



Resumen del Informe Clínico Final

Ensayo Clínico Fase II, Multicéntrico, Abierto, Controlado y Aleatorizado, para valorar la eficacia de la Infusión Intra arterial de células Mononucleadas de Médula Ósea Autóloga en Pacientes Con Ictus Isquémico

(Código del protocolo: CMMo-Ictus-2013)
(EudraCT: 2013-002135-15)

17 de diciembre de 2025, versión 1.0



Red Andaluza de Diseño y
Traslación de Terapias
Avanzadas – Fundación
Pública Andaluza
Progreso y Salud



Avda. Américo Vespucio,
15, Edificio S-2
Sevilla. 41092

Documento confidencial, quedando prohibida su distribución parcial o total sin el consentimiento de la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud M.P.

[CMMo-Ictus-2013]. Resumen Informe Clínico Final, versión 1.0, (17/12/2025)

SOP-CLI-021/02-AN-02

Contenido

1. Información general del estudio.....	4
1.1. Título del estudio.	4
1.2. Código del protocolo.	4
1.3. Número EudraCT.....	4
1.4. Fase de desarrollo.....	4
1.5. Descripción.....	4
1.6. Producto de investigación.	5
1.7. Indicación terapéutica.	5
1.8. Promotor.	5
1.9. Investigador coordinador.	5
1.10. Persona (s) de contacto.	5
1.11. Fechas relevantes.	6
1.12. Cumplimentación de Buenas Prácticas Clínicas (BPC).	6
1.13. Confidencialidad.	6
2. Resumen del estudio.....	7
2.1. Promotor	7
2.2. Título del estudio.	7
2.3. Nombre del producto terminado.....	7
2.4. Nombre de la sustancia activa.	8
2.5. Investigadores.....	8
2.6. Centro (s) del estudio.....	9
2.7. Publicaciones.	9
2.8. Periodo de estudio (años-meses).	9
2.9. Fase de desarrollo del estudio.	9
3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivos primarios.....	10
3.2. Objetivos secundarios.....	10
4. Metodología.	10
5. Número de pacientes.	12
5.1. Número de pacientes planificados.....	12
5.2. Número de pacientes analizados.....	12
5.3. Subestudio de biomarcadores plasmáticos.....	13

Documento confidencial, quedando prohibida su distribución parcial o total sin el consentimiento de la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud M.P.

[CMMo-Ictus-2013]. Resumen Informe Clínico Final, versión 1.0, (17/12/2025)

SOP-CLI-021/02-AN-02

6. Diagnóstico y principales criterios de inclusión.....	13
6.1. Criterios diagnósticos.....	13
6.2. Criterios de inclusión.....	13
6.3. Criterios de exclusión.....	14
7. Producto en estudio, dosis y modo de administración, número de lote.....	15
7.1. Producto en estudio: dosis y modo de administración	15
7.2. Terapia de referencia	15
8. Duración del tratamiento.....	16
9. Criterios de evaluación.....	16
9.1. Criterios de inicio del tratamiento.....	16
9.2. Criterios de finalización de participación.....	16
9.3. Variables del estudio.....	17
9.3.1. Eficacia.....	17
9.3.2. Seguridad.....	18
10. Métodos estadísticos.....	19
10.1. Criterios de análisis.....	19
10.2. Tamaño muestral.....	21
10.3. Análisis estadístico.....	22
10.4. Datos perdidos, no utilizados o erróneos.....	24
10.5. Aleatorización.....	25
11. Resumen de los resultados.....	25
11.1. Disposición de los pacientes.....	25
11.2. Datos demográficos y otras características basales.....	28
11.3. Disposición de los pacientes que participaron en el subestudio de biomarcadores plasmáticos	30
11.4. Resultados de eficacia.....	31
11.5. Resultados de seguridad.....	36
12. Conclusiones.....	37

1. Información general del estudio.

1.1. Título del estudio.

Ensayo Clínico Fase II, Multicéntrico, Abierto, Controlado y Aleatorizado, para valorar la eficacia de la Infusión Intra arterial de células Mononucleadas de Médula Ósea Autóloga en Pacientes Con Ictus Isquémico.

1.2. Código del protocolo.

CMMo-Ictus-2013.

1.3. Número EudraCT.

EudraCT: 2013-002135-15.

1.4. Fase de desarrollo.

Fase II.

1.5. Descripción.

El presente estudio es un ensayo clínico fase II, multicéntrico, prospectivo, abierto, controlado y aleatorizado con evaluador ciego en el que se han incluido pacientes diagnosticados de ictus isquémico agudo en el territorio de la arteria cerebral media (ACM) que cumplen todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión, y que han manifestado su conformidad con la participación en el ensayo mediante la firma del consentimiento informado.

Se planeó incluir 76 pacientes (finalmente, 79 fueron incluidos, siendo aleatorizados 77 de ellos), siendo aleatorizados en proporción 2:1:1 en un grupo control que recibió únicamente tratamiento médico convencional y en dos grupos de intervención que recibieron dos dosis diferentes de células mononucleadas de médula ósea (MO) autóloga por vía intra-arterial (un grupo de dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ de células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO) por kilogramo de peso, y otro grupo de dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ de CMMo por kilogramo de peso), además de recibir el tratamiento médico convencional. Se estableció un periodo de seguimiento para los 3 grupos de 24 meses.

La aleatorización fue estratificada en función de la puntuación NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) (NIHSS de 6-13, y de 14-20), y para cada uno de los centros fabricantes: Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, y Hospital Universitario Reina Sofía. De esta manera, tendremos un grupo NIHSS de 6-13 para la Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, NIHSS de 6-13 para el Hospital Universitario Reina Sofía, NIHSS de 14-20 para la Unidad

de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, y NIHSS de 14-20 para el Hospital Universitario Reina Sofía.

Este ensayo clínico incluye un subestudio voluntario para obtener información sobre biomarcadores plasmáticos relacionados con la angiogénesis y factores de crecimiento y confirmar la modificación de los niveles de factores de crecimiento, factores de angiogénesis, factores neurotróficos, citoquinas y metaloproteinasas.

1.6. Producto de investigación.

Células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO), suspensión celular para infusión intra-arterial, en dos dosis:

- $2 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso
- $5 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso

1.7. Indicación terapéutica.

Ictus isquémico agudo en el territorio de la arteria cerebral media.

1.8. Promotor.

Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas – Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud.

Avda. Américo Vespucio 15

41092 – Isla de La Cartuja (Sevilla)

Telf.: 955 04 83 66 / 955 04 04 50

Fax: 955 267 002

1.9. Investigador coordinador.

Francisco Moniche Álvarez

Unidad de Ictus

Servicio de Neurología

Hospital Universitario Virgen del Rocío

Avda. Manuel Siurot, s/n

41013 - Sevilla

e-mail: pmoniche@gmail.com

1.10. Persona (s) de contacto.

Blanca Quijano Ruiz.

Correo electrónico: blanca.quijano@juntadeandalucia.es

1.11. Fechas relevantes.

- Fecha de autorización del estudio por el comité: 11 Nov 2013
- Fecha autorización del estudio por la AEMPS: 20 Oct 2014
- Fecha de inicio de reclutamiento: 29 Abr 2015
- Fecha de inclusión del primer paciente: 29 Abr 2015
- Fecha de fin del periodo de reclutamiento: 6 May 2021
- Fecha de inclusión del último paciente: 6 May 2021
- Fecha de fin del estudio: 14 Abr 2023

1.12. Cumplimentación de Buenas Prácticas Clínicas (BPC).

El ensayo ha sido realizado en conformidad con el protocolo siguiendo los procedimientos normalizados de trabajo del Monitor y los establecidos en los hospitales participantes.

El ensayo se ha llevado a cabo de acuerdo con las recomendaciones para Ensayos Clínicos y evaluación de producto en fase de investigación en humanos, que figuran en la Declaración de Helsinki, revisada en las sucesivas asambleas mundiales (*World Medical Association*, 2013), y la actual Legislación Española en materia de Ensayos Clínicos (Real Decreto 1090/2015). Se han seguido las normas del Consejo Internacional para la Armonización (ICH-GCP, *International Council for Harmonisation-Good Clinical Practices*) (CPMP/ICH/135/95).

El producto en investigación se ajusta a la definición de “Producto de ingeniería tisular” según lo descrito en Reglamento 1394/2007 de 13 de noviembre de 2007.

1.13. Confidencialidad.

La información de este documento es confidencial y es propiedad de la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud. Por tanto, la información no debe ser divulgada, publicada, revelada o transferida de cualquier otro modo a una tercera parte, en ninguna forma, sin consentimiento por escrito de la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud.

Sin embargo, este documento puede ser revelado a las partes asociadas con la investigación a los investigadores y potenciales investigadores, Autoridades Sanitarias nacionales y correspondientes Comités de Ética bajo la condición de que respeten su naturaleza confidencial.

El contenido de los cuadernos de recogida de datos (CRD), así como los de confidencialidad de los datos de cada paciente, será respetada en todo momento. Se han seguido los procedimientos adecuados para asegurar el cumplimiento de lo recogido en la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, así como en el Reglamento (UE) 2016/679 del

Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos.

Los documentos generados durante el estudio serán protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación y, por tanto, serán considerados estrictamente confidenciales y no serán revelados a terceros excepto a los especificados en el apartado anterior.

El investigador ha informado a los sujetos de estudio de que los datos obtenidos en el presente ensayo serán guardados y analizados por ordenador y que se seguirán las regulaciones españolas sobre el manejo de datos computarizados.

El investigador acepta que el promotor tenga el derecho a usar los resultados del ensayo clínico incluyendo hojas del CRD o copias de éste. Para permitir el uso de la información obtenida en el ensayo clínico, el investigador comprende que está obligado a suministrar los resultados completos de las pruebas y toda la información desarrollada durante el estudio al promotor.

Se mantendrá en todo momento el anonimato de los sujetos participantes en el ensayo. Los resultados o conclusiones del ensayo clínico se comunicarán prioritariamente en publicaciones científicas antes de ser divulgado al público no sanitario. No se darán a conocer de modo prematuro o sensacionalista procedimientos de eficacia aún no determinada.

2. Resumen del estudio.

2.1. Promotor

Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas – Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud.

Avda. Américo Vespucio 15

41092 – Isla de La Cartuja (Sevilla)

Telf.: 955 04 83 66 / 955 04 04 50

Fax: 955 267 002

2.2. Título del estudio.

Ensayo Clínico Fase II, Multicéntrico, Abierto, Controlado y Aleatorizado, para valorar la eficacia de la Infusión Intra arterial de células Mononucleadas de Médula Ósea Autóloga en Pacientes Con Ictus Isquémico.

2.3. Nombre del producto terminado.

Células Mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO), suspensión celular para infusión intra-arterial, $2 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.

Células Mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO), suspensión celular para infusión intra-arterial, $5 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.

2.4. Nombre de la sustancia activa.

Células Mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO).

2.5. Investigadores.

Investigador coordinador:

Francisco Moniche Álvarez
Unidad de Ictus
Servicio de Neurología
Hospital Universitario Virgen del Rocío
Avda. Manuel Siurot, s/n
41013 - Sevilla
e-mail: pmoniche@gmail.com

Investigadores principales y coinvestigadores/colaboradores:

Francisco Moniche Álvarez
Unidad de Ictus
Servicio de Neurología
Hospital Universitario Virgen del Rocío
Avda. Manuel Siurot, s/n
41013 - Sevilla
e-mail: pmoniche@gmail.com

Miguel Ángel Gamero García
Unidad de Ictus
Servicio de Neurología
Hospital Universitario Virgen de Macarena
Avda. Doctor Fedriani s/n
41071 - Sevilla
e-mail: gamero.ma@gmail.com

Eduardo Agüera Morales
Servicio de Neurología
Hospital Universitario Reina Sofía
Avda. Menéndez Pidal, s/n
14004 Córdoba

e-mail: doctoredu@gmail.com

Lucía Forero Díaz
Servicio de Neurología
Hospital Universitario Puerta del Mar
Av. Ana de Viya, 21,
11009 Cádiz
e-mail: lucia.forero.diaz@hotmail.es

2.6. Centro (s) del estudio.

Hospital Universitario Virgen del Rocío (centro fabricante)
Avda. Manuel Siurot, s/n
41013 - Sevilla

Hospital Universitario Virgen de Macarena
Avda. Doctor Fedriani s/n
41071 - Sevilla

Hospital Universitario Reina Sofía (centro fabricante)
Avda. Menéndez Pidal, s/n
14004 – Córdoba

Hospital Universitario Puerta del Mar
Av. Ana de Viya, 21,
11009 – Cádiz

2.7. Publicaciones.

Safety and efficacy of intra-arterial bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with acute ischaemic stroke in Spain (IBIS trial): a phase 2, randomised, open-label, standard-of-care controlled, multicentre trial. Francisco Moniche, Juan Antonio Cabezas-Rodriguez, Roberto Valverde et al. *Lancet Neurol.* 2023 Feb;22(2):137-146. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00526-9.

2.8. Periodo de estudio (años-meses).

8 años (Abril 2015 – Abril 2023).

2.9. Fase de desarrollo del estudio.

Fase II.

3. Objetivos.

3.1. Objetivos primarios.

Valorar la eficacia del tratamiento con células madre de médula ósea en pacientes con ictus isquémico agudo, mediante la evaluación de la recuperación funcional tras el procedimiento.

3.2. Objetivos secundarios.

- Validar la seguridad y viabilidad, previamente demostrada clínica y experimentalmente, de la inyección intra-arterial de células madre de médula ósea autólogas en pacientes con ictus isquémico agudo y déficit neurológico incapacitante, valorando la posible aparición de efectos adversos y toxicidad derivados del tratamiento.
- Evaluar los cambios producidos tras el tratamiento, con neuroimagen estructural (Resonancia Magnética), tanto del tamaño del infarto como de la atrofia perilesional.
- Confirmar la relación observada en el estudio piloto entre el número de CD34+ infundidas y el índice de Barthel.
- Subestudio de biomarcadores plasmáticos: Confirmar la modificación de los niveles séricos de factores de crecimiento, factores de angiogénesis, factores neurotróficos, citoquinas y metaloproteinasas.

4. Metodología.

Se trata de un ensayo clínico en fase II controlado, prospectivo, aleatorizado y abierto con evaluador ciego. Consta de 3 brazos:

- Grupo control: Sin intervención.
- Grupo experimental 1: Células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO) a una dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.
- Grupo experimental 2: Células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO) a una dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.

Todos los brazos recibieron el tratamiento estándar convencional para la enfermedad.

En la visita 1 (Inclusión), el paciente potencialmente apto para el estudio fue informado de los objetivos del estudio y de los requisitos globales. Se obtuvo el consentimiento informado antes de cualquier evaluación específica del estudio. A continuación, se realizó al paciente una evaluación clínica y analítica, para asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión.

Los pacientes asignados a terapia regenerativa recibieron el tratamiento experimental objeto del ensayo en la visita 2 (día 0). A todos los pacientes de los grupos experimentales se les practicó una punción de cresta iliaca bajo anestesia local para extraer médula ósea, que fue procesada según protocolo descrito para obtener las células madre. El mismo día o al día siguiente, dependiendo del centro, se

procedió al implante intra-arterial de las células mononucleadas teniendo en cuenta que la infusión intra-arterial debía hacerse dentro de los primeros 7 días tras el ictus. Para ello, se cateterizó la arteria cerebral media ipsilateral al infarto cerebral con un microcatéter a través del cual se infundió la suspensión celular a una velocidad de 0.5-1 ml/min.

El estudio consta de diferentes visitas de seguimiento para la evaluación clínica y de seguridad tras la administración de la terapia, llevándose a cabo un seguimiento hasta la visita 9 (24 meses tras infusión). En ellas, se toman datos como los signos vitales, determinaciones analíticas, electrocardiograma (ECG), escalas NIHSS, Rankin modificado y Barthel, datos sobre rehabilitación, acontecimientos adversos, o resonancia magnética (RM) craneal.

Este ensayo clínico tiene un subestudio voluntario destinado a obtener información sobre biomarcadores plasmáticos y confirmar la modificación de los niveles de factores de crecimiento, factores de angiogénesis, factores neurotróficos, citoquinas y metaloproteinasas. Esto tuvo lugar en los siguientes tiempos del estudio:

- Determinación basal (previo a la administración de CMMo, visita 1, día 0).
- Determinación post-administración de CMMo (4 y 7 días después del procedimiento, o de la firma del consentimiento si ha sido asignado al grupo control).
- Determinación a los 3 meses desde inicio del ictus (visita 6, 180 días).

De esta manera, este subestudio, cuenta con 4 mediciones por paciente (días 0, 4, 7 y 180) de 5 paneles Olink con 92 biomarcadores plasmáticos cada uno, aproximadamente. Los paneles utilizados fueron:

- Panel CARDIOMETABOLIC (v.3601)
- Olink CARDIOVASCULAR II (v.5002)
- Olink CARDIOVASCULAR III (v.6101)
- Olink INFLAMMATION (v.3004)
- Olink NEUROLOGY (v.8001)

Para cada paciente del subestudio, finalmente se procesaron 460 biomarcadores plasmáticos mediante 5 paneles Olink en 4 momentos respecto al tratamiento asignado: Basal (día 0), Día 4, Día 7 y Día 180. Los paneles Olink utilizados en el subestudio de biomarcadores plasmáticos se encuentran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Paneles Olink utilizados en el subestudio de biomarcadores plasmáticos

Paneles Olink utilizados en el subestudio de biomarcadores plasmáticos				
Panel Olink	Versión	Área biológica	Número de marcadores	Marcadores
CARDIOMETABOLIC	v.3601	Cardio-metabólico	92	1 - 92

Documento confidencial, quedando prohibida su distribución parcial o total sin el consentimiento de la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud M.P.

[CMMo-Ictus-2013]. Resumen Informe Clínico Final, versión 1.0, (17/12/2025)

SOP-CLI-021/02-AN-02

CARDIOVASCULAR II	v.5002	Cardiovascular II	92	93 - 184
CARDIOVASCULAR III	v.6101	Cardiovascular III	92	185 - 276
INFLAMMATION	v.3004	Inflamación	92	277 - 368
NEUROLOGY	v.8001	Neurología	92	369 - 460

5. Número de pacientes.

5.1. Número de pacientes planificados

El diseño previsto por el protocolo estableció que se reclutarían 76 pacientes con ictus isquémico agudo en el territorio de la arteria cerebral media que cumplan los criterios de inclusión. Estos serían aleatorizados en proporción 2:1:1 en un grupo control (el cual no recibió ningún tratamiento o intervención como parte del estudio, recibiendo únicamente tratamiento estándar convencional) y en dos grupos de intervención que recibieron células mononucleadas de médula ósea autóloga por vía intra-arterial a dos dosis distintas, además del tratamiento estándar convencional.

- Grupo control: 38 pacientes
- Grupos experimentales: Células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO).
 - o Grupo experimental 1: 19 pacientes recibirían una dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.
 - o Grupo experimental 2: 19 pacientes recibirían una dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.

La aleatorización fue estratificada en función de la puntuación NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) (NIHSS de 6-13, y de 14-20), y para cada uno de los centros fabricantes: Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, y Hospital Universitario Reina Sofía. De esta manera, tendremos un grupo NIHSS de 6-13 para la Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, NIHSS de 6-13 para el Hospital Universitario Reina Sofía, NIHSS de 14-20 para la Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, y NIHSS de 14-20 para el Hospital Universitario Reina Sofía.

5.2. Número de pacientes analizados

79 pacientes fueron reclutados, 2 de los cuales fueron fallos de screening (1 por incumplimiento de criterios y 1 por imposibilidad de extracción de médula ósea y procesamiento el mismo día).

Los 77 restantes fueron aleatorizados:

- Grupo control: 38 pacientes. De ellos, 31 completaron el estudio. Discontinuaron el estudio 7 pacientes por: fallecimiento (4), pérdida de seguimiento (1), desviación mayor (1) o retirada del consentimiento (1).
- Grupo experimental con una dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ del producto en investigación: 20 pacientes. Todos ellos completaron el estudio.
- Grupo experimental con una dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$: 19 pacientes. De ellos, 16 completaron el estudio. Discontinuaron el estudio 3 pacientes por: fallecimiento (2) o pérdida de seguimiento (1).

Hubo 1 paciente que no llegó a ser infundido con el tratamiento experimental por problemas técnicos (Sujeto: EC17-D-02, tratamiento asignado $2 \times 10^6 \pm 10\%$), dicho paciente se analiza en seguridad asociado al grupo control.

Todos los pacientes aleatorizados fueron analizados en eficacia por intención de tratar (según el tratamiento asignado) y en seguridad (según el tratamiento recibido: 38, 20 y 19). De entre estos, los 67 pacientes que completaron el seguimiento se analizaron además por protocolo correcto.

5.3. Subestudio de biomarcadores plasmáticos

Para el subestudio de biomarcadores plasmáticos, de los 77 pacientes aleatorizados en el estudio principal (38, 20 y 19; controles, $2 \times 10^6 \pm 10\%$ y $5 \times 10^6 \pm 10\%$, respectivamente), 21 realizaron el subestudio de biomarcadores plasmáticos (10, 7 y 4; controles, $2 \times 10^6 \pm 10\%$ y $5 \times 10^6 \pm 10\%$, respectivamente).

6. Diagnóstico y principales criterios de inclusión.

6.1. Criterios diagnósticos

La población de estudio corresponde a pacientes adultos de ambos sexos con diagnóstico de ictus isquémico agudo en el territorio de la arteria cerebral media.

6.2. Criterios de inclusión.

1. Pacientes de ambos sexos con edad comprendida entre 18 y 80 años.
2. Diagnóstico clínico y radiológico de infarto isquémico en territorio de arteria cerebral media (ACM) después de 24 horas de inicio y con no más de 7 días después de la aparición de los síntomas.
3. Diagnóstico radiológico de infarto cerebral por resonancia magnética (RM) y permeabilidad de ACM confirmada por angio resonancia magnética (angioTC o arteriografía).
4. Escala de déficit neurológico de NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*) de más de 6 puntos y hasta 20 en el momento de la inclusión.

5. Pérdida de fuerza de al menos 2 puntos en ítems motores en NIHSS excepto en los casos de afasia pura.
6. Pacientes que otorguen su consentimiento informado para la participación en el ensayo clínico o consentimiento informado obtenido del representante legal del paciente participante en el ensayo clínico o el consentimiento de la persona vinculada a ella por razones familiares o de hecho.

6.3. Criterios de exclusión.

1. Incapacidad o contraindicación para el examen angiográfico.
2. Ictus hemorrágico o infarto con transformación hemorrágica sintomática.
3. Pacientes cuyo déficit neurológico actual sea secundario a un infarto lacunar.
4. Empeoramiento en la escala de NIHSS de 4 puntos o más en las 24 horas previas a la inclusión, atribuible a edema y/o hemorragia cerebral o sospecha de desarrollo de infarto maligno de arteria cerebral media.
5. Situación de coma, con puntuación de 2 o 3 puntos en el ítem 1a de la escala NIHSS.
6. Imposibilidad o contraindicación para la realización de RM.
7. Pacientes con tumores malignos o con tumores benignos en los últimos cinco años excepto carcinoma basocelular.
8. Puntuación en la escala de Rankin modificada previa al ictus mayor o igual a 2.
9. Enfermedades neuro-degenerativas.
10. Insuficiencia cardíaca descompensada o aguda
11. Coexistencia de enfermedad hematológica severa.
12. Contraindicación para la punción de médula ósea.
13. Pacientes con oclusión carotídea o estenosis crítica carotídea ipsilateral (estenosis carotídea > de un 70%) serán excluidos.
14. Coagulopatías.
15. Insuficiencia hepática.
16. Insuficiencia renal moderada (creatinina mayor de 2 mg / dl).
17. Enfermedades concomitantes graves.
18. Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia, o en edad fértil que no estén usando un método anticonceptivo eficaz. Se considera una mujer en edad fértil a todas las mujeres desde los 18 años y hasta un año después de la última menstruación en el caso de mujeres menopáusicas. Se describe como método anticonceptivo efectivo aquel método anticonceptivo oral (que combine estrógenos con gestágenos) o de otro tipo como, por ejemplo, un anticonceptivo hormonal inyectable, implantable o en parche, DIU o esterilización quirúrgica.
19. Pacientes que estén actualmente participando o hayan finalizado su participación en un ensayo clínico en un periodo inferior a 3 meses.

7. Producto en estudio, dosis y modo de administración, número de lote.

7.1. Producto en estudio: dosis y modo de administración

El producto en estudio es una suspensión de células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO), en dos dosis diferentes (2 millones $\pm 10\%$, o 5 millones $\pm 10\%$ de células/kg de peso), en solución Ringer Lactato suplementada con 2,5% glucosa y 1% albúmina.

Las células se obtuvieron mediante una punción de cresta ilíaca bajo anestesia local más sedación para extraer médula ósea que se procesó según protocolo descrito para obtener las células madre. La médula ósea del paciente se obtuvo mediante aspiraciones repetidas sobre la cresta ilíaca posterior. El procesamiento de la MO consistió únicamente en la eliminación de plasma, hematíes y granulocitos, obteniéndose exclusivamente las células mononucleadas (CMN-MO). El procedimiento se realizó mediante una centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque densidad 1077. Las CMNs obtenidas se transfirieron a un tubo de plástico estéril de 50 ml que se centrifugó. El pellet celular se resuspendió en el mismo tubo con medio de envasado consistente en solución Ringer Lactato suplementada con 2,5% glucosa y 1% albúmina. Las células resuspendidas en medio de envasado se almacenaron en dos jeringas estériles de 10 ml cada una (acondicionamiento primario). Las jeringas fueron adecuadamente cerradas con tapones luer-lock de plástico estériles que se etiquetaron de manera individual y a su vez se introdujeron en bolsas de plástico estériles de cierre por rotación (acondicionamiento secundario) que fueron etiquetadas convenientemente. Una vez el medicamento fue recibido en el lugar de administración, la persona encargada de la recepción del medicamento comprobó la llegada correcta del mismo y procedió a la firma del registro correspondiente. Si el medicamento se encontraba en óptimas condiciones, se procedía a su inmediata administración al paciente por parte del especialista asignado.

En condiciones normales, el producto celular se infundía inmediatamente al paciente. Si por alguna circunstancia era preciso la conservación del producto durante un cierto periodo de tiempo, esta se realizó a 2-8°C en un frigorífico con registro gráfico permanente de temperatura y anotada la hora de entrada y salida del medicamento de dicho equipo.

El tratamiento en investigación se administró en una única dosis al inicio del estudio. Para ello, se cateterizó la arteria cerebral media ipsilateral al infarto cerebral con un microcatéter, a través del cual se infundió la suspensión celular a una velocidad de 0.5-1 ml/min.

7.2. Terapia de referencia

El tratamiento estándar de un paciente con ictus, basado en las recomendaciones de las guías de práctica actualizadas, lo recibieron todos los pacientes incluidos en el ensayo. Estas guías se basan en el protocolo establecido en el centro en ese momento. En el caso de los participantes asignados al grupo control, recibieron el tratamiento estándar sin realizar ningún tipo de tratamiento experimental.

8. Duración del tratamiento

Para aquellos pacientes que recibieron el tratamiento en investigación, este fue administrado en una única dosis al inicio del estudio. Para ello, se cateterizó la arteria cerebral media ipsilateral al infarto cerebral con un microcatéter, a través del cual se infundió la suspensión celular a una velocidad de 0.5-1 ml/min.

9. Criterios de evaluación.

9.1. Criterios de inicio del tratamiento.

Aquellos pacientes de ambos sexos con ictus isquémico agudo en el territorio de la arteria cerebral media que cumplieran los criterios de selección y hayan firmado (o, en su nombre, su representante legal) el consentimiento informado, fueron susceptibles de ser asignados a alguno de los grupos que recibieron el producto en investigación (CMMo/CMN-MO).

Dichos pacientes aleatorizados a alguno de los grupos que recibieron el producto en investigación (CMMo/CMN-MO) lo recibieron en una única dosis al inicio del estudio.

9.2. Criterios de finalización de participación.

Se define como retirada la situación en que un paciente incluido finaliza su participación en el ensayo clínico antes de completar las visitas indicadas en el protocolo, independientemente de las circunstancias.

Los pacientes interrumpieron su participación en el ensayo clínico en caso de que se produjera alguna de las siguientes situaciones:

1. Presencia de acontecimiento adverso grave desde la inclusión del paciente en el estudio (firma del consentimiento informado) hasta la infusión de las CMMo que, a juicio del investigador o del promotor, pueda poner en riesgo la seguridad del paciente o afecte a los resultados del ensayo.
2. Condiciones clínicas del paciente que impidan su continuidad.
3. Además, los sujetos pudieron ser retirados del estudio por las siguientes razones:
 - Cuando el paciente no coopere o no cumpla los requerimientos del estudio.
 - Retirada del consentimiento por parte del paciente.
 - Pérdida de seguimiento del paciente.

Se registró en el CRD la fecha y el motivo por el que un sujeto interrumpe su participación en el ensayo clínico, debiendo notificarse inmediatamente al monitor la circunstancia de la discontinuación y si ésta ha sido un Acontecimiento Adverso Grave.

En los sujetos que hubieran discontinuado el estudio como consecuencia de acontecimientos adversos recibieron un tratamiento alternativo adecuado, el investigador debió registrar el motivo de la discontinuación del estudio, facilitar o programar un seguimiento adecuado (si es necesario) de estos sujetos y documentar la evolución del estado del sujeto. También fueron registradas todas las medicaciones administradas hasta el momento de la discontinuación en el apartado de medicación concomitante del CRD.

El paciente tenía derecho de discontinuar el estudio en el momento que lo deseara, y cualquier paciente podía ser retirado del estudio por cualquier motivo beneficioso para su bienestar.

Si la retirada era debida a un acontecimiento adverso grave, los pacientes tenían que ser controlados por el investigador o su designado hasta la finalización adecuada, es decir, hasta que desapareciera el acontecimiento adverso o hasta que se determinara que es permanente.

9.3. Variables del estudio.

9.3.1. Eficacia.

Variable principal

La variable principal del estudio fue la proporción de pacientes que alcanzan la independencia funcional (escala modificada de Rankin 0-2) después de 6 meses del tratamiento.

Variables secundarias

Constituyen variables secundarias de eficacia:

- Mejora en la escala de NIHSS entre el momento basal y los 3 y 6 meses, y entre los dos grupos, control y experimental.
- Independencia en la escala de Barthel (Barthel>90) entre el momento basal y los 3 y 6 meses, y entre los dos grupos, control y experimental.
- Volumen de infarto (difusión en RM)-Volumen final del infarto (Recuperación de la inversión atenuada de fluido (FLAIR) en RM) a los 180 días entre los dos grupos, control y experimental.
- Proporción de pacientes con puntuación en la escala modificada de Rankin 0-3 a los 6 meses del tratamiento.
- Análisis de la escala modificada de Rankin a los 6 meses del tratamiento como escala categorizada (*shift analysis*).

Además, este ensayo clínico tiene un subestudio voluntario (solo para aquellos pacientes que hayan dado su consentimiento a participar en él) para obtener información sobre biomarcadores plasmáticos y confirmar la modificación de los niveles séricos de factores de crecimiento, factores de angiogénesis, factores neurotróficos, citoquinas y metaloproteinasas. Las determinaciones plasmáticas de este subestudio incluyeron el análisis de los siguientes biomarcadores:

- Factores angiogénicos: Angiopoyetina-2 (ANG-2), bFGF, Factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF), HGF, Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), Inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP)-1, TIMP-2, Peroxidasa tiroidea (TPO), VEGF.
- Factores neurotróficos y de crecimiento: Factor de crecimiento epidérmico (EGF), HGH, Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), β -NGF, BDNF, Factor neurotrófico ciliar (CNTF), Neurotrofina-3 (NT3), Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1).
- Citoquinas: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), Factor derivado de células estromales 1 beta (SDF-1 β).
- Metaloproteinasas: Metaloproteinasas de la matriz (MMP)-9, MMP-2.

Sin embargo, finalmente se realizaron 5 paneles Olink con 92 biomarcadores plasmáticos cada uno.

Los paneles utilizados fueron:

- Panel CARDIOMETABOLIC (v.3601)
- Olink CARDIOVASCULAR II (v.5002)
- Olink CARDIOVASCULAR III (v.6101)
- Olink INFLAMMATION (v.3004)
- Olink NEUROLOGY (v.8001)

Para cada paciente del subestudio, finalmente se procesaron 460 biomarcadores plasmáticos mediante 5 paneles Olink en 4 momentos respecto al tratamiento asignado: Basal (día 0), Día 4, Día 7 y Día 180. Los paneles Olink utilizados en el subestudio de biomarcadores plasmáticos se encuentran en la **Tabla 1**.

9.3.2. Seguridad.

Variables primarias

Constituyen variables primarias de seguridad:

- Acontecimientos adversos
- Determinaciones de laboratorio del medicamento en investigación: se obtendrán alícuotas de la suspensión celular infundida a cada uno de los pacientes con los siguientes fines:
 - Cultivo microbiológico.
 - Celularidad total infundida.
 - Determinación de la composición celular en cuanto al contenido en progenitores inmaduros, progenitores de línea endotelial, progenitores de línea mesenquimal y expresión de moléculas de adhesión. También se determinará la contaminación de

hematíes en el contenido celular. Previo al estudio de marcadores, se determinará la viabilidad celular.

- Determinaciones de laboratorio del paciente:
 - Hemograma: hematíes, hemoglobina, hematocrito, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas.
 - Estudio de coagulación plasmática.
 - Bioquímica general: glucosa, urea, creatinina, sodio, calcio, potasio, GOT, GPT, bilirrubina.

Variables secundarias

Constituyen variables secundarias de seguridad:

- Mortalidad
- Tumorigénesis
- Hemorragia cerebral
- Convulsiones
- Registro de constantes vitales (TA, FC), parámetros analíticos (hemograma, ionograma, función renal, bioquímica) y presencia de complicaciones relacionadas con los procedimientos del ensayo (punción de cresta iliaca, cateterismos) además del registro de acontecimientos adversos.

10. Métodos estadísticos.

10.1. Criterios de análisis.

Se planificó realizar dos análisis estadísticos:

- Un análisis estadístico intermedio: Se llevó a cabo cuando aproximadamente el 90% de los pacientes del estudio realizaron la visita de seguimiento de 6 meses, con el objetivo de generar evidencia científica sobre la eficacia y seguridad del producto.
- Un análisis estadístico final: En él se analizaron y compararon los datos de los pacientes entre los grupos experimentales y el grupo control. Este análisis ha tenido lugar cuando todos los pacientes terminaron su seguimiento.

Los métodos estadísticos planificados para el análisis de eficacia en el protocolo fueron los siguientes: las variables principales de eficacia se iban a analizar mediante la comparación de los datos correspondientes a la condición basal y seguimiento mediante el test t-test para muestras pareadas si la variable cumple los requisitos de normalidad y mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas en otro caso. El test de la t-student no pareada se utilizaría para comparar las medias procedentes de grupos independientes (grupo de dosis 1, grupo de dosis 2 y grupo control).

Sin embargo, cuando se desarrolló el Plan de Análisis Estadístico (SAP) (antes de realizar el análisis estadístico) se establecieron los siguientes análisis:

- Dado que la variable respuesta primaria es binaria (éxito: mRS 0-2 versus fracaso: mRS 3-6), la comparación del efecto del tratamiento entre grupos será estimada mediante regresión logística binaria con enlace identidad a los 6 meses desde la intervención. Como medida del efecto clínico se calculará la diferencia común de proporciones de éxito entre los grupos, acompañada de su intervalo de confianza del 95% para evaluar la precisión de la estimación, calculado según el método de Wald. Como medida de impacto clínico se estimará la Odds ratio entre los grupos de tratamiento (cociente de éxitos/fracasos entre pares de grupos de tratamiento), acompañada de su intervalo de confianza del 95%, mediante regresión logística binaria estándar (es decir, con enlace logit).
- Las variables respuesta secundarias de tipo binario como la independencia en la escala de Barthel (Barthel>90) a los 3 y 6 meses y la puntuación en la escala modificada de Rankin 0-3 a los 6 meses, serán analizadas siguiendo la misma metodología aplicada a la variable primaria incluido las tablas modelo.
- La mejora en la escala de NIHSS desde el momento basal hasta los 3 y 6 meses, será evaluada como cuantitativa mediante un modelo lineal mixto generalizado (GLMM en sus siglas en inglés) que incluye la medición basal de la escala, así como, las mediciones repetidas postratamiento, adecuando su distribución (gaussiana/no gaussiana) y las correlaciones entre mediciones. La medida del efecto será la diferencia de medias ajustadas entre grupos a los 3 y 6 meses junto con su intervalo de confianza del 95% y nivel de significación mediante el método de Wald.
- El volumen final del infarto (FLAIR en RM) medido a los 6 meses, al ser una variable cuantitativa con elevada dispersión y potenciales outliers sin medidas repetidas, será analizada mediante regresión cuantil para comparar las medianas (y cuartiles) entre grupos de tratamiento. La medida del efecto será la diferencia de medianas ajustadas (y cuartiles), acompañadas del IC del 95%.
- La escala modificada de Rankin a los 6 meses del tratamiento como escala categorizada (shift analysis), al ser una variable categórica ordinal, se realizará mediante regresión logística ordinal. Como medida del efecto, las Odds ratio comunes entre grupos de tratamiento y su IC95%. Opcionalmente se probará a colapsar las categorías de respuesta 5-6 en la categoría 5.
- El mantenimiento neurológico será evaluado mediante las escalas mRS 0-2 y Barthel>90, pero a los 12 y 24 meses, y serán analizadas siguiendo la misma metodología aplicada a la variable primaria.
- La cantidad de CD34+ infundidas será el factor explicativo en la regresión simple sobre la respuesta funcional con la puntuación total de la escala Barthel a los 3 y 6 meses. Las pendientes de la recta en cada grupo de tratamiento será la medida del efecto y la comparación de pendientes mediante la prueba F de ANOVA la que marque la significación estadística entre grupos.

- Los niveles plasmáticos de citoquinas y factores de crecimiento del subestudio de biomarcadores plasmáticos, serán analizados como la puntuación total de la escala NIHSS.

Los métodos estadísticos planificados para el análisis de seguridad fueron los siguientes: se estableció calcular el número y porcentaje de pacientes que abandonan el estudio debido a acontecimientos adversos, los pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso, los acontecimientos adversos más frecuentes y los pacientes que han experimentado al menos un acontecimiento adverso grave. Se estableció calcular además el intervalo de confianza al 95%.

Por otro lado, en el protocolo se especifican los factores que serían incluidos para el análisis, estos factores se utilizan para realizar la estratificación por subgrupos tras la aleatorización. Están estratificadas por la puntuación NIHSS (NIHSS en rango de 6-13, y de 14-20, inclusive en ambos casos) y por la unidad de producción celular (HUVR vs HURS), dando lugar a cuatro estratos:

- NIHSS en rango de 6-13 y centro producción HUVR.
- NIHSS en rango de 14-20 y centro producción HUVR.
- NIHSS en rango de 6-13 y centro producción HURS.
- NIHSS en rango de 14-20 y centro producción HURS.

Se planteó estudiar la influencia de los factores puntuación NIHSS y centro de producción celular mediante modelos de clasificación binaria, como la regresión logística. Para las variables de eficacia, se estableció realizar análisis de subgrupos incluyendo los factores fijos de estratificación: puntuación basal NIHSS (2 categorías) y unidad de producción celular (2 categorías). Los acontecimientos adversos con mayor incidencia (al menos un 5%) serán resumidos en cada uno de los 4 grupos de estratificación.

10.2. Tamaño muestral.

Basados en el estudio piloto previo (DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.659409), se calculó que era necesario incluir 68 pacientes, asumiendo una probabilidad de que el tratamiento sea igual al control era el 18% y la probabilidad de que el control sea inferior al tratamiento era el 30%. Asumiendo un 12% de pérdidas, el número final de pacientes necesario a incluir es de 76.

- Grupo control: 38 pacientes
- Grupo experimental: Células mononucleadas adultas autólogas de médula ósea no expandidas (CMMo/CMN-MO).
 - Grupo experimental 1: 19 pacientes recibirían una dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.
 - Grupo experimental 2: 19 pacientes recibirían una dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ de células /kg de peso.

10.3. Análisis estadístico.

Los análisis del estudio se realizaron considerando tres poblaciones:

- Población por protocolo (PPC): incluye a todos aquellos pacientes que han sido reclutados para el presente estudio, cumplen todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión y han seguido las indicaciones del ensayo, han completado el plan de tratamiento, sin producirse ninguna desviación mayor del protocolo ni haber presentado criterios de retirada.
- Población por intención de tratar (ITT): consta de todas aquellos pacientes que han sido incluidos en el presente estudio, cumplan o no los criterios de selección y han sido aleatorizados.
- Población de seguridad (PS): consta de todas aquellos pacientes que han sido aleatorizados a cualquiera de los tres grupos de aleatorización y hayan recibido el medicamento en investigación.

En el análisis descriptivo las variables cualitativas se expresan mediante frecuencias absolutas y porcentajes, mientras que las cuantitativas se resumen con el número de observaciones, valores faltantes, media, desviación estándar, mediana, percentiles 25 y 75, mínimo y máximo.

Para el análisis estadístico se utilizó el software R (version 4.4.2).

Análisis de eficacia

Se ha realizado sobre la población de pacientes aleatorizados (ITT, N=77) y pacientes que completan seguimiento (PPC, N=67) asociando cada paciente a su tratamiento asignado.

- La variable primaria de eficacia es binaria (éxito: mRS 0-2 vs fracaso: mRS 3-6). La comparación entre tratamientos se ha realizado mediante regresión logística binaria con enlace identidad a los 6 meses. Se ha calculado la diferencia común de proporciones de éxito entre grupos con su intervalo de confianza al 95% (método de Wald) como medida del efecto clínico. Además, se ha estimado la odds ratio entre grupos con su intervalo de confianza al 95%, mediante regresión logística estándar con enlace logit, como medida del impacto clínico.
- Las variables respuesta secundarias binarias, como la independencia en la escala de Barthel (>90) a los 3 y 6 meses, y la escala Rankin modificada (0-3) a los 6 meses, se analizaron con la misma metodología aplicada a la variable primaria, incluyendo las tablas modelo.
- La mejora en la escala NIHSS desde el momento basal hasta los 3 y 6 meses se evaluó como variable cuantitativa mediante modelos lineales mixtos generalizados (GLMM), que incorporaron la medida basal y las mediciones postratamiento, ajustando la distribución y la correlación entre mediciones. El efecto se expresó como diferencia de medias ajustadas entre grupos, con intervalos de confianza al 95% y significación estadística mediante el método de Wald.
- El volumen final del infarto (FLAIR en RM) a los 6 meses, dado su carácter cuantitativo con alta dispersión y posibles valores atípicos, se analizó usando regresión cuantil para comparar

medianas y cuartiles entre grupos, reportando diferencias ajustadas con su intervalo de confianza al 95%.

- La escala Rankin modificada categorizada a los 6 meses se analizó mediante regresión logística ordinal (shift analysis), estimando odds ratios comunes entre grupos y sus intervalos de confianza del 95%.
- El mantenimiento neurológico, evaluado con mRS 0-2 y Barthel >90 a los 12 y 24 meses, se analizó siguiendo la misma metodología aplicada a la variable primaria.
- El análisis de subgrupos se presenta mediante tablas descriptivas de proporciones de éxito/fracaso para la variable primaria (mRS 0-2), así como resúmenes para variables secundarias, distribuidas por estrato y grupo de tratamiento.

Los datos faltantes en variables de eficacia para el análisis por ITT se han reemplazado mediante métodos de imputación simple siguiendo las siguientes premisas:

- Valores faltantes en visitas intermedias serán imputados con el valor de la visita anterior.
- Valores faltantes post-abandono, se han imputado de la siguiente forma: Fallecimientos, a 'no éxito', es decir, mRS ordinal a 6, mRS 0-2 binaria a 3-6, mRS 0-3 binaria a 4-6, Barthel ordinal al percentil 10 del grupo, NIHSS ordinal al percentil 90 del grupo y volumen de infarto final al percentil 90% del grupo.

Dado el carácter exploratorio del estudio, no se han realizado ajustes por multiplicidad de comparaciones en distintos momentos temporales ni de grupos de tratamiento, mostrando la comparación entre el grupo de dosis bajas versus control y el grupo de dosis altas versus control.

Seguridad

El análisis de seguridad se ha realizado sobre la población de pacientes aleatorizados asociando cada paciente a su tratamiento recibido (N=77). Dado el carácter exploratorio del estudio y el tamaño de muestra, se ha realizado un análisis descriptivo de acontecimientos adversos, signos vitales y parámetros de laboratorio.

Para el análisis de los acontecimientos adversos se realizó un análisis descriptivo (frecuencias y porcentajes) de los mismos a lo largo del estudio, presentando un listado de ellos, agrupados según la gravedad, intensidad y relación con la medicación de estudio, por periodo (antes de recibir tratamiento, durante el tratamiento y después del tratamiento). Estos acontecimientos se listan por paciente y grupo de aleatorización. El mismo sistema de trabajo y descripción se utiliza para los Acontecimientos Adversos y para las Reacciones Adversas Graves e Inesperadas, si las hubiere. El registro de Acontecimientos Adversos, de Acontecimientos Adversos Graves y de Reacciones Adversas Graves e Inesperadas se codificará según la clasificación MedDRA.

Subestudio de biomarcadores plasmáticos

El análisis del subestudio de biomarcadores plasmáticos se ha realizado sobre la población de pacientes aleatorizados (ITT) que hayan dado su consentimiento a participar en este subestudio. En este subestudio se ha realizado:

- Un análisis descriptivo de cada biomarcador.
- Un análisis inferencial, el cual se ha llevado a cabo mediante modelos lineales mixtos generalizados (LMM) para evaluar interacciones tiempo-tratamiento en concentraciones plasmáticas.

Para cada biomarcador, se han ajustado 3 modelos basados en el principal: considerando la concentración con distribución gaussiana (valores simétricos), distribución gamma (asimetría positiva marcada) y modelo robusto (presencia de outliers). A continuación, se ha evaluado el diagnóstico de los 3 modelos y se ha elegido el que mejor ajusta a los datos según el Criterio de Información de Akaike (AIC). Con este modelo preseleccionado se han evaluado las interacciones tiempo-tratamiento más relevantes para identificar trayectorias diferentes entre los grupos de dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ y $5 \times 10^6 \pm 10\%$ respecto al grupo control y se han graficado los biomarcadores con interacciones relevantes ($p < 0.1$).

10.4. Datos perdidos, no utilizados o erróneos.

No se realiza un análisis del posible sesgo sobre los resultados, pues la mayor parte de las diferencias observadas a nivel descriptivo no muestran significación estadística.

Los datos faltantes en variables de eficacia para el análisis por ITT se han reemplazado mediante métodos de imputación simple siguiendo las siguientes premisas:

- Valores faltantes en visitas intermedias serán imputados con el valor de la visita anterior.
- Valores faltantes post-abandono, se han imputado de la siguiente forma: Fallecimientos, a 'no éxito', es decir, mRS ordinal a 6, mRS 0-2 binaria a 3-6, mRS 0-3 binaria a 4-6, Barthel ordinal al percentil 10 del grupo, NIHSS ordinal al percentil 90 del grupo y volumen de infarto final al percentil 90% del grupo.

En relación con los valores del subestudio de biomarcadores plasmáticos no disponibles por falta de procesamiento, se encuentran los 3 marcadores siguientes: CCL22 (Cardiovascular III), BDNF (Inflamación) y BDNF (Neurología).

Respecto a los valores no disponibles por paciente: 4 no alcanzaron medidas a día 180 (grupo control), 1 no alcanzó mediciones a día 7 (grupo dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$) y 1 a día 180 (grupo dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$).

10.5. Aleatorización.

Para permitir la evaluación sin sesgos de los efectos del producto en investigación, se diseñó un estudio comparativo con un grupo control y dos ramas de tratamiento. Se trata de un estudio aleatorizado, abierto tanto para el participante como para los investigadores.

Sin embargo, el investigador que evaluó el objetivo primario (escala de Rankin modificada a los 6 meses) fue ciego al grupo asignado al paciente (experimental vs control).

La aleatorización fue estratificada en función de la puntuación NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*) (NIHSS de 6-13, y de 14-20), y para cada uno de los centros fabricantes: Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, y Hospital Universitario Reina Sofía. De esta manera, tendremos un grupo NIHSS de 6-13 para la Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, NIHSS de 6-13 para el Hospital Universitario Reina Sofía, NIHSS de 14-20 para la Unidad de Producción y Reprogramación Celular de Sevilla-planta CRTS del Campus Hospital Virgen del Rocío, y NIHSS de 14-20 para el Hospital Universitario Reina Sofía.

11. Resumen de los resultados.

La población de estudio corresponde a pacientes con diagnóstico de ictus isquémico agudo de la arteria cerebral media. El objetivo del estudio era incluir a 76 pacientes y finalmente se incluyeron 77 pacientes.

11.1. Disposición de los pacientes

La **Figura 1** presenta el flujo de pacientes del estudio. Para su elaboración se han utilizado el procedimiento y las guías CONSORT.

Reclutamiento

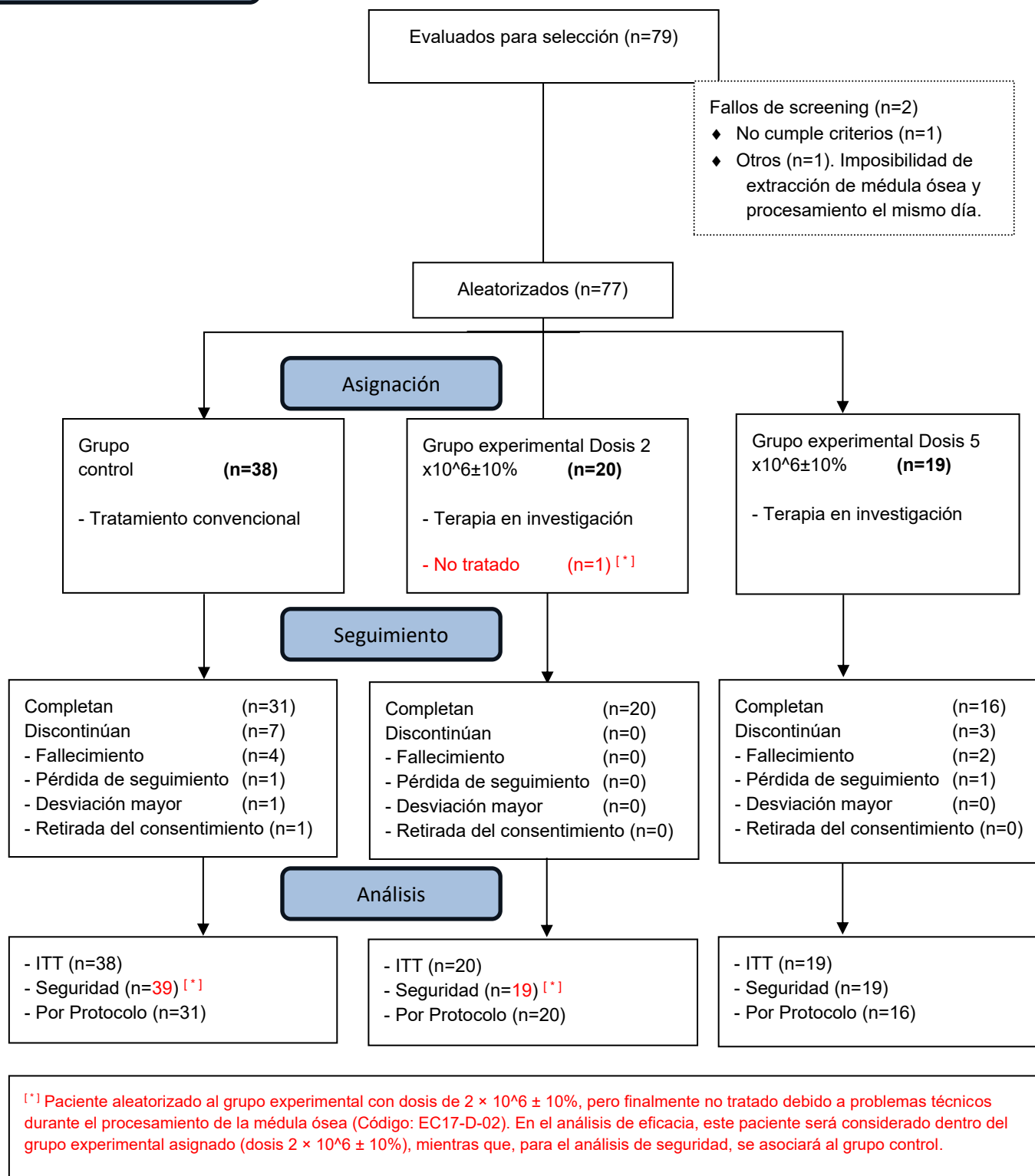


Figura 1. Diagrama de flujo de pacientes

79 pacientes fueron reclutados, 2 de los cuales fueron fallos de screening (1 por incumplimiento de criterios y 1 por imposibilidad de extracción de médula ósea y procesamiento el mismo día). Los 77 restantes fueron aleatorizados.

Hubo 1 paciente que no llegó a ser infundido con el tratamiento experimental por problemas técnicos (Sujeto: EC17-D-02, tratamiento asignado $2 \times 10^6 \pm 10\%$), dicho paciente se analiza en seguridad asociado al grupo control.

Todos los pacientes aleatorizados fueron analizados en eficacia por intención de tratar (según el tratamiento asignado) y en seguridad (según el tratamiento recibido: 39, 19 y 19). Los 67 pacientes que completaron el seguimiento se analizaron además por protocolo correcto.

Con respecto a los pacientes incluidos según el centro reclutador, en la **Tabla 2** se puede apreciar que el Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) concentró la mayoría de los pacientes, con un total de 40 (51.9% de la muestra), siendo también el centro con mayor número de pacientes tratados en ambas dosis (14 con dosis 2×10^6 y 9 con dosis 5×10^6). El Hospital Reina Sofía aportó 28 pacientes (36.4%), siendo el segundo mayor centro en reclutamiento. El Hospital Universitario Virgen Macarena y el Hospital Puerta del Mar participaron con menor número de pacientes (6 y 3 respectivamente), con reclutamientos más bajos y menor contribución a los grupos tratados.

Tabla 2. Distribución de pacientes por centro reclutador y por tratamiento asignado

Distribución de pacientes por centro reclutador y por tratamiento asignado.				
Hospital	Control	Tratado Dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$	Tratado Dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$	Total
Hospital Reina Sofía	16 (42.1%)	5 (25%)	7 (36.8%)	28 (36.4%)
Hospital Universitario Puerta del Mar	1 (2.6%)	1 (5%)	1 (5.3%)	3 (3.9%)
Hospital Universitario Virgen del Rocío	17 (44.7%)	14 (70%)	9 (47.4%)	40 (51.9%)
Hospital Universitario Virgen Macarena	4 (10.5%)	0 (0%)	2 (10.5%)	6 (7.8%)
Total	38	20	19	77

Además, se ha estudiado cual ha sido la última visita del estudio realizada, según el grupo de tratamiento asignado. Como se indica en la **Tabla 3**, el 87% de los pacientes completaron la última visita programada (V9), hubo una mayor adherencia en el grupo tratado con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$, también hubo pocos abandonos tempranos (antes de V9) y concentrados principalmente en el grupo control. La información respalda la robustez del seguimiento y la integridad de los datos para análisis finales.

Tabla 3. Última visita realizada por tratamiento asignado.

Resumen de Última visita realizada por Tratamiento asignado				
Última visita realizada	Control	Tratado Dosis 2 x10 ⁶ ±10%	Tratado Dosis 5 x10 ⁶ ±10%	Total
V4	2 (5.3%)	0 (0%)	2 (10.5%)	4 (5.2%)
V5	2 (5.3%)	0 (0%)	1 (5.3%)	3 (3.9%)
V6	1 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.3%)
V7	1 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.3%)
V8	1 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.3%)
V9	31 (81.6%)	20 (100%)	16 (84.2%)	67 (87%)
Total	38	20	19	77

11.2. Datos demográficos y otras características basales

Se incluyeron 77 pacientes en los análisis basales.

Las características demográficas se presentan en la **Tabla 4** y la **Tabla 5**, en las que se observa que la edad de los pacientes es similar entre los grupos de tratamiento y sin diferencias relevantes, habiendo un porcentaje ligeramente mayor de participantes hombres en todos los grupos.

Tabla 4: Edad (años) por tratamiento asignado

Edad (años) por Tratamiento asignado				
Estadístico	Control	Tratado Dosis 2 x10 ⁶ ±10%	Tratado Dosis 5 x10 ⁶ ±10%	Total
N (Missing)	38 (0)	20 (0)	19 (0)	77 (0)
Media (DE)	62.7 (13.7)	62.6 (11.0)	63.2 (13.1)	62.8 (12.7)
Mediana	66.0	63.0	66.0	66.0
(Percentil 25; Percentil 75)	(54.2; 72.8)	(56.2; 72.0)	(53.5; 76.0)	(54.0; 73.0)
[Mín; Máx]	[22.0; 80.0]	[40.0; 78.0]	[40.0; 80.0]	[22.0; 80.0]

Tabla 5: Sexo por tratamiento asignado

Sexo por Tratamiento asignado				
	Control	Tratado Dosis 2 x10 ⁶ ±10%	Tratado Dosis 5 x10 ⁶ ±10%	Total
Hombre	25 (65.8%)	11 (55%)	10 (52.6%)	46 (59.7%)
Mujer	13 (34.2%)	9 (45%)	9 (47.4%)	31 (40.3%)
Total	38	20	19	77

En la **Tabla 6** y la **Tabla 7** se indican los valores basales de las medidas antropométricas, donde se observa que la media del peso de los pacientes es similar entre los distintos grupos del estudio. La

talla presenta un leve predominio en el grupo control (media 167.4 cm vs 162.2 y 160.1 cm en otros grupos), probablemente sin significancia clínica.

Tabla 6: Peso (Kg) basal por tratamiento asignado

Peso (Kg) basal por Tratamiento asignado				
Estadístico	Control	Tratado Dosis 2 x10 ⁶ ±10%	Tratado Dosis 5 x10 ⁶ ±10%	Total
N (Missing)	33 (5)	20 (0)	19 (0)	72 (5)
Media (DE)	76.3 (10.8)	76.6 (15.5)	72.2 (7.5)	75.3 (11.6)
Mediana	76.0	75.5	73.3	75.0
(Percentil 25; Percentil 75)	(70.0; 82.3)	(65.0; 85.8)	(67.0; 75.7)	(67.0; 80.2)
[Mín; Máx]	[53.0; 95.0]	[52.8; 110.0]	[59.9; 85.0]	[52.8; 110.0]

Tabla 7: Talla (cm) basal por tratamiento asignado

Talla (cm) basal por Tratamiento asignado				
Estadístico	Control	Tratado Dosis 2 x10 ⁶ ±10%	Tratado Dosis 5 x10 ⁶ ±10%	Total
N (Missing)	20 (18)	8 (12)	7 (12)	35 (42)
Media (DE)	167.4 (8.6)	162.2 (8.0)	160.1 (7.6)	164.8 (8.6)
Mediana	168.5	164.0	160.0	165.0
(Percentil 25; Percentil 75)	(163.0; 172.2)	(155.0; 170.0)	(155.0; 166.5)	(157.5; 170.0)
[Mín; Máx]	[153.0; 185.0]	[150.0; 170.0]	[150.0; 168.0]	[150.0; 185.0]

En cuanto a las características basales, se analizaron las siguientes: signos vitales (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, tensión arterial sistólica y diastólica); datos del ictus (duración entre el inicio de síntomas y la aleatorización, historial de fibrinólisis y trombectomía mecánica); datos del diagnóstico radiológico del ictus mediante RM (resonancia magnética), aRM (resonancia magnética con agente de contraste), angioTC o arteriografía (duración entre el inicio de los síntomas y la RMN (resonancia magnética nuclear)/aRMN (resonancia magnética con agente de contraste), comprobación del ictus isquémico no lacunar en la arteria central media, comprobación de la permeabilidad de la arteria central media); historia médica relevante; resultados de hemograma, pruebas de coagulación y bioquímica; prueba de embarazo; escala de Rankin modificada; escala NIHSS; electrocardiograma; resonancia magnética craneal; biomarcadores plasmáticos. Como conclusión, no se evidencian desequilibrios clínicamente relevantes ni sistemáticos entre los grupos al momento basal que puedan comprometer la comparabilidad del estudio o sesgar la interpretación de resultados posteriores. Las variables demográficas, clínicas, funcionales, laboratoriales y de proceso celular están en equilibrio adecuado, con algunas diferencias menores que no alcanzan importancia estadística ni clínica.

11.3. Disposición de los pacientes que participaron en el subestudio de biomarcadores plasmáticos

La **Figura 2** presenta el flujo de los pacientes que participaron en el subestudio de biomarcadores plasmáticos. Para su elaboración se han utilizado el procedimiento y las guías CONSORT.

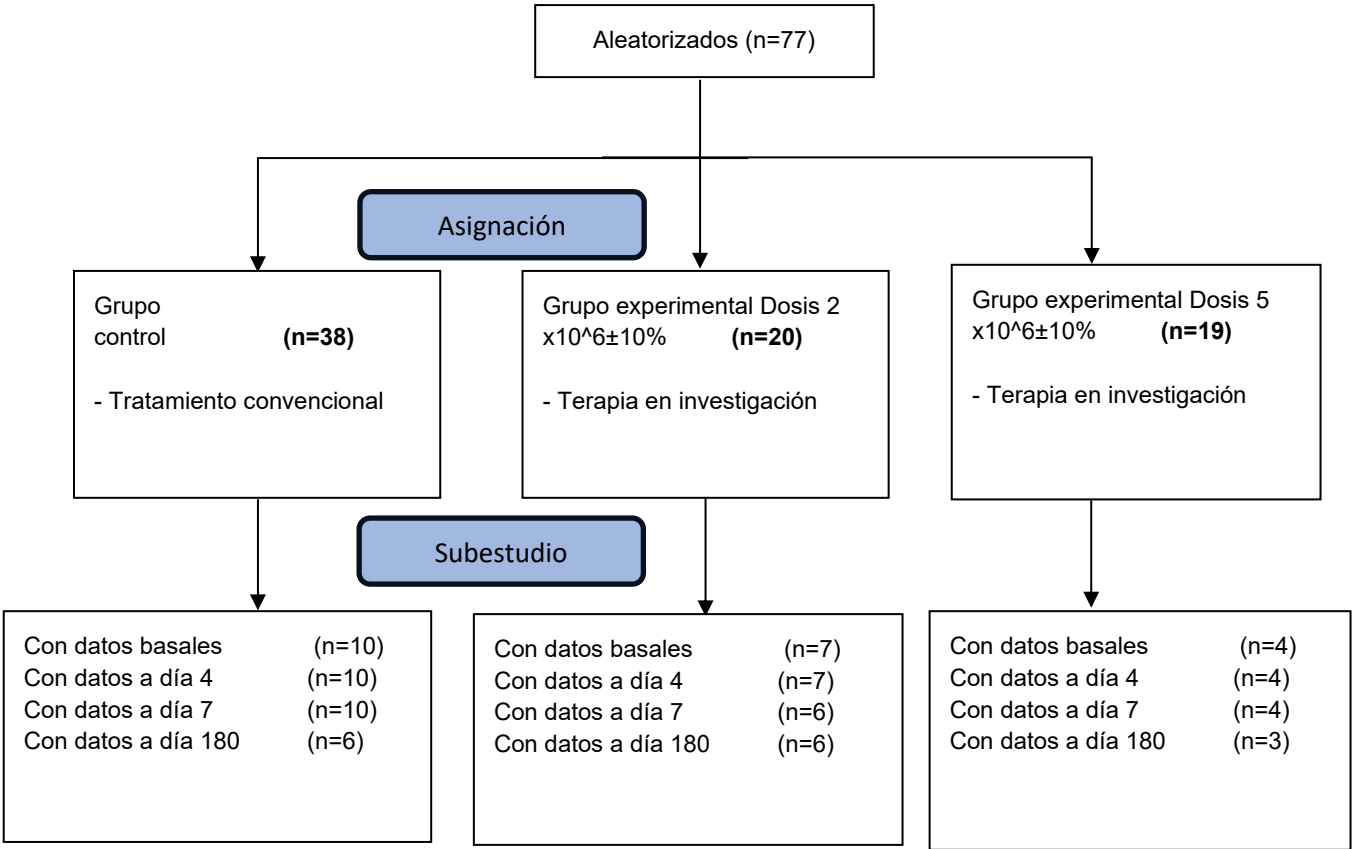


Figura 2: Diagrama de flujo de pacientes que participaron en el subestudio de biomarcadores plasmáticos

11.4. Resultados de eficacia.

En primer lugar, el estudio de la independencia funcional estricta (mRS 0-2) según la **Escala Rankin Modificada** en la población ITT mostró que ambos grupos con tratamiento celular muestran una tendencia a una mayor proporción de pacientes independientes en comparación con el control, aunque el grupo con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ presenta la proporción más alta (50%) frente al 47.4% del grupo de dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ y 42.1% del control. Además, los valores del grupo dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ en los odds ratios generales son ligeramente mayores que los del grupo dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ respecto al control, indicando una tendencia más favorable para alcanzar la independencia funcional con la dosis baja. En conjunto, los hallazgos en la independencia funcional estricta según la Escala Rankin Modificada sugieren que la dosis más baja ($2 \times 10^6 \pm 10\%$) podría asociarse con una recuperación funcional algo superior en comparación con la dosis más alta y el control, aunque la ausencia de diferencias estadísticamente significativas limita conclusiones firmes.

Los resultados de la **Escala NIHSS** muestran que existe una tendencia a una reducción mayor en la puntuación total de la NIHSS en el grupo tratado con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ respecto al control en las visitas a partir de V3 (10.7 vs 11.4 en control), manteniéndose esta tendencia hasta los 6 meses (4.6 vs 6.5 en control). Esto sugiere una posible mejor recuperación neurológica más rápida y sostenida en este grupo. Por su parte, el grupo tratado con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ muestra una tendencia menos clara o incluso ligeramente desfavorable en visitas tardías. En conjunto, estos resultados sugieren que el régimen con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ podría asociarse a una mejor recuperación neurológica en términos de NIHSS a mediano plazo, mientras que la dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ no evidencia esta pauta y podría ser menos efectivo en esta medida, aunque los resultados deben interpretarse con cautela por la falta de significancia estadística.

Además, los resultados de la **independencia funcional (Barthel > 90)** de los pacientes muestran una tendencia a una mayor proporción de pacientes que alcanzan independencia funcional a los 3 meses (V6) en el grupo tratado con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ (40%) respecto al control (21.1%) y al grupo con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ (31.6%). La diferencia más notable (+18.9%) favorece la dosis baja, con un odds ratio de 2.5, aunque sin significancia estadística. Esta tendencia de la dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ se mantiene a los 6 meses (V7), con una proporción ajustada del 45% frente al 26.3% del control. En cambio, el grupo con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ presenta una proporción menor (15.8%) incluso por debajo del control, reflejando una tendencia contraria para esta dosis en este momento. De nuevo, la falta de significancia estadística limita mucho el alcance de la interpretación de estas aparentes tendencias.

En cuanto al **tamaño del infarto**, los volúmenes iniciales promedio fueron similares entre los grupos. Por su parte, el volumen final promedio a los 6 meses (V7) presentó una leve tendencia a ser mayor en los grupos tratados, con medias ajustadas de aproximadamente 48 cm³ en control, 51 cm³ en dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$, y 56 cm³ en dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$. De esta manera, no se evidencian diferencias relevantes

ni tendencias claras en el volumen del infarto, ni al inicio ni a los 6 meses, entre los pacientes tratados y el grupo control.

El **mantenimiento neurológico a largo plazo (12 y 24 meses)** comprende los resultados en la mRS y en la escala Barthel. En la Escala Rankin Modificada (mRS 0-2), se observa una tendencia favorable sostenida en el grupo tratado con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ para alcanzar independencia funcional a los 12 meses (60% vs 47.4% en control) y a los 24 meses (60% vs 52.6% en control). Esta diferencia, aunque no estadísticamente significativa, indica un posible beneficio clínico y mantenimiento de la recuperación en el tiempo. Por el contrario, el grupo con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ muestra una menor proporción ajustada de independencia funcional tanto a 12 meses (36.8%) como a 24 meses (36.8%), inferior al control, señalando una tendencia menos favorable. En cuanto a la Escala Barthel (ABVD, Barthel >90), la dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ también presenta una tendencia consistente a mejores resultados en independencia funcional para actividades básicas a 12 meses (50% vs 36.8% en control) y a 24 meses (60% vs 39.5% en control). El grupo con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$, en cambio, muestra proporciones menores que el control, reflejando una tendencia contraria que podría indicar menor eficacia en esta medida. En conjunto, a pesar de la falta de significancia estadística, las tendencias acumuladas apuntan a un mantenimiento neurológico superior en el grupo con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$, con mayor supervivencia funcional y autonomía evidenciada en ambas escalas a medio y largo plazo. El grupo tratado con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ parece no mantener estas ganancias y muestra tendencias hacia resultados menos favorables que el grupo control.

En comparación, los resultados por protocolo correcto (población PPC) confirman y son concordantes con los del análisis por intención de tratar. El análisis por protocolo no muestra un efecto terapéutico superior al análisis por ITT, lo cual sugiere que el cumplimiento estricto del tratamiento tampoco modifica sustancialmente las conclusiones sobre eficacia.

Por último, el análisis del **estudio por subgrupos** refleja que existe un desequilibrio basal en la asignación del tratamiento dentro del estrato “14-23 & HURS”, donde el grupo tratado con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ está ausente. En los demás estratos, la asignación está más equilibrada entre tratamientos y control. Este desequilibrio puede limitar la validez interna del análisis en dicho estrato.

A los 6 meses, los análisis de mRS apuntan a un posible mayor beneficio funcional con la dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ células, mientras que la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ células ofrece resultados menos consistentes y con más variabilidad entre estratos. El patrón de respuesta parece más favorable en estratos con peor situación basal, lo que respalda la hipótesis de que el perfil de paciente condiciona el efecto. Estos hallazgos deben interpretarse considerando el tamaño muestral limitado en algunos subgrupos.

La puntuación NIHSS a los 3 y 6 meses muestra que el tratamiento con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ se asocia con un aparente mejor pronóstico neurológico en comparación con control y dosis alta. Esto se refleja

tanto a nivel global como estratificado, especialmente en estratos con mayor severidad inicial y en el centro HUVR. La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ presenta resultados más heterogéneos.

La escala de Barthel indica que el tratamiento con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ favorece una recuperación funcional más rápida y consistente a los 3 meses, con mayor porcentaje de pacientes alcanzando independencia para actividades básicas. Para el seguimiento a 6 meses, la dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ muestra mejoras en ciertos estratos y podría tener un efecto más tardío o estratificado. En general, ambos tratamientos superan al control en términos de independencia funcional, aunque con variabilidad entre centros y severidades basales.

El volumen del infarto inicial y final indica que el grupo tratado con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ puede presentar un perfil ligeramente más favorable, con menores volúmenes iniciales y finales en ciertos estratos que se asocian a mejor pronóstico funcional. En cambio, la dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ muestra resultados mixtos. Se observa claramente que aquellos pacientes con puntuaciones 14-23 presentan valores mayores de volumen de infarto que los de 6-13. Sin embargo, pese a la variabilidad existente entre grupos de tratamiento dentro de cada centro de producción, esto no es consistente al comparar entre centros, por lo que el reducido tamaño muestral en los subgrupos limita considerablemente el alcance de la interpretación de estos resultados.

El tratamiento con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ muestra un patrón consistente de mayor mantenimiento y mejora de la independencia funcional a medio y largo plazo, tanto en variables neurológicas (mRS) como funcionales (Barthel). La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ presenta resultados más heterogéneos y en general menores tasas de independencia funcional en comparación con la dosis baja, aunque con algunas excepciones en ciertos estratos. El grupo control mantiene menor proporción de independencia funcional, indicando que ambos tratamientos ofrecen beneficio relativo, con ventaja aparente para la dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$. Con carácter general, se observa que aquellos pacientes con puntuaciones 14-23 presentan un mantenimiento neurológico más marcado que los de 6-13. Sin embargo, la variabilidad existente entre grupos de tratamiento para cada centro de producción no es consistente al comparar entre centros, por lo que, de nuevo, el reducido tamaño muestral en los subgrupos limita considerablemente el alcance de la interpretación de estos resultados.

Todas estas tendencias se mantienen en las diferentes combinaciones de gravedad basal y centro hospitalario, aunque con variabilidades propias de cada estrato.

De una manera global, se observa una falta de eficacia del producto para las determinaciones clínicas recogidas. Sin embargo, los datos apuntan hacia una posible tendencia estadística favorable para la dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ células. Esto se ve reforzado en el análisis por subgrupos, donde se observa cierta mejoría, también en pacientes con mayor gravedad basal. Sin embargo, el bajo tamaño muestral (o incluso en casos como el del estrato “14-23 & HURS”, la ausencia de los mismos) tanto de los grupos

de tratamiento como de los subgrupos pueden explicar la falta de eficacia, especulando sobre la posibilidad de hallar resultados estadísticamente significativos con la dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ células frente al control con un tamaño muestral mayor en estudios futuros.

Resultados del subestudio de biomarcadores plasmáticos

Se resumen a continuación los resultados del subestudio de biomarcadores plasmáticos organizados por paneles:

- **Panel CARDIOMETABOLIC (v.3601)**

La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ muestra mayor impacto terapéutico, hallándose una disminución con respecto al control en los niveles de algunos marcadores inflamatorios como quimiocina ligando CC (CCL)14 o lipasa 2, así como de activadores del complemento. La dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ presenta efectos moderados con respecto a la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$, pero consistentes con los observados en esta.

Los cambios principales de la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ con respecto al control fueron una disminución en los niveles de citocinas/quimiocinas inflamatorias (como CCL14, *cluster of differentiation* (CD)59, CCL18), así como ciertas alteraciones en el metabolismo lipídico, matriz extracelular, o en marcadores del sistema del complemento/renal.

Así, la dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ mostró un efecto superior en 18/36 interacciones, especialmente en aquellos efectos antiinflamatorios tardíos (día 180). Algunos marcadores (como la proteína 2 de unión latente al factor de crecimiento transformante beta (LTBP2)) mostraron una respuesta temprana, siendo un indicio de una ventana terapéutica precoz (día 7). Aun así, la mayoría mostraron cambios de manera más tardía.

- **Olink CARDIOVASCULAR II (v.5002)**

La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ fue superior en 20/42 interacciones, especialmente antiinflamatorios tardíos (D180) y quimiocinas. Así, de nuevo esta dosis mostró un mayor impacto terapéutico. La dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ presentó efectos moderados con respecto a la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$, pero siendo de nuevo consistentes con los observados en esta.

Los cambios principales de la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ con respecto al control fueron una disminución en los niveles de citocinas/quimiocinas inflamatorias (menores niveles de CXCL1 (ambas dosis), CCL17, CCL3, IL16; 8 interacciones), vía endotelial/angiogénica (menores niveles de ANG-1 o VEGFD), receptores inflamatorios (disminución en el ligando de CD40 (CD40-L) o el receptor de los productos finales de glicación avanzada (RAGE), o una reducción en proteasas como proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6) o metaloproteasa desintegrina (ADAM).

La mayoría de los cambios (26/42 interacciones) fueron tardíos (día 180). Asimismo, la disminución de los niveles de marcadores trombóticos (CD40-L), angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGFD)) y renales sin incrementos compensatorios sugiere un perfil de seguridad favorable.

- **Olink CARDIOVASCULAR III** (v.6101)

La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ fue superior en 12/23 interacciones, dominando los efectos antifibróticos (disminución en galectina-3 (Gal-3), caspasa-3 (CASP-3)) y efectos antiinflamatorios tardíos. Así, de nuevo esta dosis mostró un mayor impacto terapéutico. La disminución en marcadores fibróticos cardiacos (Gal-3) y de apoptosis sin incrementos compensatorios refleja un perfil de seguridad favorable en la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$. La dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ presentó efectos moderados con respecto a la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$, pero siendo de nuevo consistentes con los observados en esta.

Los cambios principales de la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ con respecto al control fueron disminuciones en los niveles de inflamación/quimiocinas (como CCL16, 6 interacciones), en los factores de remodelación/fibrosis (como Gal-3 o CASP-3), y en trombosis/coagulación (como factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGF-A) (ambas dosis)).

La mayoría de los cambios (15/23 interacciones) fueron tardíos (día 180).

- **Olink INFLAMMATION** (v.3004)

La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ fue superior en 15/49 interacciones, dominando la reducción en los niveles de quimiocinas (como proteína quimioatrayente de monocitos 3 (MCP-3), interleucina (IL)8; 12 interacciones), citoquinas/neurotropinas (menores niveles de IL8, activador del receptor nuclear factor kappa-B (TRANCE), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF); 8 interacciones), remodelación (como disminución de los niveles de la metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1)) o de factores de estrés oxidativo (sirtuina 2 (SIRT2)). La dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ presentó efectos moderados con respecto a la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$, pero siendo de nuevo consistentes con los observados en esta.

Aunque se observan algunos efectos precoces, la mayoría (28/49 interacciones) fueron tardíos (día 180).

La disminución en los niveles de marcadores neuroinflamatorios (neurturina (NRTN), GDNF) sin incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias sugiere un perfil de seguridad favorable en la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$.

- **Olink NEUROLOGY** (v.8001)

La dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ fue superior en 11/32 interacciones, dominando factores de neurodesarrollo/reparación (disminución en neuropilina-2 (NRP2) (precoz fuerte) o aumento en

endopeptidasa neutra (NEP); 8 interacciones), señalización Wnt/Notch (4 interacciones), o disminución en marcadores de adhesión/receptores (6 interacciones). El perfil de seguridad favorable de la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$ se ve reforzado por el incremento en los niveles de NEP, responsable de la degradación de A β , sin incremento en marcadores degenerativos, unido a la disminución de marcadores de neuroinflamación (NRP2) e incremento de factores neuroprotectores (NEP, ceramidasa neutra (N-CDase)).

Aunque se observan algunos efectos precoces, la mayoría (17/32 interacciones) fueron tardíos (día 180).

11.5. Resultados de seguridad.

No se detectan diferencias relevantes en la frecuencia ni en la distribución del número de acontecimientos adversos entre los grupos de tratamiento y control, ni antes ni después de la infusión, aunque sí pueden existir incrementos puntuales en algunos periodos concretos, especialmente para la dosis más alta. Los datos sugieren un perfil de seguridad comparable entre las diferentes dosis administradas y el grupo control, sin indicios de incremento significativo en toxicidad asociada al procedimiento o al producto celular. La gran mayoría de los pacientes (alrededor del 85-95% en todos los grupos) presentó al menos un acontecimiento adverso tras la infusión, reflejando una alta incidencia global de acontecimientos adversos (AA) en la población estudiada. Por otro lado, la proporción de acontecimientos adversos graves (AAG) fue considerable, especialmente en el grupo tratado con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$, donde el 52.6% de los pacientes reportaron AAGs, en comparación con un 35.9% en control y 26.3% en dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$. Esto sugiere una mayor frecuencia de AAGs en el grupo de mayor dosis. En cuanto a las reacciones adversas, estas se reportaron solo en los grupos tratados, con un 15.8% en dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ y 10.5% en dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$, sin reacciones adversas en el grupo control. No se documentaron reacciones adversas graves, lo que sugiere que, aunque los AAGs ocurrieron, estas no fueron catalogadas como reacciones adversas graves asociadas directamente al tratamiento.

La aparición de eventos adversos graves “de especial interés” (convulsiones, crisis epilépticas, hemorragia cerebral, hematoma inguinal, tumorogénesis, mortalidad) fue muy baja y similar entre los grupos tratados y el grupo control. Los tratamientos celulares en estudio no se asociaron a un incremento relevante de eventos de seguridad graves respecto al control; el perfil de seguridad es favorable y los eventos descritos son escasos y similares o incluso menores que en el grupo control. Los casos de hematoma inguinal y tumorogénesis fueron anecdóticos y en muy baja frecuencia, sin un patrón consistente.

La revisión de los signos vitales y parámetros de laboratorio (hemograma, coagulación, bioquímica) mostró que normalmente predominan resultados normales o con alteraciones no clínicamente

significativas, presentando casos puntuales de alteraciones clínicamente significativas. Los valores presentan cierta fluctuación dependiendo del parámetro, pero sin diferencias marcadas entre grupos.

Con respecto a la composición celular, los datos indican una composición celular relativamente homogénea en ambos regímenes de dosis y la infusión de células madre de médula ósea se realizó de forma exitosa en ambos grupos de tratamiento. Solo un único paciente en el grupo de dosis baja que no pudo recibir el tratamiento debido a un incidente técnico durante el procesamiento. La infusión de CMMo en pacientes tratados con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ y $5 \times 10^6 \pm 10\%$ presenta tendencias similares en términos de realización, tiempos y seguridad, con una alta tasa de ejecución y un bajo índice de eventos adversos, apoyando la factibilidad y tolerabilidad del procedimiento en ambos regímenes de dosis. Las complicaciones asociadas al procedimiento fueron infrecuentes y leves, sin diferencias clínicas importantes entre grupos, evidenciando un perfil seguro para ambas dosis evaluadas.

En conclusión, se observa que el tratamiento con CMMo muestra evidencias de seguridad a corto y largo plazo, para ambas dosis administradas, sin una diferencia clara entre ellas. Se descartaron posibles problemas de seguridad que se habían identificado en estudios previos (como conclusiones, crisis epilépticas, tumorigénesis). Sí se observaron ciertos problemas puntuales asociados a la vía de administración que se deberán de seguir estudiando en estudios futuros. Aunque algunos pacientes fallecieron durante el estudio, en ningún caso sus muertes se consideraron relacionadas con la medicación de estudio.

12. Conclusiones.

Se puede concluir que el procedimiento de administración de CMMo es factible. Los procedimientos de extracción e infusión pudieron realizarse con éxito en todos los pacientes (salvo en uno, debido a un incidente técnico durante el procesamiento). La infusión de CMMo en pacientes tratados con dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ y $5 \times 10^6 \pm 10\%$ presentó tendencias similares en términos de realización, tiempos y seguridad, con una alta tasa de ejecución y un bajo índice de eventos adversos, apoyando la factibilidad y tolerabilidad del procedimiento en ambos regímenes de dosis. Las complicaciones asociadas al procedimiento fueron infrecuentes y leves.

Del subestudio de biomarcadores plasmáticos se concluye que la dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$ presentó un efecto terapéutico superior al control en multitud de interacciones, muchas de las cuales reflejan un carácter antiinflamatorio del producto. La dosis $2 \times 10^6 \pm 10\%$ presentó efectos moderados con respecto a la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$, pero siendo de nuevo consistentes con los observados en esta. La identificación de algunos marcadores de interés podrá dirigir nuevas dianas terapéuticas y ahondar en el posible beneficio terapéutico del producto, especialmente en la dosis de $5 \times 10^6 \pm 10\%$.

En este estudio, se descartaron posibles problemas de seguridad que se habían identificado en estudios previos, tales como conclusiones, crisis epilépticas, o tumorigénesis. La gran mayoría de los

pacientes presentó al menos un acontecimiento adverso tras la infusión, y pese a que la proporción de acontecimientos adversos graves fue considerable (especialmente en el grupo tratado con dosis $5 \times 10^6 \pm 10\%$), no se documentaron reacciones adversas graves, por lo que no fueron asociadas directamente al tratamiento. De esta manera, el tratamiento con CMMo muestra evidencias de seguridad a corto y largo plazo para ambas dosis administradas, sin una diferencia clara entre ellas.

Por su parte, la conclusión principal de la eficacia en el presente estudio apunta hacia una falta de efectividad del producto para las determinaciones clínicas recogidas. Sin embargo, los datos muestran una posible tendencia estadística favorable para la dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ células en parámetros como la independencia funcional a los 3 y 6 meses según las escalas de Rankin y la de Barthel, la severidad del ictus evaluada mediante la puntuación en la escala NIHSS, o el mantenimiento neurológico a tiempos más largos (12 y 24 meses). Esto se ve reforzado en el análisis por subgrupos. Sin embargo, el bajo tamaño muestral tanto de los grupos de tratamiento como de los subgrupos pueden contribuir a explicar la falta de eficacia observada, especulando sobre la posibilidad de hallar resultados estadísticamente significativos con la dosis de $2 \times 10^6 \pm 10\%$ células frente al control con un tamaño muestral mayor en estudios futuros.