



Universidad de Valladolid



REVISIÓN DEL CICLO DE VIDA DE UN MEDICAMENTO DE TERAPIA CELULAR

Trabajo de Fin de Máster

Máster en Investigación Biomédica

Autor: Martín Gómez Redondo

Tutora: Mercedes Alberca Zaballos

Curso 2021/2022

A mi abuela Elena y a mi madre Amor, por haberme dado la oportunidad de formarme y ser la persona que soy hoy. Sois y seréis siempre mi mayor ejemplo a seguir.

A mi tutora Kika, por haber sido la mejor profesora que he tenido nunca. Por todo el tiempo que me ha dedicado, por los mejores consejos que me podrían haber dado, por los infinitos conocimientos que me ha mostrado, por todas las horas juntos en el cuarto de cultivos y por ser una persona excepcional. Siempre estaré agradecido.

A todo el personal de Citospin por haberme proporcionado la oportunidad de trabajar junto a ellos. En especial a Berta y a Mariángeles por haberme enseñado con paciencia todos los conocimientos técnicos siempre que lo he necesitado.

A Tere y a Joserra, por haberme acogido en su laboratorio antes incluso de empezar el máster y haber conseguido trasmitirle a un físico la pasión que ellos tienen por la biomedicina. También a Pilar, Diego, Jorge, Sara, Nuria, Virginia y Esther por todas las horas juntos.

A Javi Casas, por toda la ayuda con microscopía recibida durante este proyecto.

Y finalmente, a todos mis amigos, por acompañarme siempre en todas mis aventuras (incluido este máster). Pero en especial a mis amigas Ángela y Lucía, dos amigas para siempre.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	2
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	4
MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA	4
MEDICAMENTOS DE TERAPIA CELULAR.....	6
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN TERAPIA CELULAR	6
Deficiencia de células madre limbares	7
DEL LABORATORIO AL PACIENTE	9
Sala blanca.....	11
OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
Reactivos y soportes	12
Células madre mesenquimales (MSC).....	13
Fabricación del medicamento de terapia celular MSV-MA.....	15
Soporte biológico (MA)	15
Principio activo (MSC)	16
Tinción de MSV-MA con Yoduro de Propidio y Hoescht y análisis de la viabilidad celular	17
Análisis de la viabilidad por microscopía confocal	17
Tinción con PKH67.....	17
5. RESULTADOS	18
Análisis fenotípico mediante citometría de flujo	18
Osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis.....	19
Curva de crecimiento del cultivo celular	20
Fabricación de MSV-MA.....	21
Tinción de MSV-MA con PKH67.....	22
Pruebas de estabilidad.....	23
Análisis de la viabilidad celular después de 72 horas de la liberación.....	23
Análisis fenotípico después de 72 horas de la liberación	24
Dossier de fabricación validado.....	25
6. DISCUSIÓN	25
7. CONCLUSIONES	29
8. REFERENCIAS	30
9. ANEXOS . Dossier de fabricación	33

1. ABREVIATURAS

- **ATMP:** Advanced Therapy Medicinal Product.
- **CTMP:** Cell Therapy Medicinal Product.
- **GTMP:** Gene Therapy Medicinal Product.
- **TEP:** Tissue Engineered Product.
- **CATP:** Combined Advanced Therapy Products.
- **CE:** Comisión Europea.
- **PEI:** Producto en Investigación Clínica.
- **MSC:** Mesenchymal Stem Cell.
- **CML:** Células Madre Limbares.
- **DCML:** Deficiencia de Células Madre Limbares.
- **BPL:** Buenas Prácticas de Laboratorio.
- **PNT:** Procedimientos Normalizados de Trabajo.
- **AEMPS:** Agencia Española del Medicamento y Productos Santarios.
- **EC:** Ensayo Clínico.
- **GMP:** Good Manufacturing Practice.
- **NCF:** Normas de Correcta Fabricación.
- **FBS:** Fetal Bovine Serum.
- **MO:** Médula Osea.
- **UPC:** Unidad de Producción Celular.
- **MA:** Membrana Amniótica.
- **MSV-MA:** Células Mesenquimales de Valladolid sobre Membrana Amniótica.

2. RESUMEN

El desarrollo de la investigación biomédica está permitiendo la creación de nuevas terapias y tratamientos novedosos que permiten el tratamiento de un gran número de patologías. En este sentido, las terapias celulares basadas en células madre mesenquimales están tomando un importante protagonismo en el área de la medicina regenerativa gracias a su eficacia y complejidad. Este proyecto tiene como objetivo el diseño y fabricación de un medicamento de terapia celular de células madre mesenquimales cultivadas sobre un biosoporte para uso en oftalmología. Además, se llevará a cabo la traslación de la investigación básica de laboratorio a una unidad de producción celular, que cumpla los requisitos establecidos por la Guía de Correcta Fabricación de Medicamentos de Terapia Avanzada. Los resultados obtenidos muestran el proceso de aislamiento y expansión de las MSC a partir de una muestra de médula osea, la fabricación del medicamento MSV-MA y pruebas de estabilidad tras 72 horas de almacenamiento a temperatura ambiente y fuera del incubador en diferentes medios de acondicionamiento. Además, se ha elaborado un Dossier de Fabricación validado que permita mantener un registro de todo el proceso de fabricación del medicamento dentro del marco de un sistema de calidad farmacéutico con el fin de que el proceso de producción sea robusto, homogéneo y de alta calidad.

Palabras clave: ATMP, terapia celular, células madre mesenquimales, membrana amniótica y GMP.

The development of biomedical research is enabling the creation of new therapies and novel treatments that allow to treat a large number of pathologies. In this way, cell therapies based on mesenchymal stem cells are taking an important role in the area of regenerative medicine thanks to their efficacy and complexity. The aim of this project is to design and manufacture a cell therapy medicinal product based on mesenchymal stem cells cultured in a biocarrier for use in ophthalmology. In addition, the translation of the basic laboratory research to a cell production unit that complies the Good Manufacturing Practice guidelines for Advanced Therapy Medicinal Products will be carried out. The results obtained show the process of isolation and expansion of MSCs from a bone marrow sample, the manufacture of the MSV-MA product and the stability tests after 72 hours of storage at room temperature and outside the incubator in different conditioning media. In addition, a validate Manufacturing Dossier has been developed to keep track of entire product manufacturing process within the framework of a pharmaceutical quality system for a robust, homogeneous and high quality production process.

Key words: ATMP, cell therapy, mesenchymal stem cells, amniotic membrane and GMP.

3. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la biotecnología y la investigación biomédica ha supuesto un cambio en el paradigma del tratamiento de todo tipo de enfermedades que afectan al ser humano. En la actualidad, comienzan a aparecer nuevas estrategias terapéuticas para patologías que antes causaban una alta tasa de morbilidad, mortalidad y costes socioeconómicos. Además, actualmente surgen alternativas a tratamientos cuya eficacia no resultaba lo suficientemente alta como para lograr la remisión de ciertas patologías graves. Todo este avance científico está respaldado por una potente investigación preclínica en los laboratorios de investigación básica de todo el mundo y una importante labor traslacional para poder transformar estos conocimientos en ensayos clínicos que culminen con la aparición de nuevos medicamentos y terapias.

Ante esta nueva perspectiva de la medicina cabe destacar el uso de células, genes y tejidos como base del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El potencial que presentan estos componentes biológicos es extremadamente alto, pues permiten introducir variables en el problema que antes eran totalmente inimaginables. Las células como principio activo son capaces de interactuar con los organismos de una forma mucho más compleja dado su carácter vivo y capacidad de adaptación. Las terapias basadas en ácidos nucleicos recombinantes dan forma a una estrategia totalmente inédita consistente en la modificación del material genético del paciente para resolver patologías causadas por mutaciones genéticas. La ingeniería tisular permite el uso de biomateriales y células con el fin de reparar y sustituir tejidos dañados, incluso llegando a mejorar su funcionalidad. El infinito horizonte que marcan estas nuevas estrategias suponen una auténtica revolución para las terapias convencionales estableciendo lo que hoy se conoce como medicina regenerativa y personalizada.

MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA

Los medicamentos de terapia avanzada (ATMP, Advanced Therapy Medicinal Products) son una clase de medicamento cuyo principio activo está basado en células, genes y tejidos. El uso de estos componentes se ha utilizado en la historia de la medicina moderna con cierta regularidad, sobre todo en el uso de tejidos y células en trasplantes (1). Sin embargo, con el desarrollo de nuevos conocimientos en el área de la biomedicina surgieron nuevas estrategias de investigación que pronto se transformaron en terapias avanzadas que paulatinamente se fueron estandarizando y comercializando (2). Los ATMPs han supuesto un punto de inflexión en el tratamiento de patologías y en la mejora de la eficacia de los tratamientos convencionales.

Los ATMPs se pueden clasificar, de acuerdo a su naturaleza, de la siguiente manera (3):

- **Medicamentos de terapia celular somática (CTMPs, Cell Therapy Medicinal Products).** Son medicamentos basados en células somáticas o tejidos que han sido sometidos a manipulaciones sustanciales. Estas manipulaciones consisten en procesos que cambian sus características biológicas o su fisiología original. El principio activo de los CTMPs son células, componentes celulares, lisados celulares o células cultivadas, expandidas o modificadas genéticamente. (4,5)

- **Medicamentos de terapia génica (GTMPs, Gene Therapy Medicinal Products).** Son medicamentos cuyo principio activo es un ácido nucleico recombinante que se administra a un paciente con el fin de modificar o reparar su información genética. Estas modificaciones pueden ser estables o transitorias (4,5).
- **Medicamentos de ingeniería tisular (TEPs, Tissue-Engineered Products).** Son medicamentos que consisten en células o tejidos modificados sustancialmente y empleados para la regeneración o el reemplazo de tejidos humanos dañados (4).
- **Medicamentos de terapias avanzadas combinadas (CATPs, Combined Advanced Therapy Products).** Son productos que incorporan uno o varios dispositivos biomédicos además de células o tejidos para facilitar su función biológica en el organismo del paciente (4,6,7). Un ejemplo de CATP es la utilización de biopolímeros recombinantes de elastina (ELRs) para formar hidrogeles que sirvan como carrier para células madre mesenquimales en el tratamiento de defectos osteocondrales (8).

En cualquiera de los medicamentos previamente definidos las células y tejidos que forman algunos de sus principios activos puede tener carácter autólogo, alogénico o xenogénico, lo que proporciona una gran versatilidad a la hora de su fabricación y diseño.

Toda esta clase de productos han permitido el tratamiento de enfermedades de características muy variadas. Algunos ejemplos de estas patologías son la epidermólisis bullosa distrófica (9), la diabetes mellitus (10), la atrofia muscular espinal (11), la esclerosis múltiple (12) o enfermedades autoinmunes como el lupus nefrítico (13).

El marco regulatorio europeo, mediante el Reglamento de la CE Nº 1394/2007 (BOE núm.174, de 20 de julio de 2009) (4), estableció una clasificación conforme a los requerimientos legales de cada tipo de medicamento de terapia avanzada. En esta clasificación se incluyeron cuatro grandes grupos:

1. Medicamentos de terapia avanzada (ATMPs).
2. Medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial.
3. Plasma rico en plaquetas (PRP).
4. Medicamentos en situaciones especiales. En esta categoría se incluyen los medicamentos de uso compasivo en investigación, uso de ATMPs en condiciones diferentes a las autorizadas y ATMPs no autorizados en España.

Debido a su alta complejidad y alto coste de producción, los ATMPs en España han sido casi siempre diseñados y fabricados en universidades y pequeñas spin-offs. El proceso de fabricación de estos medicamentos es tan complejo y personalizado que su fabricación industrial sería completamente inviable y, por eso, generalmente el proceso de producción de los ATMPs es un proceso no compatible con el ámbito industrial. Para solventar legislativamente la imposible fabricación industrial de estos medicamentos, se emplea el concepto de Producto en Fase de Investigación Clínica (PEI), que permite utilizar estas terapias en los centros autorizados para su aplicación. La legislación que regula la aprobación y uso de este tipo de productos se trata de la Ley 25/1990 del 20 de diciembre (14) y el RD 1090/2015 del 24 de diciembre (15), a través de los cuales se establecen los requisitos para la utilización de medicamentos en ensayos clínicos.

MEDICAMENTOS DE TERAPIA CELULAR

Los medicamentos de terapia celular son aquellos medicamentos cuyo principio activo son células viables modificadas sustancialmente o cualquier derivado de ellas (3). Una modificación sustancial de las células consiste en aplicar procesos biológicos, físicos y químicos que permiten el cambio de sus propiedades biológicas o fisiológicas (4,5). De acuerdo a la regulación europea, algunos ejemplos de estas manipulaciones son expansión del cultivo, diferenciación de células madre o modificaciones genéticas. Todos aquellos procesos que no alteren las propiedades biológicas y fisiológicas no se consideran sustanciales y por ende, no podrá considerarse medicamento a dicho producto. Estas manipulaciones están detalladas en el Anexo I del Reglamento (CE) N.º 1394/2007 (4). A través de este marco regulatorio, se permite que las terapias basadas en trasplantes no entren dentro de la clasificación como medicamentos y así facilitar su uso como terapias de medicina regenerativa.

El objetivo principal de un CTMP consiste en la reparación o sustitución de tejidos dañados que el propio organismo no es capaz de regenerar por sí mismo. En ocasiones, las células empleadas poseen funcionalidades más allá de la renovación y la sustitución que pueden resultar en una mejora de la eficacia del tratamiento. Un ejemplo de este mecanismo son las propiedades inmunomoduladoras que poseen las células madre mesenquimales empleadas en terapia celular (16). Las células empleadas en estos medicamentos pueden derivar del propio paciente (uso autólogo) o provenir de un donante diferente (uso alogénico), siempre que sea inmunológicamente compatible con el paciente o cuyas células no generen una respuesta inmune en el organismo. Una vez administrado el CTMP, las células pueden o bien reparar un tejido dañado o bien inducir la reparación del tejido mediante la liberación de factores tróficos que la reparación del tejido requiere. El CTMP puede poseer la presentación que se desee. En ocasiones el tejido en el que se administra el medicamento no tiene por qué ser el lugar donde se ha producido el daño pues muchas células empleadas en terapia celular poseen propiedades migratorias que pueden ser aprovechadas (17).

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN TERAPIA CELULAR

Las células madre siempre han sido una excelente diana como posible principio activo de los CTMPs debido a sus propiedades de autorrenovación y diferenciación (18,19). Estas células tienen la capacidad de autorrenovarse siempre y cuando el medio en el que vivan esté libre de factores que induzcan la diferenciación, lo que permite a los fabricantes generar grandes cultivos de estas células para su uso en terapia celular. Ante determinados estímulos, las células madre son capaces de cambiar su fenotipo y diferenciarse a una determinada célula somática que realice una función concreta en el organismo, característica que se puede aprovechar en el tratamiento de patologías que generen un daño tisular (20).

Las células madre mesenquimales (MSC) son células pluripotentes con capacidad de autorrenovación presentes en diferentes etapas del desarrollo embrionario, en el cordón umbilical y en el individuo adulto (21). Además, es posible aislarlas de una gran cantidad de tejidos como la médula osea, el tejido adiposo, pólipos endometriales y sangre menstrual (22,23).

Para la caracterización de las MSC, la Sociedad Internacional de Terapia Celular definió un patrón para poder establecer si una célula se considera mesenquimal o no. Esta caracterización establece que las MSC (24,25):

- Deben ser positivas para los marcadores de superficie CD90, CD73, CD166 y CD105.
- Deben ser negativas para los marcadores CD14 (proteína muy presente en macrófagos y células de la inmunidad innata), CD34 (característico del tejido hematopoyético y vascular), CD45 (proteína muy expresada en linfocitos) y HLA-DR.
- Son células capaces de adherirse a las placas de cultivo.
- Son células pluripotentes, es decir, son células capaces de diferenciarse a células de las tres capas germinales: osteocitos, adipocitos, condrocitos, células musculares, neuronas, células de los islotes pancreáticos y a hepatocitos (26,27).

Además de esta alta pluripotencia, las MSC son células con una capacidad inmunomoduladora extraordinaria (28). Esta propiedad les permite modificar la respuesta inmunológica en función del microambiente en el que se encuentren mediante la activación o supresión de la función de los linfocitos T y B y las células NK (29,30). Este efecto inmunológico es especialmente interesante en situaciones de reparación de tejidos pues permite estimular y modular la respuesta del propio organismo ante la falta de función tisular, participando no solo en el recambio de células diferenciadas si no en la estimulación de una respuesta natural del organismo. Aunque aún no se conocen plenamente los mecanismos de acción inmunes de estas células y la función fisiológica de esta capacidad, se considera una excelente oportunidad para el desarrollo de CTMP. En esta misma línea, las MSC, al poseer un HLA muy poco desarrollado son células con una inmunogenicidad muy baja, ideales para tratamientos alogénicos, ya que no se necesitaría someter al paciente a un proceso de inmunosupresión.

Deficiencia de células madre limbares

Las MSC poseen un alto potencial terapéutico debido a todas las características previamente mostradas. Como consecuencia de esto, en los últimos años se han registrado cientos de ensayos clínicos que involucran a estas células en nuevas estrategias de terapia celular. Un ejemplo del aprovechamiento de las excelentes características terapéuticas de las MSC como producto de terapia avanzada es el tratamiento de la deficiencia de células madre libares.

Las células madre limbares (CML) son células madre adultas capaces de diferenciarse a células del epitelio corneal. Están localizadas en el limbo esclerocorneal, una franja comprendida entre la córnea y la conjuntiva del globo ocular (32). Estas células poseen una doble función: la renovación de las células epiteliales de la córnea y el establecimiento de una barrera que mantenga la homeostasis entre la córnea y la esclera (33). La renovación de células epiteliales es esencial para el mantenimiento de las propiedades de transparencia y estabilidad de la córnea y la función barrera permite que la esclera no invada la córnea manteniendo el equilibrio entre ambos tejidos (34).

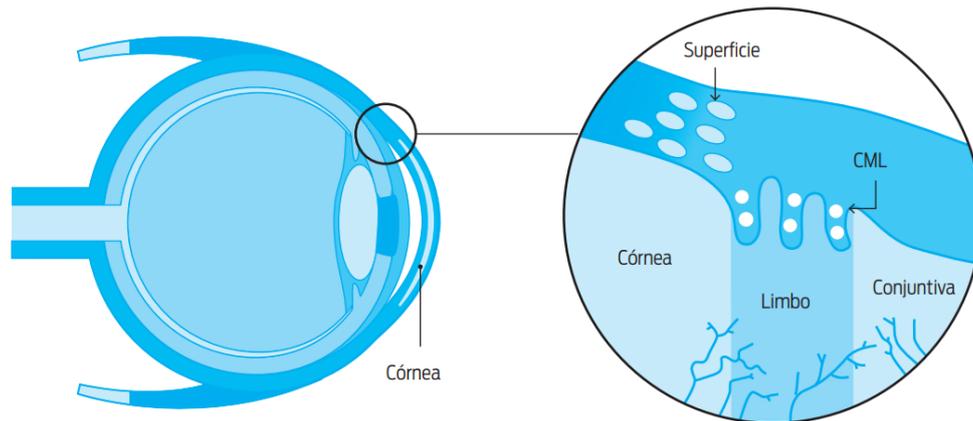


Figura 1. Esquema y localización de los diferentes tejidos que forman la córnea (31).

La deficiencia de células madre limbares (DCML) se trata de una patología poco común en la que se produce un daño directo en las CML o un daño en el microambiente de esta población celular (35). En esta situación, las CML no son capaces de regenerar el epitelio corneal y se produce una situación de inestabilidad en la superficie del globo ocular. Como consecuencia de esta situación aparece una conjuntivitis en la que la esclera invade la córnea, generando un tejido opaco que impide totalmente la visión (34). Otros síntomas de esta enfermedad son lagrimeo excesivo, dolor ocular, fotosensibilidad, contracción anómala de los músculos del párpado, problemas de visión e inflamación del tejido ocular (35,36).

Existen multitud de factores que causan DCML como quemaduras químicas o físicas, factores genéticos, enfermedades degenerativas (37), el uso de lentillas (38), enfermedades inflamatorias como el síndrome de Stevens-Johnson (39) o altas dosis de quimioterapia sistémica como la hidroxiurea (40).

Actualmente, existen numerosos tratamientos para la DCML, sin embargo, los tratamientos más eficaces son el trasplante de tejido limbal autólogo y alogénico y el trasplante de células epiteliales corneales cultivadas (41). Por otra parte, la literatura científica también muestra la capacidad de las células madre mesenquimales de contribuir a la recuperación del tejido epitelial bronquial y alveolar (32), el epitelio glomerular y tubular (33) y el epitelio pigmentario retinal (34). Por tanto, el uso de las células MSC se postula como una alternativa en el tratamiento de esta patología.

Este potencial reparador del tejido epitelial ha servido de base para la creación de estudios de regeneración corneal empleando MSC en animales (35). Los estudios han mostrado una buena respuesta de la córnea a terapias celulares basadas en MSC, lo que permite suponer que el empleo de mesenquimales como terapia para la DCML en humanos es una opción factible para el tratamiento de la patología. Esta hipótesis se corrobora con los datos obtenidos en el ensayo clínico promovido por el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (36), utilizando MSC como alternativa a los trasplantes convencionales empleados para el tratamiento de DCML. Su éxito supone una nueva perspectiva en el tratamiento más rápida y barata.

Desde un punto de vista técnico, la obtención de MSC es un proceso relativamente sencillo gracias a la presencia de estas células en una gran cantidad de tejidos. Además,

actualmente existen numerosas áreas de producción especializadas en el uso de estas células, por lo que su obtención y utilización es un proceso altamente estudiado.

DEL LABORATORIO AL PACIENTE

Todo medicamento de terapia avanzada tiene su origen en una investigación básica de un laboratorio de terapias avanzadas. Cuando dichos resultados académicos se transforman en una idea que se puede establecer como un potencial medicamento o terapia, comienza el proceso de desarrollo de un ATMP.

El sistema parte de una investigación preclínica, en la que el objetivo fundamental será evaluar la toxicidad y la actividad biológica del medicamento. Esta evaluación deberá seguir las buenas prácticas de laboratorio (BPL) establecidas por la legislación española mediante la Ley N° 14/2007 de investigación biomédica y la Directiva N° 2004/10/CE del Parlamento Europeo. Las BPL permiten garantizar unos resultados de calidad que establezcan una base adecuada para poder continuar con el proceso de diseño y fabricación del ATMP. Con el fin de satisfacer los objetivos de esta fase preclínica se desarrollarán modelos in vitro basados en cultivos celulares y sistemas acelulares y modelos in vivo, generalmente consistentes en modelos animales.

Una vez se ha culminado la fase preclínica con resultados que garanticen la no toxicidad y el control sobre la actividad biológica del medicamento, comienza la fase conocida como ensayo clínico (EC), en la que se evalúa el uso del ATMP en seres humanos.

Un ensayo clínico es un proceso de investigación experimental en el que se analiza la seguridad y eficacia de un nuevo producto, terapia o técnica sanitaria para el tratamiento de una patología. En un ensayo clínico de un medicamento de terapia avanzada participan tres grandes entidades:

- Laboratorio fabricante de terapias avanzadas. Es responsable del proceso de producción y control de calidad del ATMP. Todo este proceso incluye la recepción de muestras biológica, pruebas de control de calidad en el proceso y en el producto final y la liberación del medicamento.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Son responsables de proporcionar asesoramiento científico, evaluar el sistema de producción y fabricación, autorizar el ensayo clínico y establecer el uso del medicamento.
- Centro aplicador. Son centros sanitarios responsables de la aplicación del ATMP a los pacientes. En estos centros habrá comités éticos que evalúen las condiciones del EC. Todo centro aplicador deberá seguir los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) en los que se fijan los protocolos para poder aplicar correctamente el producto.

Los ensayos clínicos en España están regulados bajo el Real Decreto 223/2004. Dicha legislación permite disponer de las bases legales sobre las cuales se ha de regir el diseño y desarrollo de un EC con seres humanos para garantizar la protección y seguridad de los pacientes que forman parte del proceso. Además, se establecen los protocolos administrativos para la autorización de los EC por parte de la Administración General del Estado a través de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

El proceso de preparación de un EC es la etapa en la que se establecen los protocolos que se van a seguir durante el proceso posterior. Los protocolos de un EC deben

exponer toda la información de la que se disponga y que sea relevante a la hora de evaluar el proceso. Los protocolos deben contener una introducción que muestre el fundamento del estudio, el diseño y la fabricación del tratamiento, la población del estudio, una descripción precisa del tratamiento aplicado, una evaluación del EC, un análisis de la eficacia y de los efectos adversos y finalmente una descripción de todos los aspectos técnicos y prácticos del ensayo. Dichos protocolos permiten que el proceso de fabricación del ATMP sea homogéneo, reproducible y estable. Además, mediante el establecimiento de un protocolo de trabajo adecuado se permite que todas las condiciones experimentales del estudio sean conocidas y controladas. El diseño de los protocolos culmina con la formalización de un Producto en Fase de Investigación Clínica (PEI) que la AEMPS deberá autorizar para su uso en el ámbito de un Ensayo Clínico en humanos. Son productos empleados para una afección concreta y no estarán sujetos a comercialización.

Una vez se le proporciona a la AEMPS toda la información necesaria para la autorización del EC, la agencia dispone de un plazo legal de 180 días para emitir una respuesta. Si se obtiene la autorización, dará comienzo el ensayo clínico. El EC consta de cuatro fases fundamentales, aunque puede concluir al terminar cualquiera de ellas. La fase I permite analizar si el nuevo tratamiento es seguro y en ocasiones optimizar el modo de administración de la terapia mediante su aplicación a un pequeño número de pacientes. La fase II del estudio permite investigar si la patología responde al tratamiento y, normalmente, se incluye también un bajo número de pacientes. El objetivo de la fase III consiste en comparar la eficacia de la nueva terapia frente a tratamientos ya estandarizados con un número más elevado de pacientes. Y finalmente, en la fase IV se pretende profundizar en los datos de eficacia y buscar posibles efectos adversos de la terapia. Para ello se le aplicará el tratamiento a un número más elevado de pacientes y se compararán los resultados con pacientes a los que se les administra una terapia ya establecida mediante un sistema doble ciego. Todas las etapas del proceso contienen una fase posterior de farmacovigilancia en la que se estudia de manera minuciosa los efectos de la nueva terapia en el organismo de los pacientes para garantizar la seguridad de estos.

En el caso de ensayos clínicos con nuevos medicamentos, y en especial medicamentos de terapia avanzada, la fabricación del medicamento ha de seguir las normas de correcta fabricación (Good Manufacturing Practice, GMP). Las GMP son unas directrices que permiten garantizar que los medicamentos y productos sanitarios se fabriquen bajo estrictos estándares de calidad. Estas normas establecen por tanto las condiciones y requerimientos mínimos para que la fabricación sea uniforme y controlada y que los procesos que rigen esta fabricación sean homogéneos, robustos y reproducibles. En la UE estas directrices están establecidas bajo la Guía de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario de la Unión Europea (37), y contienen un apartado específico para Medicamentos de Terapia Avanzada. Esta guía establece las directrices mínimas en el proceso de fabricación en torno a nueve grandes grupos: sistema de calidad farmacéutico; personal; locales y equipos; documentación; producción; control de calidad; actividades subcontratadas; reclamaciones, defectos de calidad y retiradas de productos y, finalmente, autoinspección. Es importante destacar que las GMP no proporcionan ni una metodología ni un protocolo de trabajo, esencialmente establecen las condiciones adecuadas para que el fabricante, mediante el sistema que decida emplear, proporcione un producto sanitario que satisfaga las condiciones y estándares de calidad que se requieren para su uso clínico. Por tanto, las GMP se han de considerar como la arquitectura fundamental del sistema de fabricación

de un ATMP y todo aquel proceso que esté involucrado en la fabricación ha de adecuarse estrictamente a estas normas de fabricación.

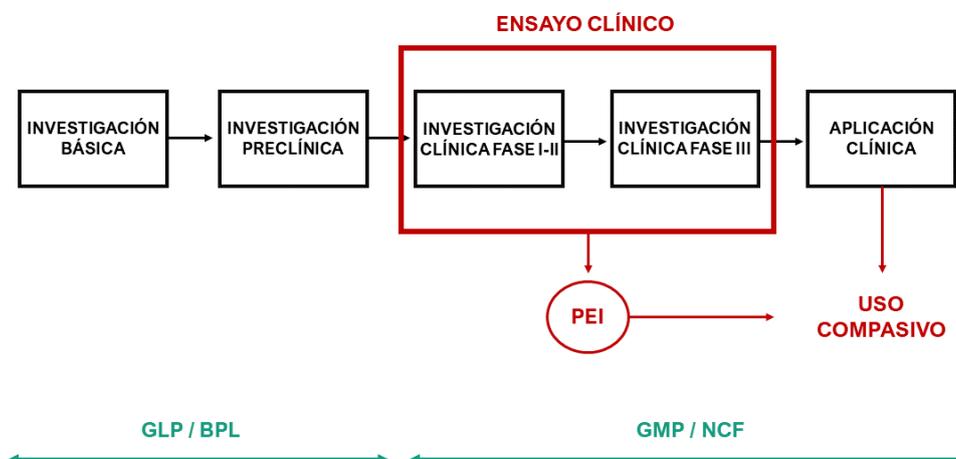


Figura 2. Esquema del proceso de investigación de un medicamento en el marco regulatorio español.

Sala blanca

Uno de los objetivos fundamentales a la hora de fabricar un medicamento de terapia celular es la ausencia absoluta de cualquier contaminante en el producto final. Para garantizar la esterilidad del medicamento, el fabricante debe establecer equipos y protocolos que faciliten la ausencia de cualquier microorganismo o contaminante basándose en todo momento en las normas GMP. Un elemento esencial en la fabricación de estos medicamentos es la sala blanca.

Una sala blanca o sala GMP es una estancia diseñada para mantener bajos niveles de contaminación en todo momento y controlar de manera estricta los parámetros ambientales. Estas salas contienen todos los equipos, productos y materiales que se emplean en la fabricación de un ATMP y mantener así la esterilidad del proceso en todo momento. Las salas blancas deben estar validadas y acreditadas por la AEMPS y deben garantizar el cumplimiento de las normas GMP. Además de minimizar los riesgos de contaminación, una sala blanca debe facilitar la validación de los procesos y facilitar la limpieza. La entrada de aire a la sala blanca debe estar controlada mediante un sistema de filtros y presiones con el fin de establecer un flujo de aire laminar limpio cuya dirección sea en todo momento hacia el exterior. La sala debe estar compartimentada en espacios cerrados que se clasifican en grados A, B, C y D en función del número de partículas viables y no viables presentes en el aire. El compartimento de grado A será el espacio con un número mínimo de partículas.

El personal técnico que trabaje en la sala blanca deberá portar una vestimenta que retenga todas las partículas que emite un organismo vivo. Además, requerirá de una

formación especializada y avanzada que le permita garantizar el cumplimiento de las normas y la metodología de trabajo en la sala blanca.

El Instituto de Biología y Genética Molecular posee dos salas blancas. Una de ellas está ubicada en el edificio Benito Herreros y la otra en el parque científico de la Universidad de Valladolid. Los medicamentos de terapia celular fabricados por la spin-off Citospin son elaborados mayoritariamente en la sala blanca del parque científico. Esta sala posee dos vestuarios (zona D y C), dos áreas de producción (zona B) y un área de envasado (zona B).

OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster es el diseño y desarrollo de un medicamento de terapia avanzada de uso oftalmológico. Para llevar a cabo este objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar un medicamento de terapia celular para el tratamiento de la DCML. El principio activo de este medicamento serán células madre mesenquimales cultivadas sobre un injerto biológico (membrana amniótica humana) para su posterior aplicación y sutura en el tejido corneal. Además del diseño, se llevará a cabo el proceso de fabricación del medicamento.
2. Como continuación del proceso anterior, se llevará a cabo la traslación del producto desarrollado en el laboratorio de investigación biomédica al entorno de una unidad de producción celular. Para ello se realizarán:
 - a. Un dossier de fabricación del producto validado.
 - b. Pruebas de estabilidad del medicamento por un tiempo de 72 horas en distintos acondicionamientos. Los acondicionamientos empleados serán:
 - i. DMEM + GlutaMAX enriquecido con 20% de FBS y 1% de Gentamicina.
 - ii. HypoThermosol®.
 - iii. Ringer Lactato enriquecido con Glucosa (3 mg/ml al 33%) 5mM.Como hipótesis de trabajo se supondrá que los tres acondicionamientos mantienen el producto igual de estable durante 72 horas. Es decir, las propiedades del producto elaborado se mantienen incorruptas en un 90% en los distintos acondicionamientos empleados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los equipos empleados en este proyecto han sido cedidos por el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid y Citospin. Todos los procesos y protocolos se han realizado en el cuarto de cultivos de la segunda planta del IBGM y en el área de investigación de Citospin.

Reactivos y soportes

Nombre	Casa comercial	Referencia
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco	31966-021
PBS pH 7.2 (1X)	Gibco	20012-019

0.05% Trypsin-EDTA (1X)	Gibco	25300-062
Gentamicin (10 mg/ml)	Gibco	15710-049
Kit de diferenciación de osteogénesis StemPro™	Gibco	A1007201
Kit de diferenciación de condrogénesis StemPro™	Gibco	A1007101
Kit de diferenciación de adipogénesis StemPro™	Gibco	A1007001
175 cm ² Cell Culture Flask	Corning	431466
Cell culture dish 35mm x 10 mm Style	Corning	430165
Multiwell 6 wells	Corning	353046
Hoechst	Molecular Probes	33342
MINI67-1KT (PKH67)	SIGMA	086K1853
Suero Bovino Fetal (SFB)	Gibco	10099141
Ficoll-Paque™ PREMIUM	Cytiva	17-5442-03
Glucosa 30%	B. Braun	606360
Aspiroserum Ringer-LACTATO	Fresenius Kabi	614677
Hypothermosol®	BioLife Solutions	101102

Células madre mesenquimales (MSC).

Las células madre mesenquimales humanas empleadas en este trabajo han sido obtenidas de un aspirado de médula ósea (MO). Las médulas óseas han sido donadas a la Unidad de Producción Celular (UPC) de Cytospin para su uso en terapia celular.

Obtención de células madre mesenquimales:

La médula ósea (MO) es un tejido formado por células sanguíneas, células hematopoyéticas, adipocitos y células madre mesenquimales del estroma. Estas últimas forman en torno al 0.01% y el 0.001% de la composición celular del tejido medular (38). Para su obtención y aislamiento se parte de 30 ml de MO diluida en PBS (dilución 1:2). En un tubo cónico de 50 ml se añade una capa de Ficoll de 20 ml. Sobre esta capa de Ficoll se deja caer gota a gota la dilución de MO con cuidado para que el tejido medular no penetre sobre el Ficoll y que consiga mantenerse sobre la superficie formando una bicapa. Se centrifuga la muestra a 1400 rpm durante 30 minutos sin acelerador ni freno. Una vez centrifugado, se habrá separado en diferentes capas los diferentes componentes celulares de la MO debido a un gradiente de densidades. Con una pipeta se extrae la capa de células mononucleadas (Figura 3). Se centrifuga la suspensión celular a 1400 rpm durante 10 minutos y se deshecha el sobrenadante. Se añaden 5 ml de medio DMEM +GlutaMAX enriquecido con 20% de FBS y 1% de Gentamicina y se realiza un conteo de células mononucleadas mediante hemocitómetro. Se siembran 1.75×10^5 células / cm² en un flask de 175 cm² y se introduce en el incubador al 10% de CO₂. A las 24 - 48 horas, las MSC se habrán adherido al flask y comenzarán a formar nichos clonogénicos y el resto de componentes celulares se desecharán en el medio de cultivo. De esta forma habremos obtenido un cultivo de células madre mesenquimales.

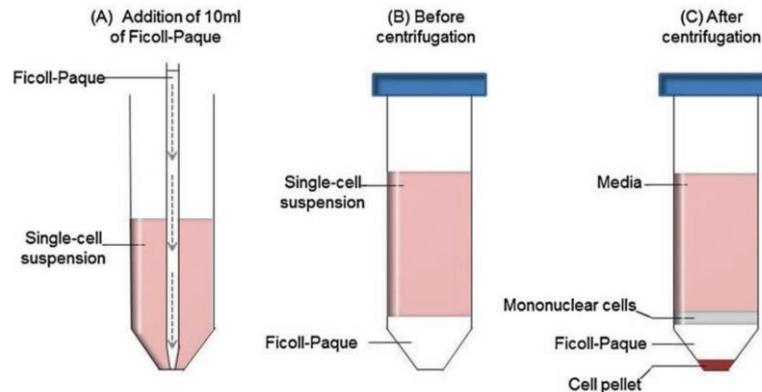


Figura 3. Gradiente de densidades por Ficoll. Las células madre mesenquimales se localizan en la capa de células mononucleadas (39).

Mantenimiento del cultivo celular:

El cultivo de MSC se mantiene en el incubador a 37°C y con una concentración ambiental de CO₂ al 10%. Para su crecimiento y expansión se emplean flask de 175 cm² con 50 ml de medio DMEM + GlutaMAX enriquecido con 20% de FBS y 1% de Gentamicina y se recambia dicho medio 3 veces por semana. Cuando las células alcanzan un 80% de confluencia, se levantan del flask mediante tripsinización. Para ello, se retira completamente el medio de cultivo y se lava el flask con 15 ml de PBS. Se retira el PBS y se añaden 15 ml de Tripsina-EDTA. Se introduce en el incubador durante 8 minutos. Tras los 8 minutos, las MSC se habrán despegado del poliestireno. Se añaden 15 ml de medio de cultivo (con FBS) para neutralizar la tripsina. Se retira la suspensión celular y se vierte en un tubo cónico. Se centrifuga durante 10 minutos a 1400 rpm. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en un volumen conocido. Se realiza un conteo celular mediante hemocitómetro y se siembra en un nuevo flask con una concentración de 10³ células / cm² (1.75 x 10⁵ células en un flask de 175 cm²).

Caracterización de las células madre mesenquimales:

Para la caracterización de las MSC se seguirán los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Para ello, se realizarán dos ensayos de caracterización: citometría de flujo y capacidad de diferenciación a osteocitos, adipocitos y condrocitos.

- Citometría de flujo.

Se tiñe una suspensión de MSC (10⁶ células / ml) con anticuerpos anti-CD14, anti-CD45 y anti-CD106 humanos conjugados con FITC, anticuerpos anti-CD34 y anti-CD90 humanos conjugados con PE-Cy5 y anticuerpos anti-CD73, anti-CD166 y anti-HLA-DR humanos conjugados con PE de acuerdo a las concentraciones establecidas en el kit de inmunotinción. Se realizó un análisis de citometría de flujo mediante un citómetro Guava easyCyte de la marca Luminex, cedido para su uso en investigación por Citospin. Para cada marcador e isotipo se adquirieron 2000 eventos. Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el software de análisis Kaluza.

- Diferenciación celular.

Para comprobar la capacidad de las MSC para diferenciarse a osteocitos, adipocitos y condrocitos se sembraron 20000 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. En tres de los pocillos se añade 2 ml de medio DMEM + GlutaMAX enriquecido con 20% de FBS y 1% de Gentamicina (controles). En cada uno de los otros 3 pocillos se añaden 2 ml de medios de diferenciación de la marca Gibco. Se recambia el medio de la placa 3 veces por semana durante al menos 2 semanas. Pasado este tiempo, los adipocitos se tiñen con Oil Red y los condrocitos con Alcian Blue de acuerdo a los protocolos de cada kit de tinción.

Fabricación del medicamento de terapia celular MSV-MA

Soporte biológico (MA)

Las membranas amnióticas humanas se emplean en este proyecto como un soporte estructural para el crecimiento de las MSC. La MA está formada por 5 capas: una capa esponjosa, una capa fibroblástica, una capa compacta, una membrana basal y un epitelio (40). Para su uso en terapia celular se ha de tratar la membrana para eliminar el componente celular epitelial y que el único principio activo del medicamento sean las células MSC.

Todas las MA de este proyecto se han obtenido del Centro de Hemoterapia de Castilla y León. La MA se recibe cortada en parches, con un tamaño de parche igual o superior a 3x3 cm² y congelada a -80°C en una solución criopreservadora. Su descongelación se realiza a 37°C en el incubador o a temperatura ambiente.

La MA posee un papel de nitrocelulosa pegado a la cara no epitelial. El papel de nitrocelulosa no se pega si el epitelio está presente y esta característica permite diferenciar la cara epitelial de la cara no epitelial. En caso de no presentar papel de nitrocelulosa, para identificar la presencia o no del epitelio se emplea una hemosteta. En caso de no adherirse a la membrana, la cara epitelial estará presente.

Preparación de la membrana amniótica para el cultivo de MSC.

Se coloca la membrana amniótica sobre una placa de cultivo grande con una gota de PBS para facilitar el tratamiento. Con ayuda de unos scrappers, se estira la membrana sobre la superficie. Se lava con 5 ml de PBS al menos 3 veces para eliminar la solución criopreservadora. Para ello se vierte el PBS sobre la MA con una pipeta pasteur y se retira cuidadosamente. Una vez lavada la MA, se procede a eliminar el papel de nitrocelulosa que contiene. En este proceso es fundamental mantener siempre la orientación de la MA para asegurar que la cara epitelial se encuentre en la parte superior. Para retirar el papel, se despega con ayuda de los scrappers la membrana del papel. Una vez despegada, se sujeta la membrana con un scrapper sobre la placa de cultivo y con ayuda de una pinza se tira del papel. De esta manera se puede retirar el papel deslizándolo bajo la membrana manteniendo la membrana con la orientación adecuada. Una vez se ha retirado el papel, se estira la MA al máximo sobre la placa de cultivo. Se retira todo el PBS sobrante con la pipeta pasteur y se añaden 10 ml de tripsina-EDTA al 0.05% sobre la MA. Se incuba a temperatura ambiente durante 4 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se retira la tripsina y con ayuda de los scrappers se desepiteliza la MA. Para ello, con uno de los scrappers se sujeta la membrana de un extremo y con el otro se frota la membrana con cuidado para no realizar rotos. Se repite este proceso por toda la superficie del parche de membrana. Se

lava la MA con 10 ml de PBS 3 veces. Cuando la MA está limpia y sin restos de Tripsina, se estira todo lo posible sobre la superficie de la placa.

Se cortará la MA con ayuda de un bisturí en parches de membrana de unos 3x3 cm² (únicamente en caso de que sea necesario). Con ayuda de dos pinzas, se agarra cada parche de dos de sus extremos y se traspasa a una placa de cultivo de 35 mm², manteniendo siempre la orientación. En la placa se estira completamente con precaución de que no queden pliegues ni burbujas. En el caso de que el parche de membrana sea más grande que el diámetro de la placa, los extremos se levantarán sobre los bordes de la placa de cultivo. Si es necesario añadir 1 gota de PBS para facilitar el estiramiento. Cuando el parche esté completamente extendido sobre la placa, se dejará secar en el incubador a 37° y 10% de CO₂ durante al menos 24 horas y como máximo 1 semana. Este proceso de secado permite garantizar la muerte celular de los posibles restos de epitelio presentes en la MA.

Principio activo (MSC)

Siembra de las células madre mesenquimales sobre la membrana amniótica.

Una vez secada la MA, se procederá a la siembra de las MSC sobre la membrana. Para ello, se añaden 2 ml de medio de cultivo DMEM + GlutaMAX enriquecido con 20% de FBS y 1% de Gentamicina a la placa con la MA. Se sembrarán 2.5 x 10⁵ MSCs vertiendo la suspensión celular sobre la MA.

Mantenimiento del cultivo.

El cultivo celular sobre la MA se mantiene en el incubador a 37° y 10% de CO₂ durante 72 horas. Pasadas las 72 horas, se elimina el medio de cultivo y se añade el medio de acondicionamiento. Una vez transcurrido este proceso, el medicamento de terapia celular fabricado estará listo para su liberación y aplicación. De ahora en adelante se llamará al medicamento MSV-MA.

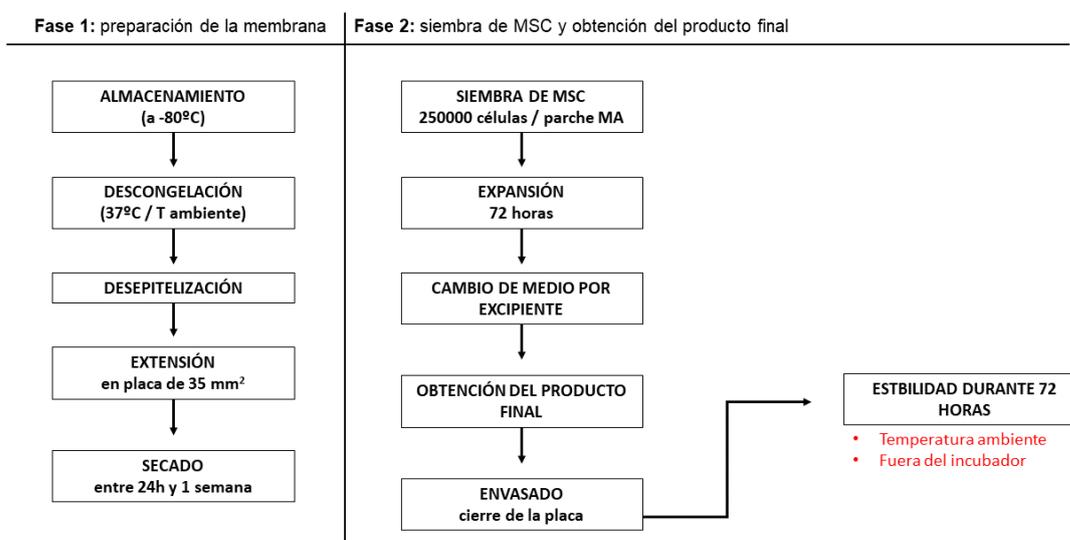


Figura 4. Esquema general del proceso de fabricación de MSV-MA

Tinción de MSV-MA con Yoduro de Propidio y Hoescht y análisis de la viabilidad celular

Para el análisis de la viabilidad de las células madre mesenquimales sobre la MA se realiza una doble tinción de Yoduro de Propidio (IP) y Hoescht. El Hoescht es un fluoróforo que puede penetrar las membranas celulares y que se intercala en el DNA, por lo que se emplea para la tinción de células viables y no viables. El pico de excitación se encuentra a 350 nm de longitud de onda y el de emisión a 461 nm. El Yoduro de Propidio también es un fluoróforo que se intercala en el DNA, pero no puede penetrar las membranas celulares. Por esto, se emplea para la tinción de los núcleos de células no viables (células cuya membrana está dañada). Este colorante posee un pico de excitación a 535 nm y uno de emisión a 617 nm.

Se preparan dos disoluciones de trabajo:

- Yoduro de Propidio: 1 mg/ml en PBS 1X.
- Hoescht: 2 mg/ml en DMSO.

Para la tinción de MSV-MA, se añade en un eppendorf 1 ml de PBS y se añaden 15 μ l de disolución de trabajo de IP y 5 μ l de disolución de trabajo de Hoescht. Se voltea el eppendorf para homogeneizar la disolución. Se retira el medio de MSV-MA y se añade la disolución de tinción a la placa. Se incuba durante 10 minutos previos al análisis. Tras los 10 minutos, se retira la disolución de tinción y se añade 1 ml de PBS. Se recomienda realizar la tinción justo antes de analizar la muestra porque el IP y el DMSO son altamente tóxico para las células.

Análisis de la viabilidad por microscopía confocal

Para el análisis de la viabilidad celular se toman imágenes aleatorizadas de MSV-MA con la doble tinción de IP y Hoescht con el microscopio confocal del servicio de microscopía del IBGM. Se tomaron 3 imágenes de cada campo con un aumento 20X, una de ellas excitando a 350 nm y otra a 535 nm para observar la emisión de ambos fluoróforos seguidas de una imagen de transmisión de luz. Se analizaron 10 campos de cada placa.

Para el análisis de imagen se utilizó el software de análisis de imagen ImageJ. Este software permite el conteo de núcleos de cada campo mediante una binarización de la imagen de fluorescencia. De estos datos se extrajo el dato de viabilidad, la cantidad de células / cm^2 y la cantidad total de células tras el cultivo en cada placa (conociendo la superficie total de la placa y teniendo en cuenta que la MA recubre la placa entera).

Tinción con PKH67

El PKH67 es un fluoróforo que tiñe con colas alifáticas largas los componentes lipídicos de la membrana celular. Este colorante posee un máximo de excitación a 490 nm y un máximo de emisión a 502 nm. Para la tinción, se ha utilizado un kit comercial de tinción de la casa comercial SIGMA y se siguió el protocolo de tinción del que dispone el kit.

5. RESULTADOS

Obtención y aislamiento de células madre mesenquimales

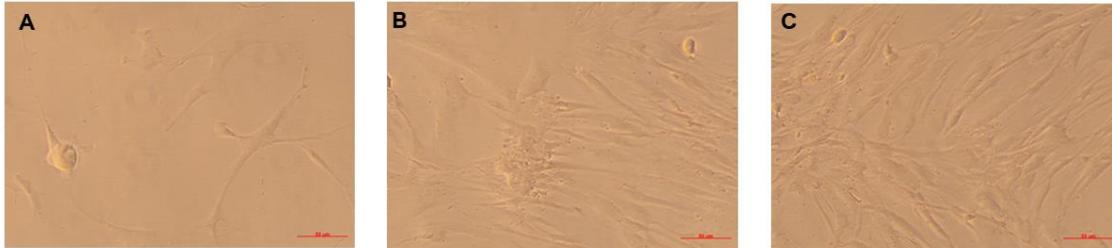


Figura 5. A. Células con morfología fibroblástica adheridas al poliestireno del flask obtenidas a partir de la capa de células mononucleadas de una muestra de médula ósea. B. Nicho clonogénico de estas células. C. Cultivo al alcanzarse un 80% de confluencia.

A partir de una muestra de tejido de médula ósea donado, se realizó un gradiente de densidades con Ficoll para el aislamiento de las células mononucleadas de la MO. Se aisló la capa de células mononucleadas y se cultivó la muestra de estas células. Se obtuvieron nichos clonogénicos (Figura 5.B) de células con una morfología similar a las células madre mesenquimales (Figura 5.A) adheridas al poliestireno del flask y el resto de células se desecharon con el medio. Dichas células adherentes se mantuvieron en cultivo hasta que se alcanzó una confluencia de aproximadamente el 80% (Figura 5.C).

Análisis fenotípico mediante citometría de flujo

Se realizó un análisis del fenotipo por citometría de flujo de las células adherentes obtenidas de la muestra de MO para comprobar que dicho fenotipo es compatible con el de una célula madre mesenquimal (según la Sociedad Internacional de Terapia

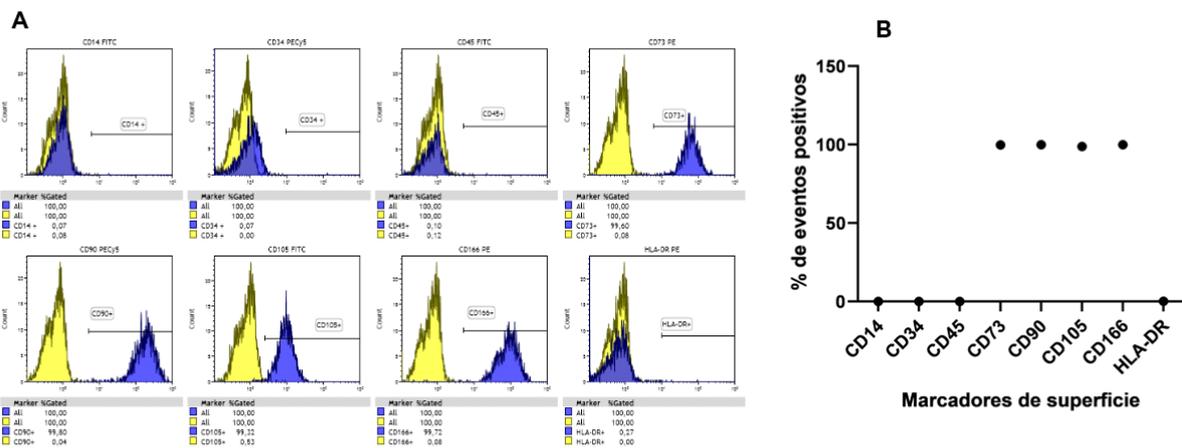


Figura 6. A. Análisis de citometría de flujo para células adherentes obtenidas de las células mononucleadas de una muestra de médula ósea. Los histogramas muestran los niveles de expresión para diferentes marcadores de superficie de la población seleccionada. B. Porcentaje de eventos positivos para cada marcador (n=6).

Celular). Se seleccionó una población homogénea de células en cuanto a tamaño y complejidad y las células de esa población mostraron una expresión superior al 98% ($p < 0.05$) para los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD166 (Figura 6). Además, mostraron una expresión inferior al 0.2% ($p < 0.05$) para los marcadores CD14, CD34, CD45 y HLA-DR (Figura 5). Este fenotipo es compatible con el establecido para las MSC.

Osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis

Una vez comprobado que las células aisladas y cultivadas son compatibles fenotípicamente con MSC, vamos a analizar la capacidad de diferenciación de estas células a adipocitos, condrocitos y osteocitos. Se emplean medios de diferenciación para los tres tipos celulares y se mantiene el cultivo durante 3 semanas renovando el medio cada 72 horas. A la semana del cultivo se empiezan a observar diferencias morfológicas en las células en los tres pocillos de diferenciación en comparación con las células control (Figura 7.G y 7.H).

En la adipogénesis (Figuras 7.A y 7.B), tras 1 semana de cultivo, se observan células que adquieren una morfología redondeada en las que aparecen inclusiones citoplasmáticas de grasa. En la condrogénesis (Figuras 7.C y 7.D), tras 1 semana de cultivo, se observan estructuras circulares formadas por células que se agrupan generando un espacio intercelular. Estas tétradas se denominan grupos isogénicos que posteriormente formarán el tejido cartilaginoso. En la osteogénesis (Figuras 7.E y 7.F) se observan depósitos extracelulares formando una matriz mineralizada. Las células de este cultivo quedan rotas o atrapadas bajo esta matriz. Esta matriz es la precursora de la posterior matriz osteoide formada por calcio y otros minerales.

Tras la tinción del cultivo de adipogénesis con OilRed podemos observar células en cuyos citoplasmas hay inclusiones que se tiñen con el colorante (Figura 8. A - D). OilRed es un lisocromo utilizado para teñir triglicéridos y lípidos, por lo que se deduce que dichas inclusiones poseen naturaleza lipídica y, por tanto, las células han sido capaces

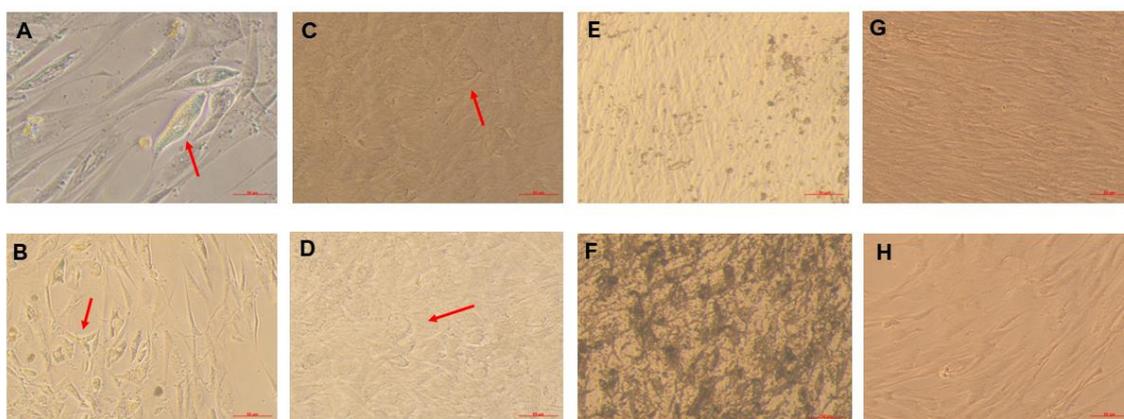


Figura 7. A y B. Imagen obtenida mediante microscopio óptico de células en medio de adipogénesis a los 20 días de la siembra. En las flechas se marcan las células con depósitos de grasa en el citoplasma. C y D. Imagen obtenida mediante microscopio óptico de células en medio de condrogénesis a los 20 días de la siembra. En las flechas se marcan los condrocitos agrupados formando tétradas. E y F. Imagen obtenida mediante microscopio óptico de células en medio de osteogénesis a los 20 días de la siembra. Se observan los depósitos de calcio. G y H. Células control tratadas con medio DMEM + GlutaMAX (20% FBS + 1% Gentamicina).

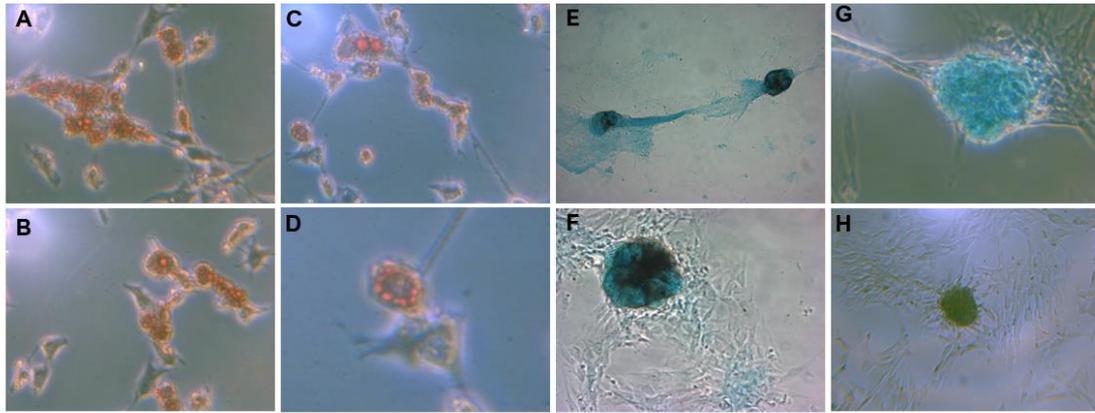


Figura 8. A - D. Imagen obtenida mediante microscopio óptico de células en medio de adipogénesis a los 10 días de la siembra teñidas con el colorante OilRed. En rojo se observan las acumulaciones lipídicas del citoplasma. E - H. Imagen obtenida mediante microscopio óptico de células en medio de condrogénesis a los 10 días de la siembra teñidas con el colorante Alcian Blue. En azul se observan los glucosaminoglicanos propios del tejido cartilaginoso teñidos con el colorante.

de diferenciarse a adipocitos. Por otra parte, en la tinción del cultivo con Alcian Blue se observan agrupaciones celulares cuyo espacio intercelular se tiñe con el colorante (Figuras 8. E - H). Alcian Blue se emplea para la tinción de glucosaminoglicanos presente en el tejido cartilaginoso, por lo que las células tratadas con medio de condrogénesis han sido capaces de diferenciarse a condrocitos.

Curva de crecimiento del cultivo celular

Se sembraron 3.5×10^5 células en flasks ($n = 4$) de 175 cm^2 en medio DMEM + GlutaMAX suplementado con 20% de FBS y 1% de Gentamicina y se realizaron contajes celulares mediante hemocitómetro para estudiar el crecimiento celular del cultivo de células madre mesenquimales durante 240 horas (Figura 9). Se tomaron medidas a diferentes tiempos y se obtuvo la curva de crecimiento celular. Mediante los datos obtenidos, se estimó un número de divisiones medio de 3.79 h

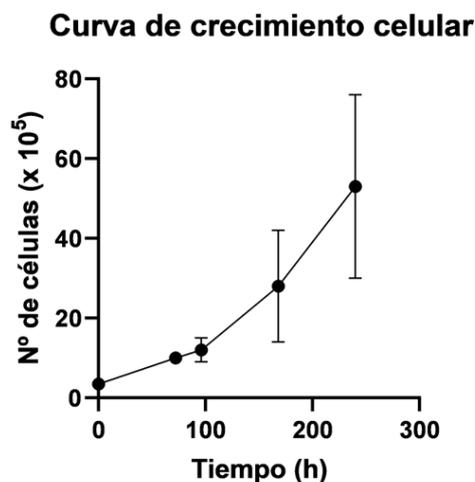


Figura 9. Curva de crecimiento celular de células madre mesenquimales empleadas en la fabricación de MSV-MA. Se analizaron cuatro cultivos diferentes ($n = 4$) para los que se midió mediante hemocitómetro el número de células en el flask (175 cm^2) a diferentes tiempos.

(desviación típica 0.77 h) y un tiempo de duplicación medio de 65.64h (desviación típica 15.64 h).

Fabricación de MSV-MA

Los parches de membranas amnióticas empleados poseían un tamaño aproximado de entre 3x3 cm² y 6x6 cm². Todos los parches se reciben con un papel de nitrocelulosa pegado a la cara no epitelial de la membrana. Se extiende la membrana sobre la placa para poder retirar el parche (Figura 10.A). Una vez retirado el parche, al extender la membrana sobre la placa (Figura 10.B) y observar al microscopio óptico (Figura 11.A), se observa el epitelio de la membrana. El epitelio amniótico está formado por una capa de células cónicas que forman una estructura en forma de red sobre la membrana. Al procesar la membrana con Tripsina-EDTA y frotar suavemente con los scrappers, se observa a simple vista el desprendimiento de un material mucoso de la membrana. Al observar al microscopio óptico el sobrenadante de este proceso, se observa una suspensión de células de pequeño tamaño (Figura 11.B). Estas células son las células epiteliales desprendidas de la membrana. Una vez retirado el epitelio y lavada la membrana con abundante PBS, se observa un cambio en la morfología de la superficie de la membrana (Figura 11.C y D). La membrana ahora posee un aspecto rugoso correspondiente al componente de proteínas fibrosas de las capas inferiores al epitelio amniótico.

Tras este proceso de desepitelización y tras un secado de al menos 24 horas de la membrana amniótica en el incubador, se procede a la siembra de las células MSC sobre la membrana (Figura 11.E). Tras 24 horas de la siembra, las células MSC se han adherido a la membrana completamente y se observa una distribución homogénea de las células sobre la membrana (Figura 11. F y G). Además, al ajustar el enfoque del microscopio se puede observar que no todas las MSC se encuentran en el mismo plano focal. Esto sugiere que las células no solo se adhieren a la superficie de la membrana si no que siguen un proceso de integración completa en la membrana.

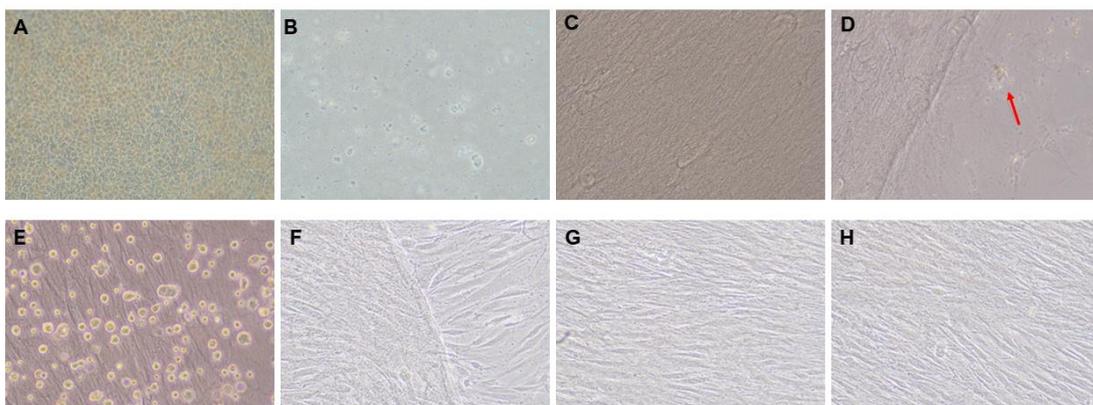


Figura 11. Imágenes obtenidas con el microscopio óptico del proceso de fabricación de MSV-MA. **A.** Membrana amniótica sin desepitelizar. **B.** Células epiteliales sobre la placa de cultivo tras la desepitelización de la membrana. **C.** Membrana amniótica sin epitelio. **D.** Extremo de la membrana amniótica sin epitelio. La flecha roja marca una célula epitelial sobre la placa. **E.** Células MSC recién sembradas sobre la membrana amniótica. **F.** MSC adheridas a la membrana (borde lateral) y a la placa de cultivo tras 24 horas de la siembra. **G.** MSV-MA 24 horas después de la siembra. **H.** MSV-MA 72 horas después de la siembra.

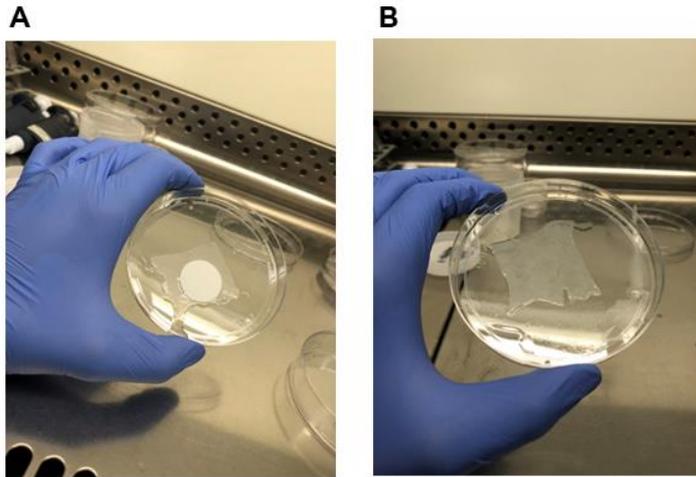


Figura 10. Preparación de la membrana. **A.** Membrana con el papel de nitrocelulosa adherido a la cara no epitelial. **B.** Membrana sin el papel de nitrocelulosa extendida sobre la placa.

El cultivo se mantiene hasta las 72 horas después de su siembra. Tras este periodo, se observa una confluencia de células de más del 80% sobre la membrana y el medicamento estará preparado para su liberación (Figura 11.H).

Tinción de MSV-MA con PKH67

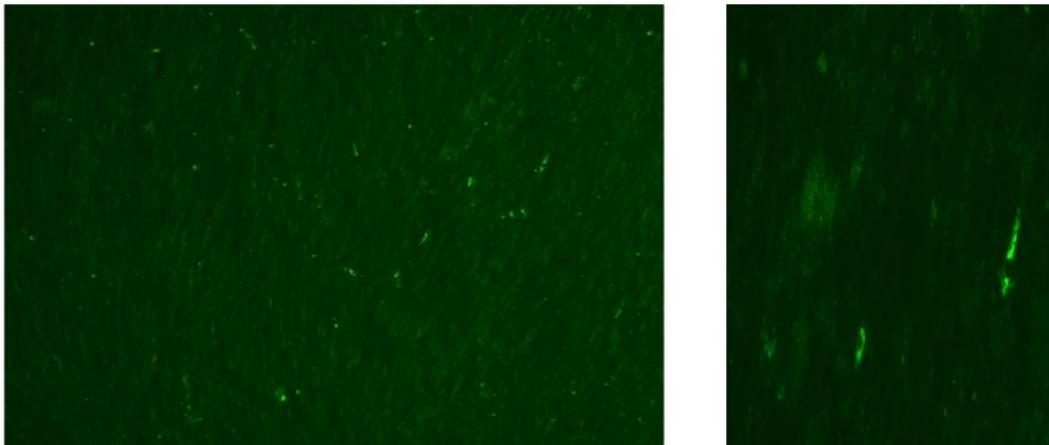


Figura 12. Membrana amniótica desepitelizada y sembrada con células MSC teñidas con PKH67. Se observa que la membrana queda cubierta por las MSC y que la distribución de estas células sobre la membrana es homogénea.

Se realizó la tinción de las células MSC con el fluoróforo PKH67 para comprobar la distribución de las células MSC sobre la MAh en MSV-MA. Tras la tinción se elaboró el producto y se tomaron imágenes mediante el microscopio de fluorescencia a las 72 horas de la siembra (Figura 12). Se observa una distribución completamente homogénea sobre toda la superficie de la membrana, formando un tejido en forma de capa sobre esta.

Pruebas de estabilidad

La estabilidad de un medicamento se define como el tiempo durante el cual las propiedades del producto elaborado se mantienen incorruptas en un 90%. En este diseño se ha establecido un tiempo de estabilidad de 72 horas para el medicamento a temperatura ambiente y sin una concentración de CO₂ controlada (exterior del incubador). Para comprobar que MSV-MA se mantiene estable durante 72 horas, se estudiaron dos parámetros de control: en primer lugar, se analizó la viabilidad celular de las MSC sobre la MA y, en segundo lugar, se realizó un análisis por citometría para comprobar el estado del fenotipo de las MSC. Para el análisis de la viabilidad celular se realizaron experimentos con tres excipientes de acondicionamiento diferentes: medio de cultivo DMEM + GlutaMAX (+ 20% FBS, + 1% Gentamicina), Ringer Lactato (+ 5 mM Glucosa al 33%) e HypoThermosol.

Análisis de la viabilidad celular después de 72 horas de la liberación

Tras 72 horas de la liberación del medicamento, se realizó a cada placa una doble tinción de Yoduro de Propidio y Hoescht. Se tomaron imágenes de microscopía confocal a 10 campos aleatorizados de cada placa y se realizó un conteo de núcleos de células viables y no viables (hoechst) y células no viables (IP) mediante el software ImageJ. Con estos datos se realizó una estimación de la viabilidad media ($n = 3$) de las MSC sobre la MA para cada uno de los tres medios de acondicionamiento diferentes, así como una estimación del número de células totales en el medicamento (extrapolando los datos mediante el área imagen y el área total de la placa y suponiendo en todo momento que el parche de membrana recubre la placa por completo). Con los datos obtenidos, se realizó un test estadístico ANOVA de comparación de medias para observar diferencias significativas en el análisis de los diferentes medios de acondicionamiento del medicamento.

En cuanto al número de células por placa, se obtuvieron valores compatibles con el número de células sembradas y el tiempo de duplicación de las MSC (Figura 13.A). El test estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre el número de células por placa en los distintos acondicionamientos ($p = 0.257$).

En cuanto a la viabilidad, los resultados mostraron viabilidades superiores al 90% (condición de estabilidad) para los tres excipientes (Figura 13.B), si bien es cierto que el test estadístico mostró diferencias significativas entre las viabilidades del medicamento acondicionado con Ringer Lactato e HypoThermosol ($p = 0.010$), siendo la viabilidad media del excipiente Ringer Lactato ligeramente más alta, del 99.49%.

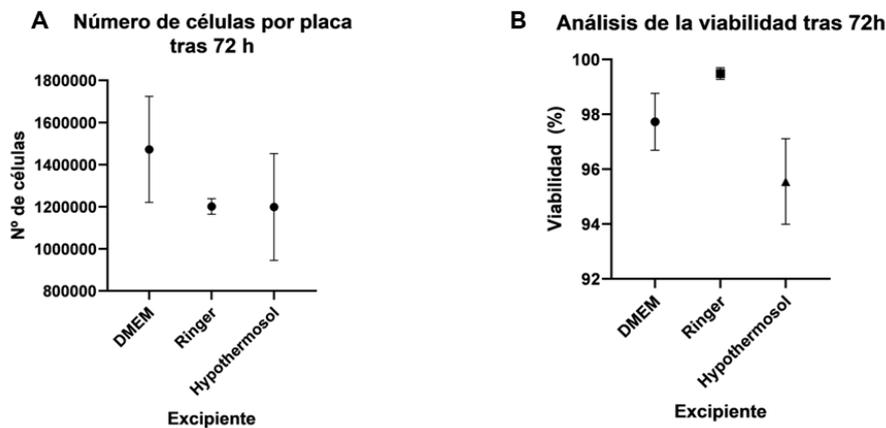


Figura 13. Análisis del número total de células en MSV-MA (A) y de la viabilidad (B) tras 72 horas de la liberación medido mediante doble tinción de Yoduro de Propidio y Hoechst para los tres medios de acondicionamiento (n = 3 para cada excipiente). No se observan diferencias significativas en el número total de células pero sí en las viabilidades de los medios Ringer e Hypothermosol.

Análisis fenotípico después de 72 horas de la liberación

Con el fin de comprobar que el fenotipo de las células madre mesenquimales no ha cambiado tras el proceso de producción y de almacenamiento durante 72 horas, se realizó un análisis por citometría de flujo de las MSC de MSV-MA tras este proceso. Para ello, se tripsinizó la MA y se retiró el sobrenadante que posteriormente se llevó al citómetro de flujo. Este estudio solo se realizó a MSV-MA acondicionado con medio DMEM + GlutaMAX.

Se observaron resultados prácticamente idénticos a los obtenidos en el análisis del fenotipo de las MSC y absolutamente compatibles con el fenotipo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para las MSC (Figura 14).

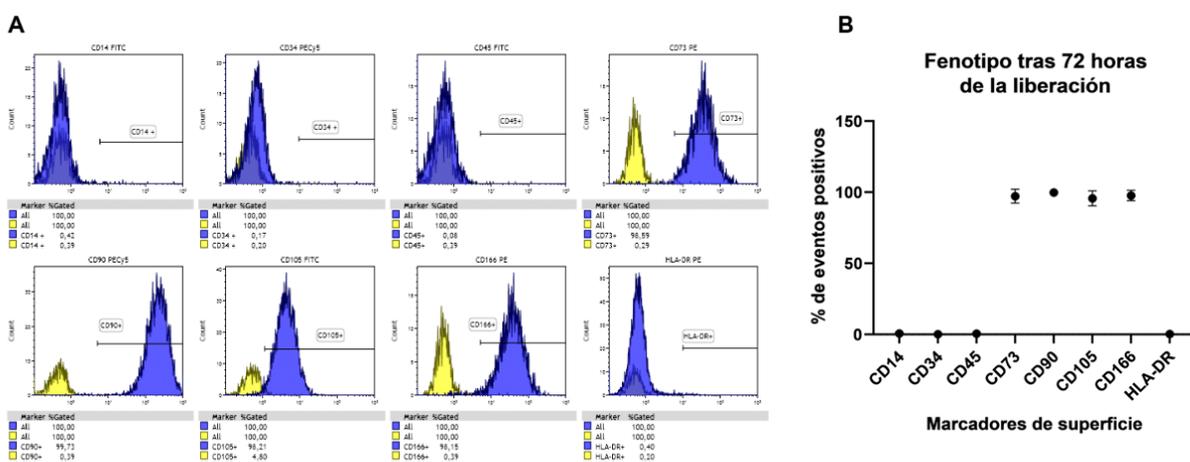


Figura 14. A. Análisis del fenotipo por citometría de flujo de las MSC de MSV-MA tras 72 horas de su liberación. **B.** Porcentaje de eventos positivos para cada marcador (n=4).

Dossier de fabricación validado

La Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea para Medicamentos de Uso Humano y Uso Veterinario (normas GMP) establecen los principios básicos para la correcta fabricación de los medicamentos. Esta Guía consta de una introducción y cuatro partes en las que se desglosan los diferentes aspectos relacionados con el proceso de producción y fabricación de medicamentos. La Parte IV de la guía (Directrices sobre normas de correcta fabricación específicas para Medicamentos de Terapia Avanzada) especifica el uso de las normas de correcta fabricación para medicamentos de terapia avanzada, entre los que se encuentran los medicamentos de terapia celular. En ella se establece los requisitos básicos para la fabricación de ATMPs en referencia a materiales, métodos, técnicos de producción, maquinaria e instalaciones. Estos requisitos son necesarios para que el proceso de producción sea robusto, homogéneo y reproducible y que el producto final mantenga las características de esterilidad y calidad necesarias.

Uno de los requisitos fundamentales que establecen estas normas (37) (apartado 1.2. Principios generales), es la necesidad de la creación de “un sistema de documentación que asegure que se establezcan especificaciones apropiadas para materiales, productos intermedios, productos a granel y productos terminados, que el proceso de producción esté comprendido claramente y que se conserven los registros adecuados”. En este sentido, se ha querido llevar a cabo una traslación del trabajo realizado en este proyecto en el cuarto de cultivos a un sistema de calidad farmacéutico mediante la creación de una propuesta documental que permita satisfacer estos objetivos planteados. Para ello, se ha diseñado un Dossier de Fabricación (ver Anexo) que cumple con la normativa GMP y que permite registrar todo el proceso de fabricación de MSV-MA, así como de la calidad del producto producido.

6. DISCUSIÓN

En este Trabajo de Fin de Máster se han visto cumplidos todos los objetivos marcados inicialmente para su desarrollo. El proyecto pretendía dar una visión global del proceso de diseño y fabricación de un medicamento de Terapia Celular. Este proceso siempre comienza con una fase experimental preclínica que se ha llevado a cabo en el laboratorio y continua con una traslación completa a una unidad de producción celular, donde se establece un protocolo de trabajo siempre ajustado a las Guías de Correcta Fabricación de Medicamentos de Terapia Avanzada. Este trabajo de traslación se ha querido simular mediante la creación de un Dossier de Fabricación que ha sido validado gracias a la producción de MSV-MA para el desarrollo de este trabajo.

El aislamiento y expansión de células madre mesenquimales provenientes de médula osea concluyó satisfactoriamente en la obtención de un cultivo de células con una morfología fibroblástica y fusiforme. En las fases iniciales del cultivo se observan otros subtipos celulares provenientes de la capa de células mononucleadas compatibles con otras poblaciones de la médula osea (células linfocíticas), si bien es cierto que durante los sucesivos cambios de medio y de recipiente estas células sin capacidad clonogénica van desapareciendo del cultivo. Una vez que el cultivo adquiere cierta homogeneidad, el análisis del fenotipo de estas células muestra una expresión de marcadores compatible

con el de una MSC. Por otra parte, ha sido posible demostrar la pluripotencia de estas células mediante las pruebas de diferenciación a adipocitos, osteocitos y condrocitos. Estas pruebas de diferenciación son una parte fundamental en el proceso de validación del protocolo de obtención de células madre mesenquimales de MO, aunque una vez se ha establecido el protocolo y se ha demostrado que mediante dicho protocolo es posible la obtención de las MSC, las pruebas de diferenciación no serían necesarias en cada rutina de obtención de células. Esta validación permite que únicamente mediante un análisis del fenotipo se pueda confirmar que las células obtenidas son células mesenquimales.

El análisis del crecimiento celular muestra resultados semejantes a los presentados en la literatura para las células madre mesenquimales. El crecimiento de estas células es relativamente lento y el alto contenido en FBS que se le proporciona en el medio facilita el proceso de expansión del cultivo. Los resultados mostraron una alta variabilidad de los datos de concentración celular en los diferentes flask, aunque se cree que estos resultados se deben a errores cometidos en el proceso de contaje.

El diseño del protocolo de fabricación del medicamento de Terapia Celular MSV-MA permitió establecer un método de obtención de un producto final con las características deseadas para este medicamento. Estas características son: membrana amniótica recubierta al 80% de células madre mesenquimales de MO, presentada sobre una placa Petri de 35 mm² y recubierta con medio de acondicionamiento (DMEM + GlutaMAX / Ringer Lactato / HypoThermosol). Los controles que se realizaron para verificar que el medicamento cumple las características deseadas son: morfología fibroblástica de las MSC, confluencia de capa de más del 80%, tamaño de parche de membrana mínimo de 2.5 x 2.5 cm², integridad de la membrana e integridad del envase de acondicionamiento.

En primer lugar, el tratamiento de la membrana amniótica con tripsina garantiza la acelularidad de la misma. Esto permite emplear la membrana amniótica no como un tejido si no como un biosoporte para el principio activo del medicamento: las células mesenquimales. De coexistir las MSC con otras células (células epiteliales), no se podría garantizar que la acción terapéutica del medicamento fuese exclusivamente por las MSC, y por tanto, no podríamos otorgar a estas células el papel de principio activo de la terapia celular. La retirada del epitelio de la MA mediante la tripsinización es un proceso validado mediante las imágenes de microscopía óptica mostradas en este proyecto (Figura 11) y mediante imágenes de cortes histológicos realizados en trabajos anteriores.

Una vez sembradas las MSC sobre la membrana (principio activo) se ha podido demostrar que las células son capaces de recubrir completamente la MA mediante un proceso de expansión celular. Por tanto, la MA es un soporte adecuado para el crecimiento celular, lo que junto a sus propiedades antimicrobianas, de transparencia, flexibilidad y resistencia, permite justificar su uso como carrier para las MSC en esta terapia celular oftalmológica. Otro aspecto a tener en cuenta en el diseño del medicamento es la distribución de las MSC en la MA, ya que se considera que una distribución homogénea de las células es importante para que toda la superficie de la córnea del paciente quede expuesta a las MSC y puedan llevar a cabo correctamente su acción terapéutica. Mediante la tinción con PKH67 se ha podido demostrar que efectivamente la distribución de las MSC es completamente homogénea en toda la MA y que las células forman una capa que recubre completamente todo el soporte.

Una vez se ha completado el proceso de producción del medicamento, es necesario realizar su acondicionamiento final. El acondicionamiento primario de MSV-MA será la

placa de cultivo de 35 mm² sobre la que se encuentra la MA con las MSC. Se colocará la tapa y la placa se cerrará mediante una tira adhesiva. Una vez es liberado el medicamento se establece un tiempo de caducidad de 72 horas tras la liberación, tiempo en el cual se deberá aplicar el medicamento en el centro aplicador correspondiente. Durante este tiempo el medicamento podrá almacenarse a temperatura ambiente sin necesidad de un incubador.

Para garantizar la estabilidad del medicamento durante este periodo de tiempo, se realizaron pruebas de viabilidad. Para estas pruebas se emplearon tres excipientes diferentes: DMEM + GlutaMAX (+ 20% FBS, + 1% Gentamicina), Ringer Lactato (+ 5 mM Glucosa al 33%) e HypoThermosol. El medio DMEM + GlutaMAX se trata de un medio empleado en investigación ideal para el procesamiento de cultivos celulares, por lo que su uso como medio de cultivo para las MSC sobre la MA es ideal. Sin embargo, el empleo de esta solución como excipiente para aplicación clínica no es completamente adecuado. Para solventar dicho problema, se han propuesto los otros dos candidatos. Ringer Lactato se trata de una solución salina para perfusión intravenosa empleada en clínica para la reposición de fluidos. Su habitual uso en clínica, permite que junto con el suplemento de glucosa añadido, se considere un excelente candidato como excipiente para el medicamento. Por otra parte, la solución comercial HypoThermosol se trata de un medio de conservación de tejidos y células en ambientes hipotérmicos empleada en otras aplicaciones terapéuticas. Esta capacidad de conservación permite considerar este excipiente como una alternativa al medio de cultivo DMEM al permitir la protección de la MA y las MSC.

Las pruebas mostraron una viabilidad considerablemente alta para todos los excipientes, superior en los tres casos al 90% exigido por la AEMPS para considerar estable el medicamento. Por tanto, cualquiera de los tres medios de acondicionamiento podrían ser empleados en esta terapia. Al existir diferencias significativas entre la viabilidad de las células acondicionadas con Ringer e Hypothermosol, siendo la viabilidad en Ringer Lactato relativamente más alta, se puede suponer este último medio más adecuado para el medicamento. Además, Hypothermosol es un medio que contiene bajas dosis de criopreservadores, compuestos tóxicos para las células. Esto permite explicar la pequeña reducción de la viabilidad media de las MSC. Por otra parte, este medio está indicado para la conservación de células y tejidos a baja temperatura (2-8°C), por lo que su uso en células conservadas a temperatura ambiente requeriría de mayores pruebas que garanticen la estabilidad de las características de las MSC y de la MA.

Para concluir el estudio de estabilidad, se realizó un análisis del fenotipo de las MSC tras las 72 horas para comprobar que dicho fenotipo se mantenía estable. Este análisis mostró una estabilidad del fenotipo de las MSC, de lo que se puede inferir que el estrés celular sufrido durante las 72 horas de almacenamiento no supone un cambio significativo en las características fenotípicas de las células mesenquimales. Este estudio se realizó únicamente con el medio de acondicionamiento DMEM + GlutaMAX, sin embargo, se recomienda el mismo análisis para los otros dos excipientes en futuras investigaciones.

Se considera importante realizar un breve comentario del desarrollo técnico llevado a cabo en el trabajo de análisis de la viabilidad. El análisis óptico de la membrana resultó un proceso complejo, pues al tratarse de un tejido con un grosor no uniforme y que se coloca sobre una placa de cultivos es difícil realizar un enfoque adecuado para observar la fluorescencia emitida por las células. Para la toma de imágenes se trató de emplear el equipo Cytation de la casa comercial Agilent. El uso de este equipo habría permitido

tomar imágenes de microscopía de toda la membrana, sin embargo, el equipo necesitaba realizar un enfoque automático que resultó ser inviable debido a las características morfológicas y estructurales del biosoporte. Para solventar este impedimento, se decidió emplear el microscopio confocal y tomar imágenes de diferentes campos, enfocando el plano en el que se encontraban las MSC en cada imagen. El uso del microscopio confocal permitió observar que las MSC se integran completamente en la MA, introduciéndose en ella y anidando en el tejido proteico que la forma. Las células, al morir, pierden su capacidad de adherencia y comienzan a desprenderse de la membrana. Este hecho se pudo observar claramente en las imágenes pues las células teñidas con IP se encontraban en un plano focal completamente diferente al del resto de células.

Finalmente, para concluir este proyecto, se realizó un Dossier de Fabricación cuyo objetivo fundamental era mostrar una pequeña fracción del trabajo que se requiere en materia de traslación de la investigación biomédica realizada en el laboratorio a un ambiente GMP de producción de medicamentos. Durante este trabajo se realizó una validación del dossier en cada proceso de producción de MSV-MA para la obtención de los resultados experimentales mostrados. Este dossier está compuesto por:

- Control de dictamen y decisión del lote de fabricación. Este apartado permite resumir de manera concisa todo lo ocurrido en el proceso de fabricación. En el se mantienen registrados los datos del lote de fabricación, del proceso y de los materiales empleados. También se muestran las especificaciones del producto final y de su liberación.
- Registro de recepción y control del soporte biológico (membrana amniótica) y del principio activo (células madre mesenquimales), en el que podemos observar las características del material biológico empleado en la fabricación.
- Registro de preparación de la membrana amniótica.
- Registro de expansión de las células mesenquimales sobre la membrana amniótica.
- Obtención del producto final. En este registro se muestran las características del producto obtenido con el proceso de fabricación así como del acondicionamiento final del medicamento.
- Especificaciones del producto final. Esta parte permite, en un solo cuadro, obtener la información completa de la composición y características del lote fabricado.
- Registro de incidencias del proceso de fabricación. En esta sección se deberán plasmar todas aquellas incidencias que han podido desviar el protocolo de fabricación y que puedan, de alguna manera, comprometer la calidad del producto elaborado.

Este sistema documental, junto con otros elementos necesarios según las Guías de Correcta Fabricación de Medicamentos de Terapias Avanzadas, comprende un aspecto fundamental del establecimiento de un sistema de calidad farmacéutico. Este sistema de calidad farmacéutico engloba todas aquellas medidas que en su conjunto permitan la fabricación de un medicamento que mantenga la calidad requerida para su uso clínico en humanos. Todos los procesos que engloben un sistema de producción de medicamentos de terapia celular han de ajustarse a esa Gestión de Calidad mediante la aplicación de las normas GMP, que permiten otorgar a los procesos realizados características de robustez, homogeneidad y calidad. Las normas GMP, por tanto, son la columna vertebral de todo aquel sistema de producción de medicamentos, en especial

de medicamentos de terapia celular, que por su naturaleza peculiar necesitan de un mayor control y unos requerimientos técnicos excepcionales.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este proyecto permiten concluir:

- El proceso de obtención de células madre mesenquimales de un aspirado medular es un proceso factible que permite la obtención de un cultivo de MSC, con las características fenotípicas y de pluripotencia habituales para estas células.
- En cuanto al proceso de fabricación y diseño del medicamento de terapia celular de células madre mesenquimales para uso oftalmológico (MSV-MA):
 - Ha sido posible el diseño de un protocolo de trabajo que permita fabricar un medicamento de forma homogénea y reproducible.
 - El medicamento obtenido mediante este protocolo posee siempre las mismas características.
 - El protocolo puede llevarse a cabo en el laboratorio, hecho que se ha podido comprobar mediante la validación de este protocolo de fabricación.
- El medicamento se mantiene estable durante 72 horas tras su liberación, manteniendo la viabilidad de las células mesenquimales por encima del 90% para los tres medios de acondicionamiento empleados. Además, no se observan cambios en el fenotipo de las MSC.
- Se propone el medio de acondicionamiento Ringer-Lactato suplementado con glucosa como el candidato más adecuado como excipiente del medicamento, pues su uso está establecido en la práctica clínica hospitalaria y mantiene excepcionalmente las características del producto final durante el tiempo de caducidad establecido.
- Es posible la creación de un sistema documental, basado en la normativa GMP, que permita realizar un registro de todo el proceso de fabricación, así como de todas las posibles desviaciones del proceso que pongan en riesgo la calidad del producto final.

8. REFERENCIAS

1. Marino Gómez Sandoval P de. Aproximación a la historia de los trasplantes : su introducción en España a través del Índice Médico Español (1965-1988). 1993.
2. Barroetebeña Reyes A del R, Gutiérrez Aguilera N. Terapia celular: actualidad y dificultades. El Cid Editor ; 2009.
3. Gálvez P, Clares B, Hmadcha A, Ruiz A, Soria B. Development of a cell-based medicinal product: Regulatory structures in the European Union. *British Medical Bulletin*. 2013 Mar;105(1):85–105.
4. Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *The Official Journal of the European Union*; 2007.
5. 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. *The Official Journal of the European Union*; 2009.
6. Council Directive 90/385/EEC of 20 June 1990 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Active Implantable Medical Devices. *Official Journal of the European Union*; 1990.
7. Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 Concerning Medical Devices. *The Official Journal of the European Union*; 1993.
8. Cipriani F, Ariño Palao B, Gonzalez De Torre I, Vega Castrillo A, Aguado Hernández HJ, Alonso Rodrigo M, et al. An elastin-like recombinamer-based bioactive hydrogel embedded with mesenchymal stromal cells as an injectable scaffold for osteochondral repair. *Regenerative Biomaterials*. 2019 Dec 1;6(6):335–47.
9. Gurevich I, Agarwal P, Zhang P, Dolorito JA, Oliver S, Liu H, et al. In vivo topical gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a phase 1 and 2 trial. *Nature Medicine*. 2022 Apr;28(4):780–8.
10. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*. 2008 Apr;26(4):443–52.
11. Messina S, Sframeli M. New treatments in spinal muscular atrophy: Positive results and new challenges. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Jul 1;9(7):1–16.
12. Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefosky D, Balabanov R, Katsamakakis G, et al. Articles Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *The Lancet Neurology [Internet]*. 2009;8:244–53. Available from: www.thelancet.com/neurology
13. Barbado J, Tabera S, Sánchez A, García-Sancho J. Therapeutic potential of allogeneic mesenchymal stromal cells transplantation for lupus nephritis. *Lupus*. 2018 Nov 1;27(13):2161–5.

14. Ley N°30937. BOE N° 306, Madrid, España, 20 de diciembre de 2015.
15. RD N°14082. BOE N° 307, Madrid, España, 24 de diciembre de 2015.
16. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. Vol. 18, *Cytotherapy*. Elsevier B.V.; 2016. p. 160–71.
17. Buzhor E, Leshansky L, Blumenthal J, Barash H, Warshawsky D, Mazor Y, et al. Cell-based therapy approaches: The hope for incurable diseases. Vol. 9, *Regenerative Medicine*. Future Medicine Ltd.; 2014. p. 649–72.
18. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. Vol. 10, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2019.
19. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. Vol. 27, *Cell Stem Cell*. Cell Press; 2020. p. 523–31.
20. Miki T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. Vol. 80, *American Journal of Reproductive Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2018.
21. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. Vol. 20, *Cell Transplantation*. 2011. p. 5–14.
22. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Ischemic Cerebral and Heart Diseases. *Cell Transplantation* [Internet]. 2007;16:273–84. Available from: www.cognizantcommunication.com
23. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. Current Concepts in Adult Stem Cell Therapy for Stroke. Vol. 13, *Current Medicinal Chemistry*. 2006.
24. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Aug;8(4):315–7.
25. Samsonraj RM, Rai B, Sathiyathan P, Puan KJ, Röttschke O, Hui JH, et al. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells*. 2015 Jun 1;33(6):1878–91.
26. Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Hayashi S. Differential Ability of Somatic Stem Cells. *Cell Transplantation* [Internet]. 2009;18:581–9. Available from: www.cognizantcommunication.com
27. Kuo TK, Ho JH, Lee OK. Mesenchymal stem cell therapy for nonmusculoskeletal diseases: Emerging applications. In: *Cell Transplantation*. 2009. p. 1013–28.
28. Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, Bartholomew A, Moseley A, Dodds R, et al. Immunologic Consequences of Multiple, High-Dose Administration of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells to Baboons. *Cell Transplantation* [Internet]. 2006;15:711–21. Available from: www.cognizantcommunication.com
29. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EWF, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2821–7.

30. Li H, Guo ZK, Li XS, Hou CM, Tang PH, Mao N. Functional and Phenotypic Alteration of Intrasplenic Lymphocytes Affected by Mesenchymal Stem Cells in a Murine Allosplenocyte Transfusion Model. *Cell Transplantation* [Internet]. 2007;16:85–95. Available from: www.cognizantcommunication.com
31. Comprender la deficiencia de células madre limbares (DCML) [Internet]. Chiesi. [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://www.chiesi.es/img/aree/rare/Deficiencia.pdf>
32. Badri L, Walker NM, Ohtsuka T, Wang Z, Delmar M, Flint A, et al. Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011 Oct 1;45(4):809–16.
33. Xiang E, Bing Han, Quan Zhang, Wei Rao, Zhangfan Wang, Cheng Chang, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11.
34. Prazere Lobo G, Matynia A, Solanki AK, Sundstrom JM, Zhou M, Geathers JS, et al. Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Dysfunction. *Front. Cell Dev Biol* [Internet]. 2020;8:501. Available from: www.frontiersin.org
35. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, et al. Reconstruction of Chemically Burned Rat Corneal Surface by Bone Marrow–Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006 Feb 1;24(2):315–21.
36. López-Paniagua M, de la Mata A, Galindo S, Blázquez F, Calonge M, Nieto-Miguel T. Advanced therapy medicinal products for the eye: Definitions and regulatory framework. Vol. 13, *Pharmaceutics*. MDPI AG; 2021. p. 1–18.
37. European Union. Guías de correcta fabricación de medicamentos de la Unión Europea. *Official Journal of the European Union*. 2010.
38. Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grünschläger F, Hernández-Malmierca P, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature Cell Biology*. 2020 Jan 1;22(1):38–48.
39. Tan YS, Lei YL. Isolation of tumor-infiltrating lymphocytes by ficoll-paque density gradient centrifugation. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 93–9.
40. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: From structure and functions to clinical applications. Vol. 349, *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag; 2012. p. 447–58.

9. ANEXOS. Dossier de fabricación

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

CONTROL DE DICTAMEN Y DECISIÓN DEL LOTE DE FABRICACIÓN

Código Lote de Fabricación	Lugar de fabricación	Proyecto de trabajo
Tipo de Muestra Biológica	Centro que suministra la muestra	Código de la muestra
Dictamen sobre la muestra para su procesamiento: <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC		Revisado por (Firma y fecha)

DIRECTOR DEL PROYECTO: CONFORMIDAD INICIO DE LOTE

CONFORME (Firma y fecha)	RECHAZO DE LOTE (Firma y fecha)	CAUSA:
--------------------------	---------------------------------	--------

Acondicionamiento

Código del Lote	
Lugar de fabricación	
Nº de parches obtenidos	
Tipo de envase	
Excipiente	
% de recubrimiento	
Fecha de liberación	
Realizado por	
Supervisado por	

LIBERACIÓN DE PRODUCTO MSV-MA

Revisado por: Técnico de fabricación (Firma y fecha)	Revisado por: Director del proyecto (Firma y fecha)
--	---

Observaciones:

DIRECTOR DEL PROYECTO: DICTAMEN DE LOTE

CONFORME LOTE	RECHAZO LOTE	CAUSA
Firma y fecha	Firma y fecha	

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

REGISTRO DE RECEPCIÓN Y CONTROL DE SOPORTE BIOLÓGICO: Membrana amniótica

Lugar de procedencia del tejido				
Fecha de recepción				
Lugar de almacenamiento				
Control del soporte biológico: Membrana Amniótica				
Tipo de muestra	Código de identificación	Tamaño de la muestra	Fecha de obtención	Fecha de caducidad
Control del Soporte Biológico: Membrana amniótica				
Parámetros	Criterio de aceptación		Resultados Obtenidos	
Origen	Membrana amniótica		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	
Envase	Doble envase hermético		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	
Integridad del envase	Íntegro y sellado		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	
Identificación y etiquetado	Datos identificativos de la muestra		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	
Temperatura de almacenado	Almacenado a -80°C		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	
Observaciones:				
Revisado por: Técnico de fabricación			Revisado por: Director del proyecto	
Firma y fecha			Firma y fecha	

REGISTRO DE RECEPCIÓN Y CONTROL DE MSV

Tipo de muestra	Código donante	Identificación del envase	Volumen/envase	Origen			
Células MSV							
PRINCIPIO ACTIVO							
Origen	Células mesenquimales derivadas de MO expandidas						
Controles de Principio Activo							
Parámetros	Criterios de aceptación		Resultados				
Morfología celular	Fibroblástica		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA				
Contaje	≥ 250.000	Resultado:	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA				
Viabilidad	≥ 90%	Resultado:	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA				
PD (Duplicaciones acumuladas)			<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA				
Inmunofenotipo							
Marcador	Criterio de aceptación	% Expresión	Resultados	Marcador	Criterio de aceptación	% Expresión	Resultados
CD14	Negativo ≤ 10%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	CD105	Positivo ≥ 90%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
CD34	Negativo ≤ 10%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	CD166	Positivo ≥ 90%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
CD45	Negativo ≤ 10%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	CD73	Positivo ≥ 90%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
HLA-DR	Negativo ≤ 10%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	CD90	Positivo ≥ 90%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Lote de fabricación asignado				Terapia celular		MSV-MA	
Dictamen sobre las muestras para su procesamiento <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC				Revisado por		Fecha y firma	
Observaciones:							
Revisado por: Técnico de fabricación (Firma y fecha)				Revisado por: Director del proyecto (Firma y fecha)			

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

Fecha de procesamiento:

Instalaciones		Cuarto de cultivos		Cabina de flujo laminar		Incubador	
LOTE DE MEMBRANA	Tamaño la membrana	Nº de parches	Fecha de obtención	Fecha de caducidad	Realizado		
Descongelar MA:		Temperatura 37°C <input type="checkbox"/>	Temperatura Ambiente <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR		
Abrir envase dentro de la cabina de flujo laminar							<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Coger la membrana y colocarla sobre una placa Petri de 100mm							<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Retirar el papel de nitrocelulosa (si fuera necesario)							<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR <input type="checkbox"/> NA
Lavar con 10 ml de PBS	Retirar PBS de desecho	Nº de lavados:					<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Comprobar que el lado epitelial está hacia arriba (la hemosteta no se pega al epitelio)							<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Añadir 12 ml de tripsina	Vol. Total añadido de tripsina			ml	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR		
Tiempo máximo de tripsinización 8 mins en campana			Tiempo de tripsinización	min	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR		
Lavar con 10 ml de PBS	Retirar PBS de desecho	Nº de lavados:					<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Cortar la membrana en parches de 2.5 cm x 2.5 cm Nº de fragmentos:							<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Colocar cada parche en una placa Petri de 35 mm ²							<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR

IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

ID placa	Lote de membrana	ID placa	Lote de membrana

Evaluar si los parches presentan rotura después de la desepitelización. **Aspecto de MA**

ID placa	Evaluación MA	ID placa	Evaluación MA
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable

Incubar a 37 °C y 10% CO₂

R NR

Registro de notas del operario

Revisado por

Fecha y firma

Observaciones:

DICTAMEN

CONFORME

NO CONFORME

Director del proyecto

Fecha y firma

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

EXPANSIÓN DE CÉLULAS MSV SOBRE MEMBRANA AMNIÓTICA			Fecha de procesamiento:		
Instalaciones		Cuarto de cultivos	Cabina de flujo laminar	Incubador	
Tipo de muestra	Identificación	Número de células / volumen		Fecha de obtención	Realizado
Sembrar 250.000 células MSV en suspensión / parche					
Nº células MSV sembradas totales		Volumen total			<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Incubar, máximo 2 horas, para permitir su adhesión: 10% CO ₂ y 37°C.		Tiempo de adhesión			<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Añadir 2 ml de medio de cultivo DMEM (4.5 g/l de glucosa), 20% de FBS y 1% de Gentamicina					<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Incubar a 37°C y 10% CO ₂ durante 72 horas					
IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS					
ID placa	Lote de membrana		ID placa	Lote de membrana	
Evaluar si la membrana presenta rotura después de la desepitelización. Aspecto de MA					
ID placa	Evaluación MA		Evaluación de las MSV		
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> No evaluable		
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> No evaluable		
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> No evaluable		
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> No evaluable		
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> No evaluable		
	<input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No Roto <input type="checkbox"/> No Evaluable		<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> No evaluable		
Registro de notas del operario					
Revisado por					Fecha y firma
Observaciones:		DICTAMEN		<input type="checkbox"/> CONFORME <input type="checkbox"/> NO CONFORME	
		Director del proyecto		Fecha y firma	

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

OBTENCIÓN DEL PRODUCTO FINAL			Fecha de procesamiento:	
Instalaciones	Cuarto de cultivos	Cabina de flujo laminar	Incubador	
Evaluar Aspecto del producto MSV-MA				
ID placa	Aspecto MSV-MA		% capa	Actividad a realizar
	<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No roto <input type="checkbox"/> No evaluable			<input type="checkbox"/> Acond. <input type="checkbox"/> Destrucción
	<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No roto <input type="checkbox"/> No evaluable			<input type="checkbox"/> Acond. <input type="checkbox"/> Destrucción
	<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No roto <input type="checkbox"/> No evaluable			<input type="checkbox"/> Acond. <input type="checkbox"/> Destrucción
	<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No roto <input type="checkbox"/> No evaluable			<input type="checkbox"/> Acond. <input type="checkbox"/> Destrucción
	<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No roto <input type="checkbox"/> No evaluable			<input type="checkbox"/> Acond. <input type="checkbox"/> Destrucción
	<input type="checkbox"/> Adheridas <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Roto <input type="checkbox"/> No roto <input type="checkbox"/> No evaluable			<input type="checkbox"/> Acond. <input type="checkbox"/> Destrucción
ACONDICIONAMIENTO DE LOS PRODUCTOS MSV-MA				
Retirar el sobrenadante y desecharlo			<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR	
Añadir medio de acondicionamiento hasta enrase de la placa		Vol. Añadido	ml	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR
Colocar la tapa de la placa y sellar con membrana adhesiva. Identificar la placa mediante el etiquetado primario			<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> NR	
ID placa	Lote de producto fabricado	Excipiente	Vol./envase	Hora expedición
Registro de notas del operario				
Revisado por		Fecha y firma		
Observaciones:		DICTAMEN		<input type="checkbox"/> CONFORME <input type="checkbox"/> NO CONFORME
		Director del proyecto		Fecha y firma

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

ESPECIFICACIONES DE PRODUCTO FINAL

MEDICAMENTO:	MSV-MA	ATMP	Células mesenquimales alogénicas expandidas sobre membrana amniótica
Lote de fabricación:			
MEDICAMENTO			
Origen	MSV-allo		
Composición	Células mesenquimales expandida sobre membrana amniótica		
Excipiente			
Envase	Placa Petri de 35 mm ²		
Caducidad	72 horas desde su expedición		
Temperatura de mantenimiento	Temperatura ambiente		
Almacenamiento hasta la aplicación	Conservar a temperatura ambiente hasta su aplicación		
Controles de Producto Final			
Parámetros	Criterio de aceptación		Resultados
Morfología celular	Células MSV fibroblásticas		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA
Confluencia de capa	≥ 80%		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA
Tamaño del parche terapéutico	≥ 2.5 x 2.4 cm ²		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA
Integridad de la membrana	Sin grietas		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA
Integridad del envase	Sin daños ni roturas		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC <input type="checkbox"/> NA
Observaciones			
Revisado por	Fecha y firma		
Observaciones:	DICTAMEN		<input type="checkbox"/> CONFORME <input type="checkbox"/> NO CONFORME
	Director del proyecto		Fecha y firma

Título: Dossier de fabricación de Células Mesenquimales sobre Membrana Amniótica

Expansión de Células MSV sobre Membrana Amniótica humana

Proyecto:

Entrada en vigor:

Fecha de emisión:

Registro de Incidencias de Proceso de Fabricación

Descripción resumida de la incidencia	Acciones tomadas	
		Código desviación (si aplica)
		Detectada por: Firma y fecha
		Código desviación (si aplica)
		Detectada por: Firma y fecha
		Código desviación (si aplica)
		Detectada por: Firma y fecha
		Código desviación (si aplica)
		Detectada por: Firma y fecha
		Código desviación (si aplica)
		Detectada por: Firma y fecha
Observaciones:	Conforme por el Director del Proyecto Fecha y Firma	
	Conforme por el Técnico de Producción Fecha y Firma	