuales se les realiza un seguimiento después de la infusión del medicamento estableciéndose el punto de valoración final a los 12 meses.

Se considera el éxito de la terapia si los pacientes han podido alcanzar una disminución de al menos una categoría según la clasificación Rutherford.

1.4 Desarrollo farmacéutico para un medicamento de terapias avanzadas

El gran reto para el desarrollador/fabricante de medicamentos es alcanzar una comprensión cuantitativa y detallada de la relación entre las variables del proceso de producción y las características del medicamento que produce.

Si el desarrollo y la fabricación se ejecutan utilizando las herramientas adecuadas se puede conseguir el objetivo de obtener procesos más robustos y con menores tasas de error en las operaciones de producción. Para ello es necesario identificar la variabilidad del proceso, comprender los rangos aceptables para poder manejarla y por consiguiente aplicar herramientas o técnicas para minimizarla (Silverman, et al., 2019).

INTRODUCCIÓN

Así pues, una terapia avanzada exitosa será aquella que consiga fabricar un producto consistente, independientemente del tipo que sea o su indicación y que aplique métodos de desarrollo sólidos para conseguir procesos de producción bien caracterizados (Campbell, et al., 2015).

Como se ha mencionado anteriormente los ATMPs son un prometedor avance terapéutico para el tratamiento de muchas enfermedades que no pueden ser abordadas por los medicamentos convencionales. Sin embargo, este gran potencial plantea una serie de barreras a la hora del desarrollo y la producción de este tipo de medicamentos que hacen que las tareas o actividades para garantizar una correcta funcionalidad del producto y su capacidad de fabricación rentable aún se consideren un desafío.

Estos factores pueden ser el conocimiento incompleto del mecanismo de acción, la dificultad para la caracterización celular o genética del producto, o a la variabilidad de los materiales de partida (Kirouac & Zandstra, 2008). Todo esto plantea una dificultad añadida a la hora de estandarizar y obtener procesos reproducibles los cuales requieren de flexibilidad para vencer la incertidumbre y obtener productos finales consistentes. Entre los diversos factores mencionados que influyen en la fabricación de los medicamentos de ATMPs la variabilidad entre los donantes es la principal causa de las diferencias en los productos o lotes terminados, especialmente en aquellos que son a base de células (Heathman, et al., 2016).

La metodología en auge, y que se ha aplicado durante el transcurso de esta tesis, para tratar de resolver los inconvenientes descritos es el modelo de desarrollo basado en el concepto de QbD. Los principios, prácticas y terminología del modelo de desarrollo de QbD han sido ampliamente comunicados y aceptados en foros y debates de la industria farmacéutica clásica y biotecnológica, publicaciones científicas y organismos para la reglamentación de sus actividades como la conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano (ICH), la EMA o la FDA. Esta iniciativa para el conocimiento del modelo de QbD fue concebida para fomentar y promover un mayor enfoque científico e integral durante el desarrollo, fabricación y regulación de productos farmacéuticos y biofarmacéuticos (Looby, et al., 2011).

Tradicionalmente la evaluación de los requerimientos de calidad, seguridad y eficacia se han realizado una vez finalizado el proceso de fabricación del fármaco sin tener en cuenta la variabilidad que se pudiera dar en su fabricación y rechazando aquellos lotes que no los cumplían (Holm, Allesø, Bryder, & Holm, 2017). A partir de la primera década del siglo XXI y con la aparición de los productos biológicos este criterio cambia y es definitivamente impulsado con la aparición del concepto de QbD en la guía de la ICH Q8(R2) del año 2006 en la cual se destaca la idea de

INTRODUCCIÓN

que los estándares de calidad deben estar integrados en el producto mediante su diseño y producción y no pueden simplemente ser testeados en el producto final, asentando así la perspectiva científico-farmacéutica la cual se enfoca en obtener un producto constante sin lotes fallidos o con los mínimos lotes rechazados.

En la actualidad existe una adopción generalizada del QbD por parte de los fabricantes de productos farmacéuticos quedando en desuso los modelos de desarrollo poco flexibles que se basaban en materiales de partida invariables, y procesos de producción inalterables ya que éstos no se adaptan a las necesidades que se presentan a la hora de desarrollar un fármaco y especialmente en aquellos basados en células o genes (Lipsitz, Timmins, & Zandstra, 2016).

De esta manera, la metodología de QbD se convierte en una herramienta crucial para facilitar la aparición de las terapias avanzadas como una opción terapéutica de rutina (Finkler & Krummen, 2016).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo tecnológico-farmacéutico de un medicamento de ingeniería tisular, durante el transcurso del ensayo clínico fase III siguiendo el modelo de calidad desde el diseño.

Objetivos secundarios

Establecer un proceso de producción robusto y bien controlado que sea capaz de dar como resultado un producto farmacéutico de calidad consistente.

Disminuir la variabilidad del proceso de fabricación durante el desarrollo del ensayo clínico fase III para una futura escala comercial.

Identificar el origen de la variabilidad del proceso de producción y definir los rangos de trabajo

METODOLOGÍA

III. METODOLOGÍA

3.1 Modelo de desarrollo basado en la calidad desde el diseño

3.1.1 Definición y concepto

Según la guía de armonización regulatoria de la ICH Q8(R2) sobre desarrollo farmacéutico el QbD es un acercamiento sistemático que comienza con objetivos predefinidos y enfatiza en la comprensión de los productos y el control de los procesos. (EMA Committee for Human Medicinal Products, 2009). La finalidad del QbD incluye incrementar la capacidad y la eficiencia del proceso de producción, reducir la variabilidad y los defectos para lograr así un aumento en la robustez en la fabricación que asegure un alto nivel de calidad de los productos. (Rawal, Singh, & Amiji, 2019).

Se fundamenta en el empleo de ciencia verificable y trata de identificar aquellas características del medicamento que se consideran críticas desde el punto de vista del paciente para minimizarlas haciendo hincapié en el estudio y la comprensión de las fuentes de variabilidad de los materiales utilizados y de la propia fabricación (Aponte, Díaz, & Huertas, 2015). Se aplica a diferentes áreas del desarrollo farmacéutico como el diseño de principios activos, desarrollo de formas farmacéuticas, proceso de producción y su escalado.

3.1.2 Elementos del modelo de desarrollo farmacéutico

La implementación del QbD consta de varios pasos (Figura 13). El desarrollo comienza con la definición del perfil de calidad objetivo del producto (QTPP) cuya información debe ser trasladada a las características o atributos de calidad críticos (CQAs) que definen las propiedades del fármaco (Lawrence, et al., 2014). Esto junto con el establecimiento de los parámetros críticos del proceso (CPPs), que relacionan las variables del proceso de producción que influyen en esas características del producto, permiten producir un medicamento que cumpla con los requerimientos regulatorios exigidos.

Por último, se establece una estrategia de control que incluye las especificaciones del producto y los controles en el proceso de producción teniendo en consideración las capacidades del proceso definiendo los rangos óptimos para la fabricación y la mejora continua como propósito final según aumente el conocimiento sobre el proceso.

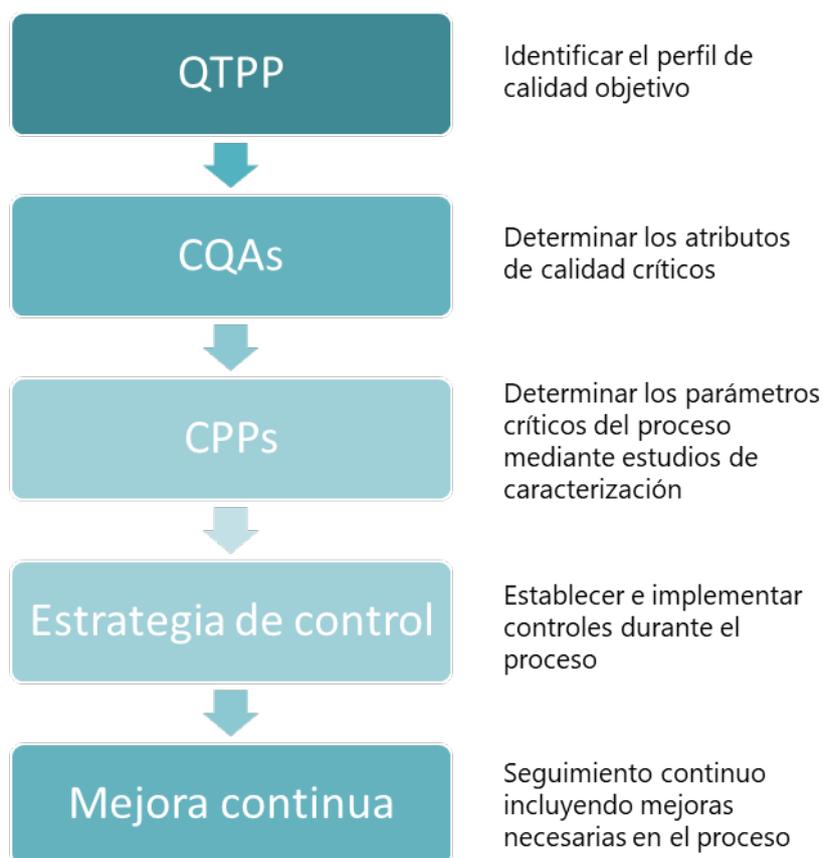


Figura 13. Esquema de los diferentes elementos que forman parte del método de desarrollo de QbD.

3.1.3 Perfil de calidad objetivo del producto

El desarrollo de un producto farmacéutico, utilizando el enfoque de QbD, comienza teniendo el final en mente, es decir, describiendo todas aquellas características de calidad deseadas para el medicamento. Este resumen prospectivo se conoce como QTPP.

El QTPP recoge la indicación, dosis y concentración, vía de administración, forma farmacéutica y potencia, contraindicaciones, precauciones, reacciones adversas, etc. (Tabla 7) (Iglesias-Lopez, Agustí, Obach, & Vallano, 2019).

Tabla 7. Ejemplo de los diferentes elementos del QTPP.

| |
|---------------------------------------|
| Características del producto |
| Descripción |
| Células por unidad de producto |
| Dosis por unidad de producto |
| Tamaño de lote |
| Condiciones de almacenamiento y envío |
| Perfil de uso |
| Indicación |
| Ruta de administración |
| Tiempo de tratamiento |
| Perfil de seguridad |
| Perfil de impurezas |
| Límite de residuos |
| Agentes microbianos y adventicios |

3.1.4 Atributos de calidad críticos

Una vez establecidos los objetivos finales es necesario implementar una estrategia para abordarlos. Para ello, se determinan los CQAs del producto terminado que son aquellas características físicas, químicas, biológicas o microbiológicas del medicamento que deben ser necesariamente controladas (Martin-Moe, et al., 2011).

Para establecer un listado de atributos de calidad la principal fuente de información es el QTPP, seguida de la literatura científica de productos similares o referentes y el conocimiento acumulado durante el desarrollo de las fases clínicas y no clínicas. (Rouiller, et al., 2012).

Debido a la alta criticidad la definición de algunos atributos de calidad es de obligado cumplimiento como, por ejemplo, composición, potencia, apariencia o ausencia de agentes adventicios (Alt, et al., 2016).

Los CQAs también son base fundamental para el desarrollo del proceso de fabricación. Así, nuevos cambios o mejoras en éste se valoran a través de estudios de comparabilidad, en los que se evalúa como se afectan los atributos de calidad debido a esas modificaciones (Rathore & Winkle, 2009).

La definición de los CQAs es un requerimiento de las agencias regulatorias del medicamento y debe ser fundamentado en argumentos razonados a través del conocimiento para conocer el impacto de cada uno de ellos en relación con la seguridad del paciente y la eficacia del producto.

3.1.5 Diseño de proceso y caracterización para la definir los parámetros críticos

El proceso de fabricación farmacéutico generalmente consiste en una serie de operaciones o etapas diseñadas para obtener un producto final que debe satisfacer las necesidades del paciente. En cada una de ellas existen diferentes parámetros de proceso, como pueden ser la temperatura o la presión, con unos valores que deben ser definidos.

El paradigma del QbD establece que la calidad de un producto farmacéutico debe garantizarse en base a los CQAs establecidos. ¿Pero cómo asegurar el logro de estos requerimientos? Para conseguirlo es imprescindible el estudio de las variables que entran en juego durante la producción y poder así controlarlas (Nadpara, Thumar, Kalola, & Patel, 2012). De esta manera se define como parámetro crítico del proceso (CPP) aquel cuya variabilidad tiene influencia sobre los CQAs y por lo tanto debe ser monitorizado y controlado para garantizar una correcta ejecución de la etapa de fabricación.

La forma de crear ese conocimiento sobre el proceso de producción es a través de estudios de caracterización o ensayos experimentales. La finalidad de éstos es comprender cómo afectan los parámetros de proceso al rendimiento de éste, mediante los indicadores de proceso (PPIs), y a los propios CQAs y poder así realizar los ajustes necesarios en los rangos operativos o de trabajo e implementar mejoras para una fabricación robusta y flexible que pueda ofrecer un producto consistente.

La caracterización de un proceso de producción comienza con una detallada descripción de cada una de las fases o etapas del proceso identificando los CPPs. A continuación, se diseñan y realizan los estudios experimentales. Y por último se analizan los datos y se vinculan con los CQAs para establecer los rangos aceptables de trabajo (Hakemeyer, et al., 2016).

Los estudios de caracterización de procesos se pueden realizar a escala real de fabricación o utilizando modelos a escala reducida. Los modelos a pequeña escala representan una valiosa herramienta para simplificar las estrategias de desarrollo, permitiendo disminuir la cantidad de materia prima y por tanto los recursos necesarios. Esta estrategia es de gran utilidad para medicamentos biológicos y en especial aquellos ATMPs autólogos debido a la limitada disponibilidad y el alto coste de los materiales de partida.

3.1.6 Estrategia de control y mejora continua

El conocimiento adquirido, a través de los estudios de desarrollo, constituye la base con el establecimiento de una estrategia de control que se define como el conjunto planificado de controles derivados de las características del producto y comprensión del proceso que aseguran la correcta fabricación del medicamento y cumplir sus requerimientos de calidad (Rathore A. S., 2009).

Los controles en proceso abarcan desde los materiales de partida, los productos intermedios y el producto terminado evaluando si los CQAs y los PPIs están dentro de los rangos de aceptación establecidos.

Junto con la estrategia de control, el concepto de mejora continua culmina con la estrategia de QbD. Para ello se capturan y recopilan las variaciones observadas a lo largo del tiempo de cada uno de los lotes producidos de forma rutinaria, estos datos sirven para realizar un análisis de tendencias e identificar las relaciones de causa/efecto para aquellos valores que estén fuera de rango. Así, en caso de que fuera necesario, se pueden tomar las decisiones adecuadas para realizar pequeños ajustes en el proceso de producción.

3.2 Proceso de fabricación de REX-001 durante el ensayo clínico fase III

La fabricación de REX-001 se realiza siguiendo la más estricta regulación vigente siguiendo las normas de correcta fabricación (GMPs) para la fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario que se basan en reglamentos europeos, reales decretos, reglamentos y normas de la ICH. Para cumplir con esta normativa vigente las instalaciones donde se lleva a cabo el proceso de producción conforman un área restringida, denominada sala blanca, en la cual se controla y monitoriza tanto la temperatura como la presión en todo momento y el número de partículas viables y no viables en el ambiente.

Todas las terapias basadas en células comienzan con una fuente inicial a partir de un donante o de una línea celular. En este caso el material de partida (SM) para la producción de REX-001 consiste en la BM del paciente diabético, que se someterá al tratamiento con sus propias células, junto solución anticoagulante.

El proceso de aspirado (Figura 14) se realiza de acuerdo con un protocolo establecido en base a criterios científico-médicos y el cual establece que la extracción de BM debe hacerse de la cresta ilíaca del paciente utilizando jeringas de pequeño volumen para minimizar la extracción de sangre

capilar que diluiría el contenido de células provenientes de la BM (Hernigou, et al., 2013) y además obtener una mayor eficiencia a la hora de obtener células progenitoras (Lana, et al., 2021).

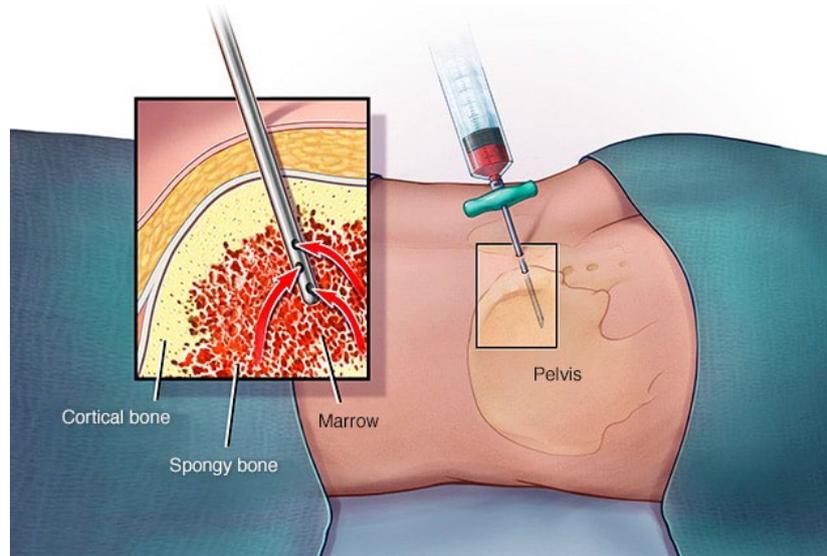


Figura 14. Aspirado de BM de la cresta ilíaca de la pelvis de un paciente para la obtención de células para el SM. Adaptado de (Draganski, Deason, & Craig, 2019).

La formación de coágulos durante el procedimiento de aspirado de BM se previene enjuagando todas las jeringas con solución anticoagulante y se mantiene en el tiempo por la acción propio anticoagulante añadido a la bolsa de colección del SM.

La cantidad utilizada de SM derivado de BM para la fabricación del principio activo (DS) es variable y se hace pasar a través de un filtro para eliminar posibles restos óseos o pequeños agregados que pudiera contener tras la extracción y que podrían dificultar el buen desarrollo del resto del proceso de producción. Una vez filtrado el SM, se reduce su volumen mediante la eliminación del plasma y parte de los RBCs. A continuación, se realiza el enriquecimiento de las células MNCs. y se filtra de nuevo.

La producción prosigue para la obtención del producto terminado con la manipulación del DS y la suspensión de las células en el medio de formulación que contiene los excipientes hasta conseguir una concentración final deseada.

En los siguientes apartados se describe de manera detallada las etapas del proceso de producción de REX-001 durante el ensayo clínico fase III.

3.2.1 Filtración del material de partida

Como se ha mencionado la cantidad recibida de SM es variable, pero con una cantidad suficiente de células para el buen transcurso del proceso de fabricación. A continuación, se realiza una filtración por gravedad de todo el SM a través de un filtro en línea para eliminar potenciales agregados, trozos de hueso y grasa que pudieran derivar de la extracción y se recoge en una bolsa de transferencia

Este paso se realiza como medida de precaución para evitar obstrucciones durante el siguiente paso del procedimiento de reducción de volumen.

3.2.2 Reducción de volumen del material de partida

La etapa de reducción de volumen se lleva a cabo para disminuir el volumen del SM eliminando la fracción de plasma y parte de los RBCs usando un solo paso de centrifugación. En esta etapa no se agrega ningún reactivo para la separación celular y, por tanto, las células permanecen sin seleccionar.

Este procedimiento requiere uno o dos ciclos de separación, está supeditado por la cantidad de volumen de SM y se realiza de forma automatizada y cerrada en el procesador de células Sepax 2 S-100.

La reducción de volumen llevada a cabo en cada lote es de varias veces el volumen inicial y dado que la reducción de volumen es la misma para cada lote, el volumen de capa leucocitaria (BC) obtenido depende del volumen del SM.

3.2.3 Gradiente de densidad con Ficoll y lavado celular

Esta etapa del proceso tiene una incidencia crucial en la composición del producto farmacéutico REX-001, por lo que puede considerarse como el paso principal de todo el proceso.

El material celular de BC obtenido de la etapa anterior, es procesado mediante la técnica de gradiente de densidad con Ficoll que permite la separación de diferentes poblaciones celulares en función de su densidad y poder así descartar las células más densas, en este caso RBCs y GRAs. Esta operación se realiza de nuevo de forma completamente automatizada y cerrada en el Sepax 2 S-100.

Tras la separación de las células en diferentes capas, la fracción de células MNCs recuperada se prepara para proceder al lavado celular y eliminar el medio el Ficoll adicionando solución de lavado que consiste en una solución salina suplementada con albúmina sérica humana (HSA).

Al ser el Ficoll un polisacárido altamente ramificado muy hidrófilo y extremadamente soluble en agua, debido a la abundancia de grupos hidroxilo, el componente principal de la solución de lavado es agua para inyectables con cloruro de sodio y así éste es fácilmente eliminado.

3.2.4 Filtración

La suspensión celular enriquecida en MNCs obtenida tras la fase de gradiente de densidad se recoge y se filtra a través de un filtro en un tubo de centrifuga estéril dentro de la cabina de seguridad biológica (BSC)-clase A.

3.2.5 Centrifugación

Una vez la sustancia activa está adecuadamente filtrada, ésta se lleva a la centrifuga de sobre mesa y se centrifuga a una velocidad y tiempo determinados para obtener un pellet celular adecuado.

Durante esta etapa de centrifugación, se prepara el medio de formulación que contiene los excipientes de REX-001, en la BSC-clase A.

3.2.6 Formulación

Después de la centrifugación, la DS se transfiere de nuevo a la BSC-clase A, y se retira el sobrenadante. A continuación, el sedimento celular de la sustancia farmacológica se resuspende con medio de formulación.

Se toma una pequeña muestra para determinar la concentración celular y se ajusta con medio de formulación hasta la concentración objetiva si fuera necesario.

Si la concentración es inferior al límite establecido el producto final estaría fuera del rango de dosis aceptado y la administración del medicamento se realiza fuera del protocolo clínico sin verse comprometida la seguridad del paciente.

3.2.7 Acondicionamiento final y almacenamiento del producto terminado

Del volumen final conseguido, los mililitros requeridos para la dosis se distribuyen equitativamente en dos jeringas para su administración intraarterial y cantidad inferior se transfiere a una tercera jeringa idéntica para el control de calidad del producto.

Una vez se llena hasta el volumen indicado, seguidamente se colocan y cierran los tapones, que harán de tope, sin dejar aire para que el émbolo ya no se pueda mover.

Tras el acondicionamiento primario, el producto se etiqueta con la información del lote específico y las jeringas de infusión se empaquetan por separado en una bolsa de plástico con cierre estéril de un solo uso. Ambas bolsas están etiquetadas de la misma manera que las jeringas conformando así el acondicionamiento secundario.

A continuación, ambas bolsas se trasladan desde la sala blanca al laboratorio de control de calidad para ser inspeccionadas visualmente y se almacenan a temperatura controlada en un rango de 2-8°C antes de su envío al centro clínico correspondiente.

3.3 Desarrollo de un modelo escalado para el gradiente de densidad con Ficoll

Los estudios de caracterización de una etapa de un proceso de fabricación pueden ejecutarse a escala real o de fabricación o mediante un modelo a pequeña escala.

Esto es especialmente útil para medicamentos biológicos, como es el caso de REX-001 en el que la disponibilidad de BM es escasa y su alto coste la convierten en un material muy valioso por lo que estos modelos a escala reducida permiten realizar distintos estudios optimizando los recursos necesarios.

Así los modelos a pequeña escala representan una estrategia de desarrollo, muy aceptada en el enfoque del QbD para el desarrollo farmacéutico que permiten disminuir la cantidad de material a utilizar y poder llevar a cabo de esta manera más ensayos experimentales.

Estos modelos deben tener en cuenta los efectos del escalado, considerar sus limitaciones, ser justificados científicamente mediante su validación y ser suficientemente representativos de la escala real (Li, et al., 2006).

El desarrollo de un modelo a pequeña escala establece como primera acción la identificación de aquellos parámetros de un proceso de producción que son dependientes de la escala para poder proporcionarlos y de aquellos que son independientes, los cuales mantienen los valores utilizados a escala real (Sandner, Pybus, McCreath, & Glassey, 2019).

Durante el transcurso de este trabajo de tesis se desarrolló y validó un modelo a escala reducida para la etapa de gradiente de densidad con Ficoll utilizando como soporte para la separación celular en tubos de centrifuga de 15 mL

Para ello inicialmente se identificaron todo los parámetros de proceso para esta etapa y se clasificaron en dependientes e independientes de la escala (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de proceso para la etapa de gradiente de densidad con Ficoll y posterior lavado celular clasificados en aquellos que son dependientes de la escala y los que no.

| Fase del proceso | Dependientes de la escala | Independientes de la escala |
|-------------------------|---|------------------------------------|
| Gradiente de densidad | Volumen de la muestra | Velocidad de centrifugación |
| | | Tiempo de centrifugación |
| | Volumen de Ficoll | HCT |
| Lavado celular | Volumen de solución de lavado | Velocidad de lavado |
| | | Tiempo de lavado |
| | Volumen intermedio de células entre lavados | Ciclos de lavado |

HCT: hematocrito.

Para que el modelo fuera válido era fundamental mantener el mismo grado de separación celular independientemente de la cantidad de BC procesada. Para lograr esto fue necesario mantener la altura que alcanza el volumen de la muestra y de Ficoll en el procesador celular Sepax 2 S-100 en un tubo de centrifuga de 15 mL utilizado para realizar el proceso a escala reducida (Sanjuan-Gimenez, et al., 2021).

Dado que la forma de la cámara dónde se produce la separación en el procesador celular se asemeja a un cilindro y conociendo el diámetro de ésta se aplicó la siguiente fórmula para calcular la altura.

$$V = \pi \times r^2 \times h$$

De esta manera el volumen de 90 mL de Ficoll utilizado a escala real correspondía a una altura 4,08 cm que para el tubo de 15 mL representaban 5,5 mL. Utilizando el mismo razonamiento se pudo representar el rango de volúmenes de BC.

Para el lavado celular, por un lado, se utilizó la cantidad suficiente para llenar el tubo al máximo de su capacidad al igual que ocurre en el Sepax 2 S-100 y por otro, el volumen de pellet de células intermedio entre los lavados también fue proporcionado.

Tanto para el tiempo y la velocidad de centrifugación en el gradiente de densidad y en la fase de lavado, el HCT y el número de ciclos de lavado se mantuvieron los valores a escala de fabricación.

Una vez establecida la equivalencia entre escalas el modelo se validó realizando un estudio de comparabilidad entre 6 procesos a pequeña escala y 20 lotes a escala real utilizando análisis estadístico two one-sided test (TOST) (Hakemeyer, et al., 2016) usando el software estadístico Minitab® 19.1.

3.4 Desarrollo de las etapas de centrifugación y formulación del principio activo

Durante el ensayo clínico, el proceso de fabricación desde la sustancia activa hasta la consecución del medicamento se realiza en etapas en abierto con intervenciones manuales que requieren operadores especialistas y una infraestructura dedicada con una sala blanca y con una BSC-clase A lo que conlleva un mayor riesgo de contaminación microbiológica para el producto.

Por estos motivos se evaluó la manera de conseguir que la etapa de centrifugación y formulación del proceso de producción de REX-001 se realizase de forma automatizada y cerrada. Conociendo el funcionamiento del procesador celular se investigó la posibilidad de adaptar algún protocolo de éste para obtener el producto final celular formulado con sus excipientes correspondientes.

De esta manera se seleccionó un protocolo diseñado para lavar, concentrar e intercambiar el medio del producto celular en el dispositivo Sepax 2 para evaluar la factibilidad de cerrar y automatizar las etapas de centrifugación y formulación manteniendo el mismo procedimiento fundamental.

3.5 Descripción de los métodos analíticos

Los métodos analíticos utilizados para evaluar los estudios experimentales se resumen en la siguiente tabla (Tabla 9). El recuento de células se realizó en un analizador hematológico automatizado y la determinación fenotípica de progenitores hematopoyéticos y subpoblaciones celulares en un citómetro de flujo.

Tabla 9. Test y métodos analíticos para la detección y cuantificación de las diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas

| Test | Método |
|---|---|
| Conteo celular (células/mL) | |
| Conteo WBCs | |
| Conteo RBCs | Detección óptica e impedancia |
| Conteo PLTs | |
| Determinación de células maduras (%) | |
| Linfocitos T (CD45 ⁺ /CD3 ⁺) | |
| Linfocitos B (CD45 ⁺ /CD19 ⁺) | |
| Linfocitos NK (CD45 ⁺ /SSC low /CD16 ⁺ /CD56 ⁺ /CD3 ⁻) | 8-Color Kit de inmunfenotipado de Miltenyi Biotec para determinar los marcadores de superficie celular. |
| Monocitos (CD45 ⁺ /CD14 ⁺) | |
| Granulocitos (CD45 ⁺ /SSC high / región no monocítica/ CD16 ⁺ /CD56 ⁺ y CD16 ⁻ /CD56 ⁻) | |
| Determinación de progenitores celulares y viabilidad (%) | |
| Viabilidad (7-AAD) | 7-AAD incluido en el kit de determinación de progenitores CD34 ⁺ de Miltenyi Biotec. |
| Progenitor cells (CD45 ⁺ /CD34 ⁺) | |

7-AAD: 7-aminoactinomicina D.

3.5.1 Contaje celular

Para el recuento total de WBCs en cada muestra de BM o suspensión celular obtenida, así como los recuentos de RBCs y PLTs se midieron utilizando un contador celular automatizado, provisto del instrumental necesario para la detección óptica e impedancia (Yumizen® analizador de hematología H500, HORIBA Medical) de estas poblaciones celulares.

3.5.2 Citometría de flujo

Las muestras tomadas en las diferentes etapas de la fabricación fueron analizadas en el citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer. Para ello se diluyeron 1:10 en solución tampón de separación MACS (Miltenyi Biotec), ajustando su contenido celular a 1×10^6 de WBCs. Posteriormente, las células se centrifugaron y se suspendieron en la misma solución. Las fracciones celulares de monocitos, granulocitos y linfocitos T, B y NK se tiñeron con el kit de inmunofenotipado de 8 colores (Miltenyi Biotec) durante 10 min en la oscuridad y a 4°C. A continuación, las células teñidas se incubaron en solución de lisis de RBCs durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Seguidamente las células se lavaron y suspendieron de nuevo en la solución tampón anteriormente utilizada para su análisis en el citómetro de flujo MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec).

Por otro lado, los progenitores hematopoyéticos y las células viables se analizaron utilizando el kit de enumeración CD34⁺ (Miltenyi Biotec) y añadiendo solución 7-aminoactinomicina D (7-AAD). El 7-AAD es un compuesto químico fluorescente con una fuerte afinidad por el ADN.

Al igual que antes se ajustó el contenido celular a 1×10^6 de WBCs y las células se centrifugaron y suspendieron en el tampón de separación MACS. Tras esto se añadió el anticuerpo y se incubó durante 10 min en la oscuridad y a 4°C. Una vez teñidas las células se incubaron en solución de lisis de RBCs durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Después las células se lavaron y se suspendieron en la solución tampón. Antes de proceder al análisis en el citómetro de flujo, las muestras se incubaron con solución 7-AAD durante 10 minutos en la oscuridad a 4°C para evaluar también la viabilidad celular.

3.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cuantitativas para cada una de las etapas del proceso presentadas a través de la media, mediana, desviación estándar y el rango mínimo-máximo de los resultados obtenidos.

Además, se evaluaron ciertos PPIs y atributos de calidad para determinar su comparabilidad a lo largo del proceso de producción utilizando para ello el test estadístico "*t de Student*" para las medias y la prueba "*F de Fischer*" para comparar las varianzas.

Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software estadístico GraphPad Prism® 8.0.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Definición del perfil y atributos de calidad de REX-001

Para abordar el enfoque del QbD en el estudio y desarrollo del proceso de producción de REX-001 es necesario describir, al menos, de una manera sencilla aquellas características de calidad deseadas para el medicamento que garantizan la seguridad y eficacia de éste. Esta información como se especificó en el epígrafe 3.1.3 se detalla en el QTPP.

A continuación, se muestra el QTPP que fue establecido para definir las peculiaridades de REX-001.

Tabla 10. Perfil de calidad objetivo de REX-001.

| Características del producto | |
|-------------------------------------|--|
| Descripción | REX-001 es un producto de terapia celular autóloga. A base de células autólogas derivadas de la médula ósea y células progenitoras CD34 ⁺ . |
| Formulación (excipientes) | El medio de formulación consiste en una solución A suplementada con B y solución C |
| Dosis | Células variables |
| Forma farmacéutica | Suspensión celular |
| Volumen | X mL |
| Acondicionamiento primario | Jeringas de X mL cerradas con tapón |
| Vida útil | X horas |
| Almacenamiento | 2-8°C |
| Potencia (actividad) | Una sola dosis de REX-001 contiene células autólogas con al menos un porcentaje de células viables y otro porcentaje de células progenitoras CD34 ⁺ . |

| Perfil de uso | |
|------------------------------|---|
| Indicación | Pacientes diabéticos adultos con úlceras isquémicas causadas por la CLTI (Rutherford grado III categoría 4 y 5). |
| Ruta de administración | Intraarterial |
| Tratamiento | Dosis |
| Perfil de seguridad | |
| Agentes microbianos | Cumplir con las regulaciones de los ATMPs para la esterilidad, Perfil de endotoxinas utilizando un método por compendio de acuerdo con la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 2.6.27, Ph. Eur. 2.14) |
| Agentes adventicios | La fabricación y composición de REX-001 conlleva un riesgo extremadamente remoto de transmisión de enfermedades virales |
| Impurezas celulares | Las impurezas residuales no tienen un impacto adverso en la seguridad del paciente. |
| Impurezas tras la producción | No se considera que los residuos potenciales de Ficoll presenten problemas de seguridad según el informe de evaluación de seguridad proporcionado por Cytiva fabricante del producto. |
| Formulación (excipientes) | Ninguno de los excipientes ha mostrado ningún efecto adverso en los ensayos clínicos anteriores. |

De modo que, el principal objetivo que se debe alcanzar tras la fabricación es la obtención de una suspensión celular estéril con un contenido celular estable con al menos un porcentaje de células progenitoras o CD34⁺ y una viabilidad.

La Tabla 10 recoge parte de las propiedades o CQAs que deben estar presentes y atribuirse a REX-001 y que deben ser controladas para garantizar su cumplimiento y aquellas que no como impurezas o contenido microbiológico que no son deseadas y que también deben ser vigiladas.

Tal y como se mencionó en la sección 3.1.4 los CQAs se pueden agrupar en distintas categorías. En la siguiente tabla se recogen los CQAs que fueron identificados para REX-001 y que definen la calidad de éste.

Tabla 11. Atributos de calidad para REX-001.

| General | |
|---|----------------------------|
| Apariencia y descripción | Suspensión celular límpida |
| Cantidad | |
| Número total de células | Variable en un rango |
| Concentración de WBCs | Variable en un rango |
| Identidad | |
| MNCs | Rango |
| GRAs | Rango |
| CD34 ⁺ | Rango |
| Impurezas relacionadas con el producto | |
| RBCs | Rango |
| PLTs | Rango |
| Potencia | |
| Viabilidad | Porcentaje |
| Seguridad | |
| Esterilidad | Estéril |
| Endotoxinas | < 5.00 (EU/mL) |

EU: Unidad de endotoxina.

Para lograr estas características de calidad descritas es necesario contar con un proceso de producción adecuado y que éste a través de los parámetros de proceso permita controlar la variabilidad.

Así, en los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos de los estudios de caracterización experimentales llevados a cabo como parte del desarrollo farmacéutico de REX-001 y que permitieron relacionar la influencia de los parámetros utilizados sobre la capacidad o eficiencia del proceso de fabricación y la calidad del producto.

4.2 Caracterización del material de partida

La obtención de una cantidad y calidad inicial de células es una de las cuestiones más críticas en la fabricación de terapias basadas en células. (Bonamassa, Gasparini, Pompilio, Aiuti, & Foggi, 2021).

Al igual que en cualquier otra terapia de este tipo el SM de REX-001 presenta una variabilidad que es inherente a su naturaleza biológica y que se hace extensible al producto final. Así, el comportamiento del material celular durante el proceso de fabricación depende, en cierto modo, de sus características de partida que pueden verse influenciadas por el propio procedimiento de extracción de la BM.

4.2.1 Variabilidad en volumen y contenido celular del SM

Como se mencionó en el apartado 3.2.1 la cantidad utilizada de SM derivado de BM para la fabricación de REX-001 es variable en un rango. La mayoría de los lotes clínicos estudiados para esta tesis presentaron un volumen cercano al máximo, ya que éste era el volumen objetivo de extracción.

A pesar de la similitud en la cantidad obtenida de SM la concentración de células y en consecuencia el número total del que se partió fue muy variable

La variabilidad de volumen y contenido celular está íntimamente ligada con la metodología utilizada en la extracción de la BM por lo que es de vital importancia seguir el protocolo establecido para la obtención del SM.

4.2.2 Variabilidad en la composición del SM

La variabilidad del SM también se pone de manifiesto en las diferencias de composición existentes entre los distintos lotes de modo que, aunque se cumpla de manera exhaustiva el procedimiento de extracción, incluso siendo el mismo centro clínico y médico el que realiza el aspirado de BM se observan disimilitudes.

La subpoblación mayoritaria es la de GRAs y en la que mayores diferencias aparecen es en la de células progenitoras CD34⁺ apreciándose una mayor dispersión de los datos entre las muestras de SM. La subpoblación de células MNCs es la suma de los linfocitos T, B, NK y monocitos (MON).

4.3 Caracterización del proceso de producción del principio activo

La producción del principio activo, como se indica en el apartado 3.2.1, comienza con la filtración por gravedad del SM. Esta operación se realiza completamente en un sistema cerrado gracias a la utilización del conector de tubos estéril que permite realizar este procedimiento en esterilidad. Esta etapa por su baja complejidad, robustez y nulo impacto en los CQAs no estuvo sujeta a ninguna optimización y por lo tanto no fue necesario realizar estudios adicionales sobre ella.

4.3.1 Estudio de la etapa de reducción de volumen

4.3.1.1 Parámetros de proceso del procedimiento de reducción de volumen

Los parámetros de proceso que definen esta etapa de la fabricación de REX-001 se detallan en la Tabla 12 tanto para la fase clínica II y III.

Tabla 12. Parámetros de proceso para la etapa de reducción de volumen para la producción de REX-001 en el ensayo clínico fase III y para el fase III.

| Parámetros operativos |
|-------------------------------|
| Velocidad de centrifugación |
| Tiempo de centrifugación |
| Volumen de plasma añadido |
| Volumen inicial de SM |
| Volumen obtenido de BC |
| Ratio de reducción de volumen |
| Número de células |

SM: material de partida derivado de médula ósea; BC: capa leucocitaria obtenida como material intermedio tras el proceso de reducción de volumen.

- **Velocidad y tiempo de centrifugación**

Aunque los parámetros de velocidad y tiempo de centrifugación se consideraron CPPs por su influencia en la división de las distintas fracciones celulares del SM, sus valores están automatizados, controlados y optimizados por el fabricante del Sepax 2 para conseguir una correcta separación de las fases celulares BC, RBC y el plasma.

- **Volumen de plasma**

El volumen de plasma adicionado al BC durante el protocolo de SmartRedux tiene como objetivo reducir el valor del HCT de este producto intermedio.

Aunque este parámetro de proceso no influye en esta etapa de la fabricación sí que lo hará en la siguiente, por lo que se le consideró como CPP.

RESULTADOS

- Ratio de reducción de volumen, volumen inicial de SM y volumen obtenido de BC

En el estudio de fase II el rango para el parámetro de proceso de volumen inicial de SM era más amplio y el volumen final de BC tenía un valor invariable más la misma cantidad fija de plasma para cada lote.

Esta independencia entre los parámetros de volumen inicial de SM y volumen obtenido de BC provocaba que la reducción de volumen no fuera constante ni proporcional.

De acuerdo con las indicaciones y recomendaciones del fabricante del procesador celular y tras un estudio de caracterización (ver siguiente apartado 4.3.1.2) en el que se evaluaron distintas ratios de reducción se optó por mantener un valor constante.

Por todo lo mencionado se consideró que el volumen inicial de SM, el volumen obtenido de BC y la ratio de reducción de volumen como CPPs ya que su variación afecta considerablemente como se verá más adelante al rendimiento del proceso y a los CQAs.

- Número de células

El último parámetro de proceso que aparece en la Tabla 14, que se clasificó también como CPP, es el número de células a procesar y cuyo valor no puede ser superior a una determinada cantidad.

Este valor proviene de un cálculo teórico y de una premisa recomendada por el fabricante del procesador celular Sepax 2 el cual aconseja no superar una concentración elevada en el BC que se utiliza en la fase siguiente del proceso.

Para reservar un margen de células y no alcanzar la concentración máxima se decidió reducir la cantidad de células a procesar para conseguir un buen transcurso del proceso de producción y unos rendimientos óptimos.

4.3.1.2 Rendimiento del procedimiento de reducción de volumen

- Resultados previos al inicio del ensayo clínico fase III

Aunque no se disponen de los rendimientos obtenidos de esta etapa para los lotes fabricados en el ensayo clínico II (no se analizaba el producto intermedio de BC), se calculó el rendimiento de forma indirecta analizando los porcentajes de recuperación celular en la siguiente etapa del proceso de gradiente de densidad con Ficoll.

En esta se producía una elevada pérdida de células debido a la no proporcionalidad en la ratio de volumen durante la etapa de reducción de volumen.

Esta pérdida de células comprometía alcanzar el número de células blancas suficiente para el rango de dosis en el estudio clínico fase III.

Esto suponía una gran contrariedad previa al inicio del estudio clínico fase III ya que no era admisible el rechazo de lotes por no alcanzar la dosis suficiente.

Por este motivo se propuso un estudio de caracterización, fuera del ámbito clínico, y evaluar diferentes ratios de reducción de volumen.

Aquellos lotes en los que hubo una mayor pérdida de células fueron los que tuvieron una ratio de reducción mayor.

En el resto de los lotes hubo una recuperación acorde al valor establecido por el fabricante del procesador celular Sepax 2 como adecuado o ideal para el protocolo de reducción de volumen.

De esta manera se seleccionó la ratio de reducción de disminución de volumen constante del volumen inicial teniendo en cuenta además la recomendación del fabricante del procesador celular.

- Resultados obtenidos en el estudio clínico fase III

Una vez alcanzado el objetivo, para esta fase del proceso de fabricación, de conseguir una alta recuperación de células para asegurar así el alcance de dosis, se llevó a cabo la fabricación de lotes para el ensayo clínico fase III, durante el cual se corroboraron estos resultados.

Solo se estudiaron ciertos lotes de los mencionados inicialmente en la caracterización del SM debido a la no disponibilidad de datos para las subpoblaciones celulares en esta etapa del proceso de producción.

Los resultados obtenidos de la recuperación de células para los lotes procesados previos al estudio clínico fase III y los fabricados durante este ensayo se observó un incremento para los

RESULTADOS

lotes del ensayo clínico, en los que la ratio de reducción permaneció constante y proporcional al volumen de SM. Además, la desviación estándar se redujo, indicando que hubo una disminución en la dispersión de los resultados obtenidos, es decir, más lotes tenían un comportamiento parecido al de la media.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de las distintas poblaciones celulares se utilizó la prueba de "*t de Student*" con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha < 0,05$).

Así, al comparar la media de células para los lotes de desarrollo previos al ensayo clínico fase III y los lotes del estudio clínico se obtuvieron unos resultados para el "*P valor*" superiores a 0,05. Esto indicaba que no había diferencias significativas y que por tanto el fundamento del protocolo de reducción de volumen para la reducción de volumen seguía manteniéndose, pero consiguiéndose una mejora en la recuperación celular.

Además, se incluyó la prueba "*F de Fischer*" para comparar las varianzas y en este caso los resultados para el "*P valor*" fueron inferiores a 0,05. Esto indicaba que existían diferencias estadísticamente significativas y que de este modo la variabilidad entre los lotes durante el ensayo clínico fase III se había reducido y por tanto estandarizando esta etapa de la fabricación.

En cuanto al PPI de recuperación de células progenitoras CD34⁺ su rango de valores fue más amplio que para las otras poblaciones celulares.

4.3.1.3 Atributos de calidad obtenidos para el BC

Como se mencionó en el apartado 3.2.2 la etapa de reducción de volumen no es selectiva, es decir, está diseñada para eliminar el plasma y parte de los RBCs y reducir así el volumen del SM.

Por tanto, el procedimiento no está destinado a separar las células de interés y esto hace que la composición para el BC obtenido tras esta fase no varíe significativamente al compararla con la del SM.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de las distintas poblaciones celulares se utilizó la prueba de "*t de Student*" con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha < 0,05$).

Así, al comparar la media de células MNCs, GRAs y células progenitoras CD34⁺ para el SM y el BC se obtuvieron unos resultados para el "*P valor*" superiores a 0,05. Esto indicaba que no había diferencias significativas y que por tanto no había cambios de composición para las subpoblaciones de WBCs y células progenitoras tras la etapa de reducción de volumen confirmando que no es una etapa selectiva.

4.3.2 Estudio de la etapa de gradiente de densidad con Ficoll y lavado celular

4.3.2.1 Parámetros de proceso del procedimiento de gradiente de densidad con Ficoll y lavado celular

Los parámetros operativos de esta etapa, descritos en el apartado 3.3., se dividen en 2 categorías aquellos que corresponden al gradiente de densidad y los que se refieren al lavado celular.

Tabla 13. Parámetros de proceso para la etapa de gradiente de densidad con Ficoll y posterior lavado celular.

| | Parámetros operativos |
|-------------------------|---|
| Fase de la etapa | Velocidad de centrifugación |
| | Tiempo de centrifugación |
| | Volumen inicial de BC |
| | Volumen de Ficoll |
| | Porcentaje de HCT |
| Lavado celular | Velocidad de lavado |
| | Tiempo de lavado |
| | Volumen de solución de lavado |
| | Volumen intermedio de células entre lavados |
| | Número de lavados |
| | Volumen final de DS |

BC: capa leucocitaria; HCT: hematocrito; DS: producto farmacológico

RESULTADOS

- Velocidad y tiempo de centrifugación del gradiente de densidad

Estos parámetros están automatizados y controlados por el procesador celular al igual que en el protocolo de reducción de volumen. Así, aunque la velocidad de centrifugación y el tiempo se consideraron CPPs por su influencia en la sedimentación celular, están suficientemente optimizados por el fabricante del Sepax 2 para conseguir una correcta ejecución de este procedimiento.

- Volumen inicial de BC

Como ya se ha explicado en apartados anteriores para el ensayo clínico fase II el volumen de BC se mantenía invariable para cada lote, mientras que para el estudio de fase III se estableció un rango variable para mantener la proporcionalidad en la reducción de volumen durante en la etapa de reducción de volumen en cada lote.

Para evaluar la criticidad del rango en cuanto a su influencia en el rendimiento del proceso y los atributos de calidad para la sustancia activa se realizó un estudio específico cuyos resultados se detallarán más adelante.

- Volumen de Ficoll

El volumen de Ficoll utilizado en ambos estudios clínicos para esta etapa de proceso fue de 90 mL para cada lote.

Al utilizar un volumen variable de BC en el ensayo clínico fase III se llevó a cabo un estudio en el cual se valoró como podía afectar que el volumen de Ficoll se mantuviera fijo a la hora de la separación celular por gradiente de densidad y que no fueran proporcionales. El planteamiento y resultados de este estudio se expondrán más adelante.

- Porcentaje de HCT

Como se comentó en el apartado 3.2.3 el porcentaje de HCT determina la cantidad de RBCs que contiene el BC. Durante el estudio clínico fase II se utilizaba por defecto un valor estándar. Sin embargo, para el fase III se optó por utilizar el valor real de HCT de cada muestra de BC y de esta manera ser más preciso a la hora de definir el volumen de RBCs.

Por este motivo se realizó un estudio experimental para este parámetro de proceso y definir la criticidad que tiene sobre la composición de la DS obtenida y el rendimiento de esta etapa del proceso de producción.

RESULTADOS

- **Velocidad y tiempo de centrifugación de lavado**

La velocidad y el tiempo de lavado tienen unos valores establecidos, automatizados y adecuados para conseguir una alta eliminación plaquetaria y un pellet celular apropiado para conformar el contenido de la DS.

- **Volumen de solución de lavado**

La cantidad de solución de lavado utilizada para eliminar los restos de Ficoll tras el gradiente de densidad aprovecha el máximo de la capacidad del procesador celular Sepax 2.

- **Volumen intermedio de células entre lavados**

El volumen intermedio de células que permanece en la cámara entre los lavados es variable, pero garantiza que no se pierdan células.

- **Número de lavados**

El número de ciclos de lavado son los suficientes para alcanzar la eliminación completa del Ficoll.

- **Volumen final de DS**

El volumen final para la DS es invariable y se mantiene constante para cada uno de los lotes.

Todos los parámetros de proceso implicados en el lavado celular se mantuvieron para la producción en ambas fases clínicas. Éstos se estimaron adecuados para conseguir una adecuada eliminación de Ficoll y obtener una suspensión de células apropiada por lo que no han sido objeto de estudio para la mejora y desarrollo del proceso de producción.

4.3.2.2 Validación del modelo de escalado para el gradiente de densidad con Ficoll

Para llevar a cabo los estudios de caracterización y cuantificar cómo influía la variación de los PPIs volumen inicial de BC, volumen de Ficoll y porcentaje de HCT sobre el rendimiento del proceso y los atributos de calidad del DS se utilizó un modelo a escala reducida del procedimiento realizado en el procesador celular.

El desarrollo de este modelo se describió en el apartado 3.3, y permitió disminuir la cantidad de material celular necesaria para realizar los ensayos experimentales, pero previamente a su utilización fue necesario demostrar que existía una relación de equivalencia entre las dos escalas y que eran estadísticamente comparables.

La validación del modelo se llevó a cabo analizando los resultados obtenidos de 6 ensayos a pequeña escala y comparándolos con los resultados de 20 lotes realizados a escala real utilizando el test estadístico de comparabilidad "Two-one side test (TOST)" (Hakemeyer, et al., 2016).

En la Tabla 21 se muestran los porcentajes de recuperación para WBCs, MNCs y células progenitoras CD34⁺ y de eliminación para GRA, RBCs y PLTs de los procesos realizados a escala real y pequeña. Estos resultados representan los PPIs de esta etapa.

Tabla 14. Valores medios, desviaciones estándar y rangos mínimos-máximos de los porcentajes de recuperación para WBCs, MNCs y células progenitoras CD34⁺ y de eliminación de GRA, RBCs y PLTS obtenidos a escala real (n=20) y escala reducida (n=6).

| | | Escala real | | | | Pequeña escala | | | | |
|---------|-------------------|-------------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| PPIs | n | Media | SD | Min | Max | n | Media | SD | Min | Max |
| REC (%) | WBCs | 38,78 | 8,89 | 22,46 | 57,41 | 6 | 36,10 | 12,48 | 24,09 | 52,41 |
| | MNCs | 69,22 | 11,76 | 48,79 | 90,04 | | 44,04 | 7,61 | 33,72 | 54,85 |
| | CD34 ⁺ | 93,85 | 25,74 | 56,95 | 110,3 | | 62,63 | 22,15 | 37,08 | 88,79 |
| ELI (%) | GRAs | 69,85 | 9,97 | 51,67 | 86,18 | | 67,07 | 13,63 | 47,48 | 78,49 |
| | RBCs | 99,02 | 0,45 | 97,44 | 99,47 | | 99,63 | 0,20 | 99,34 | 99,79 |
| | PLTs | 81,33 | 5,29 | 70,88 | 88,89 | | 93,04 | 1,42 | 91,35 | 95,05 |

PPIs: indicadores de proceso; REC: recuperación; ELI: eliminación; WBCs: leucocitos; MNCs: células mononucleadas; GRAs: granulocitos; RBCs: eritrocitos; PLTs: plaquetas. SD: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo.

RESULTADOS

En la Tabla 15 se indican los porcentajes de cada uno de los atributos de calidad evaluados en esta etapa, porcentaje de MNCs, GRA y células CD34⁺ y viabilidad para ambas escalas.

Tabla 15. Valores medios de los atributos de calidad (composición) de MNCs, GRA, células CD34 y viabilidad obtenido a escala real (n=20) y escala reducida (n=6). Las desviaciones estándar y rangos máximos y mínimos también son representados.

| Atributos de calidad | Escala real | | | | | Pequeña escala | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|------|-------|-------|
| | n | Media | SD | Min | Max | n | Media | SD | Min | Max |
| MNCs (%) | 20 | 33,66 | 9,65 | 19,61 | 58,17 | 6 | 27,78 | 7,38 | 55,39 | 75,35 |
| GRAs (%) | | 59,74 | 10,72 | 35,19 | 74,20 | | 67,66 | 7,38 | 55,39 | 75,39 |
| CD34⁺ (%) | | 1,34 | 0,55 | 0,57 | 2,53 | | 1,01 | 0,45 | 0,57 | 1,85 |
| Viabilidad (%) | | 97,11 | 1,67 | 92,10 | 98,73 | | 96,83 | 1,11 | 95,45 | 98,61 |

MNCs: células mononucleadas; GRAs: granulocitos; SD: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo.

La premisa para afirmar que los modelos eran equivalentes fue si la diferencia de las medias en ambas escalas para los PPIs del proceso y los atributos de calidad estaban dentro del rango aceptable o de equivalencia definido como 3 desviaciones estándar de los datos de referencia, en este caso los 20 lotes llevados a cabo a escala real.

Ambos grupos de datos fueron comparables con una significancia estadística de $P < 0,05$ y un intervalo de confianza del 90%. Los resultados se muestran en la Figura 40 y la Figura 41

RESULTADOS

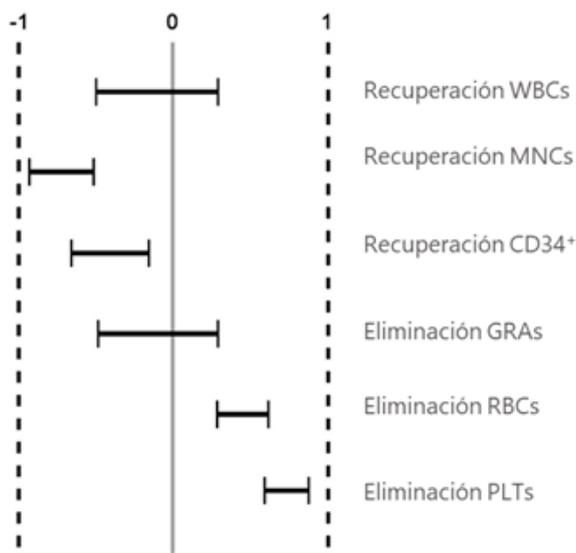


Figura 15. Resultado del test de equivalencia para la recuperación de WBCs, células MNCs y CD34+ además de la eliminación de GRAs, RBCs y PLTs. Las líneas discontinuas representan los límites de equivalencia que corresponden a 3 desviaciones estándar y normalizados entre -1 y 1. Las barras negras representan el intervalo de confianza del 90% entre escalas.

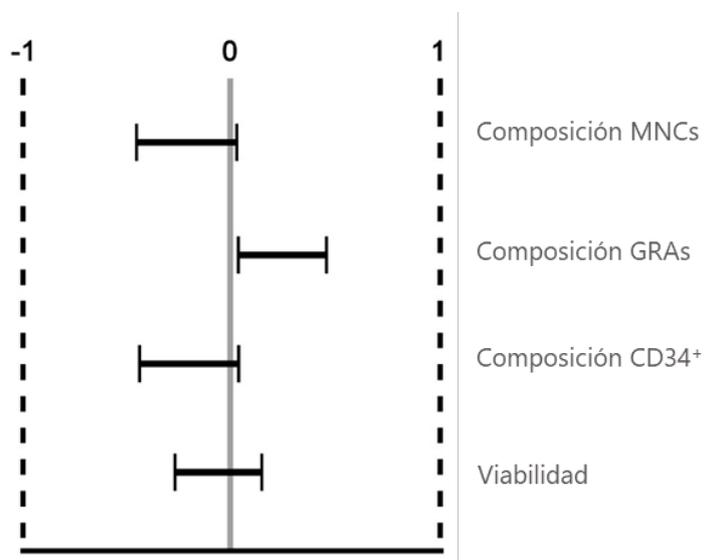


Figura 16. Resultado del test de equivalencia de los atributos de calidad del producto obtenido células MNCs, GRAs, CD34+ y viabilidad celular. Las líneas discontinuas representan los límites de equivalencia que corresponden a 3 desviaciones estándar y normalizados entre -1 y 1. Las barras negras representan el intervalo de confianza del 90% entre escalas.

Tras corroborar la equivalencia se procedió al uso del modelo de escala reducida para los estudios de caracterización de esta etapa para evaluar el impacto de la variación de los parámetros de proceso en los atributos de calidad y los rendimientos.

4.3.2.3 Estudio experimental para evaluar el volumen inicial de concentrado de capa leucocitaria y el volumen de Ficoll

Se podría suponer que el volumen de Ficoll debería ser proporcional al volumen de BC inicial para la etapa del gradiente de densidad, Sin embargo, independientemente de la cantidad de BC obtenida tras la etapa de reducción de volumen la cantidad de Ficoll utilizado para cada lote es de 90 mL.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante esta cantidad de Ficoll está indicada para la separación por gradiente para aquellos productos que no excedan una concentración de células determinada.

Para evaluar el procedimiento de separación celular variando la cantidad de BC inicial y manteniendo el volumen de Ficoll constante se diseñó un estudio experimental con distintas condiciones.

Utilizando el modelo a pequeña escala se evaluó el rango de volumen de BC establecido en el ensayo clínico fase III y diferentes concentraciones como indica la Tabla 16.

RESULTADOS

Tabla 16. Condiciones utilizadas en el estudio experimental para la evaluación de la cantidad de plasma y Ficoll utilizada durante el ensayo clínico fase III.

| Ensayo | Condiciones | Concentración WBCs inicial ($\times 10^6/\text{mL}$) | Volumen a pequeña escala (mL) |
|------------------|-------------|--|-----------------------------------|
| Donante 1 | A | 33,82 | 1,5 mL plasma + 4,5 mL muestra |
| | B | 30,44 | 1,5 mL plasma + 3,0 mL muestra |
| | C | 23,42 | 1,5 mL plasma + 1,5 mL muestra |
| Donante 2 | A | 20,79 | 1,5 mL plasma + 4,5 mL muestra |
| | B | 18,16 | 1,5 mL plasma + 3,0 mL muestra |
| | C | 15,06 | 1,5 mL plasma +1,5 mL muestra |
| Donante 3 | A | 20,28 | 1,5 mL plasma + 4,5 mL muestra |
| | B | 17,70 | 1,5 mL plasma + 3,0 mL muestra |
| | C | 13,51 | 1,5 mL plasma + 1,5 mL muestra |

WBCs: leucocitos.

RESULTADOS

El volumen de muestra para las distintas condiciones en el modelo de escala reducida varió entre 1,5 mL y 4,5 mL más 1,5 mL de plasma. De esta manera se representó el rango de volumen utilizado para la etapa de gradiente de densidad.

El volumen de Ficoll utilizado para cada condición fue de 5,5 mL correspondiente a los 90 mL utilizados para el proceso realizado en el procesador celular.

Se disminuyó la variabilidad biológica de cada condición estudiada realizando los ensayos con material celular proveniente de un mismo donante fuera del marco del estudio clínico. Al variar la cantidad de BC utilizada manteniendo el volumen de plasma constante hizo que la concentración de WBCs también cambiara.

Los resultados obtenidos referidos al rendimiento del proceso se muestran en la Tabla 24. De éstos se puede deducir que la variación de la cantidad de BC tanto en volumen como en concentración de WBCs manteniendo la cantidad de volumen de Ficoll constante no afecta a la eliminación de las impurezas de RBCs ni de PLTs.

Tabla 17. Rendimiento del gradiente de densidad para los diferentes PPIs utilizando el modelo a pequeña escala para la evaluación del volumen inicial de BC y Ficoll utilizados para el ensayo clínico fase III.

| Ensayo | Condiciones | PPIs | | |
|------------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | | Recuperación WBCs (%) | Eliminación RBCs (%) | Eliminación PLTs (%) |
| Donante 1 | A | 34,75 | 99,45 | 95,00 |
| | B | 30,88 | 99,44 | 94,60 |
| | C | 27,20 | 99,49 | 95,72 |
| Donante 2 | A | 36,07 | 99,63 | 96,10 |
| | B | 33,97 | 99,63 | 95,90 |
| | C | 29,66 | 99,65 | 96,18 |
| Donante 3 | A | 49,28 | 99,60 | 95,79 |
| | B | 49,51 | 99,58 | 96,13 |
| | C | 43,32 | 99,59 | 96,38 |

WBCs: leucocitos; RBCs: eritrocitos; PLTs: plaquetas.

RESULTADOS

Por otro lado, la condición A, en la que se procesó más volumen de BC, tuvo un porcentaje de recuperación superior al resto de condiciones. Además, las mayores recuperaciones se obtuvieron en el donante 3 cuya concentración de WBCs inicial para las distintas condiciones eran similares a las del donante 2 pero inferiores al donante 1. Esto puso de manifiesto que conseguir una o menor cantidad de células blancas guarda más relación con la naturaleza biológica de éstas que por las diferencias en la cantidad de BC procesada utilizando un volumen fijo de 90 mL de Ficoll.

4.3.2.4 Estudio experimental para evaluar la influencia del hematocrito

Para tratar de elucidar como afecta la variación del porcentaje de HCT a los atributos de calidad de composición tras la separación celular con Ficoll se realizó otro estudio experimental, de nuevo con 3 muestras de diferentes donantes, no incluidos en el ensayo clínico y utilizando el modelo a pequeña escala.

Se evaluaron 3 condiciones para cada uno de los donantes asignando un valor de HCT distinto a cada una de ellas tal y como describe la Tabla 18.

La cantidad de BC utilizada para cada condición era la equivalente a 90 mL a escala real, dentro del rango de volumen para esta etapa del proceso, pero cercana al máximo. Así, se partió de un volumen de Ficoll de 5,5 mL y de 5,5 mL de BC utilizando el modelo de escala reducida.

Tabla 18. Condiciones utilizadas para el estudio experimental para evaluar la influencia del HCT en la composición del DS de REX-001.

| Ensayo | Condiciones | HCT real (%) | HCT evaluado (%) |
|------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| Donante 1 | A | | 10 |
| | B | 39,15 | 39,15 |
| | C | | 60 |
| Donante 2 | A | | 10 |
| | B | 32,05 | 32,05 |
| | C | | 60 |
| Donante 3 | A | | 10 |
| | B | 35,05 | 35,05 |
| | C | | 60 |

HCT: Hematocrito.

RESULTADOS

En la Tabla 18 aparece el valor del HCT real que tenía la muestra y el valor del HCT evaluado. De este modo, aunque el valor del HCT real era cercano al 30% se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el volumen de RBCs suponiendo que el porcentaje fuera del 10 o del 60%.

Esta variabilidad en la cantidad de eritrocitos a eliminar, podía afectar a la composición final de la sustancia activa obtenida por lo que era conveniente estudiarlo y motivó este estudio experimental.

Los resultados obtenidos tras la separación de las diferentes fracciones celulares por gradiente de densidad para la composición de la sustancia activa se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Atributos de calidad obtenidos tras el estudio para evaluar la influencia del HCT en la composición del DS utilizando el modelo a pequeña escala.

| Ensayo | Condiciones | Composición (%) | | |
|------------------|-------------|-----------------|-------|-------------------|
| | | GRAs | MNCs | CD34 ⁺ |
| Donante 1 | A | 71,58 | 22,04 | 2,23 |
| | B | 66,86 | 26,03 | 2,53 |
| | C | 65,28 | 26,90 | 3,01 |
| Donante 2 | A | 58,29 | 35,18 | 1,91 |
| | B | 56,45 | 36,53 | 2,06 |
| | C | 55,37 | 37,51 | 2,12 |
| Donante 3 | A | 69,04 | 25,79 | 2,15 |
| | B | 62,43 | 31,26 | 2,63 |
| | C | 60,96 | 32,04 | 2,97 |

GRAs: granulocitos; MNCs: células mononucleadas;

Como se mencionó en el apartado 3.2.3 el valor del HCT seleccionado define el volumen de RBCs en la muestra a procesar. Así la fracción de células a eliminar está determinada por el volumen de RBCs. Por tanto, si el volumen de RBCs es pequeño, el volumen a eliminar es menor y en consecuencia la fracción recuperada es mayor.

RESULTADOS

La Tabla 19 indica que el porcentaje de GRAs presentes en la sustancia activa, aumentó a medida que el valor del HCT se reducía, esto se debía a que la fracción eliminada era menor. Así en la condición A con un porcentaje del 10% presentó más cantidad de GRAs con respecto a las otras dos.

De manera inversa, el porcentaje de células MNCs y progenitoras CD34⁺ se incrementó cuando el valor del HCT aumentaba porque la fracción eliminada era mayor. De este modo la condición C con un porcentaje de 60% tuvo una composición mayor en estas células menos densas.

De este estudio se pudo discernir que el parámetro del HCT afecta a los CQAs de composición y que por tanto es un CPP para controlar, A pesar de esto, la variabilidad encontrada no era substancial como para cambiar la actividad del DS y se decidió utilizar el valor de HCT real que contiene la muestra a procesar.

En ninguna de las condiciones se observó contenido residual de RBCs en la fracción de células recuperadas.

4.3.2.5 Rendimiento del procedimiento de gradiente de densidad y lavado celular

Los rendimientos obtenidos tras la ejecución del protocolo del gradiente de densidad para los lotes del ensayo clínico fase III, una vez implementados los cambios en los valores de los parámetros de proceso tanto para esta etapa como para la anterior de reducción de volumen, se detallan a continuación

Solo se estudiaron ciertos lotes de los mencionados inicialmente en la caracterización del SM debido a la no disponibilidad de datos para las subpoblaciones celulares en esta etapa del proceso de producción.

- Recuperación de WBCs

Los resultados mostraron un rango de obtención de células blancas que fue variable en un rango. Al comparar este rendimiento con el que se obtuvo para la misma etapa del proceso durante el ensayo clínico fase II se observa claramente que el valor medio de éste se incrementó.

Se confrontó la media de recuperación de WBCs para el estudio clínico fase II y fase III, utilizando el test estadístico de "*t de Student*" con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha < 0,05$), y se obtuvo un resultado para el "*P valor*" inferior a 0,05. Esto indicaba que había diferencias significativas y que el proceso de separación celular utilizando el gradiente de densidad con Ficoll había cambiado para poder conseguir la mejora en el rendimiento pretendida.

Como se explicó en el apartado 4.3.1.2 este aumento en la recuperación de WBCs se debió fundamentalmente a la reducción proporcional de volumen en la etapa anterior al gradiente de densidad.

Previamente a la limitación en la concentración de células a procesar para esta etapa del proceso de fabricación se realizaron varios lotes orientados al desarrollo de proceso utilizando material celular procedente de donantes fuera del marco del estudio clínico.

En estos lotes se procesó una concentración celular para el BC superior a 100×10^6 WBCs/mL, aunque únicamente fueron 4 ya que no es común obtener este tipo de muestras con una celularidad tan elevada. A pesar de esto, los resultados obtenidos si fueron bastante representativos del rendimiento para este tipo de casos.

La comparativa del rendimiento obtenido para las células en los lotes de desarrollo mencionados, en lo que se procesó un BC con una concentración superior a la recomendada, y los lotes fabricados durante el ensayo clínico fase III demostró una media de recuperación celular obtenida para los lotes de desarrollo superior y aunque se podría pensar que este alto rendimiento sería algo beneficioso para tener un mayor número de células y así asegurar la dosis, esto en realidad era indicativo de que la separación celular por gradiente no estaba siendo adecuada y que el volumen empleado de Ficoll era insuficiente para procesar ese elevado contenido celular.

Este rendimiento anormalmente alto al compararlo con el rango estándar obtenido en los lotes fabricados durante el estudio clínico fase III, se debía a una baja eliminación de las células que debían eliminarse.

- Recuperación de MNCs y CD34⁺

La recuperación lograda para la subpoblación de células MNCs alcanzó un valor medio superior al del rendimiento obtenido para los WBCs ya que esta etapa de gradiente de densidad con Ficoll tiene el fin de enriquecer la sustancia activa de REX-001 en este tipo de células y progenitoras, aunque con mayor variabilidad entre lotes como indicó la desviación estándar.

- Eliminación de GRAs, RBCs y PLTs

La depleción de GRAs y RBCs alcanzó un valor medio del alto con un rango variable ya que por su naturaleza más densa provoca que eliminen junto a los RBCs.

Al contrario de lo que ocurre con los GRAs y los RBCs, las PLTs se eliminan junto con el plasma o parte líquida, pero por su menor densidad.

4.3.2.6 Atributos de calidad obtenidos para el principio activo

Las características del principio activo de REX-001 están definidas por sus atributos de calidad. Los resultados obtenidos para éstos en los lotes fabricados para el ensayo clínico, tras los cambios realizados en los parámetros del proceso para el gradiente de densidad y para la etapa anterior de reducción de volumen se detallan a continuación.

Solo se estudiaron ciertos lotes de los mencionados inicialmente en la caracterización del SM debido a la no disponibilidad de datos para las subpoblaciones celulares en esta etapa del proceso de producción.

- Atributos de calidad de composición

La composición celular que se obtiene para sustancia activa tras el procedimiento de gradiente de densidad en el procesado celular determina la composición del medicamento REX-001 y por este motivo se define como la etapa más trascendente del proceso de fabricación.

Se destaca que tras el gradiente de densidad con Ficoll los GRAs seguían siendo la población mayoritaria a pesar de conseguir, como se ha mencionado en el apartado anterior, una alta eliminación para esta subpoblación. No obstante, el porcentaje de GRAs disminuyó considerablemente.

Con respecto a las células MNCs y progenitoras CD34⁺ el valor medio en el DS se incrementó al compararlo con el que tenían el SM y el BC.

- Atributo de calidad de viabilidad

La viabilidad celular varió a lo largo del proceso de producción de la sustancia activa desde el SM.

El SM presentó un porcentaje previo a la fabricación de los lotes para el estudio clínico fase III menor que para el producto intermedio de BC como la DS. Esto significaba que durante los procesos de reducción de volumen y de gradiente de densidad las células no viables eran eliminadas y que además no afectaban a la integridad celular.

4.4 Caracterización del proceso de producción del producto terminado

Cómo se describió en los apartados 3.2.5 y 3.2.6 la obtención del DP consiste en 2 etapas principales la centrifugación de la suspensión celular de la sustancia activa para eliminar la solución de lavado y la formulación de las células en el medio que contiene los excipientes para el ajuste de la dosis de REX-001.

El principal propósito del desarrollo de proceso de producción del producto terminado era automatizar y cerrar estas etapas de la fabricación. Para ello se estudió la implementación del procedimiento en el procesador celular que permite el intercambio de medios de suspensión para las células mediante centrifugación y sustituir así el procedimiento manual y en abierto, en las que es indispensable el uso de una BSC-Clase A, utilizado durante el ensayo clínico fase II y III.

4.4.1 Estudio de la etapa de centrifugación y formulación

4.4.1.1 Parámetros de proceso del procedimiento de centrifugación y de formulación

Los parámetros de proceso utilizados para la centrifugación del DS tanto en el estudio clínico fase II y III se detallan a continuación en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros de proceso para la centrifugación y formulación en el proceso manual utilizado durante el ensayo clínico fase II y III.

| Parámetros operativos |
|--|
| Velocidad de centrifugación |
| Tiempo de centrifugación Volumen inicial de DS |
| Volumen celular intermedio |
| Número de ciclos de centrifugación |
| Volumen final de DP |

DS: principio activo; DP: producto farmacológico.

- **Velocidad y tiempo de centrifugación**

Los valores para la velocidad y el tiempo de centrifugación eran adecuados para conseguir un pellet celular apropiado y así más tarde poder retirar el sobrenadante sin que hubiera riesgo de pérdida celular.

- **Volumen inicial de DS**

El volumen inicial para esta etapa de proceso correspondía a la cantidad obtenida en la etapa anterior del gradiente de densidad.

- **Volumen celular intermedio**

El volumen obtenido, una vez se retiraba el sobrenadante tras la centrifugación, varió dependiendo del rendimiento obtenido en la etapa anterior.

- Número de ciclos de centrifugación

Al ser un único intercambio de medio de solución bastaba con un solo ciclo de centrifugación a diferencia de los lavados de células para eliminar el Ficoll de la etapa anterior.

- Volumen final de DP

El volumen final de formulación suficiente para alcanzar la dosis de REX-001 y realizar la batería de test necesaria para el control de calidad del producto para su posterior infusión.

Este volumen podía ser mayor en el caso de que hubiera que diluir el producto hasta obtener la concentración objetiva.

4.4.1.2 Rendimiento del procedimiento de centrifugación y formulación

Los rendimientos de estas fases del proceso no se muestran debido a que en la producción del DP no hay pérdida celular y por este motivo los PPIs de recuperación celular fueron prácticamente del 100%.

4.4.1.3 Atributos de calidad obtenidos para el producto farmacológico

A continuación, se detalla la composición y la viabilidad celular de lotes estudiados para el ensayo clínico fase III para las distintas subpoblaciones de celulares y las células progenitoras CD34⁺ del DP tras estas etapas del proceso de producción.

- Atributos de calidad de composición

Estas etapas no supusieron un cambio sustancial en la composición del DP con respecto al DS como mostró el valor medio y la desviación estándar para los GRAs, las células MNCs y las células progenitoras CD34⁺ para ambas suspensiones celulares.

Al comparar el valor medio obtenido de las distintas subpoblaciones celulares entre sí utilizando el test estadístico de "*t de Student*" con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha < 0,05$), se obtuvo como conclusión que no había diferencias significativas entre ellas, ya que el "*P valor*" obtenido era superior a 0,05.

Esto se debe a que estas etapas de la fabricación no son selectivas, es decir, están diseñadas para recuperar la mayor cantidad de células posibles de la sustancia activa y simplemente cambiar el medio de solución en el que se encuentran y lograr así una suspensión celular con los excipientes que conforman el producto REX-001.

RESULTADOS

- *Atributo de calidad de viabilidad*

El porcentaje de viabilidad tampoco se ve alterado por estas etapas del proceso ya que el valor medio tanto para la sustancia activa como para el producto terminado fue el mismo.

- *Atributos de calidad de cantidad de células*

En este apartado además se han incluido los resultados relativos a la cantidad de células que corresponde con los CQAs para el DP de concentración (Figura 52) y número total. Así para cada uno de los lotes estudiados en el ensayo clínico fase III se alcanzó una cantidad de células suficiente para la administración de la dosis de REX-001.

Además, se alcanzó incluso una concentración celular superior al rango necesario y por tanto hubo que realizar una dilución del producto final para garantizar la concentración objetiva del tratamiento.

De la misma manera el número total de células logrado para cada uno de los lotes también estaba dentro o por encima del rango empleado para la dosis utilizando únicamente aquellas que eran precisas para el acondicionamiento final y su almacenamiento a temperatura controlada en un rango de 2-8°C, antes de su envío al centro clínico correspondiente.

4.4.2 Estudio de la automatización y cerrado de la etapa de centrifugación y formulación utilizando el procesador celular.

Como ya se ha mencionado, desde la obtención de la sustancia activa hasta la consecución del producto final el proceso de fabricación para el ensayo clínico fase III se llevó a cabo mediante intervenciones manuales.

Para alcanzar la viabilidad de la producción REX-001 a mayor escala y dentro de la estrategia de mejora continua como parte de la metodología del QbD, son necesarios esfuerzos para optimizar y progresar en el proceso de fabricación, incluyendo la introducción de la máxima automatización posible y la integración de sistemas cerrados.

Por estos motivos se evaluó la posibilidad de utilizar el procesador celular Sepax 2 para concentrar el DS mediante centrifugación e intercambiar el medio de solución agregando los excipientes para la formulación final.

Para ello se llevaron a cabo una serie de estudios de caracterización con el principal propósito de valorar la potencial implementación de este procedimiento en el proceso de producción de REX-001 sustituyendo así a las actuales etapas de centrifugación y formulación forma manual en las que es indispensable el uso de una BSC-Clase A.

Así, estos estudios contribuyeron a la comprensión del protocolo utilizado, a la evaluación de su rendimiento y a la identificación de aquellos parámetros de proceso que pudieran requerir una optimización.

4.4.2.1 Parámetros de proceso del procedimiento de CultureWash

Los parámetros de proceso elegidos inicialmente para el protocolo de CultureWash se basaron en la equivalencia con los parámetros de la centrifugación y formulación del proceso de fabricación del ensayo clínico fase III.

- **Velocidad y tiempo de centrifugación**

Los valores para la velocidad y el tiempo de centrifugación del proceso automatizado variaron con respecto a los del proceso manual. Así para ambos parámetros se disminuyó su valor. A pesar de esta reducción seguían siendo adecuados para conseguir una sedimentación celular apropiada.

- **Volumen inicial de DS**

El volumen inicial para el proceso automatizado correspondía a la cantidad obtenida tras el procedimiento de gradiente de densidad.

- **Volumen celular intermedio**

El volumen de células obtenido una vez se retiraba de forma manual el sobrenadante tras la centrifugación era variable dependiendo del rendimiento obtenido en la etapa anterior. Sin embargo, para el proceso automatizado se optó por una cantidad de pellet celular de 8 similar al mismo parámetro, pero en este caso del protocolo de gradiente de densidad el cual de forma automatizada establece ese valor por defecto para el volumen celular intermedio entre los lavados para la eliminación del Ficoll.

- **Número de ciclos de centrifugación**

El número de ciclos de centrifugación utilizado en el protocolo de CultureWash fue el mismo que en el proceso de centrifugación manual.

- **Volumen final de DP**

El volumen final de formulado en el que se resuspenden las células para obtener el producto REX-001 se mantuvo con el mínimo del proceso manual y que en caso de que hubiera que diluir el producto hasta obtener la concentración objetiva éste sería mayor.

4.4.2.2 Evaluación de los parámetros de proceso del procedimiento de CultureWash

Para valorar la consistencia de este protocolo, se ejecutaron diferentes experimentos. Tres utilizando sangre periférica y dos con BM de donantes sanos fuera del estudio clínico fase III.

De los cinco procesos experimentales se evaluaron los rendimientos del protocolo por medio de los PPIs de recuperación de las distintas poblaciones celulares y el atributo de calidad de viabilidad.

Los resultados obtenidos fueron acordes a las indicaciones y recomendaciones del fabricante del procesador celular. Además, el porcentaje de viabilidad también fue superior al mínimo estipulado para la liberación del lote, lo que significaba que esta centrifugación no afectaba a la integridad celular.

Aunque estos resultados se consideraron como aceptables, es necesario señalar que existía una pérdida de células con respecto al proceso manual en el que la recuperación era prácticamente del 100%, como se indicó en el apartado 4.4.1.2.

Sin embargo, esta disminución de células era totalmente asumible teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las etapas anteriores que excepto para tres lotes la cantidad de células obtenidas para el DP fue superior a la dosis objetiva.

Así, gracias a las mejoras introducidas en las etapas anteriores del proceso de fabricación esta pérdida, que no comprometería alcanzar la cantidad de células necesaria para el tratamiento del paciente. Así la opción de automatizar y cerrar la ejecución de los lotes sería asumible, contribuyendo de esta manera a la disminución del riesgo de una posible contaminación microbiana y la simplificación de la operación, es decir, una reducción de eventuales fallos debida a la manipulación del operador.

Tras los experimentos realizados se detectó la aparición de pequeños restos celulares en la cámara de separación celular del kit utilizado en el procesador celular al finalizar el protocolo de CultureWash, que posiblemente se debían a una elevada velocidad de centrifugación. Por otra parte, la precisión del procesador celular a la hora de obtener el volumen final no estaba siendo la esperada, y después de la observación de la ejecución del protocolo se advirtió que se debía a la no dilución inicial del DS.

Para resolver estas contrariedades se realizaron estudios de caracterización adicionales de este proceso automatizado de centrifugación y formulación.

4.4.2.3 Optimización del parámetro de velocidad de centrifugación

La velocidad de centrifugación para la sedimentación celular es un parámetro seleccionable en un rango. Como se ha mencionado, para los procesos anteriores se utilizó la velocidad máxima porque era la velocidad más próxima del proceso de centrifugación manual, y a la cual se hallaron pequeños restos celulares en la cámara una vez finalizado el proceso.

El protocolo establece por defecto un valor medio, pero en base a la experiencia ganada durante el desarrollo de proceso y la producción de lotes se estimó que una velocidad baja era suficiente para conseguir una adecuada sedimentación celular. Este razonamiento deriva de la velocidad para el lavado celular durante el protocolo de NeatCell durante el cual se alcanza una velocidad baja para la sedimentación de las mismas células.

Por tanto, se hizo una aproximación con la velocidad más baja seleccionable y se estudiaron las diferencias entre una y otra velocidad de centrifugación utilizando el mismo material biológico y así observar si los restos celulares persistían, si se modificaba el PPI de recuperación celular y/o si existían diferencias de viabilidad.

Tras llevar a cabo estos dos procesos de CultureWash se evidenció que a mayor velocidad aparecían una mayor cantidad de esos pequeños restos celulares que a la velocidad baja.

En cuanto a los rendimientos del proceso y a la viabilidad celular no se observaron prácticamente diferencias entre ambos procedimientos y fueron comparables en recuperación y viabilidad celular.

Esto indicaba que la velocidad mínima de centrifugación era suficiente para una adecuada sedimentación celular y que no había una pérdida de células por esta menor velocidad.

La viabilidad en ambos ensayos alcanzó un valor por encima del mínimo establecido para asegurar la calidad del producto final de REX-001.

La menor cantidad de restos celulares que aparecían tras la centrifugación a la velocidad inferior y la no diferencia en rendimientos y viabilidad demostró que un valor menor era suficiente para sedimentar las células y se consideró que el parámetro de velocidad de centrifugación estaba optimizado.

4.4.2.4 Inclusión del parámetro de dilución previo a la centrifugación

Al no incluir una dilución inicial del producto intermedio de DS, representado por el parámetro de proceso "ratio de dilución", provocaba que la cantidad de volumen obtenido de DP fuera inferior a la cantidad establecida para la dosis y la realización de los test de control de calidad.

Esto se debía a que la línea o el tubular de la bolsa de medio de formulación y que lo une a la cámara de separación del kit utilizado permanecía vacía y a la hora de formular el producto celular, tras la centrifugación, se introducía un volumen de aire generando esta imprecisión.

El estudio de comparabilidad llevado a cabo tenía como objetivo la evaluación de la dilución y la no dilución de la DS antes de comenzar el proceso de centrifugación. Esta dilución no afectaba a la ejecución del procedimiento, ya que como se explicó en el apartado 3.4 toda la fase o parte líquida se elimina tras la centrifugación quedando únicamente el sedimento celular.

Los ensayos se realizaron en paralelo y para reducir la variabilidad como en el estudio anterior se utilizó la misma muestra biológica.

Así, para el ensayo A se utilizó una dilución igual que el volumen inicial previamente a comenzar la centrifugación usando los valores estándares indicados por el fabricante del procesador celular.

Realizados ambos ensayos, se comprobó el volumen final midiendo la cantidad obtenida con una jeringa de 50 mL.

RESULTADOS

De esta manera el volumen obtenido utilizando la dilución previa a la centrifugación fue mayor al requerido. Aunque el procesador celular tiene una variabilidad en la precisión y el volumen final fue superior, es preferible obtener una cantidad mayor que el hecho de no alcanzar el volumen necesario para la dosis y la realización de los test analíticos que certifican la calidad de un lote para que el producto REX-001 pueda ser administrado.

Además, en cinco procesos en los que no se utilizó dilución del producto inicial, aquellos que fueron descritos en el apartado 4.4.2.2. en ninguno de ellos se alcanzó el volumen final requerido. Por el contrario, para el ensayo evaluado en este apartado y otros dos procesos adicionales realizados posteriormente, en los que se utilizó la dilución para el protocolo de CultureWash se puede apreciar que el volumen final obtenido fue superior al establecido.

Esto demostraba la importancia de incluir el parámetro de ratio de dilución para este procedimiento para lograr un volumen suficiente para asegurar la dosis y la realización de los test analíticos.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La BM es un material biológico y como tal presenta una variabilidad inherente entre los pacientes que donan sus células para el tratamiento con REX-001. Por este motivo los resultados obtenidos para este trabajo de tesis estuvieron influenciados por el uso de esta materia prima.

Se puede afirmar que esta variabilidad es el principal factor que influye negativamente a la hora de obtener un proceso de producción reproducible (Van den Bos, Keefe, Schirmaier, & McCaman, 2013) y que a diferencia de las materias primas para aquellos medicamentos de síntesis química las características propias del SM serán diferentes para cada lote de producción a fabricar. Este hecho se convierte así en una de las piedras angulares o retos de las terapias basadas en células.

Las disimilitudes se hacen patentes en el volumen de SM a procesar, en el contenido celular (concentración y número de células) y en la composición celular (granulocitos, monocitos, linfocitos, células CD34⁺) como se presentó en los apartados 4.2.1 y 4.2.2 y contribuyeron en gran medida a las diferencias observadas entre los lotes durante la separación celular y en las características finales del medicamento REX-001.

Con respecto al volumen y al contenido celular del SM se advierte cierta tendencia que indica que a mayor volumen mayor contenido en número de células. Siendo éste un razonamiento lógico, no siempre fue así, tal y como se apreció en ciertos lotes.

Para conseguir un proceso de producción robusto y al mismo tiempo flexible por el tipo de materia prima utilizado y conseguir la máxima estandarización posible entre lotes y consistencia del producto final era necesario distinguir entre esta variabilidad descrita y propia del SM, la cual no es posible eliminar y aquella debida a la propia ejecución de la fabricación del medicamento.

Así que, para cumplir el objetivo de reducir la variabilidad generada por el proceso de producción era necesario introducir cambios y mejoras a lo largo de las distintas etapas. En este sentido fue necesaria la identificación y el estudio de los CPPs para cada fase de la fabricación y poder entender así el comportamiento del material celular en cada una de las operaciones llevadas a cabo para la producción de REX-001.

La evaluación del efecto de las variaciones realizadas se reflejó en los resultados mostrados como rendimientos del proceso o PPIs y en los CQAs a lo largo de esta tesis.

El análisis de los parámetros de proceso para la fase de reducción de volumen descrito en el apartado 4.3.1.1 reveló la importancia de una apropiada comprensión de la influencia de éstos en

DISCUSIÓN

la ejecución de este protocolo para conseguir una cantidad de células adecuada sin alterar la composición.

De modo que, conseguir la proporcionalidad adecuada entre los parámetros de proceso de volumen inicial de SM y volumen obtenido de BC mostró ser la clave para lograr una recuperación celular aceptable. Mantener la ratio de reducción constante evitó la pérdida celular que tenía lugar en la etapa de reducción de volumen durante el ensayo clínico fase II.

La consecución de una recuperación celular media adecuada para los lotes estudiados durante el ensayo clínico y la conservación de la composición del BC respecto al SM se consideró por tanto un aumento de la robustez para esta etapa del proceso de producción y de la consistencia del producto obtenido tras ella respectivamente.

Como se indicó también en el apartado 4.3.1.1 dos de estos parámetros de proceso ponen de manifiesto su influencia en la siguiente etapa de gradiente de densidad con Ficoll. Estos son procesar una cantidad de WBCs adecuada y el volumen de plasma añadido al BC.

El número de células a procesar tiene una gran influencia en la ejecución del protocolo de NeatCell y es dependiente de los 90 mL de Ficoll utilizados en cada uno de los lotes. Esta cantidad fue concebida para obtener una separación celular adecuada partiendo de un número de células por debajo del límite establecido.

Esta restricción del número de células blancas se superó en 4 lotes de desarrollo, fuera del ámbito del ensayo clínico y alcanzó un valor medio de recuperación de células muy superior al estándar.

Al comparar este porcentaje con los obtenidos tanto para los lotes de desarrollo descritos en el apartado 4.3.2.3 como para los lotes del ensayo clínico se observa claramente que era anormalmente alto.

Así, siempre que se procesó un número de células blancas por debajo del límite establecido, el volumen de 90 mL de Ficoll fue suficiente para alcanzar una apropiada sedimentación celular. Si se supera ese número de células la capacidad de selección del gradiente de densidad se ve mermada y por tanto se recuperan células que deberían eliminarse.

De esta manera se consiguió aumentar la fiabilidad y la estandarización para esta etapa del proceso de producción considerando cierto grado de flexibilidad establecido por el rango de aceptación para la recuperación de células.

DISCUSIÓN

En cuanto al otro parámetro de proceso de la etapa de reducción de volumen que influye en la fase de gradiente de densidad, volumen de plasma adicionado al BC, tiene como función disminuir el valor del HCT para poder obtener una adecuada separación celular.

La cantidad adicionada de plasma fue suficiente para la dilución de la muestra y de esta manera en ninguno de los lotes estudiados del ensayo clínico el porcentaje de HCT para el BC fue superior o igual al valor límite.

Como se explicó en el apartado 3.2.3 el HCT define el volumen de RBCs que contiene la muestra de BC y que se van a eliminar de modo que para valorar el grado de influencia del HCT en la separación celular, en el apartado mencionado se estudió, en diferentes experimentos, la variación de este CPP para un mismo material biológico. Los resultados obtenidos demostraron que efectivamente tenía cierta incidencia en la composición, pero estas diferencias existentes entre las distintas condiciones no se consideraron lo suficientemente sustanciales para cambiar el perfil farmacológico del DS.

Las diferencias observadas en la composición del DS) tras el gradiente de densidad durante el desarrollo de este trabajo de tesis muestran aquella variabilidad que no puede ser evitada debida a la naturaleza biológica por ser un medicamento a base de células ya que la mayor o menor recuperación de una subpoblación celular y por tanto del porcentaje que represente en la composición va a depender de la densidad de cada una de ellas.

Las células progenitoras CD34⁺ son aquellas que tienen una mayor recuperación seguidas de las células MNCs porque son las poblaciones que menos densidad presentan. Por otro lado, la eliminación de RBCs y la de GRAs se debe a que son las células con mayor densidad.

A pesar de estos resultados la subpoblación mayoritaria para el DS seguía siendo la de GRAs en comparación con la de MNCs y células progenitoras CD34⁺. Esto se debe principalmente a dos razones, por el alto contenido inicial de GRAs que presentaba el SM y aunque se elimine un alto porcentaje persiste como subpoblación mayoritaria y por las diferencias en densidad de este heterogéneo grupo celular en la BM.

La Figura 59 muestra los diferentes estadios de maduración para los distintos tipos celulares durante el proceso de hematopoyesis. La franja amarilla muestra la maduración celular en la BM y en ella se advierte que las células precursoras de los GRAs al ser todavía un estado indiferenciado poseen un tamaño y complejidad mucho más parecido a una célula mononucleada, ya que tanto los GRAs como los monocitos derivan de la misma célula progenitora mieloide, el Mieloblasto, y probablemente su densidad en estos estadios tempranos también sean similares y por tanto se recuperan junto con la fracción de células MNCs.

DISCUSIÓN

Al aplicar esta misma técnica de gradiente de densidad con Ficoll, pero utilizando material de aféresis derivado de sangre o sangre de cordón, como describen los trabajos de (Janssen, Ribickas, Meyer, & Smilee, 2010) y (Kaur, et al., 2017), utilizando el procesador celular Sepax se obtuvo una depleción de GRAs de un 90% ya que en ese tejido el proceso de granulopoyesis se ha completado y los GRAs presentan esa forma polimorfonuclear tan característica que le confieren esa mayor densidad que hacen que permiten que sean eliminadas tras la separación con Ficoll.

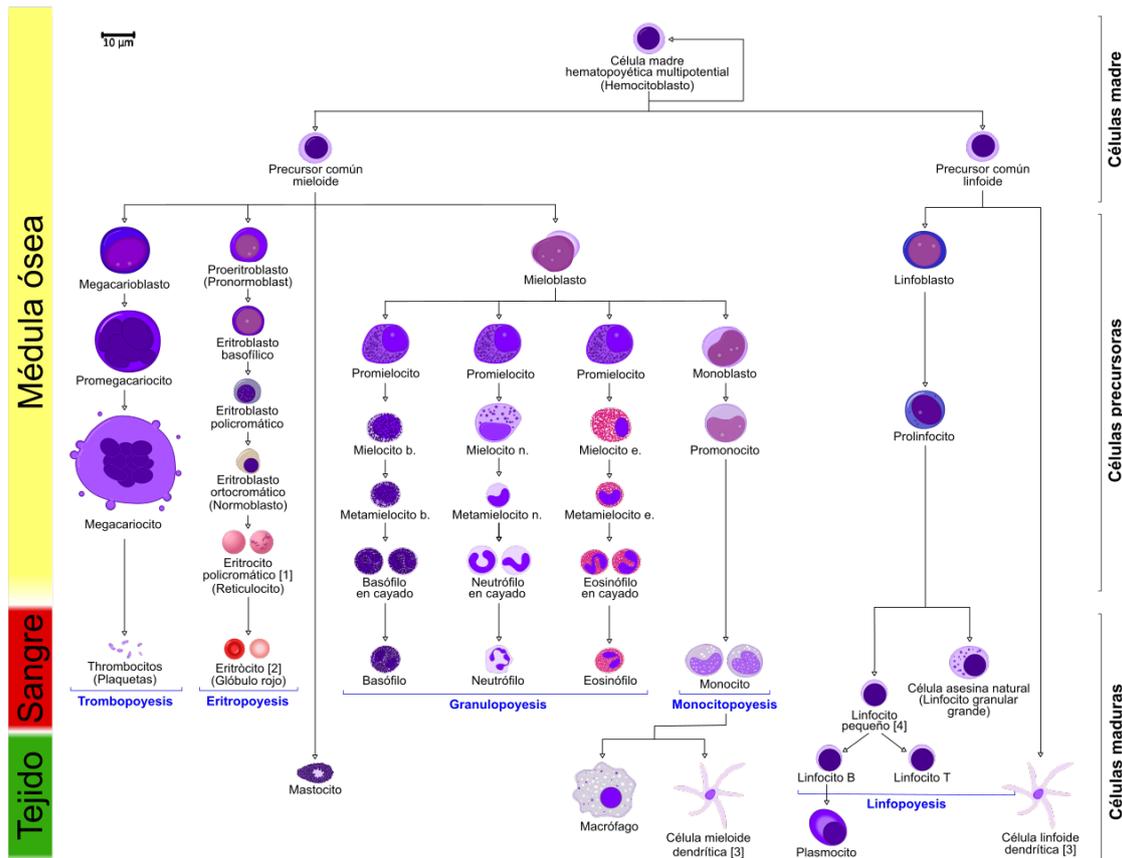


Figura 17. Proceso de hematopoyesis para la formación, desarrollo y maduración de los elementos de la sangre a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética multipotente. Adaptado de (Hägström, 2014).

DISCUSIÓN

Como se explicó en el apartado 4.4 la producción del DP consiste principalmente en un intercambio de medio en el que se elimina la solución de lavado mediante centrifugación y se adicionan los excipientes al pellet de células que forman el DS. Esto hace que no haya pérdida o selección celular y que por tanto no existan diferencias significativas en la composición entre ambos productos como muestra la Figura 50.

En cuanto al número de células logrado en la obtención del producto terminado REX-001 arrojan el buen rendimiento conseguido a lo largo del proceso de producción obteniéndose para la gran mayoría de los lotes un número de células superior al requerido para la dosis.

Como las etapas de centrifugación y formulación para obtener el DP durante el ensayo clínico fase III se realizaban de forma manual era esencial un cambio en éstas de cara al escalado de la producción y conseguir un proceso cerrado y automatizado para reducir el riesgo de contaminación microbiológica y evitar posibles errores por parte de los técnicos que se encarguen de la fabricación.

Para ello se adaptó el protocolo de CultureWash utilizado habitualmente para el lavado de células tras un cultivo celular y utilizando el procesador celular Sepax 2. Como se describe en el apartado 4.4.2 se realizó un estudio de los parámetros de proceso para la adecuación al nuevo procedimiento y determinar cuáles eran los que más influían. La estrategia inicial fue mantener en la medida de lo posible los mismos parámetros que en el proceso del estudio clínico fase II y III.

Tras los ensayos realizados se advirtió que existía una pérdida de células que representaría un porcentaje ínfimo adicional en el total del proceso lo cual es perfectamente asumible gracias al alto rendimiento obtenido en la producción de REX-001. Esto permitía garantizar en todos y cada uno de los lotes evaluados en este estudio clínico el número de células necesario para la consecución de la dosis.

A pesar de esto, se encontraron dos inconvenientes derivados del procedimiento de CultureWash uno fue la aparición de ciertos restos celulares en la cámara de separación del kit utilizado en el procesador celular y otro la falta de precisión en la obtención del volumen final que incluyen la cantidad necesaria para administrar la dosis de REX-001 y para el control de calidad del producto.

Para evitar que esto sucediera se evaluaron los diferentes parámetros de procesos y se determinó que la velocidad de centrifugación y la ratio de dilución podían ser los causantes respectivamente de estos dos indeseados resultados por lo que se realizaron estudios adicionales para optimizar los parámetros mencionados.

DISCUSIÓN

Disminuir la velocidad de centrifugación permitió eliminar la aparición de estos restos de células sin que se vieran afectados los rendimientos de recuperación celular ni a la viabilidad celular tal.

El hecho de establecer una dilución inicial del DS fue una decisión necesaria para adecuar el funcionamiento del procedimiento ejecutado por procesador celular y poder conseguir un volumen más preciso al volumen deseado o al menos no una cantidad inferior como ocurrió en el estudio de la evaluación de los parámetros de proceso de centrifugación y formulación (apartado 4.4.2.2) en el que en los ensayos realizados se obtuvo una cantidad menor por la no inclusión de este parámetro.

Esta dilución previa a la centrifugación no representaba ningún cambio reseñable en el conjunto del protocolo de CultureWash ya que era realizada utilizando el mismo formulado que contiene los excipientes.

Tras realizar un estudio de comparabilidad entre incluir o no una dilución inicial del DS, se comprobó que efectivamente en el proceso llevado a cabo con una dilución inicial la cantidad de volumen obtenida era la requerida, en este caso superior la cual está dentro del rango de variabilidad de precisión de volumen del procesador celular. Dos ensayos adicionales realizados posteriormente alcanzaron también un volumen superior.

Una vez finalizados estos estudios de caracterización de las etapas de centrifugación y formulación para la implementación del procedimiento automatizado y cerrado en el procesador celular cabe señalar que éstos fueron satisfactorios desde el punto de vista de la practicabilidad y por los buenos resultados obtenidos en cuanto a rendimiento de proceso como muestran los PPIs de recuperación de células superiores recomendado por el fabricante del equipo.

En cuanto a los CQAs se mantuvo una alta viabilidad con valores por encima del necesario para el efecto terapéutico del medicamento a pesar del cambio del equipo utilizado y la velocidad de centrifugación con respecto al proceso manual.

Evaluando el beneficio-riesgo entre una etapa abierta y manual, que es susceptible de contaminación y que requiere de elevados costes por la necesidad de unas instalaciones con mayores requerimientos para mantener la esterilidad frente a una etapa cerrada, que elimina el riesgo de contaminación, disminuye los costes y permite una mayor flexibilidad a la hora del escalado comercial, a pesar de tener un 3% menos de rendimiento, se consideró que existía una ganancia del procedimiento automatizado.

DISCUSIÓN

No obstante, será necesario realizar en el futuro más lotes de fabricación de desarrollo fuera del marco del ensayo clínico fase III para la centrifugación y formulación del DP utilizando el protocolo de CultureWash para incrementar el conocimiento y recabar más datos sobre esta etapa y confirmar así los datos obtenidos antes de su implementación en la producción para el tratamiento de los pacientes.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. REX-001 es un ATMPs de ingeniería tisular, derivado de BM para el tratamiento de la CLTI en pacientes con diabetes mellitus que ha demostrado seguridad y eficacia tras los estudios clínicos fase I y II y que actualmente bajo el marco de un ensayo clínico fase III se presenta como alternativa terapéutica aquellos pacientes que no responden a tratamientos convencionales o revascularización.
2. El desarrollo y la producción de medicamentos de ATMPs por su naturaleza biológica presentan una serie de retos que requieren de una metodología adecuada para conseguir estandarizar los productos obtenidos mediante procesos de fabricación reproducibles.
3. La implementación de los principios que presenta el modelo de desarrollo de QbD facilitan la obtención de resultados más robustos para el cumplimiento de la seguridad y eficacia del medicamento gracias a la comprensión de los efectos de los parámetros del proceso de producción en los atributos de calidad que conforman las características o cualidades del producto y poder así reducir la variabilidad.
4. Este sistema, desde el punto de vista industrial, promueve una mejora de la productividad con la reducción de lotes fallidos y que en el caso de REX-001 puede provocar dejar sin tratamiento al paciente por ser un medicamento autólogo. Además, facilita una eficiente comunicación con las agencias regulatorias ya que por un lado éstas promueven el modelo de QbD para el desarrollo de fármacos y por otro permite evidenciar la comprensión y el conocimiento adquirido sobre el proceso de producción y el comportamiento del producto a lo largo de éste.
5. La aplicación del método de desarrollo de QbD ha permitido la mejora del proceso de producción de REX-001 para que éste sea más reproducible a la vez que flexible. Así el estudio de los parámetros de proceso permitió aumentar el rendimiento al conseguir una mayor recuperación de células en la etapa de reducción de volumen y un rango estándar en la fase de gradiente de densidad con Ficoll.

CONCLUSIONES

6. El incremento de capacidad y eficiencia del proceso hizo que el número de células obtenido para la gran mayoría de los lotes fabricados fuera superior al necesario para alcanzar la dosis en el DP.
7. La reproducibilidad del proceso se vio favorecida además por el uso del procesador celular Sepax 2 S-100 que permitió la reducción de fallos y una mayor precisión en las operaciones gracias a ser un equipo automatizado y cerrado. Esto motivó que la producción del DP dejara de ser un proceso manual y abierto para adaptarse a este dispositivo.
8. De nuevo, el estudio de los parámetros de proceso y su optimización permitió mantener las características deseadas en el producto terminado, aunque con una pérdida de células que resultó asumible ya que el rendimiento del proceso global así lo posibilita.
9. En definitiva, el uso del método de QbD permitió avanzar en el desarrollo del proceso de producción de REX-001, comprender que éste debe ser flexible por el hecho de trabajar con un material biológico, cuya variabilidad se pudo reducir, pero no eliminar por completo, y por último conseguir lotes estándar que alcancen la dosis eficaz y lograr así tratar al mayor número de pacientes posibles.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aboyans, V., Ricco, J. B., Bartelink, M. L., Björck, M., Brodmann, M., Cohnert, T., & Desormais, I. (2018). 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS) Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal,. *European heart journal*, 39(9), 763-816.
- Abramson, J. S., Siddiqi, T., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Arnason, J. E., & Maloney, D. G. (2018). High durable CR rates and preliminary safety profile for JCAR017 in R/R aggressive B-NHL (TRANSCEND NHL 001 study): a defined composition CD19-directed CAR T cell product with potential for outpatient administration. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(3), S25.
- Acosta, N. E. (2016). Medicamento celular como alternativa terapéutica en la isquemia crónica crítica: De miembros inferiores en pacientes diabéticos sin posibilidades de revascularización. *Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla*.
- Alt, N., Zhang, T. Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., & Harris, R. J. (2016). Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals*, 44(5), 291-305.
- American Diabetes Association. (2003). Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes care*, 26(12), 3333-3341.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- American Diabetes Association. (2015). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*, 38(Supplement 1), S8-S16.
- Anderson, D. E., Williams III, R. J., DeBerardino, T. M., Taylor, D. C., Ma, C. B., Kane, M. S., & Crawford, D. C. (2017). Magnetic resonance imaging characterization and clinical outcomes after NeoCart surgical therapy as a primary reparative treatment for knee cartilage injuries. *The American journal of sports medicine*, 45(4), 875-883.
- Aponte, O. F., Díaz, B. M., & Huertas, C. E. (2015). La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. *Estudios Gerenciales*, 31(134), 68-78.

- Armstrong, E. J., Chen, D. C., Westin, G. G., Singh, S., McCoach, C. E., Bang, H., & Laird, J. R. (2014). Adherence to guideline-recommended therapy is associated with decreased major adverse cardiovascular events and major adverse limb events among patients with peripheral arterial disease. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), e000697.
- Aung, P. P., Maxwell, H., Jepson, R. G., Price, J., & Leng, G. C. (2007). Lipid-lowering for peripheral arterial disease of the lower limb. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4).
- Baigent, C., Blackwell, L., Collins, R., Emberson, J., Godwin, J., Peto, R., & Zanchetti, A. (2009). Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 373(9678), 1849-1860.
- Beckman, J. A., Creager, M. A., & Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama*, 287(19), 2570-2581.
- Belch, J., Hiatt, W. R., Baumgartner, I., Driver, I. V., Nikol, S., Norgren, L., & Van Belle, E. (2011). Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *The Lancet*, 377(9781), 1929-1937.
- Bellingan, G., Jacono, F., Bannard-Smith, J., Brealey, D., Meyer, N., Thickett, D., & Ting, A. (2019). Primary analysis of a phase 1/2 study to assess MultiStem® cell therapy, a regenerative advanced therapy medicinal product (ATMP), in acute respiratory distress syndrome (MUST-ARDS). *American Thoracic Society*, A7353-A7353.
- Benoit, E., O'Donnell, T. F., Iafrati, M. D., Asher, E., Bandyk, D. F., Hallett, J. W., & Patel, A. N. (2011). The role of amputation as an outcome measure in cellular therapy for critical limb ischemia: implications for clinical trial design. *Journal of translational medicine*, 9(1), 1-9.
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*, 114(12), 1852-1866.
- Black III, J. H., LaMuraglia, G. M., Kwolek, C. J., Brewster, D. C., Watkins, M. T., & Cambria, R. P. (2005). Contemporary results of angioplasty-based infrainguinal percutaneous interventions. *Journal of vascular surgery*, 42(5), 932-939.
- Bonaca, M. P., Bhatt, D. L., Storey, R. F., Steg, P. G., Cohen, M., Kuder, J., & Sabatine, M. S. (2016). Ticagrelor for prevention of ischemic events after myocardial infarction in patients with peripheral artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(23), 2719-2728.

- Bonamassa, B., Gasparini, P., Pompilio, G., Aiuti, A., & Foggi, P. (2021). The importance of starting materials: quality and regulatory considerations for cell-based therapies. *Cell & Gene Therapy Insights*, 7(2), 273–280.
- Campbell, A., Brieva, T., Raviv, L., Rowley, J., Niss, K., Brandwein, H., & Karnieli, O. (2015). Concise review: process development considerations for cell therapy. *Stem cells translational medicine*, 4(10), 1155-1163.
- Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 341-347.
- Clark, T. W., Groffsky, J. L., & Soulen, M. C. (2001). Predictors of long-term patency after femoropopliteal angioplasty: results from the STAR registry. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 12(8), 923-933.
- Coats, P., & Wadsworth, R. (2005). Marriage of resistance and conduit arteries breeds critical limb ischemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(3), H1044-H1050.
- Cooke, J. P., & Losordo, D. W. (2015). Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies. *Circulation research*, 116(9), 1561-1578.
- Cooke, J. P., & Meng, S. (2020). Vascular regeneration in peripheral artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(7), 1627-1634.
- Creager, M. A., Olin, J. W., Belch, J. J., Moneta, G. L., Henry, T. D., Rajagopalan, S., & Hiatt, W. R. (2011). Effect of hypoxia-inducible factor-1 α gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication. *Circulation*, 124(16), 1765-1773.
- Criqui, M. H., & Aboyans, V. (2015). Epidemiology of peripheral artery disease. *Circulation research*, 116(9), 1509-1526.
- Criqui, M. H., McClelland, R. L., McDermott, M. M., Allison, M. A., Blumenthal, R. S., Aboyans, V., & Shea, S. (2010). The ankle-brachial index and incident cardiovascular events in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Journal of the American College of Cardiology*, 56(18), 1506-1512.
- Critical Leg Ischaemia Prevention Study (CLIPS) Group. (2007). Prevention of serious vascular events by aspirin amongst patients with peripheral arterial disease: randomized, double-blind trial. *Journal of internal medicine*, 261(3), 276-284.

- Cytiva. (2019). Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications. Retrieved from <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=16156>
- Davies, M. G. (2012). Critical limb ischemia: cell and molecular therapies for limb salvage. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 8(4), 20.
- Dolan, N. C., Liu, K., Criqui, M. H., Greenland, P., Guralnik, J. M., Chan, C., & McDermott, M. M. (2002). Peripheral artery disease, diabetes, and reduced lower extremity functioning. *Diabetes care*, 25(1), 113-120.
- Draganski, E., Deason, T., & Craig, F. E. (2019). Bone Marrow Aspiration and Biopsy Performed by RNs: A Review of Clinical Practice. *AJN The American Journal of Nursing*, 119(9), 47-53.
- Duncan, C., Eichler, F., Musolino, P. L., Orchard, P. J., De Oliveira, S., Thrasher, A. J., & Williams, D. A. (2018). Lenti-D Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy to Arrest Progression of Cerebral Adrenoleukodystrophy: Interim Results of an International Phase 2/3 Trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(3), S73-S74.
- Dwarshuis, N. J., Parratt, K., Santiago-Miranda, A., & Roy, K. (2017). Cells as advanced therapeutics: State-of-the-art, challenges, and opportunities in large scale biomanufacturing of high-quality cells for adoptive immunotherapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 222-239.
- Eder, C., & Wild, C. (2019). Technology forecast: advanced therapies in late clinical research, EMA approval or clinical application via hospital exemption. *Journal of market access & health policy*, 7(1), 1600939.
- EMA Committee for Human Medicinal Products. (2009). ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. *EMA/CHMP/ICH/167068/2004*. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf
- Estevez Alamo, J., Timón, M., González Gómez-Platero, C., Doadrio Abad, C., Velasco Gonzalez, M., & Martin de la Sierra San Agustin, M. A. (2019). Clinical trials of advanced therapy investigational medicinal products in Spain: preparing for the European clinical trials regulation. *Cell & Gene Therapy Insights*, 5(11), 1431-1449.

- European Commission. (2009). Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products. In *Official Journal of the European Union* 15.9. 2009. L242/3-12.
- European Parliament and the Council of the European Union. (2007). Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *Official Journal*, 324, 121-137.
- Farber, A. (2018). Chronic limb-threatening ischemia. *New England Journal of Medicine*, 379(2), 171-180.
- Finkler, C., & Krummen, L. (2016). Introduction to the application of QbD principles for the development of monoclonal antibodies. *Biologicals*, 44(5), 282-290.
- Fowkes, F. G. (2013). Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, 382, 1329-1340.
- Gálvez, P., Clares, B., Hmadcha, A., Ruiz, A., & Soria, B. (2013). Development of a cell-based medicinal product: regulatory structures in the European Union. *British medical bulletin*, 105(1), 85-105.
- Grimes, D. A., Hubacher, D., Nanda, K., Schulz, K. F., Moher, D., & Altman, D. G. (2005). The Good Clinical Practice guideline: a bronze standard for clinical research. *The Lancet*, 366(9480), 172-174.
- Häggröm, M. (2014). Medical gallery of Mikael Häggström. *WikiJournal of Medicine*, 1(2), 1-53.
- Haghighat, L., Ionescu, C. N., Regan, C. J., Altin, S. E., Attaran, R. R., & Mena-Hurtado, C. I. (2019). Review of the current basic science strategies to treat critical limb ischemia. *Vascular and Endovascular Surgery*, 53(4), 316-324.
- Hakemeyer, C., McKnight, N., John, R. S., Meier, S., Trexler-Schmidt, M., Kelley, B., & Wurth, C. (2016). Process characterization and design space definition. *Biologicals*, 44(5), 306-318.
- Hardman, R. L., Jazaeri, O., Yi, J., Smith, M., & Gupta, R. (2014). Overview of classification systems in peripheral artery disease. *Seminars in interventional radiology*. Thieme Medical Publishers, 31(4), 378.

- Heathman, T. R., Rafiq, Q. A., Chan, A. K., Coopman, K., Nienow, A. W., Kara, B., & Hewitt, C. J. (2016). Characterization of human mesenchymal stem cells from multiple donors and the implications for large scale bioprocess development. *Biochemical engineering journal*, *108*, 14-23.
- Henry, T. D., Hirsch, A. T., Goldman, J., Wang, Y. L., Lips, D. L., McMillan, W. D., & Keo, H. H. (2011). Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. *Gene therapy*, *18*(8), 788-794.
- Hernigou, P., Homma, Y., Lachaniette, C. F., Poignard, A., Allain, J., Chevallier, N., & Rouard, H. (2013). Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *International orthopaedics*, *37*(11), 2279-2287.
- Hiatt, W. R., Fowkes, F. G., Heizer, G., Berger, J. S., Baumgartner, I., Held, P., & Patel, M. R. (2017). Ticagrelor versus clopidogrel in symptomatic peripheral artery disease. *N Engl J Med*, *376*, 32-40.
- Hiramoto, J. S., Teraa, M., de Borst, G. J., & Conte, M. S. (2018). Interventions for lower extremity peripheral artery disease. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(6), 332-350.
- Holm, P., Allesø, M., Bryder, M., & Holm, R. (2017). Q8 (R2) Pharmaceutical Development. *ICH quality guidelines: an implementation guide*, 535-577.
- Huang, P., Li, S., Han, M., Xiao, Z., Yang, R., & Han, Z. C. (2005). Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes care*, *28*(9), 2155-2160.
- Iglesias-Lopez, C., Agustí, A., Obach, M., & Vallano, A. (2019). Regulatory framework for advanced therapy medicinal products in Europe and United States. *Frontiers in pharmacology*, *10*.
- Ilic, D. (2018). Latest developments in the field of stem cell research and regenerative medicine compiled from publicly available information and press releases from nonacademic institutions. *Regenerative medicine*, *13*(4), 361.
- Imagawa, A., Hanafusa, T., Miyagawa, J. I., & Matsuzawa, Y. (2000). A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *New England journal of medicine*, *342*(5), 301-307.
- Janssen, W. E., Ribickas, A., Meyer, L. V., & Smilee, R. C. (2010). Large-scale Ficoll gradient separations using a commercially available, effectively closed, system. *Cytotherapy*, *12*(3), 418-424.

- Jude, E. B., Oyibo, S. O., Chalmers, N., & Boulton, A. J. (2001). Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes care*, *24*(8), 1433-1437.
- Kaur, I., Zulovich, J. M., Gonzalez, M., McGee, K. M., Ponweera, N., Thandi, D., & Shpall, E. (2017). Comparison of two methodologies for the enrichment of mononuclear cells from thawed cord blood products: The automated Sepax system versus the manual Ficoll method. *Cytotherapy*, *19*(3), 433-439.
- Kirouac, D. C., & Zandstra, P. W. (2008). The systematic production of cells for cell therapies. *Cell stem cell*, *3*(4), 369-381.
- Koga, J. I., & Aikawa, M. (2012). Crosstalk between macrophages and smooth muscle cells in atherosclerotic vascular diseases. *Vascular pharmacology*, *57*(1), 24-28.
- Kusumanto, Y. H., van Weel, V., Mulder, N. H., Smit, A. J., van den Dungen, J. J., Hooymans, J. M., . . . Hospers, G. A. (2006). Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Human gene therapy*, *17*(6), 683-691.
- Lahoz, C., & Mostaza, J. M. (2007). La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Revista española de cardiología*, *60*(2), 184-195.
- Lambert, M. A., & Belch, J. F. (2013). Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? *Journal of internal medicine*, *274*(4), 295-307.
- Lana, J. F., da Fonseca, L. F., Azzini, G., Santos, G., Braga, M., Cardoso Junior, A. M., & Percoppe de Andrade, M. A. (2021). Bone Marrow Aspirate Matrix: A Convenient Ally in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 2762.
- Lawrence, X. Y., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., & Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*, *16*(4), 771-783.
- Lederman, R. J., Mendelsohn, F. O., Anderson, R. D., Saucedo, J. F., Tenaglia, A. N., Hermiller, J. B., & Annex, B. H. (2002). Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *The Lancet*, *359*(9323), 2053-2058.
- Leeper, N. J., Hunter, A. L., & Cooke, J. P. (2010). Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation*, *122*(5), 517-526.

- Li, F., Hashimura, Y., Pendleton, R., Harms, J., Collins, E., & Lee, B. (2006). A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes. *Biotechnology progress*, 22(3), 696-703.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2009). Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *Journal of the American college of cardiology*, 54(23), 2129-2138.
- Lipsitz, Y. Y., Timmins, N. E., & Zandstra, P. W. (2016). Quality cell therapy manufacturing by design. *Nature biotechnology*, 34(4), 393-400.
- Looby, M., Ibarra, N., Pierce, J. J., Buckley, K., O'Donovan, E., Heenan, M., & Baganz, F. (2011). Application of quality by design principles to the development and technology transfer of a major process improvement for the manufacture of a recombinant protein. *Biotechnology progress*, 27(6), 1718-1729.
- Mäkinen, K., Manninen, H., Hedman, M., Matsi, P., Mussalo, H., Alhava, E., & Ylä-Herttuala, S. (2002). Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Molecular Therapy*, 6(1), 127-133.
- Martin, A., Komada, M. R., & Sane, D. C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal research reviews*, 23(2), 117-145.
- Martin-Moe, S., Lim, F. J., Wong, R. L., Sreedhara, A., Sundaram, J., & Sane, S. U. (2011). A new roadmap for biopharmaceutical drug product development: Integrating development, validation, and quality by design. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(8), 3031-3043.
- Mason, C., & Dunnill, P. (2009). Assessing the value of autologous and allogeneic cells for regenerative medicine. *Regenerative medicine*, 4(6), 835-853.
- Massó, F. J., & Gómez, M. F. (2014). Concepto, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *La Diabetes en la Práctica Clínica*.
- Matoba, S., Tatsumi, T., Murohara, T., Imaizumi, T., Katsuda, Y., & Ito, M. (2008). Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *American heart journal*, 156(5), 1010-1018.
- Mazza, C. S. (2018). Diabetes MODY. Enfoque pediátrico. *Med. infant*, 315-321.

- Mohler III, E. R. (2003). Peripheral arterial disease: identification and implications. *Archives of Internal Medicine*, 163(19), 2306-2314.
- Moutsatsou, P., Ochs, J., Schmitt, R. H., Hewitt, C. J., & Hanga, M. P. (2019). Automation in cell and gene therapy manufacturing: from past to future. *Biotechnology letters*, 41(11), 1245-1253.
- Nadpara, N. P., Thumar, R. V., Kalola, V. N., & Patel, P. B. (2012). Quality by design (QBD): A complete review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 17(2), 20-8.
- Nehler, M. R., Duval, S., Diao, L., Annex, B. H., Hiatt, W. R., Rogers, K., & Hirsch, A. T. (2014). Epidemiology of peripheral arterial disease and critical limb ischemia in an insured national population. *Journal of vascular surgery*, 60(3), 686-695.
- Nikol, S., Baumgartner, I., Van Belle, E., Diehm, C., Visoná, A., Capogrossi, M. C., & Meyer, F. (2008). Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Molecular Therapy*, 16(5), 972-978.
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., & Fowkes, F. G. (2007). Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Journal of vascular surgery*, 45(1), S5-S67.
- Norgren, L., Weiss, N., Nikol, S., Hinchliffe, R. J., Lantis, J. C., Patel, M. R., & Aberman, Z. (2019). PLX-PAD cell treatment of critical limb ischaemia: Rationale and design of the PACE trial. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 57(4), 538-545.
- Novo, S., Coppola, G., & Milio, G. (2004). Critical limb ischemia: definition and natural history. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders*, 4(3), 219-225.
- O'sullivan, S., Healy, D. A., Moloney, M. C., Grace, P. A., & Walsh, S. R. (2013). The role of N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy in patients undergoing peripheral angiography: a structured review and meta-analysis. *Angiology*, 64(8), 576-582.
- Ozturk, A., Kucukardali, Y., Tangi, F., Erikci, A., Uzun, G., Bashekim, C., & Oktenli, C. (2012). Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia. *Journal of Diabetes and its Complications*, 26(1), 29-33.
- Powell, R. J., Goodney, P., Mendelsohn, F. O., Moen, E. K., & Annex, B. H. (2010). Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial. *Journal of vascular surgery*, 52(6), 1525-1530.

- Powell, R. J., Marston, W. A., Berceli, S. A., Guzman, R., Henry, T. D., Longcore, A. T., & Bartel, R. L. (2012). Cellular therapy with Ixmyelocel-T to treat critical limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled RESTORE-CLI trial. *Molecular Therapy*, *20*(6), 1280-1286.
- Powell, R. J., Simons, M., Mendelsohn, F. O., Daniel, G., Henry, T. D., Koga, M., . . . Annex, B. H. (2008). Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, *118*(1), 58-65.
- Powers, A. C. (2016). Diabetes mellitus: diagnóstico, clasificación y fisiopatología. In P. J. Barnes , D. L. Longo , & A. S. Fauci , *Tratado de medicina interna* (19 ed., pp. 2399-2407). Mc Graw Hill.
- Procházka, V., Gumulec, J., Jalůvka, F., Šalounová, D., Jonszta, T., Czerný, D., & Klement, G. L. (2010). Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. *Cell transplantation*, *19*(11), 1413-1424.
- Prockop, S. E., Reshef, R., Tsai, D. E., Bunin, N., Abu-Arja, R., Mahadeo, K. M., & Nikiforow, S. (2020). Long-Term Outcomes of Patients with Epstein-Barr Virus Post-transplant Lymphoproliferative Disease Following Solid Organ Transplant or Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Treated with Tabelecleucel in a Multicenter Expanded Access Program Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *26*(3), S61-S62.
- Qadura, M., Terenzi, D. C., Verma, S., Al-Omran, M., & Hess, D. A. (2018). Concise review: cell therapy for critical limb ischemia: an integrated review of preclinical and clinical studies. *Stem Cells*, *36*(2), 161-171.
- Rafiq-Qasim, A., Thomas, S., & Robert, J. (2016). The evolving role of automation in process development & manufacture of cell & gene-based therapies. *Cell and Gene Therapy Insights*, *2*(4), 473-479.
- Rajagopalan, S., Mohler III, E. R., Lederman, R. J., Mendelsohn, F. O., Saucedo, J. F., Goldman, C. K., & Annex, B. H. (2003). Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent cl. *Circulation*, *108*(16), 1933-1938.
- Rajagopalan, S., Olin, J., Deitcher, S., Pieczek, A., Laird, J., Grossman, P. M., . . . Chronos, N. (2007). Use of a Constitutively Active Hypoxia-Inducible Factor-1 α Transgene as a Therapeutic

- Strategy in No-Option Critical Limb Ischemia Patients. Phase I Dose-Escalation Experience. *Circulation*, 115, 1234-1243.
- Raje, N., Berdeja, J., Lin, Y. I., Siegel, D., Jagannath, S., Madduri, D., & Kochenderfer, J. N. (2019). Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 380(18), 1726-1737.
- Rathore, A. S. (2009). Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends in biotechnology*, 27(9), 546-553.
- Rathore, A. S., & Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology*, 27(1), 26-34.
- Rawal, M., Singh, A., & Amiji, M. M. (2019). Quality-by-design concepts to improve nanotechnology-based drug development. *Pharmaceutical research*, 36(11), 1-20.
- Revert, A., Pallardó, Y., Esteban, E., Jornet, J., & Mollá, E. (2006). Evaluación de la arteriopatía de los miembros inferiores por tomografía computarizada multidetector comparada con la angiografía por sustracción digital. *Radiología*, 48(6), 369-374.
- Ridker, P. M., MacFadyen, J., Libby, P., & Glynn, R. J. (2010). Relation of baseline high-sensitivity C-reactive protein level to cardiovascular outcomes with rosuvastatin in the Justification for Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER). *The American journal of cardiology*, 106(2), 204-209.
- Riera, M. L., Salazar, A. A., Stefanov, K. S., Tong, H., Riera, C. L., & García-Olmo, D. (2017). Phase Ib open clinical trial to assess the safety of autologous mesenchymal stem cells for the treatment of nonrevascularizable critical lower limb ischemia. *J Stem Cell Res Ther*, 7, 391.
- Rouiller, Y., Solacroup, T., Deparis, V., Barbafieri, M., Gleixner, R., Broly, H., & Eon-Duval, A. (2012). Application of quality by design to the characterization of the cell culture process of an Fc-fusion protein. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 81(2), 426-437.
- Roy, D. C., Walker, I., Maertens, J., Lewalle, P., Olavarria, E., Selleslag, D., & Mielke, S. (2020). ATIR101 administered after T-cell-depleted haploidentical HSCT reduces NRM and improves overall survival in acute leukemia. *Leukemia*, 34(7), 1907-1923.
- Ruiz-Salmeron, R., De La Cuesta-Diaz, A., Constantino-Bermejo, M., Pérez-Camacho, I., Marcos-Sánchez, F., Hmadcha, A., & Soria, B. (2011). Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear

- cells in diabetic patients with critical limb ischemia. *Cell transplantation*, 20(10), 1629-1639.
- Rutherford, R. B., Baker, J. D., Ernst, C., Johnston, K. W., Porter, J. M., Ahn, S., & Jones, D. N. (1997). Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *Journal of vascular surgery*, 26(3), 517-538.
- Sandner, V., Pybus, L. P., McCreath, G., & Glassey, J. (2019). Scale-down model development in Ambr systems: An industrial perspective. *Biotechnology journal*, 14(4), 1700766.
- Sanjuan-Gimenez, J. C., Morales, M. L., Carranza-Garcia, I., del Pino-Zumaquero, A., Hernández-Ruiz, L., & Villegas, E. (2021). Development and qualification of a representative scale-down model of automated Ficoll-based processing of a cell-based therapeutic according to quality by design principles. *Cytotherapy*, 23(10), 953-959.
- Schneiderman, J., Thompson, A. A., Walters, M. C., Kwiatkowski, J. L., Kulozik, A. E., Sauer, M. G., & Locatelli, F. (2020). Interim results from the phase 3 Hgb-207 (Northstar-2) and Hgb-212 (Northstar-3) studies of betibeglogene autotemcel gene therapy (LentiGlobin) for the treatment of transfusion-dependent β -thalassemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 26(3), S87-S88.
- Seimetz, D., Heller, K., & Richter, J. (2019). Approval of first CAR-Ts: have we solved all hurdles for ATMPs? *Cell Medicine*, 11.
- Setacci, C., De Donato, G., Teraa, M., Moll, F. L., Ricco, J. B., Becker, F., & Apelqvist, J. (2011). Chapter IV: treatment of critical limb ischaemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 42, S43-S59.
- Sharma, A., Helft, G., Garg, A., Agrawal, S., Chatterjee, S., Lavie, C. J., & Marmur, J. D. (2017). Safety and efficacy of vorapaxar in secondary prevention of atherosclerotic disease: a meta-analysis of randomized control trials. *International Journal of Cardiology*, 227, 617-624.
- Sharma, A., Sinha, M., Pandey, N. N., & Chandrashekhara, S. H. (2019). Stem cell therapy in critical limb ischemia: Current scenario and future trends. *The Indian Journal of Radiology & Imaging*, 29(4), 397.
- Shigematsu, H., Yasuda, K., Iwai, T., Sasajima, T., Ishimaru, S., Ohashi, Y., & Morishita, R. (2010). Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene therapy*, 17(9), 1152-1161.

- Shutterstock. (2021). *Atherosclerosis and plaque formation*. Obtenido de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/stable-atherosclerotic-plaque-formation-human-artery-638970265>
- Shutterstock. (2021). *Pathomechanism of atherosclerosis plaque rupture*. Obtenido de <https://www.shutterstock.com/es/image-vector/thrombus-blood-clot-unstable-plaque-formation-263374133>
- Silverman, L. I., Flanagan, F., Rodriguez-Granrose, D., Simpson, K., Saxon, L. H., & Foley, K. T. (2019). Identifying and managing sources of variability in cell therapy manufacturing and clinical trials. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 5(4), 354-361.
- Smith, F. B., Bradbury, A., & Fowkes, G. (2012). Intravenous naftidrofuryl for critical limb ischaemia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(7).
- Soga, Y., Iida, O., Hirano, K., Suzuki, K., Kawasaki, D., Miyashita, Y., & Nobuyoshi, M. (2011). Impact of cilostazol after endovascular treatment for infrainguinal disease in patients with critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery*, 54(6), 1659-1667.
- Soria-Juan, B., Escacena, N., Capilla-Gonzalez, V., Aguilera, Y., Llanos, L., Tejedo, J. R., & Soria, B. (2019). Cost-effective, safe, and personalized cell therapy for critical limb ischemia in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in immunology*, 10, 1151.
- Sprengers, R. W., Moll, F. L., Teraa, M., Verhaar, M. C., & JUVENTAS Study Group. (2010). Rationale and design of the JUVENTAS trial for repeated intra-arterial infusion of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with critical limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, 51(6), 1564-1568.
- Ten Ham, R. M., Hoekman, J., Hövels, A. M., Broekmans, A. W., Leufkens, H. G., & Klungel, O. H. (2018). Challenges in advanced therapy medicinal product development: a survey among companies in Europe. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 11, 121-130.
- Teraa, M., Sprengers, R. W., Schutgens, R. E., Slaper-Cortenbach, I. C., Van Der Graaf, Y., Algra, A., & Verhaar, M. C. (2015). Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial. JUVENTAS. *Circulation*, 131(10), 851-860.

- Uemura, S., Matsushita, H., Li, W., Glassford, A. J., Asagami, T., Lee, K. H., & Tsao, P. S. (2001). Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circulation Research*, *88*(12), 1291-1298.
- US Food and Drug Administration. (2013). Paving the way for personalized medicine: FDA's role in a new era of medical product development. *Silver Spring*.
- Van den Bos, C., Keefe, R., Schirmaier, C., & McCaman, M. (2013). Therapeutic human cells: manufacture for cell therapy/regenerative medicine. (D. Eibl, & R. Eibl, Eds.) *Disposable Bioreactors II*, *138*, 61-97.
- Verma, S., & Anderson, T. J. (2001). The ten most commonly asked questions about endothelial function in cardiology. *Cardiology in review*, *9*(5), 250-252.
- Vignal-Clermont, C., Girmens, J. F., Audo, I., Said, S. M., Errera, M. H., Plaine, L., & Sahel, J. A. (2021). Safety of Intravitreal Gene Therapy for Treatment of Subjects with Leber Hereditary Optic Neuropathy due to Mutations in the Mitochondrial ND4 Gene: The REVEAL Study. 1-14.
- Vinik, A. I., Erbas, T., Park, T. S., Nolan, R., & Pittenger, G. L. (2001). Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes care*, *24*(8), 1476-1485.
- Vives, J., & Carmona, G. (2015). Guide to Cell Therapy GxP: Quality Standards in the Development of Cell-Based Medicines in Non-pharmaceutical Environments. *Academic Press*.
- Walter, D. H., Krankenberg, H., Balzer, J. O., Kalka, C., Baumgartner, I., & Schlüter, M. (2011). Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). *Circulation: Cardiovascular Interventions*, *4*(1), 26-37.

