

CONFIDENCIAL

SINOPSIS INFORME CLÍNICO

Ensayo clínico fase I/II multicéntrico, abierto, aleatorizado y controlado para el estudio del uso de las células madre como terapia celular en isquemia crítica del miembro inferior en pacientes diabéticos Tipo 2 insulinizados: estudio de las necesidades de insulina.

CeTMMoTa/ICPDI/2010

versión 1 de 20 de noviembre de 2020

TABLA DE CONTENIDO:

TABLA DE CONTENIDO:.....	2
A. INFORMACIÓN SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO:	4
1. Identificación del ensayo clínico.....	4
2. Identificadores.....	4
3. Promotor	4
4. Datos pediátricos.....	4
5. Datos del informe	4
6. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO	5
6.1 Medicamentos en Investigación	5
6.2 Patología de estudio	5
6.3 Diseño del ensayo	5
6.4 Investigadores	5
6.5 Centros	5
6.5 Antecedentes científicos y justificación	6
6.6 Objetivos del ensayo clínico.....	7
6.7. Plan de desarrollo del ensayo clínico.....	7
6.8 Métodos estadísticos	10
7. POBLACIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO	11
1. Selección	11
B. DISPOSICIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO	12
1.Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión/retirada del estudio y abandonos.....	13
Criterios de inclusión:	13
Criterios de exclusión:.....	14
Criterios de retirada del tratamiento o de la evaluación:.....	14
Interrupción del ensayo:.....	15
Aleatorización	15
2. Período previo a la asignación aleatoria	15
3. Periodos posteriores a la asignación	16
C. CARACTERÍSTICAS BASALES.....	16
1. Edad y sexo.....	16
2. Características basales específicas del estudio	16
D. CRITERIOS DE VALORACIÓN.	16
1.- Definiciones de los criterios de valoración.....	16
2.- Criterio de valoración nº1. Cambios en los requerimientos de insulina	17
3.- Criterio de valoración nº2. Evaluación del estado endocrino.	17

4.- Criterio de valoración nº3. Evaluación del estado inflamatorio.	17
5.- Evaluación del estado vascular.	17
6.- Cuantificación del grado de neovascularización	18
7. Evaluación de la seguridad	18
7.1 Criterio de Valoración: Seguridad durante el procedimiento y durante el seguimiento	18
E: ACONTECIMIENTOS ADVERSOS	19
1.- Información sobre AA	19
2.- Codificación y Notificación de acontecimientos adversos graves.....	20
Conclusiones de seguridad	23
F: INFORMACIÓN ADICIONAL	23
1.- Modificaciones globales sustanciales.....	23
2.- Interrupciones globales y reanudaciones	24
3. Limitaciones, sesgos potenciales, imprecisiones y advertencias	25
4. Declaración de veracidad	27

CONFIDENCIAL

A. INFORMACIÓN SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO:

1. Identificación del ensayo clínico

Título: Ensayo clínico fase I/II multicéntrico, abierto, aleatorizado y controlado para el estudio del uso de las células madre como terapia celular en isquemia crítica del miembro inferior en pacientes diabéticos tipo 2 insulinizados: estudio de las necesidades de insulina.

2. Identificadores

Código del Protocolo: CeTMMoTa-ICPDI-2010

EudraCT: 2010-019774-33

NCT: 02287974

3. Promotor

Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas- Fundación Progreso y Salud (En la actualidad Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas).

Datos de contacto:

Calle Americo Vesputio 15, Edificio S-2

41092 Sevilla

Tel.: (+34) 955 89 01 24- (+34) 955 04 83 66-(+35) 670948750/ Fax: (+34) 955 267 002

terapias.avanzadas@juntadeandalucia.es

4. Datos pediátricos

El ensayo clínico no permitió la inclusión de pacientes pediátricos.

5. Datos del informe

El ensayo clínico fue autorizado por la AEMPS con fechas 26 de julio de 2011, incluyéndose el primer paciente el 27 de septiembre de 2011. La población prevista era de 48 pacientes diabéticos clínicamente evaluables con isquemia crónica crítica de al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización, de los cuales 36 pacientes serían incluidos en el grupo experimental (12 por cada grupo celular) y 12 en el grupo control con tratamiento convencional.

Inicialmente se previó un periodo de reclutamiento de 6 meses y 12 meses de seguimiento para cada paciente, siendo la fecha de finalización global prevista para finales de marzo de 2013. Fue necesaria la ampliación del periodo de ejecución y la realización de 2 enmiendas al protocolo para tratar de posibilitar al máximo alcanzar la "n" prevista, lo que finalmente fue imposible conseguir.

La selección de los pacientes fue más dificultosa de lo esperado, especialmente y entre otros aspectos que se analizarán más adelante, por la consideración como criterio de exclusión de la presencia de genotipo DD de la ECA o genotipo E4 de la apo E, lo que llevó a que de un total de 120 pacientes que llegaron a firmar el consentimiento de participación, sólo 20 de ellos fueran finalmente aleatorizados. Aunque inicialmente no estaba prevista la realización de un análisis intermedio, el retraso en el reclutamiento, junto al hecho de la finalización de la financiación recibida, llevó al promotor en consenso con el equipo investigador a detener el reclutamiento de forma provisional el 30 de abril de 2015, y realizar un análisis intermedio para decidir la conveniencia o no de continuar con el ensayo clínico. Los resultados del mismo, condujeron a la decisión consensuada de cerrar globalmente el ensayo clínico, considerando el 30 de abril de 2015 como la fecha de cierre definitiva, lo que se comunicó a las autoridades reguladoras. El presente documento constituye el **Anexo 1** del Informe clínico global del ensayo.

Persona responsable del informe clínico

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

6. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL ENSAYO CLÍNICO

6.1 Medicamentos en Investigación

- 1.- Células mesenquimales troncales adultas autólogas de tejido adiposo expandidas.
- 2.- Células mononucleares troncales adultas autólogas de médula ósea no expandidas CD133⁺
- 3.- Células mononucleares troncales adultas autólogas de médula ósea no expandidas

Comparador: No procede. Grupo control tratamiento habitual.

6.2 Patología de estudio

pacientes diabéticos clínicamente evaluables con isquemia crónica crítica de al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización.

6.3 Diseño del ensayo

Ensayo clínico fase I-II, prospectivo, multicéntrico, abierto, randomizado y controlado. El estudio fue diseñado en 9 visitas, con un seguimiento de 12 meses tras la aleatorización del paciente. La población prevista era de 48 pacientes diabéticos clínicamente evaluables con isquemia crónica crítica de al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización, de los cuales, 36 pacientes serían incluidos en el grupo experimental (12 por cada grupo celular) y 12 en el grupo control con tratamiento convencional.

6.4 Investigadores

Investigador coordinador:

Bernat Soria Escoms.

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla

Avda. Américo Vespucio s/n. 41092. Sevilla

Tfno 954 468 004; FAX 954 461 664

Investigadores principales:

Rafael J. Ruiz Salmerón.

Hospital U. Virgen Macarena. Sevilla.

Calle Dr. Fedriani, 3, 41009 Sevilla.

Tel. 955 69 34 40- 638 713 421 / Fax. 955 01 15 33.

Correo: rjuizsalmeron@yahoo.es.

Antonio de la Cuesta.

Hospital San Lázaro. Sevilla.

Calle Dr. Fedriani, 56, 41009 Sevilla.

Tel. 955017992 – 629815012 / Fax: 955017942.

Correo: andelacuesta@gmail.com.

6.5 Centros

Reclutamiento y seguimiento de los pacientes:

Hospital San Lázaro. Sevilla.

Calle Dr. Fedriani, 56, 41009 Sevilla.

Extracción de la grasa y de la médula ósea:

Hospital U. Virgen de la Macarena.

Calle Dr. Fedriani, 3, 41009 Sevilla.

Procesamiento celular:

Células mesenquimales de tejido adiposo (CeTMAd): CABIMER.

Calle Américo Vespucio, s/n, 41092 Sevilla.

Células mononucleadas de médula ósea (CMMo) y células CD133+:Hospital Universitario Reina Sofia.

Avda. Menéndez Pidal, s/n; 14004 Córdoba.

Administración celular de CeTMAd/CMMo/CD133+:

Hospital U. Virgen Macarena. Sevilla.

Calle Dr. Fedriani, 3, 41009 Sevilla.

Determinación de polimorfismos genéticos:

Hospital de la Merced.

Av. la Constitución, 2, 41640 Osuna, Sevilla.

6.5 Antecedentes científicos y justificación

La isquemia crónica crítica (CLI del inglés critical limb ischemia) de miembros inferiores, definida por la Trans Atlantic Inter-Society Consensus (TASC) como el cuadro caracterizado por dolor crónico en reposo, úlceras o gangrena atribuibles a enfermedad arterial oclusiva comprobada, es una de las manifestaciones más severas de aterosclerosis en nuestro organismo, siendo, la isquemia crítica de la pierna el final del proceso de arteriosclerosis que puede conllevar la amputación del miembro e incluso la muerte si no se consigue una rápida y eficaz revascularización.

En pacientes con diabetes el cuadro de isquemia crítica de la pierna se desarrolla más precozmente y con mayor intensidad (15% de estos pacientes desarrollan CLI). La incidencia de CLI es de 500-1000 casos por millón y año (15-30% de los pacientes con claudicación intermitentemente desarrollarán isquemia crítica de pierna a lo largo del curso de la enfermedad).

En un ensayo reciente (Fase I-II) del equipo investigador (NCT 00872326, www.clinicaltrials.gov) llevado a cabo en 20 pacientes diabéticos, Ruiz-Salmerón y colaboradores (Ruiz-Salmeron R, de la Cuesta-Diaz A, Constantino-Bermejo M, Pérez-Camacho I, Marcos-Sánchez F, Hmadcha A, Soria B. Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischemia. Cell Transplant. 2011;20(10):1629-39. doi: 10.3727/096368910X0177.), observaron que la inyección intra-arterial de células mononucleares de médula ósea (110-435 millones, de los que 2-7 millones eran CD34+) en pacientes diabéticos con isquemia crítica del miembro inferior consigue una mejora en el cuadro clínico asociado a dicha patología: a) ningún paciente precisó de amputación mayor; b) mejoró la cicatrización de las úlceras; c) aumentó la vascularización y consecuentemente la temperatura del miembro, la presión transcutánea de oxígeno; el índice ABI; etc. A diferencia de otros estudios, en este se utilizó la vía intrarterial. Sorprendentemente, 6 de los pacientes diabéticos tipo 2 que recibía insulina, redujeron la necesidad de insulina (datos no publicados). Este resultado puede explicarse como consecuencia de: a) disminución de la inflamación asociada, b) disminución de la resistencia a la insulina, o c) un efecto directo sobre la producción de insulina pancreática. Dada la composición de la suspensión celular empleada y de la inyección localizada, las hipótesis a y b parecen las más plausibles. La suspensión celular contenía una mezcla de tipos celulares. Los candidatos a poseer un efecto terapéutico son los progenitores endoteliales CD34+/CD133+ que pueden promover el efecto revascularizador observado, y las células mesenquimales, por sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores.

El presente ensayo clínico pretendió estudiar el efecto de la terapia con células mononucleadas de médulas ósea, células CD133+ de médula ósea y células mesenquimales de tejido adiposo, sobre las citoquinas inflamatorias, la resistencia a la insulina y la disminución de las necesidades de insulina, además de evaluar la seguridad, viabilidad y eficacia de la inyección intraarterial de células madre en pacientes diabéticos tipo 2.

6.6 Objetivos del ensayo clínico

6.6.1 Objetivo Principal

- Estudiar comparativamente el efecto de la terapia celular sobre las citoquinas inflamatorias, la resistencia a la insulina y la disminución de las necesidades de insulina, mediante la administración de células mononucleares de médula ósea, células progenitoras endoteliales CD133+ de médula ósea y células mesenquimales de tejido adiposo, todas ellas de origen autólogo, en pacientes diabéticos insulín-dependientes, con isquemia crítica crónica, no revascularizables.
- Evaluar la seguridad, viabilidad y eficacia de la inyección intraarterial de estas terapias en pacientes diabéticos

6.7. Plan de desarrollo del ensayo clínico

6.7.1 Diseño del ensayo

Se diseñó un ensayo clínico fase I/II, prospectivo, multicéntrico, abierto, randomizado y controlado.

Los pacientes, fueron aleatorizados en los siguientes grupos:

- Grupo A: Células mesenquimales troncales adultas autólogas de tejido adiposo expandidas.
- Grupo B: Células mononucleares troncales adultas autólogas de médula ósea no expandidas CD133+.
- Grupo C: Células mononucleares troncales adultas autólogas de médula ósea no expandidas.
- Grupo D: Tratamiento convencional.

6.7.2 Cronograma

Según el diseño del ensayo, el paciente debía acudir al menos a 9 visitas durante todo el ensayo, tal como se expone en la Tabla 1

Tabla 1 Cronograma del ensayo clínico

VISITAS	V1.1: Selección	V1.2: Aleatorización Basal	V2: Extracción	V3: Infusión	V4: 24 horas	V5: 1 mes (±3 días)	V6: 3 meses (±3 días)	V7: 6 meses (±7 días)	V8: 9 mese (±7 días)	V9: 12 meses (±7 días)
Firma consentimiento informado	X									
Criterios inclusión/exclusión	X	X								
Aleatorización		X								
Extracción de muestra			X							
Infusión celular CMMo o CD133 ⁺			X							
Infusión celular CeTMA ^d				X						
Historia médica enfermedad de base, datos demográficos, historial medicamentoso	X									
Signos vitales de exploración física (tensión arterial, medidas antropométricas)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Perfiles glucémicos		X	X			X	X	X	X	X
Hemoglobina glicosidada		X	X			X	X	X	X	X
"Mixed meal" test		X				X				
Necesidades de insulina		X	X			X	X	X	X	X
Prueba de embarazo		X								
Marcadores de stress oxidativo, proinflamatorios y de resistencia a insulina		X				X	X	X	X	X
Moléculas anti-inflamatorias		X				X	X	X	X	X
Factores de crecimiento vascular		X				X	X	X	X	X
Rutherford-Becker	X	X					X	X		
ABI	X	X				X	X	X		X
Medida de úlcera	X	X				X	X	X		X
Clasificación de Texas	X	X				X	X	X		X
Fondo de ojo	X						X	X	X	X
Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)	X							X		X
Hematología	X	X				X	X	X	X	X
Bioquímica	X	X				X*	X	X	X	X
Coagulación						X	X	X	X	X
Test de trombofilia		X								
Polimorfismos: gen ECA, ApoE	X									
Serología VUH, Hepatitis B, Hepatitis C	X									

VISITAS	V1.1: Selección	V1.2: Aleatorización Basal	V2: Extracción	V3: Infusión	V4: 24 horas	V5: 1 mes (±3 días)	V6: 3 meses (±3 días)	V7: 6 meses (±7 días)	V8: 9 mese (±7 días)	V9: 12 meses (±7 días)
Análisis de orina	X				X	X	X	X	X	X
Angiografía, escala de vascularización				X						
Presión transcutánea de oxígeno	X	X				X	X	X	X	X
Score de dolor- método EVA		X				X	X	X	X	X
Walking test	X	X				X	X	X		X
Perímetro gemelar	X	X					X	X		X
Temperatura del miembro	X	X					X	X		X
Clínica neuropatía	X	X					X	X		X
Funcionalidad de progenitores endoteliales circulantes: CD34 ⁺ /CD133 ⁺			X							
Muestras de suero /ADN			X							
Determinación ecográfica de grosor de la íntima media (GIM)		X								X
Marcador hepático de resistencia a GGT		X				X			X	X
Medicación concomitante	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Final de estudio										X

Hemograma: hematíes, hemoglobina, hematocrito, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y VSG (velocidad de sedimentación glomerular).

Bioquímica: glucosa, creatinina, filtrado glomerular mediante MDRD, microalbuminuria, HbA1c, péptido C, colesterol total, LDL, HDL y VLDL colesterol, triglicéridos, Lipoproteína A, Apolipoproteína A1 y B100, Vitamina B12, ácido fólico, PCR ultrasensible, proteínas totales, albúmina, sodio, potasio, GOT (AST), GPT (ALT), homocisteína.

Coagulación: tiempo de protrombina (TP) y tiempo parcial de tromboplastina (PTT) y fibrinógeno.

Marcadores de estrés oxidativo, proinflamatorios y de resistencia a insulina: TNF-alfa, Interleukinas: IL-1α, IL-1ra,, IL-6, IL-15, IL-1β; IL-12p40, IL-12p70, IFN-γ, Quemoquinas: MCP-1, PCR ultrasensible., Angiotensina II, Resistina, RBP-4 (retinol binding protein type 4).

Moléculas antiinflamatorias: Adiponectina, IL-10 .

Factores de crecimiento vascular: VEGF: Factor del crecimiento del endotelio vascular, IGF-1: Insulin Growth Factor tipo 1.

Marcadores proinflamatorios en isquemia arterial periférica: Anticuerpos anti beta 2 glicoproteína.

Marcador hepático de resistencia a insulina: Gamma glutamil transferasa (GGT).

* En esta visita no será necesaria la realización de: colesterol total, LDL, HDL y VLDL colesterol, triglicéridos, Lipoproteína A, Apolipoproteína A1 y B100, Vitamina B12, ácido fólico7.3.

6.8 Métodos estadísticos

El procesamiento de los datos, así como el análisis estadístico ha sido realizado por Sermes CRO.

Se ha realizado un análisis descriptivo de todas las variables demográficas recogidas, así como de los datos clínicos previos al inicio del tratamiento. Las variables cualitativas han sido expresadas como frecuencias absolutas y porcentaje, mientras que las variables cuantitativas se han presentado mediante media, mediana, desviación típica, máximo, mínimo y número de observaciones.

Aunque en el Plan de Análisis de Datos se afirma que el análisis inferencial se llevará a cabo mediante técnicas no paramétricas, el alto número de valores perdidos, no registrados, no valorables o no disponibles y de la existencia de ninguno o pocos pacientes con datos disponibles en algunas de las visitas (inclusive a nivel basal) hace que no se lleve a cabo ningún análisis inferencial puesto que en la gran mayoría de las variables no hay pacientes ni datos que garanticen que las variables tengan variabilidad y por lo tanto, opción de ser comparadas. Además, en el grupo control sólo se dispone de datos de un paciente (dado que el paciente EC10A10 discontinúa el estudio por AAG), lo cual impide la realización de comparaciones entre grupos. Por lo tanto, únicamente se ha podido realizar un estudio descriptivo (medias y desviaciones típicas para las variables cuantitativas y número de casos y porcentaje para las variables cualitativas) de cada una de las variables, así como el número de valores perdidos en cada visita en cada grupo y en función del tipo de población analizada (ITT y PP).

Las variables de seguridad evaluadas fueron el número y porcentaje de pacientes que abandonan el estudio debido a los acontecimientos adversos, pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso, acontecimientos adversos más frecuentes y pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso grave. Se ha calculado con un intervalo de confianza del 95%.

NOTA: para una información más detallada de los resultados expuestos en el presente informe consultar el Informe Estadístico v1.0 con fecha de 13/08/2018

6.8.1 Descripción de las poblaciones de análisis:

El análisis de eficacia se llevó a cabo en la **Población por Intención de Tratar (ITT)**. Se define la Población por Intención de Tratar como “todos los sujetos que hayan recibido infusión celular (CD133+, CMMo y CeTMAd)”. La población ITT también incluye los casos que incumplan el protocolo. Y en la **Población por Protocolo (PP)**, la cual se define como “todos los sujetos que hayan completado el ensayo clínico de acuerdo con el protocolo, incluidos aquellos que se retiren en cualquier momento después de la infusión celular, así como los asignados a grupo control”.

“La Población de Seguridad (PS) consta de todos los sujetos que hayan recibido infusión celular (CD133+, CMMo y CeTMAd) así como los asignados a grupo control.”

6.8.2 Análisis de Seguridad:

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

6.8.3 Codificaciones:

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

6.8.4 Paquete estadístico:

Para el análisis de datos se usó el paquete estadístico SPSS versión 21.0.

6.8.5 Determinación del tamaño de la muestra:

No se ha efectuado cálculo del tamaño del muestral. El tamaño muestral se ha basado en criterios clínicos, a fin de obtener información significativa sobre la seguridad y factibilidad al mismo tiempo que se minimiza la exposición innecesaria del sujeto.

7. POBLACIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO

La población prevista era de 48 pacientes diabéticos clínicamente evaluables con isquemia crónica crítica de al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización. Finalmente, no fue posible alcanzar la “n” prevista, incluyéndose 20 pacientes que fueron aleatorizados a los 4 grupos previstos, resultando la siguiente distribución:

Grupo	N
A Células mesenquimales troncales adultas autólogas de tejido adiposo expandidas	8
B Células mononucleares troncales adultas autólogas de médula ósea no expandidas CD133 ⁺	6
C Células mononucleares troncales adultas autólogas de médula ósea no expandidas.	3
D Tratamiento convencional	3

1. Selección

La selección de los pacientes fue realizada entre los pacientes atendidos en la Unidad de Isquemia crítica del Hospital de San Lázaro de Sevilla. 120 pacientes, aceptaron participar en el ensayo clínico y firmaron los consentimientos informados; sin embargo, tras la realización de las pruebas establecidas en el protocolo, 81 de los pacientes fueron fallos de selección, por no cumplir los criterios de inclusión o presentar alguno de exclusión, no pudiendo ser aleatorizados. Independientemente de esto, tras la firma del consentimiento otros 19 pacientes no pudieron ser aleatorizados por los motivos que se recogen en la Tabla2. Finalmente, sólo 20 pacientes fueron aleatorizados.

La figura 1 recoge indica el flujo de pacientes incluidos en el estudio:

B. DISPOSICIÓN DE LOS SUJETOS DE ENSAYO

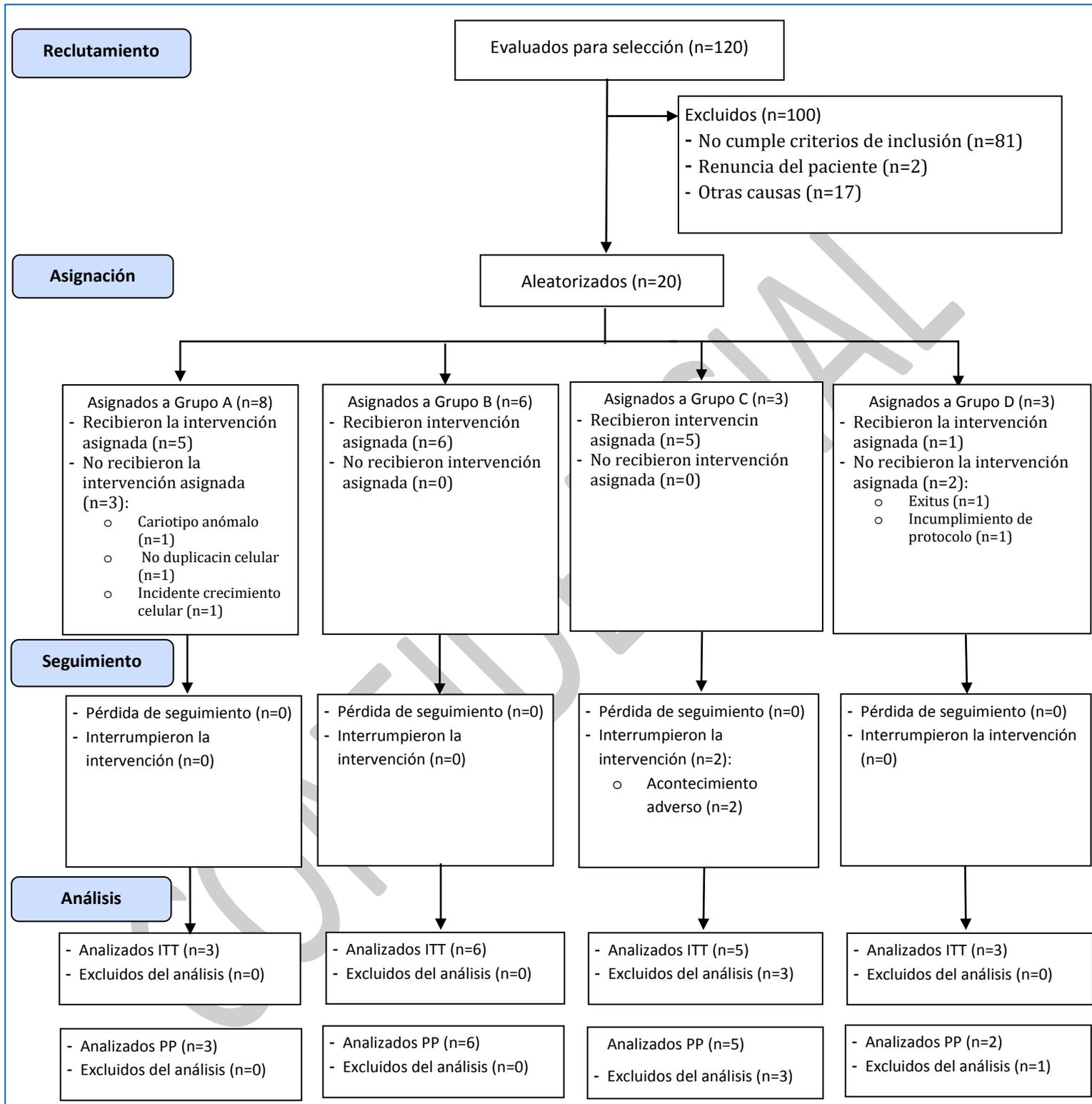


Figura 1. Disposición de sujetos de estudio

Fallos de selección	N pacientes
Criterio de inclusión No cumplido	
Nº2. Diabético tipo 2, en tratamiento con insulina al menos 3 meses previos	1
Nº 4. Imposibilidad de revascularización quirúrgica o endovascular	1
Nº7. Parámetros bioquímicos y de médula ósea normales	2
Criterio de exclusión presentado	
Nº 7 genotipo DD de la ECA o genotipo E4 de la apo E	72
Nº 9 Índice de masa corporal > 40kg/m ² .	4
Nº 18 Anemia (Hemoglobina <7,9 g/dl).	1
Retirada previa a aleatorización	N pacientes
Renuncia a participar	2
AAG	1
Cierre prematuro del ensayo (sin confirmación del cumplimiento o no de los criterios de inclusión)	16

Tabla 3. Fallos de selección y retiradas

1. Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión/retirada del estudio y abandonos.

Se han incluido pacientes diabéticos con isquemia crónica crítica en al menos un miembro inferior y sin posibilidades de revascularización.

Criterios de inclusión:

- Edad ≥ 18 y ≤ 85 años.
- Diabético tipo 2, en tratamiento con insulina al menos 3 meses previos.
- Enfermedad vascular infrapoplíteica aterosclerótica de grado severo (pacientes con categoría Rutherford-Becker ≥ 4) mono o bilateral. Se define la isquemia crítica del pie como dolor persistente/recurrente que requiere analgesia y/o úlceras no cicatrizantes presentes >4 semanas, sin evidencia de mejoría con terapias convencionales y/o walking test ente 1-6 minutos en dos ergometrías separadas al menos por 2 semanas y/o índice tobillo-brazo en reposo $<0,8$.
- Imposibilidad de revascularización quirúrgica o endovascular o fracaso en la cirugía de revascularización realizada al menos tres días antes, con persistencia o entrada en fase isquemia crítica.
- Expectativa de vida > 2 años.
- No se prevé amputación mayor en ninguno de los miembros en los próximos 6 meses tras la inclusión.
- Parámetros bioquímicos y de médula ósea normales.
- Leucocitos ≥ 3000 .
- Neutrófilos ≥ 1500 .
- Plaquetas ≥ 140000 .
- AST/ALT $\leq 2,5$ rango estándar institución.
- Creatinina $\leq 2,5$ mg/dl y aclaración de creatinina ≤ 30 ml/min (MDRD4).
- Las mujeres en edad fértil deberán tener resultado negativo en una prueba de embarazo realizada en el momento de la inclusión en el estudio y comprometerse a usar un método anticonceptivo médicamente aprobado mientras dure el estudio.
- Pacientes que den su Consentimiento Informado por escrito para la participación en el estudio.
- Pacientes que no hayan participado en otro ensayo clínico en los 3 últimos meses antes de la inclusión.

Criterios de exclusión:

1. Antecedente de neoplasia o enfermedad hematológica (enfermedad mieloproliferativa, síndrome mielodisplásico o leucemia) en los últimos 2 años.
2. Amputación mayor previa.
3. Pacientes con hipertensión arterial incontrolada (definida como tensión arterial >180/110 en más de una ocasión).
4. Insuficiencia cardiaca severa (NYHA IV) o Fracción de Eyección del ventrículo izquierdo (FE) inferior al 30%.
5. Pacientes con arritmias ventriculares malignas o angina inestable.
6. Diagnóstico de trombosis venosa profunda en los 3 meses previos.
7. Pacientes con genotipo DD de la ECA o genotipo E4 de la Apo E.
8. Terapia concomitante con oxígeno hiperbárico, sustancias vasoactivas, agentes contra angiogénesis o inhibidores Cox-II. Se permite el uso de agentes antiplaquetarios.
9. Índice de masa corporal > 40kg/m².
10. Pacientes con el diagnóstico de alcoholismo en el momento de la inclusión.
11. Retinopatía proliferativa sin posibilidad de tratamiento.
12. Nefropatía diabética con hemodiálisis.
13. Enfermedad concomitante que reduzca la expectativa de vida a menos de 1 año.
14. Imposibilidad prevista para obtener aspirado de 100 ml de médula ósea.
15. Infección por VIH, Hepatitis B o Hepatitis C.
16. Dificultad en el seguimiento.
17. ACV o infarto de miocardio en los últimos 3 meses.
18. Anemia (Hemoglobina <7,9 g/dl).
19. Pacientes previamente tratados con terapia celular.

Criterios de retirada del tratamiento o de la evaluación:

Los pacientes interrumpirán su participación en el ensayo clínico si se produjera alguna de las siguientes situaciones:

- En caso de no haber podido recibir el tratamiento asignado por no alcanzar el volumen final y concentración óptima de la suspensión celular. En estos casos el IP ha sido el encargado de decidir si el paciente fue infundido o no y por tanto si continúa o no en el ensayo. Los pacientes tratados con dosis inferiores a las previstas en el protocolo han sido incluidos en el análisis de seguridad, pero no en el análisis de eficacia por protocolo.
- Presencia de un acontecimiento adverso grave anterior a la infusión de las células madre que a juicio del investigador y/o promotor haya podido poner en peligro la seguridad del paciente o interferir en la interpretación de los resultados del ensayo clínico.
- Condiciones clínicas del paciente que hayan impedido su continuidad.
- Cuando el paciente no ha cooperado o no ha cumplido los requerimientos del estudio.
- Cuando el investigador haya considerado que la salud del paciente ha estado comprometida debido a reacciones adversas, enfermedades concomitantes o cualquier otra circunstancia que se haya prestado durante el estudio.
- Infección activa o gangrena húmeda el día de infusión de las células.
- Por acontecimiento(s) adverso(s) grave(s), siempre que a juicio del investigador principal y promotor haya (n) supuesto un riesgo para la vida del paciente la continuidad en el ensayo.
- Valor(es) anómalos de laboratorio, siempre que a juicio del investigador principal y promotor haya supuesto un riesgo para la vida del paciente la continuidad en el ensayo.

- Resultado(s) anormal(es) de los procedimientos de las pruebas.
- Efecto terapéutico insatisfactorio.
- Violación del protocolo.
- Paciente ha retirado el consentimiento informado.
- Pérdida del seguimiento.

Interrupción del ensayo:

El estudio sería interrumpido en cualquiera de las siguientes situaciones:

- Toxicidad grave relacionada con la infusión en 2/12 pacientes.
- Infecciones graves relacionadas con el proceso en >2/12 pacientes.
- Mortalidad relacionada con el procedimiento ≥ 1 paciente.
- Falta de inclusión de un mínimo de 4 pacientes en los primeros 12 meses desde su aprobación y distribución.

Aleatorización

Se trata de un ensayo abierto, por lo que no procede enmascaramiento. La aleatorización se llevó a cabo en la Unidad de Coordinación siguiendo el listado generado por un sistema de aleatorización restrictivo asignado por bloques de 12, para un tamaño total de la muestra de 48. La asignación de la aleatorización se realizó mediante la tabla: "The Rand Corporation, A Million Random Digits with 100.000 Normal Deviates (New York: The free Press, 1995)".

Finalmente se han aleatorizado un total de 20 pacientes distribuidos según los siguientes grupos (acorde al análisis estadístico), que fueron los que pudieron ser analizados:

- **Grupo experimental:**
 - **Grupo de aleatorización A:** 8 pacientes.
 - **Grupo de aleatorización B:** 6 pacientes.
 - **Grupo de aleatorización C:** 3 pacientes.
- **Grupo de aleatorización D:** 3 pacientes.

2. Período previo a la asignación aleatoria

Tras la firma del consentimiento informado, se realizaron las pruebas analíticas necesarias para la confirmación de los criterios de selección. Entre ellas, se incluía la determinación de la presencia de genotipo DD de la ECA o genotipo E4 de la apo E. Debido a que el polimorfismo genético de la apolipoproteína E y el polimorfismo inserción/delección (I/D) de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) están asociados a un mayor riesgo vascular y en concreto aquellos individuos con el genotipo DD de la ECA o el genotipo E4 de la apo E, se excluyó en la selección inicial a estos pacientes para evitar este factor de confusión en el análisis de los resultados. La realización de esta determinación, que fue realizada en el hospital de Osuna y en Cabimer, provocó por una parte un retraso en la aleatorización de pacientes, y por otra, a la exclusión de 72 de los pacientes que firmaron el consentimiento. En total, 81 de los pacientes fueron fallos de selección, por no cumplir los criterios de inclusión o presentar alguno de exclusión. Otros 19 pacientes no pudieron ser aleatorizados por los motivos que se recogen en la Tabla2. Finalmente, sólo 20 pacientes fueron aleatorizados (Figura 1).

El periodo de tiempo establecido por protocolo tanto en la versión inicial del mismo, como en la enmienda número 1, durante el cual se debían realizar todas las pruebas necesarias para confirmar que los pacientes cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se demostró muy insuficiente, dando lugar por este motivo a desviaciones del protocolo en todos los pacientes. Este hecho fue considerado un Incumplimiento grave, su repetición llevó al promotor a plantear la realización de una enmienda al protocolo, para lo cual, solicitó al equipo investigador información y justificación sobre el máximo periodo de tiempo de validez de las pruebas diagnósticas, de modo que, sin poner en riesgo la seguridad de los pacientes ni la integridad de los datos, se pudiera facilitar el reclutamiento de pacientes y el cumplimiento del protocolo. Estas consultas, y las reuniones organizadas por el promotor, generaron la

enmienda 2 al protocolo con fecha 1 de abril de 2014. Tras la aprobación de la enmienda y hasta el cierre del ensayo clínico no se aleatorizó ningún otro paciente.

3. Periodos posteriores a la asignación

Tras la aleatorización no se produjeron pérdidas de seguimiento en los 20 pacientes aleatorizados, aunque si una elevada tasa de datos faltantes y desviaciones de protocolo, que han imposibilitado la obtención de resultados concluyentes tras el análisis de los datos.

C. CARACTERÍSTICAS BASALES

1. Edad y sexo

Tal como se recoge en el apartado 7 (Tabla 2), la distribución por edad y sexo es homogénea entre los grupos de aleatorización, con una proporción mayor de hombres que de mujeres en todos los grupos (70/30 %), como reflejo de la incidencia de la patología en la población general.

Grupo	Hombre		Mujer		Edad (mediana, min, max)
	N	%	N	%	
A	6	75.0	2	25.0	64,5 (45-77)
B	4	66.7	2	33.3	61,5 (49-73)
C	2	66.7	1	33.3	73 (70-77)
D	2	66.7	1	33.3	78 (63-79)
Total	14	70.0	6	30.0	

2. Características basales específicas del estudio

No se observaron diferencias significativas entre los grupos en las características basales específicas, como los requerimientos de insulina. Respecto a los factores de riesgo cardiovascular, los datos de consumo de alcohol y tabaco carecen de interés. Como era de esperar, todos los pacientes estudiados presentaron antecedentes de enfermedad cardiovascular.

D. CRITERIOS DE VALORACIÓN.

1.- Definiciones de los criterios de valoración

El estudio se ha llevado a cabo en pacientes diabéticos con isquemia crítica crónica del miembro inferior mono o bilateral y sin posibilidad de revascularización.

Se ha evaluado el efecto de la terapia celular mediante diferentes tipos de células como ya se ha explicado anteriormente, siendo la variable principal del estudio los cambios en los requerimientos de insulina (dosis total de insulina/día). Además, como variables secundarias se han evaluado los cambios en el estado endocrino, citoquinas inflamatorias, el grado de neovascularización (angio/arteriogenesis y vasculogenesis) y los cambios en el estado vascular a los 6 meses de la administración intraarterial de los 3 compuestos celulares estudiados.

El análisis de eficacia se realizó en la Población por Intención de Tratar (ITT) y en la Población por Protocolo (PP).

Finalmente, sin tener en cuenta los valores perdidos, el análisis de eficacia se realizó en los siguientes pacientes:

Grupo	Población	
	ITT	PP
A	EC10A03	EC10A03

	EC10A07	EC10A07
	EC10A17	EC10A17
	EC10A20	EC10A20
B	EC10A02	EC10A02
	EC10A12	EC10A12
	EC10A14	EC10A14
	EC10A16	EC10A16
	EC10A18	EC10A18
	EC10A19	EC10A19
C	EC10A04	EC10A04
	EC10A08	EC10A08
	EC10A13	EC10A13
D	EC10A10	EC10A10
	EC10A15	EC10A15
	EC10A06	

NOTA: los pacientes EC10A01, EC10A05, EC10A09 y EC10A11, no se incluyeron en este análisis debido a que no fueron infundidos. Además, en la PP se excluyó al paciente EC10A06 por incumplimiento de protocolo. Debido a la escasez de datos disponibles, no ha realizado ningún análisis inferencial. Aunque se exponen en este informe los criterios de evaluación, lamentablemente, el número de datos faltantes en el seguimiento de los pacientes a lo largo del ensayo, y la escasa población, han hecho imposible obtener resultados del análisis, o incluso realizar el análisis previsto, por lo que, el informe final se ha visto reducido casi en su totalidad a un análisis descriptivo.

2.- Criterio de valoración nº1. Cambios en los requerimientos de insulina

Los datos disponibles no consiguen demostrar que los diferentes tipos de tratamientos administrados afecten a las necesidades de insulina dado que el porcentaje de datos perdidos es elevado.

3.- Criterio de valoración nº2. Evaluación del estado endocrino.

Además de las necesidades de insulina, el protocolo recoge la evaluación de los cambios en el perfil glucémico (valoración de los perfiles glucémicos antes y 2 horas después de desayuno, almuerzo y cena lo cual permitiría estimar además si la dosis de insulino terapia es la adecuada), la hemoglobina glicosilada (HbA1c), la reserva pancreática (a través de la determinación del Péptido C y el "Mixed meal" test. consistente en la toma de 10Kcal/kg de peso de un compuesto líquido con una proporción de 45% de carbohidratos, 40% de grasa y 15 % de proteínas y posterior medición de Péptido C a los 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, y los indicadores de resistencia a la insulina, a través de la realización del clamp euglicémico hiperinsulinémico, HOMA y los parámetros TG/HDL-c; CGT hepáticos.

4.- Criterio de valoración nº3. Evaluación del estado inflamatorio.

Los parámetros evaluados en esta sección han sido: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, MCP-1, PCR ultrasensible, angiotensina II, resistina, RBP-4, adiponectina, IGF-1, VEGF. Dada la escasez de la información disponible, solamente se observa desde el punto de vista descriptivo que hay diferencias a lo largo del tiempo en el caso RBP-4. Adiponectina e IGF-1, permanecen más o menos constantes hasta los 3 meses (en pacientes con información disponible).

5.- Evaluación del estado vascular.

La evaluación del estado vascular se ha evaluado con: Escala Rutherford-Becker, polimorfismos genéticos Apo E/ECA, antecedentes de amputaciones en extremidades inferiores, índice de tobillo-brazo (ABI), medida de la úlcera en el miembro diana y Clasificación de Texas, presión transcutánea de oxígeno, perímetro gemelar, angiografía y escala de

vascularización, walking test, score dolor, temperatura del miembro y determinación ecográfica del grosor de la íntima media (GIM) carotídea.

De ninguno de los parámetros analizados ha sido posible obtener conclusiones ni intra ni intergrupos, no observándose cambios en la Presión transcutánea del oxígeno, índice tobillo-brazo, o en el perímetro gemelar o la temperatura del miembro. Respecto al Score de dolor en reposo, la información correspondiente a la escala EVA se ha evaluado en ambas poblaciones, PP e ITT, y en ambos miembros, diana y contralateral. Los resultados disponibles muestran que en la población ITT en todos los grupos hay un descenso de dolor a lo largo del tiempo en el miembro diana. No obstante, el número de datos perdidos no permite establecer una conclusión clara. El Test de la marcha (Walking test), también se ha evaluado esta variable en la población PP e ITT y en ambos miembros (diana y contralateral), sin embargo, en ninguno de los casos se dispone de datos del grupo control. Por tanto, la falta de datos no permite establecer conclusiones sobre esta variable.

6.- Cuantificación del grado de neovascularización

El grado de neovascularización se ha evaluado por angiografía mediante el programa “Metamorph Image System”: Esta variable no ha sido evaluada en el grupo control. Debido a esto, las poblaciones ITT y PP coinciden en este caso. La Tabla 3 muestra los resultados de angiografía para ambas poblaciones (ITT y PP).

Área	Grupo	Infusión				6 meses			
		Límite inferior	Media	Límite superior	Valores perdidos	Límite inferior	Media	Límite superior	Valores perdidos
Área total de los tubos (TTA)	A	8052.76	9384.58	10716.40	5	7202.91	8304.88	9406.85	6
	B	6412.81	7626.42	8840.03	3	7616.74	8557.63	9498.51	4
	C	9782.32	10143.88	10505.43	1	9770.25	10394.50	11018.76	1
Puntos de ramificación (BP)	A	8.62	13.67	18.71	5	6.21	10.50	14.79	6
	B	4.00	8.08	12.16	3	10.72	14.13	17.53	4
	C	26.00	28.75	31.50	1	11.15	14.75	18.36	1
Segmentos (S)	A	183.50	238.00	292.50	5	144.73	185.00	225.28	6
	B	132.15	176.67	221.18	3	191.80	235.88	279.95	4
	C	347.96	375.88	403.80	1	230.12	264.63	299.14	1
Longitud total del tubo (TLL)	A	1586.74	1953.40	2320.06	5	1966.72	2248.28	2529.84	6
	B	1775.40	2090.92	2406.44	3	2124.87	2382.89	2640.90	4
	C	2492.12	2602.69	2713.26	1	2744.72	2914.51	3084.30	1

Tabla 4. Angiografía (poblaciones ITT y PP)

7. Evaluación de la seguridad

El análisis de seguridad se ha realizado en la Población de Seguridad definida como “todos los sujetos que hayan recibido infusión celular (CD133+, CMMo y CeTMAd) así como los asignados a grupo control”.

7.1 Criterio de Valoración: Seguridad durante el procedimiento y durante el seguimiento

Para el análisis de seguridad se han evaluado las posibles complicaciones derivadas del procedimiento en las primeras 24 horas tras la administración de las células madre y la incidencia de Acontecimientos Adversos Graves y no graves relacionados con el Medicamento en investigación o en el procedimiento de administración a lo largo de todo el seguimiento.

Los pacientes EC10A09, EC10A11 fueron excluidos del análisis de seguridad porque no reciben el tratamiento. El paciente EC10A11 sufrió un AAG moderado de reagudización de la isquemia crítica del pie izquierdo. No relacionado.

El paciente EC10A09 tuvo un AAG moderado consistente en una insuficiencia cardíaca congestiva descompensada. No relacionado. En el presente estudio determinados pacientes no ha sido infundidos por lo que no se incluyen dentro de esta población. Estos pacientes excluidos de este análisis son: EC10A01, EC10A05, EC10A09 y EC10A11. Finalmente, se han incluido los siguientes pacientes:

Grupo	Población de seguridad
A	EC10A03 EC10A07 EC10A17 EC10A20
B	EC10A02 EC10A12 EC10A14 EC10A16 EC10A18 EC10A19
C	EC10A04 EC10A08 EC10A13
D	EC10A10 EC10A15 EC10A06

E: ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

La Tabla 5 presentada a continuación ofrece el listado de Acontecimientos Adversos registrados.

1.- Información sobre AA

- **Pacientes que han sufrido al menos un Acontecimiento Adverso:** ha habido un total de 12 pacientes en los que se ha registrado al menos un AA. A continuación, se resumen los pacientes en cada grupo y el número de AA registrados en cada paciente:
 - **Grupo A:** EC10A03 (1 AA), EC10A07 (1 AA) y EC10A17 (1 AA). Estos AA representan un 18.75% del total de los pacientes de la PS (16).
 - **Grupo B:** los pacientes EC10A02 (3 AA), EC10A12 (2 AA), EC10A14 (1 AA) y EC10A16 (2 AA). Estos AA representan un 25.00% del total de los pacientes de la PS (16).
 - **Grupo C:** los pacientes: EC10A04 (1 AA); EC10A08 (1 AA) y EC10A13 (3 AA). Estos AA representan un 18.75% del total de los pacientes de la PS (16).

- **Grupo D:** EC10A10 (2 AA) y EC10A15 (1 AA). Estos AA representan un 12.50% del total de los pacientes de la PS (16). **Acontecimientos Adversos más frecuentes:** Se observa que el Acontecimiento Adverso más frecuente es el dolor en una extremidad (código PT 10033425), el cual ha ocurrido 5 ocasiones en 5 pacientes diferentes, suponiendo un total de 29.41% del total de acontecimientos adversos acaecidos en el ensayo clínico. El resto de los acontecimientos adversos tienen la misma frecuencia, es decir, han ocurrido en una ocasión.
- **Pacientes que han experimentado al menos un Acontecimiento Adverso Grave:** en la población de seguridad un total de 5 pacientes han sufrido al menos un AAG (tabla 7). A continuación, se resumen los pacientes en cada grupo y el número de AAG registrados en cada paciente:
 - **Grupo A:** EC10A07 (1 AA). Estos AAG representan un 6.25% del total de los pacientes de la PS (16).
 - **Grupo B:** los pacientes EC10A02 (2 AA), EC10A12 (1 AA), EC10A14 (1 AA). Estos AAG representan un 18.75% del total de los pacientes de la PS (16).
 - **Grupo D:** EC10A10 (1 AA). Estos AAG representan un 6.25% del total de los pacientes de la PS (16).

2.- Codificación y Notificación de acontecimientos adversos graves

- **Reacciones Adversas Graves e Inesperadas:** en el presente estudio, no se han presentado Reacciones Adversas Graves e Inesperadas.
- **Acontecimientos Adversos Graves (AAG):** en la Tabla 6 se muestran los AAG. Se han producido un total de 6 AAG en la Población de Seguridad (35.29% del total de los AA). Un dato a tener en cuenta es que en el Grupo C no se ha reflejado ningún AAG.
- **Acontecimientos Adversos Graves ocurridos en las 24 h tras la administración del tratamiento:** no se han registrado Acontecimientos Adversos Graves en las 24 horas tras la administración del tratamiento.
- **Pacientes que abandonan el estudio debido a los Acontecimientos Adversos:** se han dado dos casos en los grupos A y D que abandonan el estudio debido a un Acontecimiento Adverso:
 - **Grupo A:** paciente EC10A07 debido a un *“ingreso en UCI tras evolución tórpida postcirugía bocio multinodular”*.
 - **Grupo D:** paciente EC10A10 debido a *“ACV grave en el contexto de enfermedad grave cardiovascular. Exitus”*.

Tabla 5. Acontecimientos Adversos.

Grupo	Paciente	Acontecimiento Adverso (AA)	Grave	Severidad	Relación	Nº de AA (% por paciente)	Nº de AA (% sobre el total de AA)
A	EC10A03	Aumento de leucocitos, neutrófilos y VSG	No	Leve	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A07	Ingreso en UCI tras evolución tórpida postcirugía bocio multinodular	Sí	Grave	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A17	Refiere dolor moderado en MII	No	Leve	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
B	EC10A02	Anemia aguda	Sí	Moderado	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A02	Dolor en ambas piernas y cansancio por encontrarse en ayunas	No	Leve	No relacionado	1 (50.0%)	2 (11.74%)
		Scacest anterior evolucionado Killip III	Sí	Moderado	No relacionado	1 (50.0%)	
	EC10A12	IAM no Q apical con disfunción sistólica	Sí	Grave	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
		Dolor de carácter articular en tobillo izdo.	No	Leve	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A14	Absceso pie derecho	Sí	Moderado	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A16	Pesadez en miembros inferiores	No	Leve	No relacionado	1 (50.0%)	2 (11.74%)
Dolor ocasional en miembro inf derecho		No	Leve	No relacionado	1 (50.0%)		
C	EC10A04	Implantación de stent no liberador de droga en enf de un vaso	No	Moderado	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A08	Dolor en 4º dedo MII, edema, calambres ocasionales y punzadas en reposo	No	Leve	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
	EC10A13	Ciatalgia derecha	No	Moderado	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)
D	EC10A10	Gripe	No	Leve	No relacionado	1 (50.0%)	2 (11.74%)
		ACV grave en el contexto de enfermedad grave cardiovascular	Sí	Grave	No relacionado	1 (50.0%)	
	EC10A15	Episodios de hipotensión	No	Leve	No relacionado	1 (100%)	1 (5.88%)

Tabla 5. Acontecimientos Adversos

Grupo	Paciente	Código SOC	SOC	Código PT	PT	Verbatim	Severidad	Relación con el medicamento
B	EC10A02	10005329	Trastornos de la sangre y del sistema linfático	10002034	Anemia	Anemia aguda	Moderado	No relacionado
		10007541	Trastornos cardiacos	10051592	Síndrome coronario agudo	Scasest anterior evolucionado Killip III	Moderado	No relacionado
	EC10A12	10007541	Trastornos cardiacos	10000891	Infarto agudo de miocardio	IAM no Q apical con disfunción sistólica	Grave	No relacionado
	EC10A14	10021881	Infecciones e infestaciones	10050473	Absceso en extremidad	Absceso pie derecho	Moderado	No relacionado
A	EC10A07	10022117	Lesiones traumáticas, intoxicaciones y complicaciones de procedimientos terapéuticos	10058046	Complicación post-intervención	ingreso en UCI tras evolución tórpida postcirugía bocio mutinoquiar	Grave	No relacionado
	EC10A09	10038738	Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos	10013968	Disnea	Disnea progresiva	Moderado	No relacionado
	EC10A11	10047065	Trastornos vasculares	10034576	Isquemia periférica	AAG antes de infusión isquémica crítica de pie izq que precisa de intervencionismo	Grave	No relacionado
D	EC10A10	10047065	Trastornos vasculares	10008190	Accidente cerebrovascular	ACV grave en el contexto de enfermedad grave cardiovascular	Grave	No relacionado

Tabla 6. Acontecimientos Adversos Graves en todos los pacientes

Tabla 7. Acontecimientos Adversos Graves (AAG).

Grupo	Paciente	Acontecimiento Adverso Grave (AAG)	Severidad	Relación	Nº de AAG (% por paciente)	Nº de AAG (% sobre el total de AAG)
A	EC10A07	Ingreso en UCI tras evolución tórpida postcirugía bocio multinodular	Grave	No relacionado	1 (100%)	1 (16.67%)
B	EC10A02	Anemia aguda	Moderado	No relacionado	1 (50.0%)	2 (33.33%)
		Scasest anterior evolucionado Killip III	Moderado	No relacionado	1 (50.0%)	
	EC10A12	IAM no Q apical con disfunción sistólica	Grave	No relacionado	1 (100%)	1 (16.67%)
	EC10A14	Absceso pie derecho	Moderado	No relacionado	1 (100%)	1 (16.67%)
D	EC10A10	ACV grave en el contexto de enfermedad grave cardiovascular	Grave	No relacionado	1 (100%)	1 (16.67%)

Tabla 7. Acontecimientos Adversos Graves en la población de seguridad

Conclusiones de seguridad

En el presente estudio no se han producido acontecimientos adversos relacionados con la administración del producto celular ni con el procedimiento de extracción ni infusión. Podemos concluir que el uso de cualquiera de los tratamientos investigados presenta un buen perfil de seguridad.

F: INFORMACIÓN ADICIONAL

1.- Modificaciones globales sustanciales

A lo largo del ensayo se han realizado 2 enmiendas al protocolo. A continuación, se detallan los cambios de las enmiendas:

Enmienda Nº1: 15 de agosto de 2011, con las siguientes modificaciones:

- Actualización en el procedimiento de obtención de las células de la médula ósea, tanto mononucleadas como CD133⁺:
- Inclusión de una prueba clínica en el protocolo. Se incorpora el uso de Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) en 3 visitas para un mejor seguimiento del estado general del paciente.

Las dificultades de inclusión de pacientes y desarrollo del ensayo llevaron a promotor y equipo investigador a someter a revisión el protocolo y eliminar aquellas pruebas de las cuales no se obtuviera una información necesaria para alcanzar los objetivos del ensayo. Además, se acordó revisar la vigencia de los resultados de las pruebas (su caducidad), para alargar en lo posible el plazo permitido desde su realización a la aleatorización de los pacientes, evitando así las desviaciones del protocolo. Para todo ello, fue necesario realizar una nueva enmienda al protocolo (Enmienda 2 de diciembre de 2014). Dicha enmienda suponía una versión simplificada del protocolo inicial, aunque mantenía la "n" de 48 pacientes prevista inicialmente.

Enmienda Nº2: de 1 de abril de 2014, con las siguientes modificaciones fundamentales:

1. Cambio del Director técnico del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla.
2. Cambios en el equipo investigador y actualización de la CRO.
3. Cambio en la redacción de los objetivos, en la redacción de las variables del ensayo.
4. Ampliación del periodo de reclutamiento.
5. Unificación del orden de referencia de los 4 grupos de tratamiento.
6. Modificación de criterios de retirada.
7. Modificación del plan de visitas.
8. Aclaración de la fecha de realización de las visitas 3 y 4.
9. Supresión de ciertos parámetros del test de trombofilia y del perfil lipídico.
10. Especificación de las determinaciones que se realizarán como marcadores del estrés oxidativo dentro de la evaluación del estado inflamatorio.
11. Supresión o sustitución de algunas pruebas/procedimientos por ser considerados inviable y no aportar datos a la consecución de los objetivos del ensayo clínico.
12. Supresión de la prueba AngioTAC.
13. Actualización de los parámetros cuantitativos más relevantes que se extraerán de la Angiografía mediante MetaMorph.
14. Eliminación de la función plaquetaria.
15. Eliminación del Clamp euglicémico hiperinsulínico.
16. Ampliación del periodo de ventana en la visita de selección hasta 3 meses (en lugar de 1 que establecía el protocolo vigente).
17. Sustitución de Retinografía por Fondo de ojo.
18. Cambios en la evaluación neuropatía diabética.
19. Cambios de Retinografía por Fondo de ojo.
20. Generación de un modelo de ratificación del otorgamiento del consentimiento informado para la participación en el ensayo clínico.

2.- Interrupciones globales y reanudaciones

El ensayo clínico objeto de este Informe fue finalizado antes de alcanzar el reclutamiento previsto, a pesar de las distintas ampliaciones del periodo de reclutamiento tramitadas por el promotor. El protocolo original, de 25 de enero de 2011, aprobado por el Comité de ética y la AEMPS, establecía una población de 48 pacientes, clínicamente evaluables, con un periodo de reclutamiento de 6 meses. No obstante, el primer paciente se incluyó en septiembre de 2011, cuando ya se había presentado la primera enmienda al protocolo (de 15 de agosto de 2011), en la que se seguía considerando el reclutamiento de los 48 pacientes en 6 meses. Finalmente, fue necesario ampliar de nuevo el periodo de reclutamiento, que se alargó hasta 40 meses en la enmienda 2 de diciembre de 2014, fijando la fecha fin de reclutamiento en diciembre de 2015. A pesar de ello, sólo se consiguió incluir 20 pacientes clínicamente evaluables, antes del cierre definitivo del ensayo el 30 de abril de 2015. Los datos de estos 20 pacientes son el objeto de la información recogida, analizada, y descrita en el presente Informe final.

3. Limitaciones, sesgos potenciales, imprecisiones y advertencias

Los datos recogidos en este estudio permiten comprobar que los medicamentos en investigación son seguros, dado que los acontecimientos adversos no están relacionados con los tratamientos, la extracción del material de partida o la administración de los mismos.

En lo que respecta a eficacia, los resultados son no concluyentes. El elevado número de datos faltantes y de desviaciones del protocolo ha impedido que el análisis para comprobar si hay cambios asociados al tratamiento conforme pasa el tiempo del estudio pudiera llevarse a cabo.

Desde los primeros pacientes incluidos en el ensayo se puso de manifiesto la complejidad del protocolo, fundamentalmente debido a los estrictos criterios de inclusión/exclusión, que han llevado al hecho llamativo de que 120 pacientes hayan sido incluidos en el mismo, es decir, han sido seleccionados y sometidos a una batería de pruebas tras la firma del consentimiento informado, para finalmente comprobarse que no cumplían criterios de selección en el 88% de los casos. Cabe destacar que el 61% de la población de estudio se ha excluido por polimorfismos genéticos (ApoE/ECA.). Debido a que el polimorfismo genético de la apolipoproteína E y el polimorfismo inserción/delección (I/D) de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) están asociados a un mayor riesgo vascular y en concreto aquellos individuos con el genotipo DD de la ECA o el genotipo E4 de la apo E, se decidió excluir en la selección inicial a estos pacientes para que no pudieran introducir un sesgo, y seleccionar solamente a los pacientes con el genotipo E3/E3 de la apo E así como el genotipo DI e II de la ECA. Los datos previos indicaban que, en la población general, estas características se presentaban en el 80 y 66% de la población general; sin embargo, el hecho de que el 61% de la población inicialmente seleccionada no cumpliera estos criterios, contradice los conocimientos previos.

Además, el diseño del protocolo inicial fue muy ambicioso y exigente para los servicios colaboradores, ya de por sí con una carga asistencial muy alta. Los requerimientos en cuanto a exploraciones previas a la aleatorización de los pacientes eran muy amplios, dependiendo no sólo de los servicios colaboradores del hospital reclutador, sino de un hospital colaborador en el que se llevaba a cabo el estudio genético. La batería de pruebas solicitadas en la visita de selección correspondía a los servicios de: endocrinología, hematología, oftalmología y medicina interna. Para todas estas pruebas se contaba por protocolo con 1 mes de tiempo antes de la aleatorización del paciente. La coordinación de todos los servicios implicados para cada paciente era realmente difícil, y el papel de los investigadores principales y de la Data Manager en este sentido, decisivo. La realidad fue que en ningún caso se consiguió hacerlas en el plazo previsto, produciéndose en todos ellos una desviación del protocolo.

Por otro lado, la inclusión en el diseño de 4 brazos y tres Medicamentos en Investigación, implicaba a dos laboratorios fabricantes: CABIMER en Sevilla y la Unidad de Producción Celular del Hospital Reina Sofía en Córdoba, lo que aumentó la complejidad de la coordinación.

Durante las visitas de monitorización llevadas a cabo durante el seguimiento inicial, se detectaron diversas desviaciones del protocolo, por lo que el promotor, siguiendo sus procedimientos normalizados, y en aras de velar por el cumplimiento de las BPC y para establecer las oportunas medidas correctoras, contrató una auditoría externa para este ensayo clínico, que fue realizada por la empresa TFS en enero de 2013. Tras recibir el informe de la misma, desde el promotor se propusieron al centro las acciones correctoras para resolver los hallazgos encontrados y prevenir futuras desviaciones, objetivo que no se llegó a cumplir satisfactoriamente.

En un intento de reconducir el proyecto, promotor e investigadores decidieron someter a revisión el protocolo y eliminar aquellas pruebas de las cuales no se obtuviera una información necesaria para alcanzar los objetivos del ensayo. Además, se acordó revisar la vigencia de las mismas, para alargar en lo posible el plazo permitido desde su realización a la aleatorización de los pacientes, evitando así las desviaciones del protocolo. Para todo ello, fue necesario realizar una nueva enmienda al protocolo (Enmienda 2 de diciembre de 2014). Dicha enmienda suponía una versión simplificada del protocolo inicial, aunque mantenía la “n” de 48 pacientes prevista inicialmente. La referida enmienda preveía un periodo de reclutamiento que finalizaba en diciembre de 2014, lo que suponía, teniendo en cuenta el periodo de seguimiento establecido de 12 meses para cada paciente, el fin del ensayo clínico en diciembre de 2015.

Por otro lado, el ensayo clínico recibió financiación en 2009, siendo necesaria la solicitud de prórrogas de la financiación concedida en 4 ocasiones, que fueron todas ellas autorizadas por parte de la entidad financiadora. La última resolución data del 19 de noviembre de 2013, y en ella se establece que el periodo de ejecución se prorroga de forma inaplazable hasta el 31 de diciembre de 2014, posibilitando el uso de remanentes presupuestarios hasta el 30 de junio de 2015.

A pesar de los esfuerzos realizados, después de la aprobación de dicha enmienda no se consiguió aleatorizar a ningún paciente nuevo, por lo que, tras varias reuniones entre el promotor y los investigadores, y en vista de que los datos preliminares de los 20 pacientes aleatorizados parecían sugerir que no iba a ser posible demostrar la hipótesis de partida del ensayo clínico, a saber, que el tratamiento con las terapias celular en investigación podía reducir los requerimientos de insulina en los pacientes diabéticos tipo 2, junto con el enorme coste en recursos humanos, económicos y temporales, y la posibilidad de que el protocolo del ensayo clínico por su complejidad, no fuera el óptimo para alcanzar conclusiones definitivas, llevó al equipo investigador de acuerdo con el promotor del ensayo clínico, a plantearse el siguiente plan de actuación:

1. Parada de reclutamiento con fecha 30 de mayo de 2015.
2. Realización de un análisis intermedio que permitiera tomar la decisión de continuar invirtiendo recursos en el proyecto, o realizar un cierre definitivo del ensayo clínico y replantear el protocolo de forma global para un nuevo proyecto en el que se tuviera en cuenta el aprendizaje obtenido del presente. Con este fin:
 - Se diseñó un plan de monitorización dirigida, tras el análisis de qué variables de las recogidas en el CRD tenían transcendencia real para alcanzar los objetivos del ensayo. Este plan de monitorización dirigida fue realizado a propuesta de la CRO contratada al efecto y supervisado por el departamento médico del promotor, con el acuerdo del investigador coordinador.
 - Recogida de datos de seguimiento de los pacientes antes del 15 de junio de 2015.
 - Inclusión de los datos en la base ya diseñada.
 - Emisión de queries.
 - Análisis estadístico tras la solución de las queries generadas.

3.- Análisis de la situación y toma de decisión sobre una parada temprana del ensayo o continuarlo hasta alcanzar la “n” prevista de 48 pacientes.

Finalmente, los resultados de dicho análisis que se completó hasta constituir el análisis final del ensayo, llevaron a la decisión consensuada de cierre definitivo del mismo con fecha 30 de abril de 2015, con cierre de la base de datos el 22 de abril de 2016.

Consideramos importante hacer mención a estas dificultades ya que, a pesar de los esfuerzos realizados, el hecho de que sólo se pudieran incluir 20 pacientes clínicamente evaluables, distribuidos en 4 grupos no homogéneos (8, 6, 3 y 3), hace imposible un análisis estadístico potente al menos en lo que respecta a la eficacia de cualquiera de los Medicamentos en Investigación estudiados. Los datos disponibles no consiguen demostrar que los diferentes tipos de tratamientos administrados afecten a las necesidades de insulina en pacientes diabéticos insulín-dependientes con isquemia de miembros inferiores no revascularizables.

Si, en cambio, podemos concluir que en lo que respecta al análisis de seguridad, se observa que ninguno de los acontecimientos adversos acaecidos durante el estudio tiene relación con el tratamiento, el procedimiento de extracción e infusión del producto celular. Por lo tanto, podemos concluir que el uso de cualquiera de los tratamientos investigados presenta un buen perfil de seguridad.

4. Declaración de veracidad

El promotor declara que los resultados y conclusiones presentados en este informe son veraces y se corresponden con los recogidos en los Cuadernos de recogida de Datos del ensayo que han sido monitorizados y contrastado con los datos fuente. El presente resumen es extraído del informe clínico con fecha 13 de diciembre de 2019, realizado por SERMES CRO y ratificado por IP y promotor con sus firmas, que a su vez fue redactado en base al informe estadístico V 1.0, con fecha 13 de agosto de 2018.