Universidad de Oviedo

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

Línea: Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

Tesis doctoral

Desarrollo y producción de Medicamentos de Terapia Avanzada para Oftalmología

Silvia Berisa Prado

Oviedo, Diciembre de 2021

ISBN: 978-84-09-36166-3

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Desarrollo y producción de medicamentos de terapia avanzada para oftalmología

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

Línea: Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

Oviedo, Diciembre 2021

Silvia Berisa Prado

Directores: Dr. Jesús Merayo Lloves, Dr. Luis Fernández-Vega Cueto-Felgueroso

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Tesis doctoral:

Desarrollo y producción de medicamentos de terapia avanzada para oftalmología

Trabajo de investigación realizado por:

Silvia Berisa Prado

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo

Directores: Dr. Jesús Merayo Lloves, Dr. Luis Fernández-Vega Cueto-Felgueroso

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

Línea: Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

RD 99/2011 (BOE 35, 10/02/2011); Reglamento de Estudios de Doctorado, BOPA 173 de 17-07-2019

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo y producción de Medicamentos de Terapia Avanzada para Oftalmología.	Inglés: Development and compounding of Advanced Therapy Medicinal Products for Ophthalmology.

2.- Autor	
Nombre: Silvia Berisa Prado	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Dpto. de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas.	

FOR-MAT-VOA-010 (Reg.2018)

RESUMEN (en español)

El presente trabajo de investigación desarrolla una unidad de producción de terapias avanzadas original, para poder trasladar a la práctica clínica la elaboración de un Medicamento de Terapia Avanzada (MTA) para el tratamiento de la insuficiencia límbica o déficit limbar. El medicamento desarrollado consiste en la expansión *ex vivo* de células madre limbocorneales alogénicas, utilizando Plasma Rico en Factores de Crecimiento (del inglés, *Plasma Rich in Growth Factors*, PRGF) como único suplemento del medio de cultivo y como andamiaje (*scaffold)* para poder cultivar y trasplantar las células madre limbares. La unidad de producción desarrollada, tiene las ventajas competitivas de su reducido tamaño, coste y mantenimiento y permite la realización de MTA oftalmológicos cumpliendo toda la normativa vigente.

La fabricación de MTA, al igual que la fabricación de los medicamentos comercializados, tiene que cumplir los estándares de un sistema de calidad farmacéutico para cumplir con la Guía de las Normas de Correcta Fabricación (NCF), que implican el cumplimiento de unos requisitos durante la producción y la vida útil de todo el producto que van a asegurar la calidad y efectividad del medicamento para el uso al que está destinado; este cumplimiento implica la producción en una sala limpia con estrictas condiciones ambientales (área de trabajo clase A y ambiente clase B).

Estos requisitos hacen que la producción de los MTA sea costosa, y en muchos casos poco rentable, al limitarse su uso, a unos pocos pacientes y a una sola unidad por lote de fabricación, en la mayoría de las producciones.

Para hacer los MTA económicamente viable se pueden fabricar en un sistema reducido aislado del entorno externo (aislador), lo que permite la ubicación de esta instalación

en un entorno de clase D, que es mucho más permisivo y menos costoso.

En el presente trabajo de investigación, se ha diseñado una unidad de producción de terapias avanzadas, como alternativa a una sala blanca convencional, consistente en un aislador, situado en la sala de elaboración de estériles del Servicio de Farmacia Hospitalaria (SFH), donde se han instalado los aparatos necesarios para la producción de un MTA para el tratamiento de la insuficiencia límbica, llevándose a cabo una cualificación tanto de la instalación como de los aparatos instalados.

Asimismo, se ha desarrollado el sistema de calidad farmacéutico adaptado a esta unidad de producción, redactándose todos los procedimientos y los registros que éstos generan, donde se demuestra que se cumplen las NCF, y que permite tener una mejora continua del proceso de producción. Además, se ha llevado a cabo la evaluación periódica de los proveedores, y las validaciones pertinentes para asegurar que el personal está debidamente formado, y que los procesos son eficaces y consistentes, asegurando la reproducibilidad en la producción.

Con la unidad de producción, y el sistema de calidad farmacéutico diseñado, se ha demostrado que se puede producir un MTA dentro de un aislador situado en la sala de elaboración de estériles del SFH, cumpliendo todos los estándares de garantía de seguridad a un coste asequible para los pacientes. Este entorno de trabajo ultra limpio a pequeña escala, cumple con los estándares de las NCF y podría ser una solución para el alto coste asociado con la producción de MTA en una sala limpia convencional.

RESUMEN (en Inglés)

The present work develops an original facility for the production of an advanced therapy medicinal products (ATMP) for the treatment of limbal stem cell deficiency, a rare disease. This ATMP is an ex vivo expansion of allogeneic limbocorneal stem cells, using PRGF as the only one supplement to the culture medium and as a scaffold to transport limbal stem cells, thus avoiding the use of xenogeneic products, that was developed in the basic laboratory research. This unit has the competitive advantages of its small size, cost and maintenance, and allows the performance of ophthalmological ATMP in compliance with all current regulations.

To produce ATMP the manufacturer has to meet the standards of a pharmaceutical

quality system to comply with the guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP), a series of requirements during production to assure the quality and the effectiveness of the drug. These standards require a control during production and imply production in a clean room with strict environmental conditions (class A work area and class B environment). These requirements make the production of ATMP expensive and in many cases unprofitable, as their use is limited to a few patients and a single unit per manufacturing batch, in most productions.

To make ATMP economically viable they can be manufactured in a reduced system isolated from the external environment (isolator), which allows the location of this installation in a class D environment, which is much more permissive and less expensive.

In the present work, the installation of a mini clean room has been designed, as an alternative to a conventional clean room, consisting of a scaled-down system isolated from the external environment (isolator), where the necessary devices have been installed for the production of the ATMP for the treatment of limbic insufficiency, leading to carry out a qualification of both the installation and the installed devices.

The quality system adapted to this facility has been developed, with the development of all registers, where it is shown that it complies with the GMP rules and that allows for continuous improvement of the production process. In addition, the periodic evaluation of the suppliers has been carried out and validations have been carried out to ensure that the staff has received training; processes are efficient and consistent, ensuring reproducibility in that production.

With this installation, inside the sterile production room of the hospital pharmacy service, and the designed quality system, an ATMP could be produced inside an isolator, complying with all the safety guarantee standards to an affordable cost for patients. This small-scale, ultra-clean work environment meets GMP standards and could be a solution to the high cost associated with ATMP production in a conventional clean room.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis doctoral, es fruto de un trabajo de investigación realizado por el grupo de superficie ocular y medicina regenerativa de la Fundación de Investigación Oftalmológica, a todos ellos quiero expresar mi máximo agradecimiento, sin ellos no hubiera sido posible este trabajo. En especial a Natalia, un pilar fundamental por su dedicación en el desarrollo de este trabajo, gracias por todo, por tu tiempo invertido, tu perseverancia y tu criticidad.

A mis directores, al Dr. Merayo por hacerme descubrir y enseñarme el método científico, y al Dr. Fernández-Vega por su apoyo en este trabajo.

Al Dr. Meana, por iniciarme en el mundo de las terapias avanzadas, y por no dejar con su espíritu investigador de innovar y buscar siempre las posibilidades más extremas.

A Manuel, por ser el gran investigador que eres, y por tu total disponibilidad y originalidad.

A Ana, por descubrirme el maravilloso mundo de la oftalmología dentro de la farmacia hospitalaria, los años que hemos trabajado juntas ha sido un verdadero placer, ahora en otras áreas seguiremos investigando juntas.

Al Dr. Alfonso, por abrirme la puerta a la oftalmología clínica y confiar plenamente en nuestras recomendaciones y aportaciones desde el servicio de farmacia.

A mis padres, Basi y Charo, gracias porque me habéis dado todo lo que habéis podido y más, hoy soy la persona que soy gracias a vosotros, sin vuestra ayuda no hubiera podido llegar hoy hasta aquí. Por inculcarme ese espíritu de superación y exigencia. Gracias también por ser los mejores abuelos que se pueden tener, tenemos mucha suerte de teneros.

A mi hermano, Basilio, por ser más que un hermano, un apoyo en mi vida, y estar siempre ahí.

A Fran, mi pilar básico, gracias cariño por tu apoyo incondicional, sin ello no hubiera sido posible esto. Gracias por estar siempre apoyándome en todo y animándome a conseguir los retos más inalcanzables.

A Alba, mi luz y mi inspiración, gracias por alegrarnos tanto el día a día con la luminosidad de tu sonrisa y tu vitalidad. Eres lo mejor de nuestras vidas.

A toda mi familia, en especial a mis abuelos, Rosa, Javier y Clori, que me han dado ese cariño incondicional que sólo unos abuelos pueden dar y que he tenido y tengo la suerte de seguir recibiéndolo. Y como no, a mi tía Nieves y mi hermana Lara, mis marujas, a mi tío Gregorio y Borja, que me han ayudado, ahora y siempre.

Al Centro Comunitario del Sangre y Tejidos de Asturias, y a sus trabajadores, por su colaboración en el presente trabajo de investigación.

A la familia Fernández-Vega por la oportunidad de trabajar junto a ellos y poder brindar a los pacientes la excelencia en la oftalmología y por la confianza depositada en mí.

A Ramón, por su apoyo en toda la gestión documental de la presente tesis.

A todos los trabajadores del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega y de la Fundación de Investigación Oftalmológica, ha sido un verdadero placer trabajar con vosotros. Y a todo el personal que se haya visto involucrado en el presente trabajo de tesis doctoral.

Gracias a todos de verdad.

Pamplona, 20 de Noviembre de 2021

A mis padres y mi hermano

A Fran y Alba

"Somos lo que hacemos repetidamente. La excelencia, entonces, no es un acto, es un hábito"

Aristóteles

Índice

RESUMEN **19**

ABSTRACT **23**

MOTIVACIÓN, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y ESTRUCTURACIÓN **27**

INTRODUCCIÓN **31**

1. ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS PARA OFTALMOLOGÍA 31

1.1. ANATOMÍA OCULAR Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN 31

1.2. FORMAS FARMACÉUTICAS OFTÁLMICAS Y REQUISITOS GALÉNICOS 32

2. MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA 33

3. MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA EN OFTALMOLOGÍA 37

4. REGULACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA 39

5. NORMAS DE CORRECTA FABRICACIÓN 42

6. UNIDADES DE PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA 51

6.1. SALAS BLANCAS CONVENCIONALES 51

6.2. SALAS BLANCAS MODULARES 53

6.3. ESTACIONES DE TRABAJO PARA PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 54

JUSTIFICACIÓN **61**

HIPÓTESIS **65**

OBJETIVOS **69**

CAPÍTULO 1: DISEÑO, INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS ADAPTADA PARA LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS EN OFTALMOLOGÍA **73**

1. MATERIAL Y MÉTODO 73

1.1. DISEÑO, INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 73

1.1.1. REQUERIMIENTOS DE USUARIO PARA LA INSTALACIÓN 73

1.1.2. DISEÑO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 73

1.1.3. INSTALACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 74

1.1.4. PLAN DE CUALIFICACIÓN 74

1.1.4.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN 74

1.1.4.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA 75

1.1.4.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL 76

1.1.5. PROGRAMA DE MANTENIMIENTO 77

1.2. INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS 78

1.2.1. REQUERIMIENTOS DE USUARIO DE LOS APARATOS 78

1.2.2. INSTALACIÓN DE LOS APARATOS 78

1.2.3. PLAN DE CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS 78

1.2.3.1. INCUBADOR 78
1.2.3.2. CENTRÍFUGA 80
1.2.3.3. MICROSCOPIO 82
1.2.3.4. FRIGORÍFICOS Y ESTUFAS 83
1.2.4. PROGRAMA DE MANTENIMIENTO DE LOS APARATOS 85
1.3. PLAN DE MONITORIZACIÓN AMBIENTAL 86
1.3.1. MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS 86
1.3.2. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS NO VIABLES 87
1.3.3. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS VIABLES 87
2. RESULTADOS 89
2.1. DISEÑO, INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 89
2.1.1. DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE USUARIO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS SEGÚN LA NORMATIVA ACTUAL 89
2.1.2. DISEÑO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 89
2.1.3. INSTALACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 91
2.1.4. PLAN DE CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS .92
2.1.4.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN 92
2.1.4.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA 93
2.1.4.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL 93
2.2. INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS 101
2.2.1. DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE USUARIO DE LOS APARATOS 101
2.2.1.1. INCUBADOR 101
2.2.1.2. CENTRÍFUGA 102
2.2.1.3. MICROSCOPIO 102
2.2.1.4. FRIGORÍFICOS 102
2.2.1.5. ESTUFAS 102
2.2.2. INSTALACIÓN DE LOS APARATOS 103
2.2.3. PLAN DE CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS 109
2.3. MONITORIZACIÓN AMBIENTAL 132
2.3.1. MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS 132
2.3.2. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS NO VIABLES 134
2.3.3. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS VIABLES 134
CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CALIDAD FARMACÉUTICO ADAPTADO A LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS 139
1. MATERIAL Y MÉTODO 139
1.1. MANUAL DE CALIDAD 139
1.2. MANUAL DE RIESGOS. EVALUACIÓN DEL RIESGO DURANTE LA PRODUCCIÓN 139

1.3. REDACCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS GENERALES DE GARANTÍA DE CALIDAD Y REGISTROS 143
1.4. NO CONFORMIDADES Y GESTIÓN DE ACCIONES CORRECTIVAS Y PREVENTIVAS 144
1.5. DISEÑO DE UN PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN 145
1.5.1. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL INVOLUCRADO EN EL PROCESO 146
1.5.2. CUALIFICACIÓN DE LOS PROVEEDORES 146
1.5.3. CUALIFICACIÓN DE LOS LOCALES Y APARATOS 148
1.5.4. VALIDACIÓN DE LA LIMPIEZA 148
1.5.5. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN 149
1.6. GESTIÓN DE AUDITORÍAS INTERNAS 149
2. RESULTADOS 150
2.1. MANUAL DE CALIDAD 150
2.2. MANUAL DE RIESGOS 150
2.3. REDACCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS GENERALES DE GARANTÍA DE CALIDAD Y REGISTROS 166
2.4. NO CONFORMIDADES Y GESTIÓN DE ACCIONES CORRECTIVAS Y PREVENTIVAS 172
2.5. DISEÑO DE UN PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN 174
2.5.1. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL INVOLUCRADO EN EL PROCESO 174
2.5.2. CUALIFICACIÓN DE LOS PROVEEDORES 177
2.5.3. CUALIFICACIÓN DE LOS LOCALES Y EQUIPOS 181
2.5.4. VALIDACIÓN DE LA LIMPIEZA 181
2.5.5. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN 182
2.6. GESTIÓN DE AUDITORÍAS INTERNAS 182
CAPÍTULO 3: PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA (LAMELA EPITELIAL) PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA, EN LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DISEÑADA 187
1. MATERIAL Y MÉTODO 187
1.1. PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA 187
1.1.1. ELABORACIÓN EL MEDIO DE CULTIVO Y DE LAS MEMBRANAS DE PRGF 187
1.1.2. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE LIMBO ESCLEROCORNEAL 188
1.1.3. CAMBIOS DE MEDIO DE CULTIVO 189
1.1.4. OBTENCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA (LAMELA EPITELIAL) 189
1.1.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA 189
1.1.6. PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA 190
1.2. CONTROLES DE CALIDAD 190
1.2.1. MONITORIZACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL DEL PROCESO 190
1.2.2. CONTROLES DE CALIDAD DEL PRODUCTO 191
1.3. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIAS AVANZADAS 193
1.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA 194

1.5. DISEÑO DE UN PLAN DE REVISIÓN ANUAL DE PRODUCTO 195
2. RESULTADOS 195
2.1. PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA 195
2.2. CONTROLES DE CALIDAD 197
2.2.1. CONTROLES DE CALIDAD DEL PROCESO 197
2.2.2. CONTROLES DE CALIDAD DEL PRODUCTO 197
2.3. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIAS AVANZADAS 199
2.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA 202
2.5. DISEÑO DE UN PLAN DE REVISIÓN ANUAL DE PRODUCTO 203
DISCUSIÓN 215
FUTUROS PROYECTOS 229
CONCLUSIONES 233
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 237
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS 253
ÍNDICE DE FIGURAS 259
ÍNDICE DE TABLAS 261
DIVULGACIÓN CIENTÍFICA 265
CRÉDITOS Y FINANCIACIÓN 269
ANEXOS 271

Resumen

Resumen

El presente trabajo de investigación desarrolla una unidad de producción de terapias avanzadas original, para poder trasladar a la práctica clínica la elaboración de un Medicamento de Terapia Avanzada (MTA) para el tratamiento de la insuficiencia límbica o déficit limbar. El medicamento desarrollado consiste en la expansión ex vivo de células madre limbocorneales alogénicas, utilizando Plasma Rico en Factores de Crecimiento (del inglés, Plasma Rich in Growth Factors, PRGF) como único suplemento del medio de cultivo y como andamiaje (scaffold) para poder cultivar y trasplantar las células madre limbares. La unidad de producción desarrollada, tiene las ventajas competitivas de su reducido tamaño, coste y mantenimiento y permite la realización de MTA oftalmológicos cumpliendo toda la normativa vigente.

La fabricación de MTA, al igual que la fabricación de los medicamentos comercializados, tiene que cumplir los estándares de un sistema de calidad farmacéutico para cumplir con la Guía de las Normas de Correcta Fabricación (NCF), que implican el cumplimiento de unos requisitos durante la producción y la vida útil de todo el producto que van a asegurar la calidad y efectividad del medicamento para el uso al que está destinado; este cumplimiento implica la producción en una sala limpia con estrictas condiciones ambientales (área de trabajo clase A y ambiente clase B).

Estos requisitos hacen que la producción de los MTA sea costosa, y en muchos casos poco rentable, al limitarse su uso, a unos pocos pacientes y a una sola unidad por lote de fabricación, en la mayoría de las producciones.

Para hacer los MTA económicamente viable se pueden fabricar en un sistema reducido aislado del entorno externo (aislador), lo que permite la ubicación de esta instalación en un entorno de clase D, que es mucho más permisivo y menos costoso.

En el presente trabajo de investigación, se ha diseñado una unidad de producción de terapias avanzadas, como alternativa a una sala blanca convencional, consistente en un aislador, situado en la sala de elaboración de estériles del Servicio de Farmacia Hospitalaria (SFH), donde se han instalado los aparatos necesarios para la producción de un MTA para el tratamiento de la insuficiencia límbica, llevándose a cabo una cualificación tanto de la instalación como de los aparatos instalados.

Asimismo, se ha desarrollado el sistema de calidad farmacéutico adaptado a esta unidad de producción, redactándose todos los procedimientos y los registros que éstos generan, donde se demuestra que se cumplen las NCF, y que permite tener una mejora continua del proceso de producción. Además, se ha llevado a cabo la evaluación periódica de los proveedores, y las validaciones pertinentes para asegurar que el personal está debidamente formado, y que los procesos son eficaces y consistentes, asegurando la reproducibilidad en la producción.

Con la unidad de producción, y el sistema de calidad farmacéutico diseñado, se ha demostrado que se puede producir un MTA dentro de un aislador situado en la sala de elaboración de estériles del SFH, cumpliendo todos los estándares de garantía de seguridad a un coste asequible para los pacientes. Este entorno de trabajo ultra limpio a pequeña escala, cumple con los estándares de las NCF y podría ser una solución para el alto coste asociado con la producción de MTA en una sala limpia convencional.

Abstract

Abstract

The present work develops an original facility for the production of an advanced therapy medicinal products (ATMP) for the treatment of limbal stem cell deficiency, a rare disease. This ATMP is an ex vivo expansion of allogeneic limbocorneal stem cells, using PRGF as the only one supplement to the culture medium and as a scaffold to transport limbal stem cells, thus avoiding the use of xenogeneic products, that was developed in the basic laboratory research. This unit has the competitive advantages of its small size, cost and maintenance, and allows the performance of ophthalmological ATMP in compliance with all current regulations.

To produce ATMP the manufacturer has to meet the standards of a pharmaceutical quality system to comply with the guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP), a series of requirements during production to assure the quality and the effectiveness of the drug. These standards require a control during production and imply production in a clean room with strict environmental conditions (class A work area and class B environment). These requirements make the production of ATMP expensive and in many cases unprofitable, as their use is limited to a few patients and a single unit per manufacturing batch, in most productions.

To make ATMP economically viable they can be manufactured in a reduced system isolated from the external environment (isolator), which allows the location of this installation in a class D environment, which is much more permissive and less expensive.

In the present work, the installation of a mini clean room has been designed, as an alternative to a conventional clean room, consisting of a scaled-down system isolated from the external environment (isolator), where the necessary devices have been installed for the production of the ATMP for the treatment of limbic insufficiency, leading to carry out a qualification of both the installation and the installed devices.

The quality system adapted to this facility has been developed, with the development of all registers, where it is shown that it complies with the GMP rules and that allows for continuous improvement of the production process. In addition, the periodic evaluation of the suppliers has been carried out and validations have been carried out to ensure that the staff has received training; processes are efficient and consistent, ensuring reproducibility in that production.

With this installation, inside the sterile production room of the hospital pharmacy service, and the designed quality system, an ATMP could be produced inside an isolator, complying with all the safety guarantee standards to an affordable cost for patients. This small-scale, ultra-clean work environment meets GMP standards and could be a solution to the high cost associated with ATMP production in a conventional clean room.

Motivación, Pregunta de Investigación y Estructuración

Motivación, pregunta de investigación y estructuración

La práctica farmacéutica más antigua, y que más identifica a los farmacéuticos, es la farmacotecnia o elaboración de medicamentos, gracias a la cual se adaptan los principios activos para poder dar forma farmacéutica y aplicarlos en el lugar adecuado, y así aliviar o curar enfermedades en los pacientes que lo necesitan.

La farmacotecnia es un pilar básico dentro de la Farmacia Hospitalaria, con la elaboración de medicamentos en los servicios de farmacia, actualmente, se adaptan medicamentos ya existentes para ser administrados por vías de administración diferentes a las aprobadas, aumentando su efectividad y biodisponibilidad, o adaptando los medicamentos a poblaciones más susceptibles como la pediátrica, con estos medicamentos elaborados en ocasiones también se cubren patologías todavía sin resolver por parte de la industria farmacéutica con los medicamentos actualmente comercializados.

El objetivo de la apertura del SFH dentro del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega fue poder ofrecer a los pacientes más calidad y servicios en la prescripción y preparación de los medicamentos para las patologías que trata el hospital, y así abordar el problema no resuelto de ofrecer medicamentos para las patologías oftalmológicas, que no son abordados por la industria farmacéutica, éstos vacíos son cubiertos con las fórmulas magistrales. Es por ello, que en el día a día del SFH se elaboran medicamentos cumpliendo con las normativas vigentes, para proporcionarles un tratamiento seguro, efectivo y de la calidad adecuada para resolver sus problemas de salud ocular.

Pese a esto, existen pacientes que sufren patologías oculares con limitadas opciones terapéuticas, como es el caso de la insuficiencia límbica o déficit limbar, en la que ni los medicamentos comercializados ni las técnicas quirúrgicas convencionales, como el trasplante penetrante o lamelar de córnea, constituyen un tratamiento eficaz. Es en estos casos donde los MTA, han demostrado que pueden resolver esta enfermedad, siendo un tratamiento eficaz y seguro.

Actualmente en el mercado, existe un MTA, para el tratamiento de la insuficiencia límbica, no financiado por la Seguridad Social y a un precio que lo hace inaccesible para pacientes. Eso unido a un hándicap, el uso de productos xenogénicos para su producción, llevó al Instituto

Oftalmológico Fernández-Vega a iniciar una línea de investigación en MTA aplicados a la oftalmología, a la cual me incorporé a mi llegada al SFH en el año 2015. Esta línea de investigación dio lugar al desarrollo de un MTA para el tratamiento de esta enfermedad basado en el PRGF, en el que éste se utiliza como único suplemento del medio de cultivo de las células limbares, y para el desarrollo del soporte que permite su crecimiento y trasplante, habiendo demostrado un efecto terapéutico en quemaduras precursoras de esta enfermedad en un modelo animal.

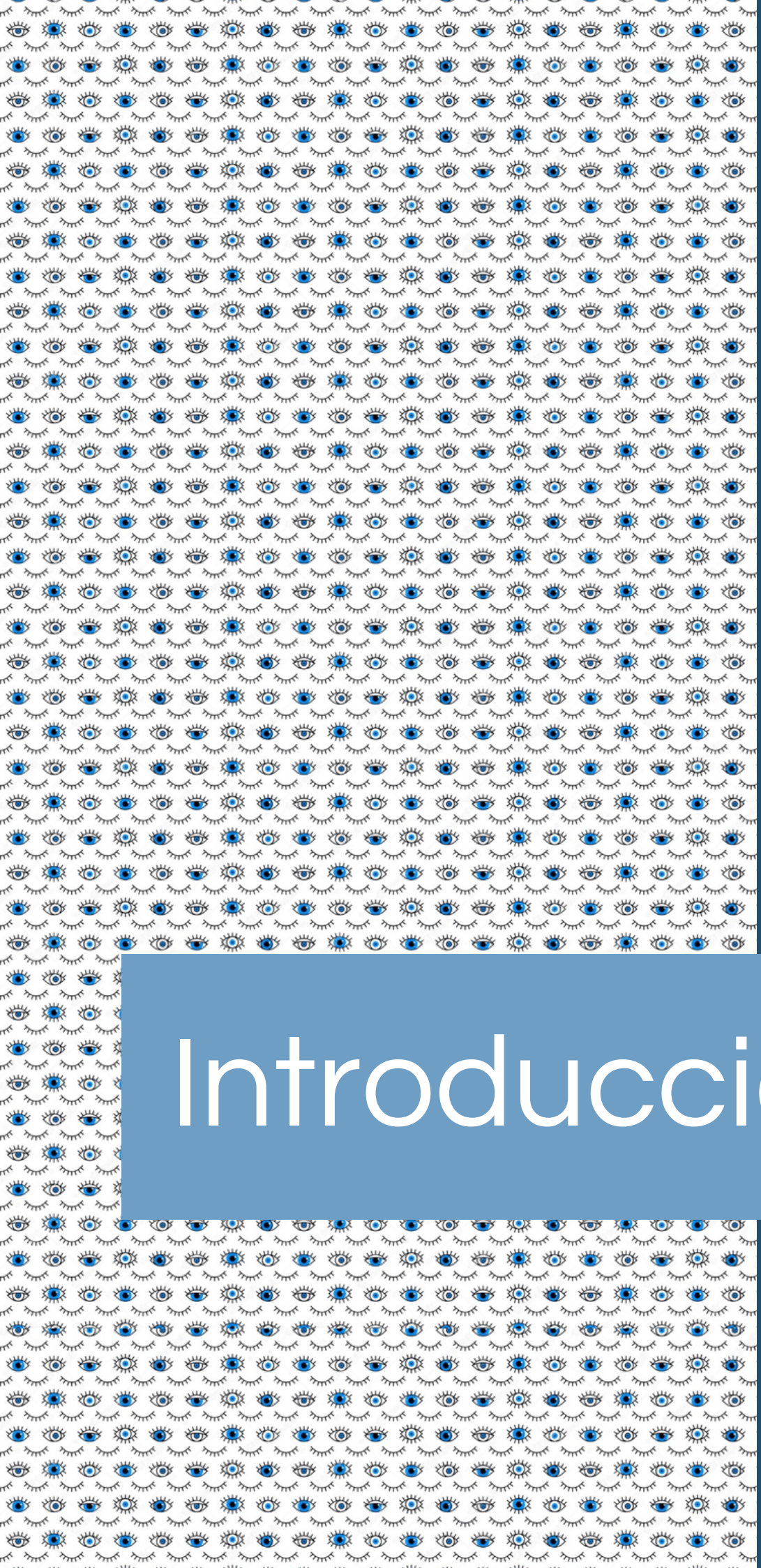
En el presente trabajo de investigación, y continuando la línea de investigación, se realiza la traslación clínica, de la producción de un MTA para el tratamiento de la insuficiencia límbica, intentando responder a la siguiente pregunta de investigación: ¿Se podría diseñar una instalación adaptada para oftalmología dentro del SFH, para la producción de un MTA cumpliendo la Guía de NCF?

El presente trabajo de tesis doctoral se ha desarrollado siguiendo el método científico, y para facilitar su comprensión se ha dividido en tres partes:

La primera parte dedicada al diseño de una instalación que cumpla la normativa actual de producción de terapias avanzadas, teniendo en cuenta el reducido número de lotes a producir y el mínimo tamaño de un MTA para oftalmología, demostrando mediante las cualificaciones necesarias que cumple con las NCF.

La segunda parte desarrolla el sistema de calidad farmacéutico, para asegurar la trazabilidad de cualquier producto y la validación de los procesos que van a influir en el producto final, asegurando que la producción del MTA se realiza de manera segura y es de la calidad adecuada para el uso al que está destinado.

La tercera parte se centra en la producción de un MTA para el tratamiento de la insuficiencia límbica, que cumpla con las NCF y con los requisitos definidos en su ficha técnica.



Introducción

Introducción

1. ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS PARA OFTALMOLOGÍA

1.1. ANATOMÍA OCULAR Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

El ojo es un órgano ideal para el uso de terapias avanzadas debido a las siguientes características (1):

- Tamaño: es pequeño (23-25mm) (2), y se necesita poca cantidad de medicamento para su tratamiento.
- Anatomía ocular: está perfectamente compartimentado, lo que hace que la distribución del medicamento sea limitada (Figura 1).
- Accesibilidad: es adecuada para aplicación de tratamientos y valoración de resultados, con diferentes rutas de administración, que hacen posible depositar el fármaco en el lugar de acción requerido, teniendo una biodisponibilidad del 100%.
- Aislamiento: está perfectamente aislado del resto del cuerpo gracias a la barrera hemato-retiniana que hace del ojo un órgano inmunológicamente privilegiado.

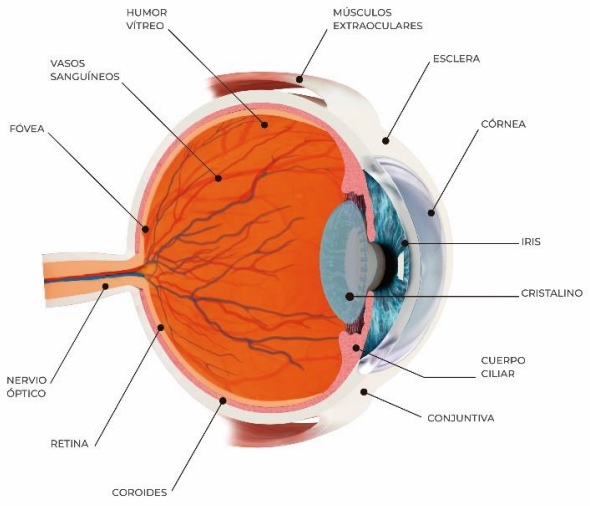


FIGURA 1: Partes del ojo

La estricta compartimentalización hace que existan diferentes vías de administración en el globo ocular, que facilitan el depósito de fármaco en el lugar diana terapéutico, estas son (3-5):

- Vía tópica oftálmica: la vía tópica oftálmica deposita los medicamentos sobre la superficie ocular. Es la ruta más sencilla de aplicación de fármacos en el ojo. Si bien, la biodisponibilidad ocular por esta vía es muy baja. Con los nuevos diseños de liberación de fármacos, como las nanopartículas, se podrá acceder a las vías más profundas desde una aplicación tópica (6), favoreciendo la biodisponibilidad del fármaco y con una administración sencilla y sin riesgos.
- Vías perioculares: la vía peribulbar, retrobulbar, subconjuntival y subtenoniana son las vías de administración de medicamentos inyectados debajo de la conjuntiva o tejido de Tenon, evitando la barrera corneal y conjuntival.
- Vías intraoculares: la vía intracameral deposita fármacos en el humor acuoso (7); las vías intravítrea, subretiniana y la coroidea en el humor vítreo y retina, en el polo posterior (8); y la vía intracorneal deposita fármaco directamente en la córnea (9).

1.2. FORMAS FARMACÉUTICAS OFTÁLMICAS Y REQUISITOS GALÉNICOS

En los SFH, se elaboran a diario cientos de fórmulas magistrales o preparados oficinales, para adaptar los principios activos a formas farmacéuticas que se puedan administrar por la vía adecuada. Estos medicamentos elaborados cubren un vacío terapéutico no cubierto con los medicamentos comercializados actualmente, siendo una práctica muy frecuente y necesaria en especialidades como la pediatría y la oftalmología.

Las preparaciones oftálmicas son preparaciones líquidas, semisólidas o sólidas, estériles, destinadas a ser administradas en el globo ocular y/o en las conjuntivas, o a ser introducidas en el saco conjuntival (10).

Para la elaboración de estos medicamentos, se debe de tener en cuenta las características de la forma farmacéutica elaborada, y de la vía de administración seleccionada, para así cumplir con una serie de requisitos galénicos y conseguir la tolerancia y efectividad del tratamiento.

La elaboración de estos medicamentos debe de asegurar las condiciones óptimas para que sean de la calidad adecuada, y esto se consigue cumpliendo el Real Decreto (RD) 175/2001 (11) y la Guía de Buenas Prácticas de Preparación de los Medicamentos en los SFH (12). Dicho cumplimiento dará lugar a una autorización de elaboración de fórmulas magistrales en el SFH por las autoridades competentes, las consejerías de salud de cada comunidad autónoma.

Los requisitos galénicos condicionan una adecuada tolerancia y biodisponibilidad. Entre ellos cabe destacar los siguientes:

- **Limpidez:** los colirios en solución deben de estar libres de partículas(13). Las suspensiones presentan cierto efecto "retard" (14), en estas preparaciones la Farmacopea Española especifica que por cada 10 µg de principio activo sólido, no más de 20 partículas deben presentar una dimensión máxima superior a 25 µm y no más de 2 de estas partículas tener una dimensión máxima superior a 50 µm. Ninguna partícula debe tener una dimensión máxima superior a 90 µm (10).
- **Neutralidad:** el pH deberá estar en un rango de 6,5 a 8,5 (15).
- **Isotonicidad:** deberán tener una osmolaridad en torno a 302-318 mOsm/L (15).
- **Esterilidad:** un requisito imprescindible para las fórmulas magistrales y medicamentos para oftalmología, es la esterilidad, y es por ello que se han de seguir unas rigurosas medidas para su elaboración, siendo preparadas bajo condiciones estériles y con una técnica aséptica debidamente demostrada(16). Todas las preparaciones oftálmicas deben cumplir el capítulo 2.6.1 de la Farmacopea, para demostrar su esterilidad (10).

2. MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA

Los medicamentos de uso humano, según la Ley del Medicamento, se definen como *"toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico" (17)*.

Los MTA son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico.

Se clasifican en 4 grupos (18):

1. **Terapia génica:** hace 45 años se inició su desarrollo, y en esta última década ya se han demostrado sus beneficios clínicos en inmunodeficiencias primarias, hemofilias y leucemia (19). Se definen como un medicamento biológico que incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, con

objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica. Su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia. Los medicamentos de terapia génica no incluyen las vacunas contra enfermedades infecciosas (20). Estos medicamentos de terapia génica ofrece una estrategia terapéutica para enfermedades en la retina (21, 22), hemofilia B, atrofia espinal musculoesquelética…(23)

2. **Terapia celular:** es un medicamento biológico que contiene células o tejidos que han sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para el uso clínico previsto, o por células o tejidos que no se pretende destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante (20).

   La terapia celular incluye diferentes tipos celulares como pueden ser células madre mesenquimales, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células mononucleares, células progenitoras endoteliales, células madre neurales, células de tejido primario específico como pueden ser los condrocitos, miocitos o queratinocitos(24), con el objeto de tratar enfermedades neurológicas, oftalmológicas, autoinmunes, cardiovasculares, enfermedades degenerativas musculo-esqueléticas y vasculares periféricas (25).

3. **Ingeniería de tejidos:** un “producto de ingeniería tisular” es aquel que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, con el objetivo de regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano (20). El progreso en el desarrollo de tejidos que inició en 1987, abarca tejidos como el hígado, órganos vitales, médula espinal, vasos sanguíneos, piel, cartílago o vejiga (26).

4. **Medicamento combinado de terapia avanzada:** es el MTA que incorpora, como parte integrante del mismo, uno o más productos sanitarios (según la Directiva 93/42/CEE)(27), o uno o más productos sanitarios implantables activos (según la Directiva 90/385/CEE)(28). Su parte celular o tisular tiene que contener células o tejidos viables o no viables que ejerzan en el organismo humano una acción que pueda considerarse fundamental respecto de la de los productos sanitarios mencionados (20, 29).

La clasificación de los MTA en uno u otro grupo a veces puede no ser fácil, sobre todo para clasificarlos como terapia celular o ingeniería de tejidos ya que ambos productos incluyen células (Figura 2). La principal diferencia entre terapia celular y de tejidos se encuentra en la acción terapéutica para la cual están destinados, siendo el objeto de la terapia celular: tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad mediante acción farmacológica, inmunológica o metabólica, a diferencia de los tejidos los cuales tienen acciones reparadoras, regenerativas o de reemplazo de tejidos humanos (1).

Para que las células o tejidos se consideren «manipulados por ingeniería» deben cumplir al menos una de las condiciones siguientes (20):

- Han sido sometidos a manipulación sustancial, de modo que se logren las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para la regeneración, reparación o sustitución pretendidas. Se considera manipulación sustancial cualquier tipo de manipulación distinta de las manipulaciones no sustanciales enumeradas en particular en el anexo I del Reglamento (CE) Nº 1394/2007 (20): corte, trituración, moldeo, centrifugación, imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas, esterilización, irradiación, separación, concentración o purificación celular, filtrado, liofilización, congelación, criopreservación y vitrificación.
- Las células o tejidos no están destinados a emplearse para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante.

Cuando un medicamento no cumpla las condiciones estipuladas en las definiciones anteriores, no se considerará MTA. Un ejemplo sería el caso de células o tejidos para implante que no hayan sido objeto de una manipulación sustancial y que se vayan a utilizar con la misma función esencial en donante y receptor, como el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

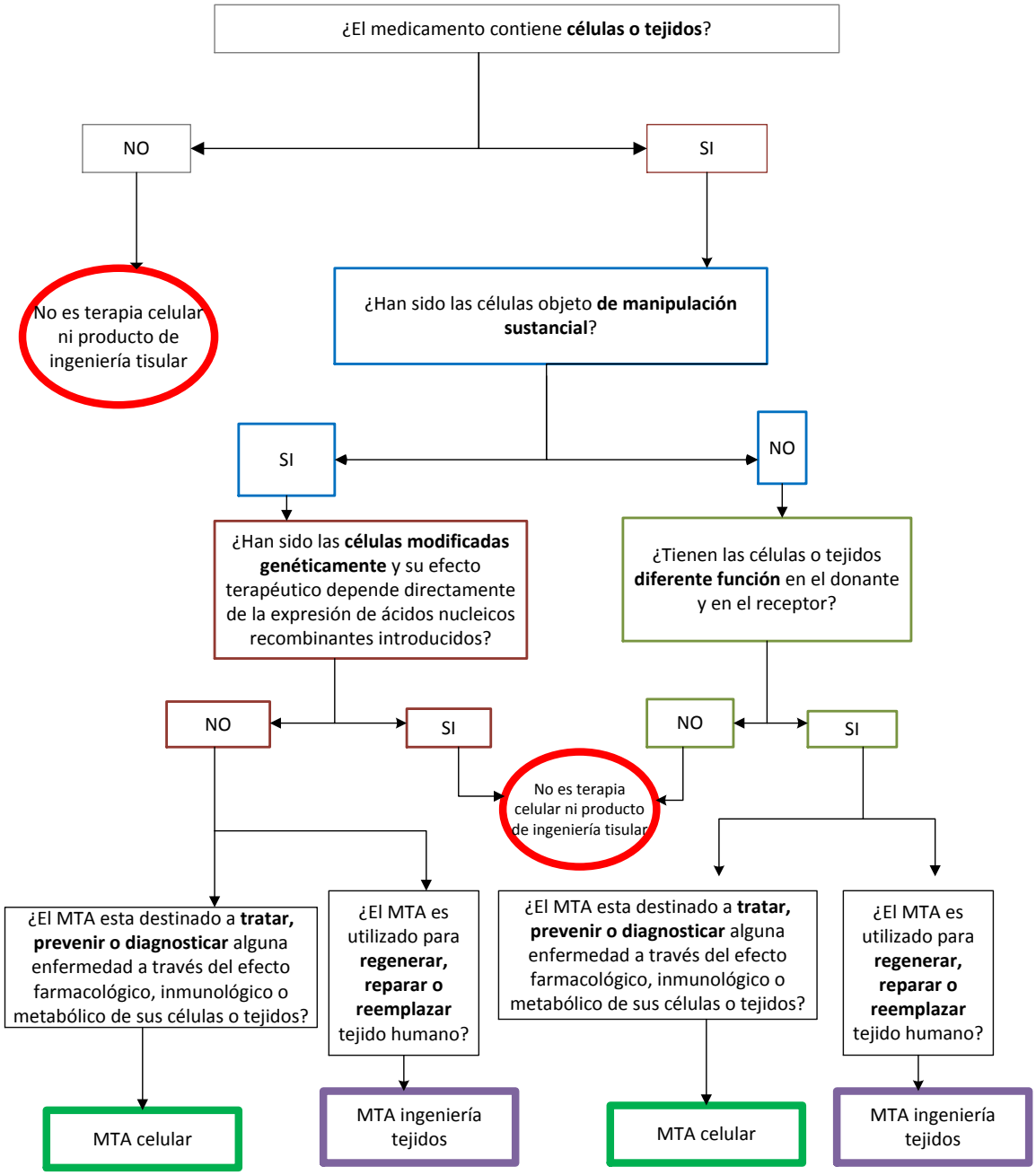


FIGURA 2: Clasificación de medicamentos de terapia avanzada en terapia celular o ingeniería de tejidos. Adaptada de *López Paniagua et al.* (1) MTA: Medicamento de Terapia Avanzada.

Los MTA constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces, como es el caso de algunas enfermedades raras, que afectan a un número pequeño de personas en comparación con la población general y que, por su rareza, plantean cuestiones específicas. En Europa, se considera que una enfermedad es rara cuando afecta a 1 persona de cada 2.000 (30).

Actualmente, además de las enfermedades citadas anteriormente, también existen terapias avanzadas comercializadas y en investigación para tratamiento de enfermedades como la isquemia de miembros (31), la enfermedad de Parkinson (32), enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica (33, 34), el infarto de miocardio (35), las lesiones de la médula espinal (36, 37), la enfermedad de Crohn (38), la diabetes tipo 1 (39), la diabetes tipo 2 (40, 41), la enfermedad renal (42), la enfermedad hepática (43), las enfermedades degenerativas musculoesqueléticas (44)…

3. MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA EN OFTALMOLOGÍA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las principales causas de ceguera crónica son las cataratas, el glaucoma, la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), las opacidades corneales, la retinopatía diabética, el tracoma y las afecciones oculares infantiles, como las causadas por la carencia de vitamina A (45). La ceguera relacionada con la edad y la debida a la diabetes no controlada están aumentando en todo el mundo, mientras que la ceguera de causa infecciosa está disminuyendo gracias a las medidas de salud pública. Estos datos se esperan que aumenten drásticamente en las próximas décadas debido al crecimiento y al envejecimiento de la población.

Tres cuartas partes de los casos de ceguera son prevenibles o tratables, pero hay una parte que, en la actualidad, está todavía sin resolver por los tratamientos y procedimientos médicos realizados en la práctica clínica habitual. Ocurre en enfermedades como la retinosis pigmentaria, la enfermedad de Stadgard, la amaurosis congénita de Leber, el edema macular diabético, la DMAE, las patologías del nervio óptico o la insuficiencia limbar; patologías, en las que las terapias avanzadas, están dando esperanza de tratamiento a los pacientes que las sufren (46-49).

Las terapias avanzadas en oftalmología, se describieron como tal por primera vez en 1997. En ese año *Pellegrini y cols.* publicaron los resultados de una terapia celular para el tratamiento del déficit limbar, consistente en el cultivo e implantación de células madre limbares autólogas para restaurar el daño corneal en dos pacientes (50). Una terapia que se presentó como un tratamiento ocular alternativo a los tratamientos basados en tejidos habitualmente utilizados como el trasplante de córnea.

En 2008, la Agencia Europea del Medicamento (EMA), autorizó la designación de medicamento huérfano a "Células madre autólogas expandidas ex vivo que contienen epitelio corneal humano expandido para el tratamiento de lesiones corneales debidas a quemaduras" (51).

Posteriormente, en 2010, el mismo grupo de investigación publicó un trabajo en el que el grupo de pacientes tratados con este medicamento fue más numeroso, 112 casos (52), y finalmente, en 2015, este MTA, el Holoclar® (Holostem Advanced Therapies, Italia) (53) fue el primer MTA aprobado por la EMA (54), con indicación en ficha técnica para el tratamiento de pacientes que padecen deficiencia de células madre limbares de moderada a grave, unilateral o bilateral, debida a quemaduras oculares por agentes físicos o químicos.

La deficiencia de células madre limbares o insuficiencia del limbo esclerocorneal (ORPHA:171673), es una enfermedad rara que afecta a la superficie ocular, con una prevalencia de 1-5/10.000 (30).

El mecanismo de acción del Holoclar® se fundamenta en el reemplazo del limbo corneal, en aquellas regiones deficientes de la córnea a partir de células madre del propio paciente, expandidas *in vitro* a partir de una pequeña biopsia de tejido limbar. Al restablecer el reservorio de células pluripotenciales, posibilita la reparación del epitelio corneal, habiendo demostrado un efecto estadísticamente significativo, y clínicamente relevante en la obtención de un epitelio corneal estable a los 12 meses del trasplante, en pacientes con quemaduras oculares moderadas a graves, sin presencia de neovascularización significativa.

La eficacia de Holoclar® en el tratamiento de pacientes se apoya en los resultados de tres estudios llevados a cabo en Italia (53): el estudio HLSTM01 (113 trasplantes), HLSTM02 (29 pacientes) y HLSTM04 (15 pacientes). En estos estudios, el 72% de los pacientes tratados tuvieron un trasplante con buenos resultados.

Posteriormente, se ha trabajado en muchos laboratorios en esta terapia avanzada, cultivando células madre limbares procedentes de cadáveres y utilizando otras fuentes celulares como pueden ser la mucosa oral, células mesenquimales… (55)

En España, en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid (IOBA), se han realizado ensayos clínicos para demostrar la seguridad y eficacia del trasplante de células mesenquimales expandidas ex vivo sobre una membrana amniótica, para el tratamiento de la ceguera debido a la insuficiencia limbar (56). Esta misma institución está

trabajando actualmente en nuevas vías de administración, como la vía subconjuntival, para la administración de una inyección de células madre mesenquimales, como una vía mínimamente invasiva, no siendo necesario el uso de *scaffold*, y permitiendo administrar muchas células en un volumen reducido (57).

También en España, la Iniciativa Andaluza de Terapias Avanzadas, ha llevado a cabo las fases 1 y 2 de un ensayo clínico para evaluar la seguridad y viabilidad de la implantación de córneas artificiales alogénicas humanas para el tratamiento de úlceras refractarias al tratamiento convencional(58).

Actualmente existen cerca de 1.000 ensayos clínicos activos, que tienen como fármacos de estudio terapias celulares, terapias génicas e ingeniería de tejidos para el tratamiento de patologías oculares (59).

Sin embargo, en Europa, sólo existen actualmente dos MTA oculares aprobados y comercializados por la EMA. El Holoclar®, anteriormente mencionado, y el Luxtuna® (Novartis, Suiza) (60), un producto de terapia génica que contiene la sustancia activa voretigén neparvovec. Voretigén neparvovec proviene de un virus adenoasociado de origen natural que ha sido modificado mediante técnicas de ADN recombinante, se trata de un vector de transferencia genética que utiliza la cápsida de un vector viral adenoasociado de serotipo 2 como vehículo para introducir en la retina el cADN de la proteína de 65 kDa del epitelio pigmentario de la retina humano (hRPE65). Luxturna® está indicado para el tratamiento de adultos y niños con pérdida de visión debido a una distrofia retiniana asociada a la mutación *RPE65* bialélica confirmada y que tienen suficientes células retinianas viables.

4. REGULACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA

Los MTA se amparan en el marco legal constituido por el Reglamento (CE) Nº 1394/2007 del Parlamento Europeo y el RD 1/2015 de la legislación española, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (17, 20).

Estas normas de calidad específicas aplicables, son equivalentes a los previstos en el Reglamento 726/2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano (61).

En general, la autorización de comercialización de estos medicamentos se realiza mediante el procedimiento centralizado solicitado a la EMA, en la que se ha creado en 2009 un comité especializado, el Comité de Terapias Avanzadas (CAT), con el fin de evaluar, certificar y clasificar estos MTA (62), donde se encuentran representados todos los países de la Unión Europea (UE) y asociaciones de médicos y pacientes (63).

El Reglamento (CE) Nº 1394/2007 del Parlamento Europeo sobre MTA, en el punto 7, contempla la "exención hospitalaria", "*que se define como la exclusión de algunos medicamentos de ese procedimiento centralizado, que son fabricados de forma no rutinaria, preparados ocasionalmente, de acuerdo con normas de calidad específicas, usados dentro del mismo Estado miembro en un hospital, bajo la exclusiva responsabilidad profesional de un facultativo para hacer frente a una prescripción médica individual de un producto a medida para un paciente concreto".* También llamada "cláusula de exclusión hospitalaria", da origen a la regulación nacional de los MTA de fabricación no industrial. La autorización de estos medicamentos corresponde a las autoridades nacionales, en el caso de España, a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (20), quien los autoriza, y éstos deben asegurar la trazabilidad y los requerimientos de farmacovigilancia, así como estándares específicos de calidad, que serán equivalentes a los que se ofrecen a nivel de la UE para los MTA que siguen el procedimiento centralizado de autorización.

La regulación de autorización de uso de estos MTA está contemplada en el RD 477/2014 (64), en que se describe que "*al igual que sucede con otros medicamentos tales como las fórmulas magistrales o los radiofármacos, se ha considerado que los MTA de fabricación no industrial deben disponer de un procedimiento específico de autorización que se adapte a sus especiales características de producción y aplicación sin olvidar la naturaleza específica de los MTA y sin menoscabo de las garantías de calidad, seguridad, eficacia, identificación e información".*

A su vez, el RD 1/2015, estableció la necesidad de un desarrollo reglamentario para la aplicación de dicha ley a los MTA cuando, aun concurriendo en ellos las características y condiciones establecidas en las definiciones de «medicamento de terapia génica» o de «medicamento de terapia celular somática», no hubieran sido fabricados industrialmente (65).

Hasta llegar a la actual normativa europea y española, la regulación de estos productos ha sido cambiante, la consideración de algunos de ellos como medicamentos se ha modificado a lo largo del tiempo y la cláusula de exclusión para medicamentos de fabricación no industrial se ha definido también de modo distinto. Con la actual normativa europea y española se ha

producido, en este ámbito, la consolidación de las definiciones y procedimientos de las recientes regulaciones y esta situación de estabilidad actual permite una aproximación regulatoria que defina las normas para la autorización de estos productos.

Como se recoge en el RD 477/2014: *"Algunos de estos productos, que en su día no se consideraron medicamentos, se encuentran en situación de uso en la práctica en algunas instituciones hospitalarias, y deberán, de acuerdo con las nuevas regulaciones, obtener una autorización por parte de la AEMPS de acuerdo con lo establecido en la disposición transitoria única de este RD. Entre ellos se encuentran el trasplante autólogo de condrocitos, el implante de queratinocitos para tratamiento de quemados o el tratamiento de lesiones corneales con células troncales limbocorneales"* (64). Esto se traduce en la consolidación de éstos tres MTA a nivel europeo, no siendo exigible para ellos ensayos clínicos previa autorización de uso.

Actualmente en España, existen 2 medicamentos aprobados por este procedimiento, acogidos a la exclusión del procedimiento centralizado de autorización (66):

1. NC1: Suspensión celular de células mesenquimales troncales adultas autólogas a una concentración de 100-300×106 células/µL en plasma autólogo. Aprobado en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid), en enero de 2019, cuya indicación terapéutica es el tratamiento de pacientes adultos (≤65 años) con secuelas de lesión medular traumática crónica, que presenten lesiones medulares incompletas a nivel dorsal o lumbar. Las lesiones medulares dorsales o lumbares completas están excluidas, con la excepción de lesiones completas localizadas quísticas, con cavidad centro-medular que no se extienda más de 1-3 segmentos medulares. (67)

2. ARI-0001 Dispersión de Chimeric Antigen Recetor T-Cell (CAR-T) para perfusión que contiene 0,1-1×10^6 células/kg. Aprobado en el Hospital Clinic Barcelona, en febrero de 2021, está indicado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de células B CD19+ en recaída o refractaria tras un mínimo de dos líneas de tratamiento o en recaída post-trasplante en pacientes adultos mayores de 25 años (68). Es un producto en el que la sustancia activa son linfocitos T diferenciados autólogos de sangre periférica expandidos y transducidos con un lentivirus para expresar un receptor antigénico quimérico con especificidad anti-CD19 (A3B1) conjugado con las regiones coestimuladoras 4-1BB y CD3z.

5. NORMAS DE CORRECTA FABRICACIÓN

Según el artículo 64 del RD 1/2015, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios) (65), para la producción de medicamentos, donde se incluyen los MTA, se deben seguir la Guía de NCF y esto aplica tanto a los laboratorios farmacéuticos que cuentan con una autorización de comercialización como a los centros productores que se acojan a la "exención hospitalaria".

La Guía de NCF se definen como *"la parte de la garantía de calidad que asegura que los medicamentos son elaborados y controlados de acuerdo con las normas de calidad apropiadas para el uso al que están destinados"* (69). Está destinada al cumplimiento de un Sistema de Calidad Farmacéutico (70), que engloba todo aquello que puede afectar a la calidad final de un medicamento.

Esta Guía de NCF, en la parte IV, "Directrices sobre normas de correcta fabricación específicas para Medicamentos de Terapia Avanzada", publicada en 2017 y de obligado cumplimiento desde el 22 de mayo de 2018, define los requisitos que van a asegurar esos estándares de calidad en la producción de MTA (71).

Representa el conjunto de medidas adoptadas con el objeto de garantizar que los medicamentos son de la calidad requerida para el uso al que están destinados. El cumplimiento del sistema de calidad farmacéutico exige una serie de requisitos para el personal, los locales y los equipos, el sistema de documentación, el sistema de control de calidad y la trazabilidad (72).

El cumplimiento de las NCF nos asegura que:

- Existe un sistema de control de calidad que sea funcionalmente independiente de la producción.
- Existen medidas implantadas para la evaluación prospectiva de cambios planificados y su aprobación previa a su implantación.
- Los defectos de calidad y las desviaciones de proceso son identificadas tan pronto como sea posible, las causas son investigadas y se toman las medidas correctoras y/o preventivas apropiadas.

- Se implantan los sistemas adecuados para asegurar la trazabilidad de los MTA y de sus materiales de partida y materias primas críticas.

A continuación, se desarrollan todos los aspectos indicados en la parte IV de las NCF:

1. Enfoque basado en el riesgo:

Toda producción de medicamentos, tiene implícito un riesgo, por lo que será importante aplicar una buena gestión de riesgos para la calidad que ayude a la determinación de los mismos. Es muy importante el desarrollo de un análisis de riesgos, analizando los factores que puedan poner en peligro la calidad del producto final, como puede ser por ejemplo la contaminación ambiental o la contaminación cruzada (73).

El enfoque basado en el riesgo, del inglés, *Risk Based Approach* (RBA), va a permitir diseñar las medidas de control necesarias para abordar los riesgos que se puedan dar durante todo el proceso de fabricación. El RBA debe aplicarse en relación con las materias primas, con los controles tanto en productos intermedios como en el producto final, con lo que se conseguirá una buena gestión de riesgos para la calidad (74).

La gestión de los riesgos es un proceso que consiste en valorar, controlar, comunicar y revisar todos los riesgos posibles, con el objetivo de la reducción de los mismos, y finalmente su aceptación que es la decisión de asumirlos, entendiéndose por riesgo la combinación de la probabilidad de que pueda ocurrir un daño y la gravedad del mismo.

Existen diferentes metodologías y herramientas reconocidas para la gestión del riesgo como pueden ser:

- Análisis modal de fallos y efectos.
- Análisis modal de fallos, efectos y su criticidad.
- Análisis por árbol de fallos.
- Análisis de peligros y puntos críticos de control.
- Análisis de peligros de operatividad.
- Análisis preliminar de peligros.

En el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), se identifican los peligros en cada etapa del proceso de fabricación, realizándose un listado de los peligros potenciales, ya

sean de naturaleza física, química y/o microbiológica. El análisis de los peligros se centra en los 6 factores principales que afectan o intervienen en la búsqueda de la excelencia en la calidad (Figura 3): el ambiente, las personas, las materias primas, los equipos, los sistemas de monitorización, y los métodos y procedimientos, consistiendo en una primera etapa de identificación, y una segunda etapa de evaluación de los mismos, teniendo en cuenta su gravedad y la probabilidad de que ocurran, haciendo uso de una matriz de doble entrada. Los peligros que tras su clasificación se consideran intolerables o importantes, se identifican como Puntos Críticos de Control (PCC), mientras que los peligros de clasificación moderada, se someten al árbol de decisiones para determinar si son PCC. Por último, se definen los límites críticos para cada PCC, así como los procedimientos de monitorización estrecha y continua de los parámetros ambientales que puedan influir en la calidad del producto final (74).

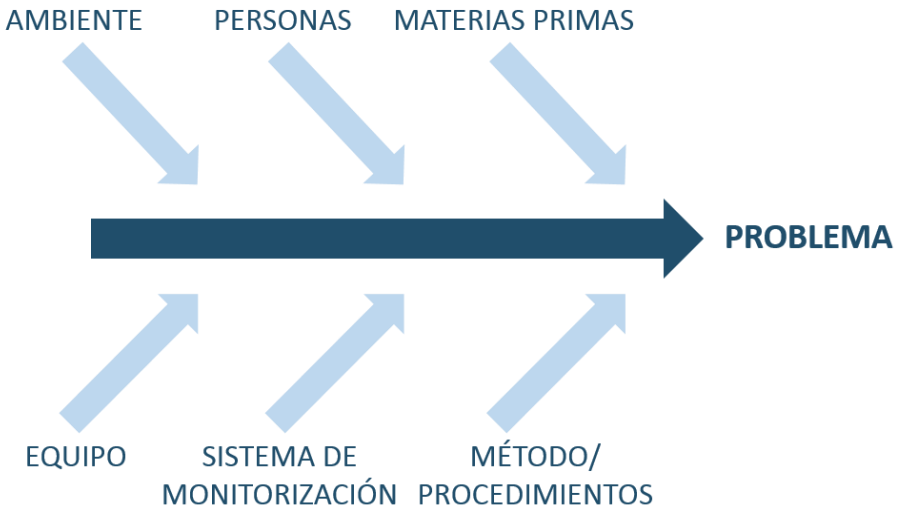


FIGURA 3: Factores que influyen en la excelencia de la calidad

2. Personal (75):

Se debe designar un número adecuado de recursos humanos con la cualificación y experiencia adecuadas a las operaciones que les son encomendadas.

El personal deberá estar adecuadamente formado, tanto en los principios de las NCF acorde a sus tareas, como en los procesos de producción en los que están implicados. Esta formación debe evaluarse periódicamente.

En relación a la higiene, se deben desarrollar programas de higiene, y vestimenta, de acuerdo a los grados de pureza del aire en las zonas donde se realicen las actividades a desarrollar.

Se establecerá un personal clave, con funciones y responsabilidades claramente definidas:

- Persona cualificada.
- Responsable de producción.
- Responsable de control de calidad.

3. Locales y equipos (76):

Deberán ser adecuados para el uso al que están destinados y estar diseñados para minimizar la posibilidad de contaminación externa, contaminación cruzada, riesgo de errores y cualquier efecto que pueda tener consecuencias negativas en el producto terminado.

Los locales se clasifican en función de la calidad del ambiente, para su clasificación deben medirse la concentración de partículas en el aire y su tamaño, en condiciones de reposo y de funcionamiento, de acuerdo a la norma *International Standards Organization* (ISO) 14644-1 (Tabla 1) (77).

TABLA 1: Clasificación del ambiente según normas ISO

Clasificación ISO 14644-1						
CLASE	**Límite de concentración de partículas por m^3 cúbico de aire**					
	≥ 0,1µm	≥ 0,2µm	≥ 0,3µm	≥ 0,5µm	≥ 1µm	≥ 5µm
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1.000	237	102	35	8	-
ISO 4	10.000	2.370	1.020	352	83	-
ISO 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO 7	-	-	-	352.000	83.200	2.930
ISO 8	-	-	-	3.520.000	832.000	29.300
ISO 9	-	-	-	35.200.000	8.320.000	293.000

Según la regulación europea de elaboración de medicamentos, los ambientes de los locales se pueden clasificar en 4 grados, y difiere de la norma ISO en que el tamaño de partículas a tener en cuenta son igual o superior a 0,5 µm y 5 µm (Tabla 2) (78).

TABLA 2: Clasificación de los ambientes en función del número de partículas según las Normas de Correcta Fabricación

Límite de partículas por m^3 cúbico de aire				
Grado	**En reposo**		**En funcionamiento**	
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	-	-

Si bien, en esta última regulación, también se tiene en cuenta la carga microbiana del ambiente, es decir, el número de partículas viables, realizando un control microbiológico del ambiente (Tabla 3).

TABLA 3: Especificaciones para partículas viables según las Normas de Correcta Fabricación. (UFC: Unidades Formadoras de Colonia)

Grado	**Límites recomendados**			
	Muestra de aire UFC/m^3	Placas de sedimentación (diámetro 90 mm) (UFC/4 horas)	Pacas de contacto (diámetro 55 mm) (UFC/placa)	Impregnación guantes: 5 dedos (UFC/guante)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

En cada uno de grados de ambiente que distingue la regulación europea se podrán realizar las siguientes acciones (79):

- Grado A: operaciones de alto riesgo, donde se llevarán a cabo las actividades de elaboración de medicamentos. Estas condiciones se consiguen normalmente en cabina de flujo laminar.
- Grado B: entorno para la zona de grado A en el caso de preparaciones y llenados asépticos.
- Grado C y D: zonas limpias para realizar fases menos críticas de la fabricación de medicamentos estériles.

Se debe establecer un protocolo de monitorización de los parámetros ambientales claves para comprobar que se cumple el grado en cada sala.

Se deben controlar parámetros físicos de los locales, como la temperatura, o la humedad y la filtración de aire, en caso de ser necesario. En cuanto a la presión del aire, las salas de diferentes grados deben tener una diferencia de presión de 10-15 Pa.

Las áreas limpias de máximo grado de limpieza, salas blancas o salas grado A, son los espacios donde se realizan las actividades en las que el producto queda expuesto al ambiente, por lo tanto, se deben diseñar de manera que se aseguren unas condiciones asépticas, con un control del aire, tanto del área limpia como del entorno inmediato. La elaboración de MTA se debe realizar en un ambiente grado A con un entorno grado B (80). Para minimizar cualquier posibilidad de contaminación, se deben establecer unas normas y asegurar sólo la entrada de personal autorizado, así como garantizar que el área de producción tenga las superficies lisas, impermeables y sin fisuras, para poder realizar una limpieza sin dejar áreas con difícil acceso a la misma.

Dentro de las salas blancas, se debe de contar con áreas de almacenamientos, con capacidad suficiente para almacenar materiales de partida y materias primas, materiales de acondicionamiento, productos intermedios, productos en cuarentena…

Las salas blancas deben estar debidamente cualificadas según la norma ISO 14644-1 (77) y recualificarse a intervalos apropiados según la norma ISO 14644-2 (77).

En cuanto a los equipos necesarios para llevar a cabo la producción de los MTA, deben ser adecuados para los procesos de producción en los que están implicados, estar localizados minimizando el riesgo de errores y de contaminación y estar cualificados y calibrados, con una periodicidad establecida cumpliendo las NCF, teniendo que tener un protocolo de limpieza y mantenimiento definido y acorde con las acciones a realizar en la producción.

4. Documentación (81):

Un buen sistema de documentación es esencial y fundamental para asegurar el sistema de calidad y el cumplimiento de las NCF.

Para el cumplimiento del sistema de garantía de calidad, la documentación se clasifica en dos tipos principales de documentos:

- Especificaciones o instrucciones: requisitos técnicos, especificaciones de materias primas o material de acondicionamiento, especificaciones de producto final, contratos y Protocolos Normalizados de Trabajo (PNTs). Los PNTs son los procedimientos escritos y aprobados según las NCF que describen, de forma específica, las actividades que se llevan a cabo tanto en la elaboración de un MTA como en su control de calidad.

- Registros e informes: proporcionan evidencia de que las instrucciones se han cumplido correctamente. Se deben rellenar por el personal implicado, en el momento en el que se lleva a cabo cada actividad, y deberán ser trazables, siendo indispensables para la certificación y liberación del lote del producto acabado.

Se debe asegurar que se toman las medidas apropiadas para proteger la documentación contra cualquier daño o pérdida accidental, pudiendo la información documentarse en soporte papel o formato electrónico, siempre y cuando este último se encuentre validado.

Toda documentación deberá estar actualizada y revisada.

5. Materias primas/Material de partida (82):

En la medida de lo posible se deben utilizar materias primas, teniendo en cuenta la monografía de Farmacopea Europea (*Ph. Eur)* 5.2.12 (83). Siempre que sea posible las materias primas deben de ser de calidad farmacéutica, sin embargo, como en algunos casos sólo están disponibles materiales en investigación, estos riesgos deben entenderse y evaluarse correctamente.

Los proveedores que suministren las materias primas o material de acondicionamiento deben ser cualificados mediante evaluaciones periódicas.

6. Producción (84):

El proceso de fabricación debe ser adecuado para garantizar una producción consistente, para garantizar la calidad del producto y el cumplimiento de éste con las especificaciones. Este proceso debe validarse, para demostrar que se cumplen los requisitos y las características del producto final obtenido dentro de los rangos marcados en su ficha técnica, y para demostrar que los procesos de producción son reproducibles. Se deberán tomar medidas adecuadas para asegurar la prevención de cualquier riesgo de contaminación cruzada.

Previamente, a la realización de la validación de la producción se realizará una validación del proceso aséptico, el cual consiste en una prueba de simulación del proceso de producción utilizando un medio de cultivo estéril.

7. Cualificaciones y validaciones (71):

El cumplimiento de las NCF, exige que se desarrolle un Plan Maestro de Validación (PMV), donde se recogen las diferentes actividades llevadas a cabo para:

- Cualificar los locales y equipos: a través de la cualificación de los locales y los equipos, se establece que estos son adecuados para las operaciones previstas. Para llevar a cabo esta cualificación se deberán realizar las siguientes etapas:
    - Establecer las especificaciones de los requisitos de usuario (del inglés, User Requirements Specifications, URS).
    - Cualificación de diseño (del inglés Design Qualification, DQ): donde se demuestra que cumple con las especificaciones de usuario establecidas.
    - Cualificación de la instalación (del inglés Installation Qualification, IQ): donde se demuestra que los equipos e instalaciones quedan instaladas correctamente.
    - Cualificación del funcionamiento (del inglés Operational Qualification, OQ): donde se comprueba su idoneidad y funcionamiento incluso en el peor caso posible.
    - Cualificación de la ejecución del proceso (del inglés Functional Qualification, PQ): donde se comprueba su correcto funcionamiento en rutina, y que lo hacen de manera consistente.
- Validación de procesos: a través de la validación de los procesos, se establece una evidencia documentada de que el proceso obtiene los resultados previstos. Se debe llevar a cabo la validación de los siguientes procesos:
    - Validación de la limpieza: es la evidencia documentada que demuestra que con el protocolo de limpieza establecido y utilizando los productos de limpieza rutinarios se elimina de forma efectiva y reproducible cualquier posible contaminante que pueda interferir en la calidad del MTA.

- Validación del proceso de producción: es la evidencia documentada que demuestra que el proceso de producción es reproducible, obteniendo como resultado siempre un MTA de las características establecidas.

8. No conformidades, sistema de acciones correctivas y preventivas y auditorías internas:

Un aspecto importante a tener en cuenta en la producción de un MTA, es la detección de incidencias y no conformidades, que pueden dar lugar a la aplicación de acciones correctivas y preventivas, y que se deben estudiar.

Por incidencia se entiende cualquier evento que no afecta a la calidad del MTA, en tanto que una no conformidad es toda desviación o incumplimiento respecto a los requisitos especificados en la documentación que sustenta los sistemas certificados o acreditados, o bien respecto a la reglamentación aplicable.

Según la ISO 9001:2015 (85), toda acción correctiva es aquella acción tomada para eliminar la causa de una no conformidad detectada u otra situación indeseable y eliminar su recurrencia. Requieren de una evaluación previa de la situación, y se toman una vez analizadas las causas raíz de la no conformidad detectada, con el objetivo de prevenir que vuelva a suceder. En tanto que la acción preventiva es aquella tomada para eliminar la causa de una potencial no conformidad o una potencial situación indeseable. Es lo que constituye el sistema de acciones correctivas y acciones preventivas (CAPA).

Para evaluar el cumplimiento de los requerimientos de las NCF en términos de sistema de calidad, producción, instalaciones y procedimientos, se realizan las auditorías internas, que no son más que procedimientos, sistemáticos, independientes y documentados que tienen como objetivo la mejora de la calidad continua, detectando no conformidades e incumplimientos de los procedimientos establecidos, analizando las causas que los han provocado, consiguiendo una mejora continua de los procesos, para de esta manera poder alcanzar la excelencia en el sistema de calidad de una unidad de producción.

Con el cumplimiento de las NCF durante la producción de MTA se obtienen medicamentos de la calidad final requerida para la aplicación en seres humanos.

6. UNIDADES DE PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANZADA

Para la elaboración de MTA se debe contar con salas blancas, también denominadas salas limpias o salas grado A, que cumplan la legislación de las NCF.

Los primeros prototipos de sala blancas nacieron a finales del siglo XIX, dentro del mundo sanitario, donde los cirujanos y microbiólogos, descubrieron que el número de infecciones bacterianas disminuía si había una ventilación constante del aire del quirófano. Con ello se comprobó que se debían utilizar normas respecto a la higiene y la vestimenta en la sala de operaciones, así como, esterilizar todo el material quirúrgico, después de cada uso.

Las salas blancas como las conocemos hoy en día, nacen gracias a Willis Whitfield en 1960 (Figura 4), quien ideo la primera habitación con aire expulsado a través de un filtro del techo y recogido en el suelo, a un flujo constante, demostrando que el contaje de partículas se reducía por miles. Esta idea nació con el desarrollo de las armas nucleares, para aumentar la seguridad y calidad en su desarrollo (86).

FIGURA 4: Willis Whitfield junto a una sala blanca. (www.energy.gov) (87)

6.1. SALAS BLANCAS CONVENCIONALES

Las salas blancas, son zonas limpias, con aire y entorno controlados, que tienen todos los atributos para el cumplimiento del máximo grado de pureza del aire según las NCF.

Se diseñan con el objetivo de minimizar el riesgo de contaminación microbiológica y contaminación medio ambiental. Para ello deben de tener un ambiente controlado con *Heating, ventilation and air conditioning system (HVAC*), un sistema en el que el aire entra a través de un filtro HEPA (del inglés "High Efficiency Particle Arresting") colocado en el techo, y empuja el aire contaminado hacia las salidas que suelen estar situadas en la parte inferior de las paredes. Los recambios por hora del aire deben ser de al menos 30 en las salas limpias y 20 en la antesala, aunque pueden ser mayores, según la exigencia de su uso.

A la hora de su diseño se tienen en cuenta todos los requisitos exigidos en las NCF. De manera que una sala blanca tradicional ideal deberá disponer de:

- Vestuario
- Antesala
- Sala de elaboración
- Esclusa para el paso de material
- Esclusa para la gestión de residuos

Los grados del ambiente deberán ir del más exigente (A), donde se elaboran los medicamentos, al menos exigente (Figura 5).

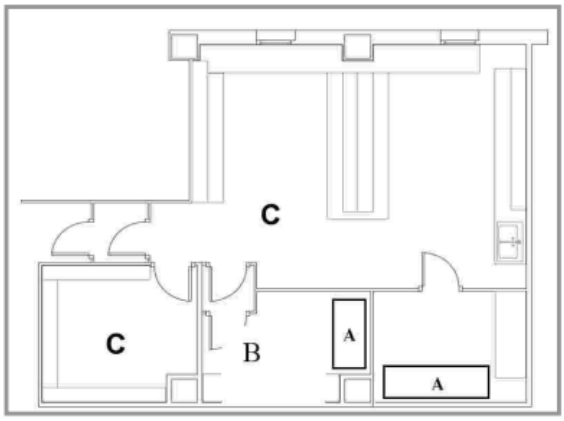


FIGURA 5: Ejemplo de sala blanca de un hospital (79). Grados del ambiente: A, B y C

Deberán tener definidos los circuitos del personal y los circuitos del material y producto terminado, debiendo ser cualificada una vez que se ha construido. Se debe realizar la cualificación de la instalación, para verificar que los locales y equipos se han instalado siguiendo el diseño aprobado y las recomendaciones de los fabricantes; la cualificación

operativa, para verificar que los locales y equipos funcionan de acuerdo a las especificaciones; y la cualificación funcional, para verificar que los locales y equipos en "actividad normal" cumplen las condiciones establecidas en la clasificación de las áreas y en el diseño.

El recuento de partículas de manera continua en estas salas se debe hacer cumpliendo los estándares ISO 14644-1 (77), siendo los ensayos a efectuar los que se especifican en la UNE EN ISO 14644-4 (88) y la frecuencia los mismos la determinada en la norma UNE EN ISO 14644-2 (89), estableciendo una periodicidad para la realización de controles en funcionamiento de 6 meses para una clasificación ISO 5 o menor, esta cualificación incluye el contaje de partículas en función del tamaño para la clasificación de los ambientes (79).

Habitualmente las salas blancas son diseñadas e instaladas por empresas especializadas, encargadas de proporcionar las características para el cumplimiento de la legislación. En España existen numerosas entidades que ofrecen estas soluciones, pero además de tener que disponer de un amplio espacio para poder llevar a cabo su instalación, los presupuestos para la puesta a punto y mantenimiento de las mismas son elevados.

6.2. SALAS BLANCAS MODULARES

Actualmente, se puede encontrar en el mercado una amplia oferta de salas blancas modulares (Figura 6), las cuales pueden instalarse de manera sencilla, pudiéndose disponer de una sala blanca para la elaboración de medicamentos sin contar con un espacio físico extremadamente amplio.

Estos nuevos diseños, los cuales suelen construirse en un entorno diferente a su ubicación final, proporcionan la calidad del aire adecuada para la fabricación de medicamentos, permitiendo llevar a cabo producciones cumpliendo la normativa exigida con inversiones rentables, constituyendo una alternativa a las salas limpias tradicionales.

Los sistemas HVAC en las salas blancas modulares están incorporados en los espacios diseñados, ocupando un mínimo espacio. Existen en el mercado, un amplio número de proveedores que ya ofrecen estas soluciones modulares, siendo la calidad de estas unidades prefabricadas tan alta, que no pueden distinguirse de las tradicionales construidas *in situ*.

FIGURA 6: Ejemplo de sala blanca modular interior (https://www.terrauniversal.com/softwall-cleanrooms.php) (90)

En el mercado, existen salas blancas modulares interiores, pero también existe la posibilidad de construir salas blancas modulares exteriores, en un espacio diferente al del laboratorio de trabajo, con una tecnología que aísla a la sala blanca del exterior cumpliendo con la calidad de aire exigida para el cumplimiento de las NCF (Figura 7).

FIGURA 7: Ejemplo de salas blancas modulares exteriores (https://ingelyt.com, https://montajesdelsaz.com) (91, 92)

6.3. ESTACIONES DE TRABAJO PARA PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

Otras alternativas a las salas blancas convencionales, que pueden proporcionar la calidad adecuada del ambiente, asegurándonos una producción cumpliendo las NCF, pero reduciendo los costes de instalación y mantenimiento son los aisladores (80).

Un aislador es un espacio independiente del ambiente exterior, en el que se realizan manipulaciones mediante unos guantes que tienen acceso a la zona crítica, grado A. El aire

dentro del aislador se filtra con filtros HEPA utilizando aire extraído de la habitación. La limpieza preliminar y la instalación de los guantes se realizan de forma no aséptica y el aislador se descontamina automáticamente antes de iniciar el proceso. La adición de componentes se realiza sin abrir el aislador, utilizando sistemas de transferencia diseñados específicamente para la entrada y salida*, Special Airlock System* (SAS). El aislador mantiene una presión positiva en todo momento y nunca se abre durante el uso (80).

Estos sistemas ya se están utilizando para la producción de líneas celulares con la posibilidad de monitorizar su crecimiento dentro del mismo ambiente. Es el ejemplo de Biomek Cell Workstation (Figura 8), un espacio para la producción celular compuesto por un ordenador, un incubador, una centrifuga, un agitador y con un ambiente de presión positiva (93).

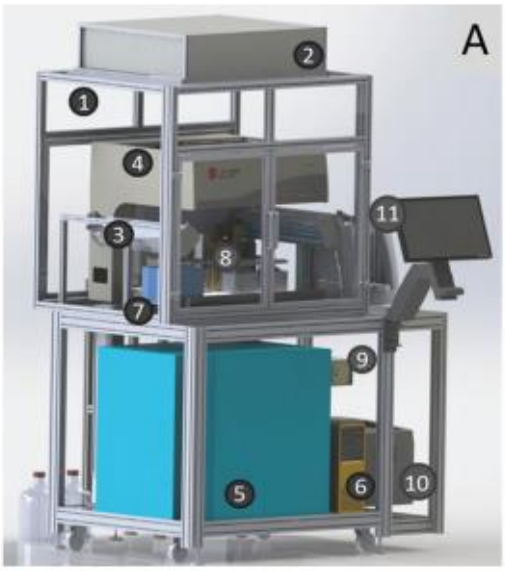


FIGURA 8: Biomek Cell Workstation®. 1: Todos los equipos están dentro de la estación de trabajo, 2: Filtros HEPA, 3: Luz UV, 4: Biomek líquido manipulador, 5: Citomat, 6: Ordenador, 7: Elevador, 8: Centrífuga, 9: Válvula selección puerto, 10: Frigorífico, 11: Pa ntalla ordenador (93)

Otro desarrollo para la producción de medicamentos, y en especial de terapias celulares, son los sistemas desarrollados en Italia, como el IsoCell Pro® de la empresa EuroClone (Figura 9) o el sistema ya instalado en Estados Unidos y Japón, denominado *Cell Processing Work Station* de Panasonic (Figura 10), que consisten en un sistema aislado, integrado e independiente para la producción celular, con el cumplimiento de NCF para uso en investigación. Estas instalaciones proporcionan el ambiente requerido ISO 4 a un coste menor que las salas blancas tradicionales, con la ventaja del reducido tamaño que permite su instalación en espacios nuevos y limitados.

Estas nuevas instalaciones (Figura 9 y 10) suponen un ahorro en los costes de mantenimiento de un 35% respecto a las salas blancas tradicionales.

FIGURA 9: ISOCell Pro® (www.tecomak.com) (94)

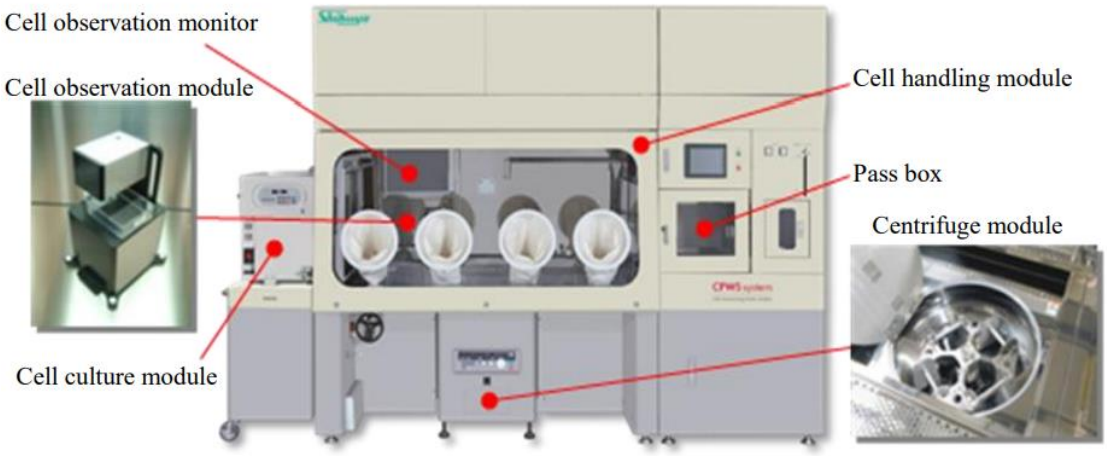


FIGURA 10: Cell Processing Work Station Panasonic® (https://cleanroomtechnology.com/) (95)

Los aisladores para la elaboración de MTA, pueden estar instalados en un entorno no tan exigente como el de una sala blanca convencional, considerándose adecuado un ambiente clase D, mientras que para un sistema abierto de elaboración de medicamentos le es exigible un entorno B (72). En el caso de elaboración de medicamentos en los SFH se requiere grado C si el material de partida no es estéril o grado B si lo es (12).La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación descontrolada de

células, pudiendo aparecer en cualquier parte del cuerpo (OMS, 2017). En todos o casi todos los casos, el cáncer se debe a la mutación o a alguna otra activación anormal de los genes celulares que controlan el crecimiento y la mitosis celular (Guyton et al., 2008).

Justificación

Justificación

La fabricación o producción de medicamentos de uso humano por parte de la industria farmacéutica se debe de llevar a cabo cumpliendo las NCF (72), una normativa que proporciona la calidad adecuada a los medicamentos comercializados en el mercado.

La fabricación de los MTA debe realizarse siguiendo la misma legislación, la cual contempla una parte que es específica para estos medicamentos; esta normativa es muy exigente, esto, junto con el número reducido de pacientes a los que van destinados la mayoría de éstos fármacos, hacen que actualmente, en el campo de la oftalmología, existan sólo dos MTA aprobados por la EMA (17), una terapia genética, Luxturna® y un producto de ingeniería tisular, Holoclar®.

Estos MTA, se han comercializado y aprobado a precios muy elevados, alcanzando incluso el millón de dólares (96), siendo prácticamente inaccesibles tanto para la Sanidad Pública como para pacientes privados.

Este precio elevado es en gran medida debido a los reglamentos que se deben cumplir, si a ello le sumamos que en oftalmología, el volumen necesario de medicamento para tratar el ojo es mínimo, los costes destinados a la producción de terapias avanzadas se hacen todavía más desorbitados, dejando sin tratamiento a pacientes con enfermedades que carecen de terapias eficaces con las técnicas quirúrgicas y los medicamentos convencionales, y para las que se han desarrollado MTA eficaces a nivel experimental que se encuentran con el hándicap de llegar al paciente a un coste asumible.

Dentro de la normativa actual (Reglamento (CE) 1394/2007) (20), existe la posibilidad de fabricar MTA a pequeña escala en un entorno hospitalario, cumpliendo la misma legislación que la industria farmacéutica.

Es por ello que, tras haber desarrollado un MTA, que consiste en la expansión *in vitro* de las células limbares libre de factores xenogénicos, utilizando PRGF como único suplemento del medio de cultivo de las células limbares, y como soporte para su crecimiento y trasplante (87), y habiéndose demostrado un efecto terapéutico en quemaduras precursoras de esta enfermedad, en un modelo animal de déficit limbar (88), en el presente trabajo de investigación, se realiza la traslación a la práctica clínica, buscando un modelo de producción que permita la fabricación de un MTA personalizado a un coste razonable, poniéndose a punto las instalaciones y el cumplimiento del reglamento necesario para ello.

Por todo lo expuesto anteriormente, es pertinente y queda sobradamente justificado, el desarrollar un trabajo de tesis doctoral, donde se aborde un problema no resuelto, la fabricación de MTA a pequeña escala donde la industria farmacéutica no llega, desarrollando una unidad de producción de terapias avanzadas, dentro del SFH, para la producción de MTA que han sido desarrollados en el laboratorio de investigación básica, cumpliendo el reglamento exigido para asegurar la calidad y seguridad del producto final.

Hipótesis

Hipótesis

Es posible desarrollar una unidad de producción de terapias avanzadas original adaptada para la fabricación de medicamentos en oftalmología, dirigida por el servicio de farmacia hospitalaria, que cumpliendo la normativa vigente y contando con un sistema de calidad farmacéutico adaptado a la misma, pueda tener como ventajas competitivas: tamaño reducido y costes bajos de producción y mantenimiento. Finalmente, esta unidad de producción ha de permitir fabricar y desarrollar un MTA para uso oftalmológico.

Objetivos

Objetivos

1. Diseñar y desarrollar una instalación adaptada para la fabricación de medicamentos de terapia avanzada de reducidas dimensiones y bajo coste de mantenimiento.

2. Cualificar la instalación de acuerdo a los requisitos de las normas de correcta fabricación dentro del servicio de farmacia hospitalaria.

3. Desarrollar un sistema de calidad farmacéutico adaptado a la instalación, cumpliendo las normas de correcta fabricación.

4. Producir un medicamento de terapia avanzada para el tratamiento de la insuficiencia límbica en el entorno propuesto.

Capítulo 1

Capítulo 1: Diseño, instalación y cualificación de la unidad de producción de terapias avanzadas adaptada para la fabricación de medicamentos en oftalmología

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. DISEÑO, INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

1.1.1. REQUERIMIENTOS DE USUARIO PARA LA INSTALACIÓN

El área de producción para la fabricación del MTA (lamela epitelial: membrana de PRGF cultivada con células limbares) fue diseñada, para que el entorno de trabajo tuviera el mínimo riesgo de contaminación cruzada y una mínima probabilidad de error en cualquier etapa de la fabricación. Para ello se especificaron los requerimientos de usuario de la unidad de producción de terapias avanzadas que proporcionarán estas características, de acuerdo a la parte IV de la Guía de NCF.

1.1.2. DISEÑO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

Una vez definidos los requisitos de usuario, estos fueron trasladados a la empresa elegida para el diseño y la construcción de la unidad de producción de terapias avanzadas. El objetivo de esta etapa fue la revisión de la documentación realizada, para confirmar que esta cumplía con los requisitos de usuario establecidos y con la Guía de NCF, y para llevar a cabo, en caso de ser necesario, la corrección de cualquier discordancia entre los requerimientos de usuario y los planos diseñados antes de la construcción de la unidad de producción de terapias avanzadas, para que no afectara al funcionamiento futuro de la misma. Esta etapa incluyó la revisión de los planos de la unidad de producción de terapias avanzadas, de los flujos de aire y de las dimensiones de la misma.

1.1.3. INSTALACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

Una vez definidos los requerimientos de usuario y habiendo realizado la comprobación del diseño sobre plano, se construyó el aislador. Una vez construido, se determinó su localización en base a los requerimientos establecidos para los entornos en los que deben estar instalados los aisladores y se situó en su interior todo el equipamiento necesario para realizar la producción evitando en todo momento que los productos intermedios estuvieran en contacto con el ambiente exterior.

1.1.4. PLAN DE CUALIFICACIÓN

Se elaboró el plan de cualificación, para demostrar que la unidad de producción de terapias avanzadas cumple con las especificaciones de uso y que están de acuerdo con los requisitos de las NCF. Para ello, se procedió a realizar las siguientes etapas:

1.1.4.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

Para demostrar que la unidad de producción de terapias avanzadas cumplía con las instrucciones y con las NCF, se redactó y aprobó el protocolo de cualificación de instalación, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones:

- Confirmar que la unidad de producción de terapias avanzadas queda instalada de manera apropiada cumpliendo con la legislación vigente:
  - La unidad de producción de terapias avanzadas queda instalada en el entorno definido que cumple con las NCF.
  - El aislador está bien sellado, no hay posibilidad de fugas.
  - No hay sitios inaccesibles para su limpieza.
  - La puerta de acceso y de salida del SAS no pueden abrirse al mismo tiempo.
- Confirmar que el aislador cuenta con las instrucciones pertinentes y que se ha realizado la cualificación en origen cuyo certificado debía incluir:
  - Clasificación ISO 14644-1 (77).
  - Laminaridad del flujo.
  - Determinación de la presión.

- Estanquidad.
- Confirmar que los sistemas electrónicos de control están disponibles.
- Redactar un PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del aislador.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación de instalación, donde se indicaron las desviaciones encontradas, justificando la aceptación de la instalación y el impacto de las mismas en el funcionamiento de la unidad de producción de terapias avanzadas.

1.1.4.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA

Tras aprobar la cualificación de la instalación, y para demostrar que la unidad de producción de terapias avanzadas operaba en reposo según lo especificado, se redactó y aprobó el protocolo de cualificación operativa, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones:

- Comprobar que los dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.
- Asegurar que, tras un fallo en el suministro eléctrico, vuelve a funcionar correctamente.
- Verificar la velocidad del flujo laminar, que sea entre 0,25-0,50 m/s y que cada lectura realizada no difiera de la velocidad media en ±20 %.
- Verificar el contaje de partículas, comprobando que cumplen con las NCF y según la ISO 14644-1 (77), que no exceden los límites de alerta establecidos, en reposo y en funcionamiento, de > 3.000 partículas de 0,5 µm o 15 partículas de 5 µm.
- Verificar la diferencia de presión.
- Comprobar la estanquidad.
- Verificar la monitorización ambiental durante tres semanas consecutivas.
- Verificar el recuento de partículas no viables durante tres semanas consecutivas.
- Monitorizar los parámetros físicos durante tres semanas consecutivas.
- Realizar la limpieza de la instalación y comprobar que se realiza fácilmente y no se obtiene contaminación ambiental tras su realización.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación operativa, donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando la aceptación de las mismas, siendo los límites de alerta y acción establecidos en la Tabla 4, para los parámetros del panel de control y los límites para

la clasificación del ambiente en función de los contajes de partículas viables y no viables en la Tabla 5 y 6 respectivamente.

TABLA 4: Límites de alerta y acción para los parámetros del panel de control del aislador

	ALERTA	ACCIÓN
Exhaust filter	15-20 Pa	< 15 Pa
Downflow filter	> 120 Pa	> 140 Pa
Inflow	< 0,28 m/s o > 0,47 m/s	< 0,20 m/s o > 0,55 m/s
Temperatura	> 25°C	> 30°C
Humedad	> 55%	> 60%

TABLA 5: Límites de las partículas no viables según la norma ISO (77)

Clasificación ISO 14644-1			
Concentración de partículas por m^3 de aire			
CLASE	**≥0,3 µm**	**≥0,5 µm**	**≥5 µm**
ISO 1	-	-	-
ISO 2	10	4	-
ISO 3	102	35	-
ISO 4	1.020	352	-
ISO 5	10.200	3.520	29
ISO 6	102.000	35.200	293

TABLA 6: Límites de las partículas viables y no viables según Anexo I de la Guía Normas de Correcta Fabricación (72). UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Grado	Límite partículas no viables				Límite partículas viables			
	Reposo		Funcionamiento					
	0,5 µm/m^3	5 µm/m^3	0,5 µm/m^3	5 µm/m^3	UFC/m^3	Placas sedimentación (90 mm) UFC/4 h	Placas de contacto (55 mm) UFC/placa	Impronta guante (5 huellas/guante)
A	3.520	20	3.520	20	<1	<1	<1	<1
B	3.520	29	352.000	2.900	10	5	5	5
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000	100	50	25	-
D	3.520.000	29.000	-	-	200	100	50	-

1.1.4.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

Después de aprobar la cualificación de instalación y la cualificación operativa y para demostrar que la unidad de producción de terapias avanzadas funcionaba en la rutina diaria de trabajo y en las peores condiciones posibles, se redactó y aprobó el protocolo de cualificación funcional, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones estando la unidad de producción de terapias

avanzadas en reposo o en funcionamiento, según corresponda, durante un periodo de cuatro meses consecutivos:

- Comprobar que tras las limpiezas de la unidad de producción de terapias avanzadas no se obtiene contaminación ambiental.
- Verificar que las monitorizaciones de partículas viables y no viables están dentro de los límites establecidos para un grado ISO 4 según la ISO 14644-1 (77) o grado A según las NCF (71) (Tablas 5 y 6, respectivamente).
- Verificar que las monitorizaciones de los parámetros físicos están dentro de los límites permitidos (Tabla 4).

Finalmente, se realizó un informe de cualificación funcional donde se indicaron las desviaciones encontradas con respecto a los límites permitidos (Tablas 4, 5 y 6) justificando la aceptación de las mismas.

1.1.5. PROGRAMA DE MANTENIMIENTO

Se estableció un programa de mantenimiento consistente en la realización de la limpieza y desinfección del área de trabajo:

- Antes de comenzar y tras finalizar cualquier actividad: utilizando un desinfectante.
- Tras finalizar las producciones: realizando una limpieza exhaustiva, utilizando la siguiente secuencia de productos: desinfectante, esporicida, detergente y desinfectante.

Anualmente se llevó a cabo la evaluación, por una empresa externa, de todos los puntos especificados en el certificado de ensayo del aislador realizado en origen (clasificación ISO, laminaridad del flujo, determinación de la presión y estanquidad).

Todas las acciones realizadas quedan debidamente registradas en los registros de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del aislador.

1.2. INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS

1.2.1. REQUERIMIENTOS DE USUARIO DE LOS APARATOS

Se especificaron los requerimientos de usuario de los aparatos necesarios para llevar a cabo toda la producción en el mismo ambiente de trabajo, y conseguir de esta manera una unidad de producción de terapias avanzadas en la que se eviten los contactos con el ambiente exterior y los riesgos de contaminación sean mínimos. Además, se definieron el resto de aparatos e instrumentos necesarios para conservar las materias primas y realizar los controles microbiológicos necesarios, así como para llevar a cabo las monitorizaciones ambientales y los controles de calidad.

1.2.2. INSTALACIÓN DE LOS APARATOS

Una vez adquiridos los aparatos que cumplían las especificaciones definidas, se determinó su localización en base a los requerimientos establecidos para los entornos en los que deberían estar instalados.

1.2.3. PLAN DE CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS

1.2.3.1. INCUBADOR

1.2.3.1.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

Se redactó y aprobó el protocolo de cualificación de instalación, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones:

- Comprobar que el incubador no tiene daños y se ajusta al espacio asignado en el interior del aislador.
- Confirmar que el incubador queda instalado de manera apropiada, quedando listo para su uso.

- Confirmar que el flujo de aire del aislador no se afecta por la instalación del incubador, comprobando que no se altera tras su colocación.
- Confirmar que el incubador viene acompañado de la documentación, instrucciones y certificado de conformidad por parte del proveedor.
- Confirmar que los sistemas electrónicos de control del incubador están disponibles, a la vista y en un lugar accesible.
- Redactar el PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparación del incubador.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación de instalación donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando si procedía la aceptación de la instalación y el impacto de las mismas en el funcionamiento del incubador.

1.2.3.1.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA

Tras aprobar la cualificación de instalación se llevó a cabo la cualificación operativa en reposo, de acuerdo al protocolo previamente redactado y aprobado, el cual incluía realizar las siguientes comprobaciones:

- Verificar la calibración del incubador realizada por una empresa externa.
- Realizar una prueba del panel de control, comprobando que los distintos dispositivos funcionan de manera correcta.
- Verificar la recuperación tras un fallo de suministro eléctrico.
- Confirmar que el incubador se limpia adecuadamente, realizando dicha limpieza de acuerdo a las instrucciones proporcionadas durante tres semanas consecutivas.
- Establecer la temperatura al nivel especificado.
- Establecer el CO2 al nivel especificado.
- Realizar monitorizaciones ambientales durante tres semanas consecutivas, con unos resultados dentro de los límites permitidos según las NCF.
- Realizar monitorizaciones de la pantalla (display) y de los parámetros físicos mostrados durante tres semanas consecutivas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación operativa donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando si procedía la aceptación de las mismas.

1.2.3.1.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

Después de aprobar la cualificación de instalación y la cualificación operativa, se llevó a cabo la cualificación funcional en reposo o en funcionamiento, según corresponda, durante cuatro meses consecutivos, de acuerdo al protocolo previamente redactado y aprobado, realizando las siguientes verificaciones:

- Realizar la limpieza del incubador, comprobando que se realiza fácilmente y no se obtiene contaminación durante la posterior monitorización ambiental.
- Realizar una monitorización ambiental del incubador durante un periodo de cuatro meses consecutivos.
- Monitorizar la temperatura en vacío durante tres períodos de cinco días consecutivos comprobando que esta permanece dentro de los límites establecidos.
- Monitorizar la temperatura simulando tres producciones consecutivas comprobando que esta permanece dentro de los límites establecidos.
- Realizar un test de temperatura con la puerta abierta, durante periodos de 30 segundos y de dos minutos, monitorizando posteriormente la temperatura y comprobando el tiempo de recuperación de la misma.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación funcional donde se indicaron las desviaciones encontradas con respecto a los límites permitidos (Tablas 4, 6 y 7) justificando la aceptación de las mismas.

TABLA 7: Límites de alerta y acción de los parámetros de temperatura y CO2 del incubador

	ALERTA	ACCIÓN
Temperatura del incubador	< 35 °C o > 38 °C	< 34,5 °C o > 38,5 °C
CO_2 del incubador	> 7%	> 10%

1.2.3.2. CENTRÍFUGA

1.2.3.2.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

Se redactó y aprobó el protocolo de cualificación de instalación, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones:

- Confirmar que la centrífuga se sitúa en su ubicación dentro del aislador y queda instalada de manera apropiada.
- Confirmar que el flujo de aire del aislador no se afecta por la instalación de la centrífuga.
- Confirmar que la centrífuga viene acompañada de la documentación (instrucciones, certificado de conformidad) proporcionada por el proveedor.
- Confirmar que los sistemas electrónicos de control de la misma estén disponibles.
- Redactar el PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparación de la centrífuga.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación de instalación donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando si procedía la aceptación de la instalación y el impacto de las mismas en el funcionamiento de la centrífuga.

1.2.3.2.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA

Tras la cualificación de instalación, se llevó a cabo la cualificación operativa en reposo, de acuerdo al protocolo de cualificación operativa previamente redactado y aprobado, el cual incluía realizar las siguientes comprobaciones:

- Realizar una prueba de panel de control.
- Realizar una limpieza durante tres semanas consecutivas.
- Realizar una monitorización ambiental durante tres semanas consecutivas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación operativa donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando si procedía la aceptación de las mismas.

1.2.3.2.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

Tras aprobar la cualificación de instalación y la cualificación operativa, se llevó a cabo la cualificación funcional en reposo o en funcionamiento, según corresponda, durante cuatro meses consecutivos, de acuerdo al protocolo previamente redactado y aprobado, realizando las siguientes verificaciones:

- Realizar la limpieza de la misma durante un periodo de cuatro meses.

- Realizar una monitorización ambiental durante un periodo de cuatro meses.
- Centrifugar suspensiones celulares obtenidas tras la digestión enzimática simulando tres producciones consecutivas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación funcional donde se indicaron las desviaciones encontradas y justificando si procedía la aceptación de las mismas.

1.2.3.3. MICROSCOPIO

1.1.3.3.1. Cualificación de instalación

Se redactó y aprobó el protocolo de cualificación de instalación, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones:

- Confirmar que el microscopio se sitúa en su ubicación dentro del aislador y queda instalado de manera apropiada.
- Confirmar que el flujo de aire del aislador no se afecta por la instalación del microscopio.
- Verificar que todos los componentes principales del equipo están presentes e identificados según las especificaciones técnicas.
- Verificar que la documentación proporcionada ofrece una correcta y completa información técnica del equipo.
- Verificar que todas las piezas necesarias para el correcto funcionamiento del equipo están instaladas.
- Redactar el PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparación del microscopio.

Por último, se realizó un informe de cualificación de instalación donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando la aceptación de la instalación y el impacto de las mismas en el funcionamiento del microscopio.

1.1.3.3.2.Cualificación operativa

Tras aprobar la cualificación de instalación, se llevó a cabo la cualificación operativa en reposo, de acuerdo al protocolo de cualificación operativa previamente redactado y aprobado, el cual incluía realizar las siguientes comprobaciones:

- Realizar una prueba de panel de control.
- Realizar una limpieza durante tres semanas consecutivas.
- Realizar una monitorización ambiental durante tres semanas consecutivas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación operativa donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando la aceptación de las mismas.

1.1.3.3.3.Cualificación funcional

Tras aprobar la cualificación de instalación y la cualificación operativa, se llevó a cabo la cualificación funcional en reposo o en funcionamiento, según corresponda, durante cuatro meses consecutivos, de acuerdo al protocolo previamente redactado y aprobado, realizando las siguientes verificaciones:

- Realizar la limpieza del mismo durante un periodo de cuatro meses.
- Realizar una monitorización ambiental durante un periodo de cuatro meses.
- Realizar la visualización de los cultivos celulares obtenidos simulando tres producciones consecutivas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación funcional donde se indicaron las desviaciones encontradas y justificando si procedía la aceptación de las mismas.

1.2.3.4. FRIGORÍFICOS Y ESTUFAS

1.1.3.4.1.Cualificación de instalación

Se redactó y aprobó el protocolo de cualificación de instalación, el cual incluía realizar las siguientes verificaciones:

- Verificar que una vez instalados en su ubicación final no tienen daños y se ajustan al espacio asignado para ellos.
- Confirmar que los aparatos están listos para su uso y no hay sitios inaccesibles para la limpieza.
- Comprobar que vienen acompañados de la documentación proporcionada por el proveedor, estando disponible el manual de instrucciones.
- Confirmar que los sistemas electrónicos de control están disponibles, estando a la vista y en un lugar accesible.
- Redactar los PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de los frigoríficos y estufas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación de instalación donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando si procedía la aceptación de las mismas y el impacto que pudieran tener las desviaciones encontradas en su funcionamiento.

1.1.3.4.2.Cualificación operativa

Tras aprobar la cualificación de instalación, se llevó a cabo la cualificación operativa en reposo, de acuerdo al protocolo previamente redactado y aprobado para los frigoríficos y las estufas, el cual incluía realizar las siguientes comprobaciones:

- Verificar que los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.
- Verificar la recuperación tras un fallo en el suministro eléctrico.
- Comprobar que los frigoríficos y las estufas se limpian adecuadamente de acuerdo a las instrucciones proporcionadas.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación operativa donde se indicaron las desviaciones encontradas justificando si procedía la aceptación de las mismas.

1.1.3.4.3.Cualificación funcional

Después de aprobar la cualificación de instalación y la cualificación operativa, se llevó a cabo la cualificación funcional de acuerdo al protocolo previamente redactado y aprobado, realizando las siguientes verificaciones:

- Realizar una monitorización diaria de la temperatura de los frigoríficos y las estufas situando un termómetro con sonda debidamente calibrado durante cinco días consecutivos en cada balda de cada aparato, anotando la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada, siendo el criterio de aceptación que la monitorización de la temperatura realizada (en funcionamiento) no excedía de los límites de acción establecidos en la Tabla 8.
- Realizar una monitorización diaria de la temperatura de los frigoríficos y las estufas situando un termómetro con sonda debidamente calibrado en cada balda al mismo tiempo durante una semana, anotando la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada y descargando el registro semanal, siendo el criterio de aceptación que la monitorización de la temperatura registrada (en funcionamiento) no excedía de los límites de acción establecidos en la Tabla 8.

Finalmente, se realizó un informe de cualificación funcional donde se indicaron las desviaciones encontradas con respecto a los límites permitidos (Tabla 8) justificando si procedía la aceptación de las mismas.

TABLA 8: Límites de alerta y acción de la temperatura de los frigoríficos y las estufas

	ALERTA	ACCIÓN
Temperatura de los Frigoríficos	< 2 °C o > 8 °C	< 0 °C o > 10 °C
Temperatura de la Estufa Prodintec	< 22 °C o > 26 °C	<20 °C o > 28 °C
Temperatura de la Estufa Memmert	< 32 °C o > 36 °C	<30 °C o > 38 °C

1.2.4. PROGRAMA DE MANTENIMIENTO DE LOS APARATOS

Se establecieron los programas de mantenimiento de los diferentes equipos, consistentes en la realización de la limpieza y desinfección de los equipos situados en el interior de la unidad de producción de terapias avanzadas (incubador, centrífuga y microscopio) tras finalizar las producciones, quedando registradas dichas limpiezas en el registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del aislador.

Además, se estableció una limpieza semestral de los aparatos térmicos (estufas y frigoríficos) quedando registradas dichas limpiezas en el registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de los diferentes aparatos.

Finalmente, una empresa externa llevó a cabo la recualificación anual de los equipos térmicos y la calibración de sus sondas, así como la calibración del resto de instrumentos necesarios para la producción (pipetas, *data loggers*, contador de partículas), quedando registrada las cualificaciones, calibraciones, así como cualquier otra actividad realizada en los aparatos en sus registros de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones, y los informes de cualificación y calibración emitidos por la empresa contratada, en el archivo de documentación de los aparatos.

1.3. PLAN DE MONITORIZACIÓN AMBIENTAL

Se definió un plan de monitorización ambiental, el cual incluía la monitorización de los parámetros físicos, y de las partículas viables y no viables de la unidad de producción de terapias avanzadas, así como la monitorización de temperaturas de los diferentes equipos térmicos.

1.3.1. MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

Los parámetros a monitorizar fueron los que muestran el *display* del aislador (*exhaust filter*, *downflow filter*, *inflow*, *downflow*, humedad y temperatura) y del incubador (CO_2 y temperatura), la integridad y ausencia de fugas de los guantes, mediante la inspección visual de los mismos, así como los valores de los manómetros de salida y entrada de gas de la bombona de CO_2 al incubador.

Se estableció una monitorización semanal de dichos parámetros quedando registrados los resultados obtenidos en el registro de monitorización de parámetros físicos del aislador, y también una monitorización diaria de la temperatura de los equipos térmicos (frigoríficos y estufas) y del almacén, mediante un termómetro con sonda debidamente calibrado anotándose la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada en el registro de temperatura diaria de los diferentes aparatos.

Los termómetros recogieron datos cada 15 minutos y una vez al mes se procedía a la descarga de los informes generados.

Los límites de alerta y acción permitidos se detallan en la Tabla 4 para los parámetros físicos del aislador, en la Tabla 7 para los parámetros del incubador, en la Tabla 8 para los parámetros de los frigoríficos y las estufas, y a continuación en la Tabla 9 para los manómetros de entrada y salida de gas de la bombona de CO_2 y para la temperatura del almacén.

TABLA 9: Límites de alerta y acción para los manómetros del CO2 y para la temperatura del almacén

	ALERTA	ACCIÓN
Presión salida CO_2	< 50 bares	< 20 bares
Presión entrada CO_2	0,3 bares	0,3 bares
Temperatura del almacén	< 15 °C y > 25 °C	< 13 °C y > 28 °C

1.3.2. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS NO VIABLES

La monitorización del número de partículas no viables se realizó con un sistema automático, el contador de partículas no viables HPPC 3++ (0.3µm). Para ello se realizaron medidas del número de partículas no viables de 0,5 µm y de 5 µm por m^3, tanto del aislador como del SAS en condiciones de reposo, tomando un volumen de 1000 L de aire en el aislador y de 7 L en el SAS.

Se estableció una medición de partículas no viables en los momentos críticos de la producción, así como una monitorización periódica tanto del aislador como del SAS en condiciones de reposo, entre la producción de lotes o en su defecto una vez al mes, registrándose las mediciones en las guías de fabricación y en el registro de monitorización ambiental del aislador, respectivamente. Finalmente, se estableció que una vez al año una empresa externa acreditada, realizará una monitorización de partículas no viables de la sala de elaboración de estériles.

Los límites permitidos de partículas no viables se muestran en las Tablas 5 y 6.

1.3.3. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS VIABLES

La monitorización de las partículas viables se realizó tomando las siguientes muestras:

- Muestras pasivas: muestras recogidas mediante la exposición de placas de agar Sabouraud y agar tripticasa expuestas al ambiente durante un tiempo de 3 horas.

- Muestras de superficies: muestras de las superficies del aislador, del incubador y del exterior de los equipos recogidas con hisopos que se inoculan en tubos de tioglicolato.
- Inoculación: muestra de 1 mL del agua del incubador inoculada con una pipeta Pasteur en un tubo de tioglicolato.
- Impronta de huellas: impregnación de las 5 huellas de los tres guantes en placas de cultivo de agar tripticasa.

Posteriormente, los tubos de tioglicolato y las placas de agar tripticasa fueron incubados a 30-37 °C, y las placas de agar Sabouraud a 20-25 °C durante 14 días. Transcurridos los 14 días de incubación se emitió el resultado de los análisis microbiológicos quedando registrados en las guías de fabricación o en los registros de monitorización ambiental del aislador, según procediera.

Se estableció la realización de controles del procedimiento, para ello se realizaron controles negativos y positivos de los tubos de tioglicolato y de las placas de agar consistentes en:

- Control negativo: incubar durante 14 días un tubo de tioglicolato (previa introducción de un hisopo estéril) y una placa de agar tripticasa, sin abrir, en la estufa de 30-37 °C y una placa de agar Sabouraud, también sin abrir, en la estufa de 20-25 °C, identificando las muestras como controles negativos.
- Control positivo: inocular un tubo de tioglicolato con un hisopo con el que se haya muestreado una superficie de trabajo no estéril, e incubar a 30-37 °C. Abrir durante 3 horas una placa de agar tripticasa y una placa de agar Sabouraud en un ambiente no estéril, e incubar a 30-37 °C y 20-25 °C respectivamente. Realizar una impronta de huellas con guantes no estériles en una placa de agar tripticasa e incubar a 30-37 °C durante 14 días.

Se estableció una medición de partículas viables en los momentos críticos de la producción, así como una monitorización periódica tanto del aislador como del SAS en condiciones de reposo, entre la producción de lotes o en su defecto una vez al mes, registrándose las mediciones en las guías de fabricación y en el registro de monitorización ambiental del aislador, respectivamente. Adicionalmente, una vez al mes, una empresa externa acreditada realizó el control de partículas viables de la sala de elaboración de estériles, quedando el informe archivado.

Los límites permitidos de partículas viables se muestran en la Tabla 6.

2. RESULTADOS

2.1. DISEÑO, INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

2.1.1. DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE USUARIO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS SEGÚN LA NORMATIVA ACTUAL

Se definieron los siguientes requerimientos de la unidad de producción de terapias avanzadas a diseñar:

- Diseño de un espacio con una ocupación máxima de 2 m2.
- Calidad del aire grado A, con presión positiva y un flujo de aire entre 0,25 m/s y 0,50 m/s con una recirculación del aire del 90%.
- Sistemas de control con temperatura, humedad y filtración del aire.
- Dimensiones del área de producción teniendo en cuenta los aparatos necesarios para la producción.
- Esclusa de entrada de material con doble puerta de bloqueo.
- Conexión USB, HDMI y corriente continua y alterna en diferentes puntos de la instalación.
- Definición del equipamiento necesario para llevar a cabo la producción y sus requerimientos.

2.1.2. DISEÑO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

Se diseñó y construyó una unidad de producción de terapias avanzadas, utilizando un aislador de presión positiva ISO 4 (Figura 11), AISLAISO4-PP-1800 (TDI, Madrid, España), cuyos planos y flujos de aire se muestran en la Figura 12 y con las especificaciones técnicas que a continuación se detallan:

- Estructura: zona de trabajo y superficie de trabajo construida en acero inoxidable AISI 304.
- Cristal frontal con 3 guantes de butilo.
- Dimensiones externas (mm): 1.880 (ancho) x 780 (profundo) x 1.620 (alto).
- Dimensiones mesa (mm): 1.880 (ancho) x 700 (profundo) x 690 (alto).
- Área de trabajo (mm): 1.710 (ancho) x 600 (profundo) x 660 (alto).
- Peso: 390 kg.
- Clasificación del aire: ISO 4.
- Sistema de control: microprocesador con memoria Flash.
- Display: VFD.
- Filtro principal: filtro absoluto HEPA H14 con una eficacia del 99,995% mpps según normativa EN 1822 (97).
- Filtro de expulsión: filtro absoluto HEPA H14 con una eficacia del 99,995% mpps según normativa EN 1822 (97).
- Flujo laminar: 0,25 m/s - 0,50 m/s.
- Recirculación del aire: 90%.
- Expulsión del aire: 10%.
- Cristal frontal: cristal templado de seguridad.
- Nivel sonoro: <58 db.
- Iluminación: >1.000 lux.
- Lámpara ultravioleta: 1 x 40 W.
- Potencia: 220 v, 50 h ± 10%.
- Consumo: 1.350 W.
- Esclusa lateral izquierda con esterilización UV independiente y puerta de doble bloqueo.
- Conexión con gas CO2 controlado con una válvula.
- Puertos USB y HDMI, y varios puntos de corriente continua y corriente alterna.

FIGURA 11: Imagen del AISLAISO4-PP-1800 (TDI)

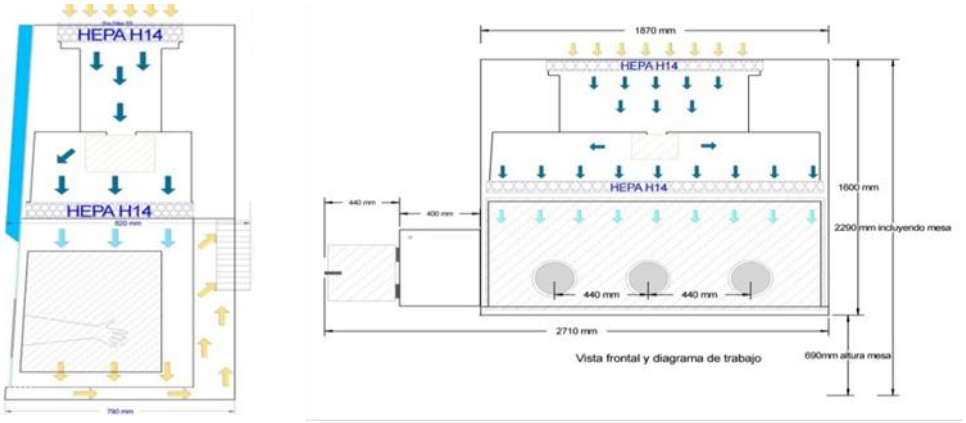


FIGURA 12: Planos de la instalación

2.1.3. INSTALACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

Se procedió a la instalación y montaje del aislador dentro de la sala acreditada por la Consejería de Sanidad del Principado de Asturias para elaboración de medicamentos estériles dentro del SFH del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega. Una sala acreditada en base a su calidad de aire como clase C.

Una vez instalado el aislador, se situó en su interior todo el equipamiento necesario para la fabricación del MTA: un incubador (24-MINICELL NB-203M, N-Biotek, Gyeonggi-do, Corea) en el que realizar el cultivo celular, una centrífuga (SPECTRAFUGE™ 6C, Labnet, Madrid, España) para el aislamiento de las células, y un microscopio (EVOS®XL, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para la observación de los cultivos celulares, completándose la fase de instalación de la unidad de producción de terapias avanzadas (Figura 13).

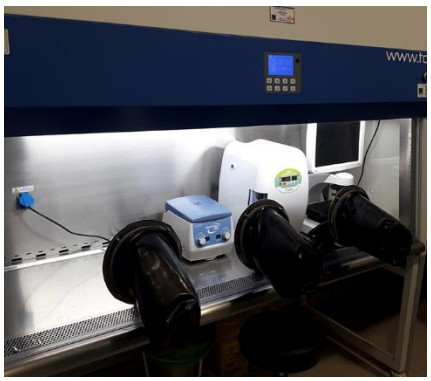


FIGURA 13: Vista general de la unidad de producción de terapias avanzadas

2.1.4. PLAN DE CUALIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS

2.1.4.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

La cualificación de la instalación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de cualificación de la instalación redactado y aprobado, el cual incluía un listado con todos los detalles que debían ser verificados.

Se comprobó que la unidad de producción de terapias avanzadas cumplía con los requerimientos de usuario y las especificaciones, estando los esquemas y diagramas de las unidades de aire, las instrucciones y el certificado en origen disponibles. Además, se comprobó que las superficies de la unidad de producción de terapias avanzadas eran lisas, libres de defectos, sin lugares inaccesibles para la limpieza, que las puertas de entrada del SAS estaban enclavadas, no pudiendo realizarse su apertura simultánea y, que el panel de control era accesible. Asimismo, se redactó y aprobó un PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del aislador. La realización de la cualificación de la instalación quedó reflejada en el informe de cualificación del aislador (Tabla 10).

2.1.4.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA

La cualificación operativa se llevó a cabo después de aprobar la cualificación de la instalación, y se realizó de acuerdo al protocolo de cualificación operativa redactado y aprobado, siendo subcontratada la cualificación operativa al fabricante del aislador.

Las pruebas realizadas demostraron que la unidad de producción de terapias avanzadas cumplía con la clasificación ISO 4 requerida, debido a que el número de partículas en reposo se mantenían dentro de los límites permitidos; la unidad de producción de terapias avanzadas tenía presión positiva y era estanca. Además, los resultados de la prueba de laminaridad demostraron que la unidad de producción de terapias avanzadas cumplía con los estándares ISO 14644, no presentando zonas con turbulencias. Finalmente, las limpiezas de la unidad de producción de terapias avanzadas se pudieron realizar sin dificultad y las monitorizaciones ambientales permanecieron dentro de los límites permitidos, no excediendo el contaje de partículas viables y no viables los límites de las NCF. Todos estos resultados aparecen reflejados en el informe de cualificación del aislador (Tabla 10).

2.1.4.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

La cualificación funcional se llevó a cabo después de aprobar la cualificación operativa, y se realizó de acuerdo al protocolo de cualificación funcional redactado y aprobado.

Las pruebas realizadas demostraron que los parámetros del panel de control y los resultados de los contajes de partículas viables y no viables, en funcionamiento o en reposo, se mantuvieron dentro de los límites permitidos durante los cuatro meses de monitorización continua. Todos estos resultados aparecen reflejados en el informe de cualificación del aislador (Tabla 10).

TABLA 10: Informe de cualificación del aislador

Hoja de registro: Informe de Cualificación del Aislador AISLAISO4-PP-1800 (AP-01)

Impreso 1/UTA/R1/PCA01/02

EQUIPO CUALIFICADO: AISLA ISO4 PP-1800 (AP-01).

DESCRIPCIÓN: se trata de un aislador aséptico de presión positiva ISO 4. GMP A-B, con esteribox (S.A.S) en uno de los laterales. Para garantizar la pureza del aire el aislador cuenta con filtros HEP H14
con una eficacia del 99,995% mpps según normativa EN 1822, que permiten un flujo laminar c entre
0,25 m/s y 0,50 m/s, con una recirculación del aire del 90%, lo que garantiza las condiciones de esterilidad requeridas para la fabricación de medicamentos.

AP-01: AISLAISO4-PP-1800; Nº de Serie: FLO335.

EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN LA CUALIFICACIÓN			
Ensayo: Contaje de partículas.			
Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
Contador de partículas	Particle Measuring system	LASAIR III 350 L	112757
Termómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500T
Higrómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500H
Contador de partículas	HACH	HHPC 3+ (0.3µm)	1712997461
Ensayo: Determinación de la laminaridad.			
Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
Anemómetro	TESTO	435-4	01348449
Termómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500T
Higrómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500H
Ensayo: Medición de las presiones.			
Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
Manómetro	TESTO	435	01348449/703
Termómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500T
Higrómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500H
Ensayo: Medición de la estanqueidad.			
Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
Contador de partículas	Particle Measuring system	LASAIR III 350 L	112757
Termómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500T
Higrómetro	VELLEMAN	DEM500	DEM500H
FECHA DE INICIO: 26/09/2018		**FECHA DE FIN: 26/04/2019**	
VERIFICADO POR: NVM **Fecha: 07/08/2020**		**ACEPTADO POR: SBP** **Fecha: 11/08/2020**	

CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN					
FECHA DE INICIO: 26/09/2018			**FECHA DE FIN: 26/09/2018**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Confirmar que el Aislador ha sido diseñado de acuerdo a las especificaciones.	El Aislador cumple las especificaciones y estas están disponibles.	El Aislador cumple con las especificaciones de la compra.	APTO	26/09/2018 NVM
2	Confirmar que el Aislador es instalado de manera apropiada cumpliendo con la legislación vigente.	El Aislador se instala en la Sala de Elaboración de Estériles y queda listo para su uso. El Aislador está bien sellado, no hay posibilidad de fugas. No hay sitios inaccesibles para su limpieza. La puerta de acceso y de salida del SAS no pueden abrirse al mismo tiempo.	El Aislador se ajusta al espacio reservado en la Sala de Elaboración de estériles y queda instalado correctamente. La inspección visual de Aislador Indica que este no tiene fugas. La puertas del SAS no pueden abrirse al mismo tiempo.	APTO	26/09/2018 NVM
3	Confirmar que se ha realizado la cualificación en origen y que el Aislador cuenta con las instrucciones.	Los certificados de la cualificación en origen están disponibles y el resultado es favorable. La instrucciones están disponibles.	El Aislador viene acompañado de la cualificación en origen y de las instrucciones, todo lo cual se archiva.	APTO	26/09/2018 NVM
4	Confirmar que los sistemas electrónicos de control del Aislador están disponibles.	Los sistemas electrónicos de control del Aislador están a la vista y en un lugar accesible.	Los sistemas electrónicos de control del Aislador están en el lugar indicado en el diseño.	APTO	26/09/2018 NVM
5	Crear el PNT de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones del Aislador.	El PNT ha sido creado así como los Registros que este genera.	Se redactó y se aprobó el PNT PA01 de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones del Aislador.	APTO	08/08/2018 NVM
OBSERVACIONES: Ninguna.					
DESVIACIONES: Ninguna.					
RESULTADO: El Aislador queda cualificado en instalación.					

CUALIFICACIÓN OPERATIVA					
FECHA DE INICIO: 09/10/2018			FECHA DE FIN: 22/01/2019		
Nº	DESCRIPCIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS	APTO/NO APTO	FIRMA Y FECHA
1	Prueba del panel de control.	Los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.	Al accionar los diferentes dispositivos del panel de control estos operan de la manera prevista.	APTO	09/10/2018 NVM
2	Verificación de la recuperación tras un fallo en el suministro eléctrico.	Tras un corte del suministro eléctrico el Aislador vuelve a funcionar correctamente.	Tras un corte del suministro eléctrico el aparato no recupera.	NO APTO	09/102018 NVM
3	Verificación por parte de una empresa externa de la velocidad y uniformidad del flujo de aire (laminaridad).	Se obtendrá un valor de velocid del flujo laminar de 0,25-0,50 m/s y cada lectura realizada) no diferirá de l velocidad media en ± 20%.	La velocidad del aire se encuentra dentro de los límites establecidos no existiendo ningún punto con laminaridad dudosa.	APTO	09/10/2018 TDI
4	Verificación por parte de una empresa externa del contaje de partículas en reposo.	Los recuentos obtenidos cumpl con la parte IV de la Guía de NC	Los recuentos obtenidos cumplen con la clasificación.	APTO	09/10/2018 TDI
5	Verificación por parte de una empresa externa de la presión.	Realizar una medición del diferencial de presión en el equipo entre el plenum y el filtro.	Se obtiene un valor medio de 31 Pa (Presión positiva).	APTO	09/10/2018 TDI
6	Verificación por parte de una empresa externa de la distribución del flujo de aire usando la prueba de humo (estanqueidad).	El Aislador es estanco.	El Aislador es estanco.	APTO	09/10/2018 TDI
7	Realización de monitorizaciones ambientales durante tres semanas consecutivas en reposo.	Las monitorizaciones realizadas no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.	No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante tres semanas consecutivas en reposo.	APTO	23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM
8	Realización de recuentos de partículas durante tres semanas consecutivas en reposo.	Los recuentos obtenidos cumpl con la parte IV de la Guía de NC	Se obtienen recuentos de partículas viables en el Aislador y en el SAS dentro de los límites permitidos durante tres semanas consecutivas en reposo.	APTO	23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM
9	Realizar monitorizaciones del display y de los parámetros físicos mostrados por el display durante tres semanas consecutivas en reposo.	Los valores mostrados por el display se encuentran dentro de los límites permitidos.	Se obtienen valores del exhaust filter, down filter, inflow, humedad y temperatura dentro de los límites permitidos durante tres semanas consecutivas en reposo.	APTO	23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM
10	Realizar la limpieza del Aislador durante tres semanas consecutivas en reposo.	La limpieza del Aislador se reali fácilmente y no se obtiene contaminación microbiana en la monitorización ambiental realiza tras su realización.	La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.	APTO	01/10/2018 (inici NVM 22/10/2018 (tras NVM 27/11/2018 (en O NVM
OBSERVACIONES: Ninguna.					
DESVIACIONES: Se genera una desviación, relacionada con que tras un fallo del suministro eléctrico el equipo no recupera.					
RESULTADO: El Aislador queda cualificado en operación al cumplir con la clasificación ISO requerida para los procesos que se van a llevar a cabo, quedando pendiente la instalación de un SAI. El SAI se instala el 22-01-2019, se comprueba que el equipo recupera y queda cualificado en operación.					

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL					
FECHA DE INICIO: 03/01/2019			**FECHA DE FIN: 26/04/2019**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECH**
1	Realizar la limpieza de Aislador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	La limpieza del Aislador se reali fácilmente y no se obtiene contaminación microbiana en l monitorización ambiental efectuada tras su realización.	La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.	APTO	03/01/2019 (reposo) NVM 08/03/2019 (producción) NVM 10/04/2019 (producción) NVM
2	Realizar una monitorización ambiental del Aislador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamient según corresponda) no exceder los límites que determina la parte I de la Guía de NCF.	No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante los cuatro meses consecutivos.	APTO	04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM
3	Realizar un recuento de partículas no viables del Aislador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamient según corresponda) no exceder los límites que determina la parte I de la Guía de NCF.	Se obtienen recuentos de partículas viables en el Aislador y en el SAS dentro de los límites permitidos durante los cuatro meses consecutivos.	APTO	04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM
4	Realizar una monitorización de los parámetros físicos del Aislador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamient según corresponda) están dent de los límites establecidos.	Se obtienen valores del exhaust filter, down filter, inflow, humedad y temperatura dentro de los límites permitidos durante los cuatro meses consecutivos.	APTO	04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM
OBSERVACIONES: Ninguna.					
DESVIACIONES: Ninguna.					
RESULTADO: El Aislador queda cualificado en funcionamiento.					
CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos no muestran ningún problema o tendencia. Todos los resultados están dentro de los límites de acuerdo a la parte IV de la Guía de NCF. El Aislador queda cualificado.					

ANEXO I. LÍMITES PERMITIDOS PARA LA CUALIFICACIÓN DEL EQUIPO

	ALERTA	ACCIÓN
Exhaust filter	15-20 Pa	< 15 Pa
Downflow filter	> 120 Pa	> 140 Pa
Inflow	< 0,28 m/s o > 0,47 m/s	< 0,20 m/s o > 0,55 m/s
Temperatura aislador	> 25 °C	> 30 °C
Humedad	> 55%	> 60%

Clasificación ISO 14644-1						
Concentración de partículas por metro cúbico de aire						
CLASE	≥ 0,1µm	≥ 0,2µm	≥ 0,3µm	≥ 0,5µm	≥ 1µm	≥ 5µm
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1.000	237	102	35	8	-
ISO 4	10.000	2.370	1.020	352	83	-
ISO 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO 7	-	-	-	352.000	83.200	2.930
ISO 8	-	-	-	3.520.000	832.000	29.300
ISO 9	-	-	-	35.200.000	8.320.000	293.000

	Número máximo de partículas de tamaño igual o superior al indicado en la tabla permitido por m^3			
	En reposo		En funcionamiento	
Grado	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Sin definir	Sin definir

Grado	muestra de aire ufc/m^3	placas de sedimentación (diámetro 90 mm) ufc/4 horas (b)	placas de contacto (diámetro 55 mm) ufc/placa	impresión de guantes 5 dedos ufc/guante
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS

CUALIFICACIÓN OPERATIVA

Fecha: 23/11/2018		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
32 Pa	102 Pa	0,46 m/s	32%	20 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5 µm		Partículas hasta 5 µm		
Aislador: 0	SAS: 3.021,20	Aislador: 0	SAS: 190,81	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
Fecha: 30/11/2018		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
35 Pa	103 Pa	0,50 m/s	30%	20 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5 µm		Partículas hasta 5 µm		
Aislador: 0	SAS: 4.195,42	Aislador: 0	SAS: 684,28	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
FECHA: 07/12/2018		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
32 Pa	103 Pa	0,46 m/s	42%	22 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5 µm		Partículas hasta 5 µm		
Aislador: 0	SAS: 4.147,86	Aislador: 0	SAS: 682,73	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
Observaciones: en la monitorización realizada el 23/11/2018, colonia en la placa de impronta de huellas del guante central. La placa se abrió.				

LIMPIEZA DEL AISLADOR

Fecha: 01/10/201	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 22/10/201	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 27/11/201	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Observaciones: Ninguna.			

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL				
Fecha: 04/01/2019		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
34 Pa	103 Pa	0,50 m/s	22%	20 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5µm		Partículas hasta 5µm		
Aislador: 0	SAS: 14,12	Aislador: 0	SAS: 0	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
Fecha: 07/02/2019		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
34 Pa	102 Pa	0,47 m/s	42%	22 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5 µm		Partículas hasta 5 µm		
Aislador: 0	SAS: N/A	Aislador: 0	SAS: N/A	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
FECHA: 11/03/2019		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
34 Pa	103 Pa	0,46 m/s	40%	23 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5 µm		Partículas hasta 5 µm		
Aislador: 0	SAS: 13.052	Aislador: 0	SAS: 509	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
FECHA: 12/04/2019		**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*		**Apto**		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS				
Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Humedad	Temperatura
36 Pa	103 Pa	0,50 m/s	30%	23 °C
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS NO VIABLES				
Partículas hasta 0,5 µm		Partículas hasta 5 µm		
Aislador: 0	SAS: 413	Aislador: 0	SAS: 21,2	
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES				
AISLADOR		SAS		
Negativo		Negativo		
Observaciones: Ninguna.				

LIMPIEZA DEL AISLADOR			
Fecha: 03/01/2019	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 08/03/2019	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 10/04/2019	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Observaciones: Ninguna.			

Tras la cualificación inicial del aislador, las posteriores recualificaciones anuales fueron realizadas por una empresa externa debidamente acreditada, Qualipharma (Madrid, España) quien verificó que la clasificación ISO, la laminaridad del flujo, la presión y la estanquidad, entraban dentro de los parámetros establecidos, y eran conformes, quedando registrada dicha evaluación en el registro de mantenimiento y reparaciones del aislador.

2.2. INSTALACIÓN Y CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS

2.2.1. DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE USUARIO DE LOS APARATOS

Se definieron los siguientes requerimientos para los aparatos instalados dentro de la unidad de producción de terapias avanzadas y el resto de aparatos necesarios para llevar a cabo la producción del MTA:

2.2.1.1. INCUBADOR

- Incubador de pequeño tamaño que pueda introducirse dentro de la unidad de producción de terapias avanzadas.
- Sistema de alerta para la temperatura.
- Sistema de alerta de los niveles de CO2.
- Display que muestre la temperatura y CO2.
- Sistema de apertura de puerta fácil con una única puerta.

2.2.1.2. CENTRÍFUGA

- Centrífuga de mesa de pequeñas dimensiones que permitan su instalación sobre la superficie del aislador.
- Rotor que permita la centrifugación de tubos de 15 mL.
- Rotor que alcance una velocidad de 4.000 g.

2.2.1.3. MICROSCOPIO

- Microscopio de contraste de fases.
- Pantalla incorporada, que permita observar las células a través del cristal del aislador.
- Conexión USB que guarde imágenes a tiempo real.

2.2.1.4. FRIGORÍFICOS

- Tamaño reducido.
- Cumpla con las especificaciones para poder almacenar medicamentos en su interior.
- Sistema de alarma según límites de temperatura definidos.
- Rango de temperatura 5 ± 3 °C.

2.2.1.5. ESTUFAS

- Tamaño reducido.
- Sistema de alarma según límites de temperatura definidos.
- Rango de temperatura 20-38 °C.

El listado completo de los aparatos e instrumentos necesarios para la producción, junto al código interno asignado, su marca, número de serie y ubicación se muestra en la Tabla 11.

TABLA 11: Listado de los equipos/instrumentos necesarios para la producción

EQUIPO/INSTRUMENTO	CÓDIGO	MARCA	Nº DE SERIE/UBICACIÓN
Aislador AISLAISO4-PP-1800	AP-01	TDI EUROAIRE	FL0335/1
Incubador 27-MINICELL NB-203M	AP-02	N-BIOTEK	1801N203M101/2
Centrífuga SPECTRAFUGE™ 6C	AP-03	Labnet	000017212348/2
Microscopio EVOS® XL	AP-04	ThermoFisher	1-800-955-6288/2
Frigorífico Liebherr 708548301	AP-05_01	Liebherr	84.880.258258.3/1
Frigorífico Liebherr 708300101	AP-05_02	Liebherr	83.529.060.7/3
Estufa Memmert UNB 500	AP-08_01	Memmert	100-800/9
Estufa Prodintec	AP-08_02	Prodintec	PR1539/9
Contador de partículas HHPC 3+	AP-06	MET ONE/HACH	1712997461/3
Data Logger Testo Saveris 2	AP-07_01	Testo	0054601412/4
Data Logger LOG200	AP-07_02	Dostmann	21019040131/5
Data Logger LOG200	AP-07_03	Dostmann	21019040133/6
Data Logger LOG200	AP-07_04	Dostmann	21019040134/7
Data Logger LOG200	AP-07_05	Dostmann	21019040135/8
Data Logger LOG200	AP-07_06	Dostmann	21019040139/3
Micropipeta LAMBDA EliteTouch 100	AP-09_01	Corning	960540018/3
Micropipeta LAMBDA EliteTouch 1000	AP-09_02	Corning	960560433/3
Pipeteador Automático STRIPETTOR ULTRA	AP-09_03	Corning	903323602/3

Ubicación: 1: Sala de elaboración de estériles. 2: Interior del aislador. 3: Almacén. 4: Interior del incubador. 5: Interior del frigorífico. AP-05_01. 6: Interior del frigorífico. AP-05_02. 7: Interior de la estufa. AP-08_02. 8: Interior de la estufa AP-08_01. 9: Sala microbiología.

2.2.2. INSTALACIÓN DE LOS APARATOS

Una vez adquiridos los aparatos que cumplían las especificaciones definidas, quedaron instalados en las localizaciones designadas. Dentro del aislador, se instaló el incubador, la centrífuga y el microscopio, en tanto que los frigoríficos y las estufas se instalaron en la sala de farmacotecnia para la elaboración de medicamentos no estériles del SFH. Los aparatos instalados, así como sus especificaciones técnicas se detallan a continuación:

2.2.2.1. INCUBADOR

Incubador 27-MINICELL NB-203M (N-Biotek, Gyeonggi-do, Korea). Nº de Serie: 1801N203M101 (Figura 14).

- Estructura: resina ABS.
- Dimensiones externas (mm): 292 (ancho) x 333 (profundo) x 433 (alto).
- Dimensiones internas (mm): 224 (ancho) x 200 (profundo) x 340 (alto).
- Capacidad interior: 15,2 L.
- Peso: 6,8 kg.
- Rango de temperatura: 15-45 °C (± 0,25 °C a 37 °C).
- CO2: 0-20% (± 0,1% al 5%).
- Humedad: hasta 80%.
- Presión gas: 1 Bar.
- Tensión de alimentación: 110 - 220 V (+/- 10%), 50-60 Hz.
- Display: LED.
- Cantidad de bandejas incluidas: 2 de acero inoxidable perforado.
- Presión de entrada de CO2: 0,3 bares.

FIGURA 14: Incubador 27-Minicell

2.2.2.2. CENTRÍFUGA

Centrífuga SPECTRAFUGE™ 6C (Fisher Scientific S.L., Madrid, España). Nº de Serie: 000017212348 (Figura 15).

- Dimensiones (mm): 209,5 (ancho) x 177,8 (alto) x 241,3 (profundo).
- Máxima velocidad: 6.500 rpm (4.000 g).
- Volumen máximo: 6 x 15 mL.
- Densidad admisible: 1,2 kg/dm3.
- Tensión de alimentación: 230 V (50-60 Hz).
- Radio rotor: 8,5 cm para tubos redondos, 8,2 cm para tubos cónicos.

FIGURA 15: Centrífuga SPECTRAFUGETM 6C

2.2.2.3. MICROSCOPIO

Microscopio EVOS® XL (Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos). Nº de Serie: 1-800-955-6288 (Figura 16).

- Dimensiones (mm): 355 (ancho) x 578 (alto) x 470 (profundo).
- Peso: 14,2 kg.
- Tensión de alimentación: 100-240 V (50-60 Hz).

- Objetivos: 2x, 4x, 10x, 20x, 40x.
- Iluminación: Led de intensidad ajustable.
- Display: 1.024 x 768 píxeles.
- Cámara: 3,1 megapíxeles color.
- 3 puertos USB y 1 DVI.

FIGURA 16: Microscopio EVOS® XL

2.2.2.4. FRIGORÍFICOS

Frigoríficos Liebherr® 7085 483 01 y 7083 001 01 (Liebherr, Kirchdorf, Alemania). Nº de Serie: 84.880.258258.3 y 83.529.060.7, respectivamente (Figura 17).

Frigorífico Liebherr 7085 483 01

- Dimensiones (mm): 640 (ancho) x 820 (alto) x 615 (profundo).
- Tipo climatológico: entre + 16 °C y + 43 °C.
- Capacidad bruta: 121 L.

Frigorífico Liebherr 7083 001 01

- Dimensiones (mm): 600 (ancho) x 615 (alto) x 830 (profundo).
- Tipo climatológico: entre + 10 °C y + 43 °C.
- Capacidad bruta: 130 L.

FIGURA 17: Frigoríficos Liebherr 7085 483 01, izquierda y Liebherr 7083 001 01, derecha

2.2.2.5. ESTUFAS

Estufa Memmert UNB 500 (Memmert, Alemani) y Estufa Prodintec (Prodintec, Gijón, Asturias, España). Nº de Serie: 100-800 y PR1539, respectivamente (Figura 18).

Estufa Memmert UNB 500

- Estructura: carcasa exterior y cámara de trabajo de acero inoxidable.
- Dimensiones externas (mm): 710 (ancho) x 550 (profundo) x 760 (alto).
- Dimensiones internas (mm): 560 (ancho) x 400 (profundo) x 480 (alto).
- Volumen interior: 108 L.
- Peso: 50 kg.
- Consumo: 2.000 W.
- Nº máximo de bandejas: 5.

- Carga máxima por bandeja: 30 kg.
- Carga máxima total de la estufa: 60 kg.
- Rango de ajuste de la temperatura: 20-220 °C.
- Precisión de ajuste: 0,5 °C.
- Resolución de la indicación: 0,5 °C.
- Sonda de temperatura PT100 de 4 hilos de clase DIN A.

Estufa Prodintec

- Estructura: carcasa exterior de acero inoxidable.
- Dimensiones externas (mm): 350 (ancho) x 315 (profundo) x 157 (alto).
- Dimensiones internas (mm): 185 (ancho) x 130 (profundo) x 100 (alto).
- Núcleo térmico de aluminio.
- Consumo: 2.000 W.
- Rango de ajuste de temperatura: 0-45ºC.

FIGURA 18: Estufas Memmert UNB 500, izquierda, y Prodintec, derecha

2.2.3. PLAN DE CUALIFICACIÓN DE LOS APARATOS

2.2.3.1. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

La cualificación de la instalación, se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos de cualificación de la instalación, redactados y aprobados, los cuales incluían un listado con todos los detalles que debían ser verificados.

Se comprobó que cada aparato instalado cumplía con los requerimientos de usuario y las especificaciones, estando las instrucciones y el certificado de conformidad disponibles. Además, se confirmó que el flujo del aire del aislador no se alteró tras la instalación del incubador, la centrífuga y el microscopio, y que los sistemas electrónicos de estos aparatos, así como de los frigoríficos y las estufas, estaban a la vista y en un lugar accesible. Así mismo, se redactó y aprobó un PNT de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones para cada uno de los aparatos instalados.

Finalmente, la realización de la cualificación de instalación de todos los aparatos quedó reflejada en los diferentes informes de cualificación de instalación de los aparatos: incubador, centrífuga, microscopio, frigoríficos y estufas (Tablas 12, 13, 14, 15 y 16).

2.2.3.2. CUALIFICACIÓN OPERATIVA

La cualificación operativa se llevó a cabo después de aprobar la cualificación de la instalación, y se realizó de acuerdo a los protocolos de cualificación operativa redactados y aprobados.

Las pruebas realizadas demostraron que los dispositivos del panel de control de cada aparato funcionaban de manera correcta, que los equipos térmicos volvían a funcionar correctamente tras la simulación de un corte del suministro y que los valores mostrados por el *display* se encontraban dentro de los límites permitidos. Además, las limpiezas se pudieron realizar sin dificultad y las monitorizaciones ambientales permanecieron dentro de los límites permitidos, no excediendo el contaje de partículas viables y no viables los límites de la parte IV de la Guía de NCF.

Todos estos resultados aparecen reflejados en los informes de cualificación operativa de los diferentes aparatos (Tablas 12, 13, 14, 15 y 16).

2.2.3.3. CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

La cualificación funcional se llevó a cabo después de aprobar la cualificación operativa, y se realizó de acuerdo a los protocolos de cualificación funcional redactados y aprobados.

Las pruebas realizadas a los diferentes aparatos demostraron que los parámetros del panel de control y los resultados de los contajes de partículas viables y no viables, en funcionamiento o en reposo, se mantuvieron dentro de los límites permitidos durante los cuatro meses de monitorización continua. Además, se obtuvieron resultados dentro de los límites permitidos para el resto de ensayos realizados:

- Incubador: durante la cualificación funcional, los resultados del test de puerta abierta mostraron que la temperatura del incubador se mantuvo dentro de los límites permitidos durante la realización del mismo.
- Centrífuga: durante la cualificación funcional se obtuvo pellet al centrifugar las suspensiones celulares obtenidas tras la digestión enzimática de cultivos celulares.
- Microscopio: durante la cualificación funcional, se pudieron visualizar los cultivos celulares pudiendo realizar y exportar fotografías de los mismos.

Todos estos resultados aparecen reflejados en los informes de cualificación funcional de los diferentes aparatos (Tablas 12, 13, 14, 15 y 16).

TABLA 12: Informe de cualificación del incubador 27-Minicell NB-203M

Hoja de registro: Informe de Cualificación del Incubador 27-MINICELL NB-203M (AP-02)

Impreso 1/UTA/R1/PCA02/02

EQUIPO CUALIFICADO: Incubador 27-MINICELL NB-203M (AP-02).

DESCRIPCIÓN: se trata de un Incubador de estructura de resina y una capacidad de 15,2 L y 6,8 kg de peso, con un rango de temperaturas de 15-45 °C (± 0,25 °C a 37 °C) y de CO_2 de 0-20% (± 0,1% al 5%), lo que garantiza las condiciones requeridas para la realización de los cultivos celulares.

AP-02: Incubador 27-MINICELL NB-203M; Nº de Serie: 1801N203M101.

EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN LA CUALIFICACIÓN

Ensayo: Medición de la temperatura del Incubador

Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
Data Logger	Testo	Testo Saveris 2T2	54601412

FECHA DE INICIO: 01/10/2018	**FECHA DE FIN: 27/05/2019**
VERIFICADO POR: NVM **Fecha: 07/08/2020**	**ACEPTADO POR: SBP** **Fecha: 11/08/2020**

CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

FECHA DE INICIO: 01/10/2018			**FECHA DE FIN: 01/10/2018**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Situar el Incubador en su ubicación dentro del aislador.**	**El Incubador no tiene daños y se ajusta al espacio asignado en el interior del Aislador.**	**La inspección visual del Incubador indica que no tiene daños.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
2	**Confirmar que el Incubador es instalado de manera apropiada.**	**El Incubador se instala en el Aislador y queda listo para su uso. No hay sitios inaccesibles para su limpieza.**	**El Incubador se ajusta al espacio reservado en el Aislador y queda instalado correctamente. No hay sitios inaccesibles para la limpieza.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
3	**Confirmar que el flujo de aire del Aislador no se afecta por la instalación del Incubador.**	**El *display* del Aislador marca que el flujo de aire no se altera tras la colocación del Incubador.**	**Tras la colocación del Incubador en su ubicación dentro del Aislador el *display* del Aislador no muestra que el flujo de aire se altere.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
4	**Confirmar que el Incubador viene acompañado de la documentación (instrucciones, certificado de conformidad) proporcionada por el proveedor.**	**El manual de instrucciones y el certificado de conformidad están disponibles.**	**El Incubador viene acompañado del certificado de conformidad y las instrucciones que quedan archivados.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
5	**Confirmar que los sistemas electrónicos de control del Incubador están disponibles.**	**Los sistemas electrónicos de control del Incubador están a la vista y en un lugar accesible.**	**Los sistemas electrónicos de Control del Aislador están en el Lugar indicado en el diseño.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
6	**Crear el PNT de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones del Incubador.**	**El PNT ha sido creado así como los Registros que este genera.**	**Se redactó y se aprobó el PNT PA02 de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones del**	**APTO**	**08/08/2018 NVM**

			Incubador.		
OBSERVACIONES: Ninguna.					
DESVIACIONES: Ninguna.					
RESULTADO: El Incubador queda cualificado en instalación.					
CUALIFICACIÓN OPERATIVA					
FECHA DE INICIO: 09/10/2018			**FECHA DE FIN: 24/12/2018**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Prueba del panel de control.**	**Los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.**	**La inspección visual de los diferentes dispositivos del panel de control indica que estos operan de la manera prevista.**	**APTO**	**09/10/2018 NVM**
2	**Verificación de la recuperación tras un fallo en el suministro eléctrico.**	**Tras un corte del suministro eléctrico el Incubador vuelve a funcionar correctamente.**	**Tras un corte del suministro eléctrico el aparato recupera.**	**APTO**	**09/10/2018 NVM**
3	**Limpiar el Incubador de acuerdo a las instrucciones proporcionadas durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**El Incubador se limpia adecuadamente.**	**La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.**	**APTO**	**01/10/2018 (inici NVM 22/10/2018 (tras NVM 27/11/2018 (en c NVM**
4	**Establecer la temperatura al nivel requerido.**	**La temperatura queda establecida en el valor requerido.**	**Ajuste de temperatura: 36,5 °C.**	**APTO**	**09/10/2018 NVM**
5	**Establecer el nivel de CO_2 en el nivel requerido.**	**El CO_2 queda establecido en el valor requerido.**	**Nivel de CO_2: 5%.**	**APTO**	**09/10/2018 NVM**
6	**Realización de monitorizaciones ambientales durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**Las monitorizaciones realizadas no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.**	**No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**APTO**	**23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM**
7	**Realizar monitorizaciones del *display* y de los parámetros físicos mostrados por el *display* durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**Los valores mostrados por el *display* se encuentran dentro de los límites permitidos.**	**Se obtienen valores de temperatura y CO_2 dentro de los límites permitidos durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**APTO**	**23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM**
OBSERVACIONES: Ninguna.					
DESVIACIONES: Ninguna.					
RESULTADO: El Incubador queda cualificado en operación.					

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL					
FECHA DE INICIO: 03/01/2019			FECHA DE FIN: 27/05/2019		
Nº	DESCRIPCIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS	APTO/NO APTO	FIRMA Y FECHA
1	Realizar la limpieza del Incubador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	La limpieza del Incubador se realiza fácilmente y no se obtiene contaminación microbiana en la monitorización ambiental efectuada tras su realización.	La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.	APTO	03/01/2019 (reposo) NVM 08/03/2019 (producción) NVM 10/04/2019 (producción) NVM
2	Realizar una monitorización Ambiental del Incubador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamiento según corresponda) no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.	No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante los cuatro meses consecutivos.	APTO	04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM
3	Realizar una monitorización de los parámetros físicos del Incubador (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamiento según corresponda) están dentro de los límites establecidos.	Se obtienen valores de la temperatura y del CO_2 dentro de los límites permitidos durante los cuatro meses consecutivos.	APTO	04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM
4	Monitorización de la temperatura del Incubador en vacío durante tres periodos de cinco días consecutivos.	La temperatura se encuentra en los límites establecidos.	Se obtienen valores de temperatura dentro de los límites establecidos en las mediciones realizadas.	APTO	20-25/11/2018 NVM 25-30/11/2018 NVM 30/11-05/12/20 NVM
5	Monitorización de la temperatura del Incubador simulando tres producciones consecutivas.	La temperatura se encuentra en los límites establecidos.	Se obtienen valores de temperatura dentro de los límites establecidos en las mediciones realizadas.	APTO	22/02-07/03/20 Lote 1901 NVM 15/03-08/04/20 Lote 1902 NVM 19/04-08/05/20 Lote 1903 NVM
6	Test de puerta abierta: se abre la puerta del Incubador durante 30 segundos y dos minutos y se monitoriza la temperatura del *display* del Incubador y del interior con el *data logger* AP-07_01.	La temperatura se mantiene dentro de los límites permitidos.	Se obtienen valores de temperatura en las mediciones realizadas dentro de los límites establecidos.	APTO	27/05/2019
OBSERVACIONES: Temperatura máxima y mínima fuera del rango especificado en momentos puntuales durante la simulación de la producción, que pudieran estar relacionados con aperturas de puerta.					
DESVIACIONES: Durante la realización de la cualificación funcional (simulación de la producción), se detectó que la temperatura del incubador estaba fuera de rango en momentos puntuales que pudieran coincidir con aperturas de puerta del Incubador necesarias para la producción.					

estudiar el efecto
de la apertura de la puerta en la temperatura del incubador se observa que la temperatura se recupera aproximadamente a los 2 minutos
pero el tiempo de temperatura fuera de rango no sobrepasa los 30 segundos.

RESULTADO:
El incubador queda cualificado en funcionamiento dado que la temperatura del Incubador vuelve a los parámetros establecidos.

CONCLUSIONES:
Los resultados obtenidos muestran que las temperaturas fuera de rango son puntuales, en momentos necesarios de apertura de puerta del incubador, no viéndose afectada la calidad de los lotes producidos.
El incubador queda cualificado.

ANEXO I. LÍMITES PERMITIDOS PARA LA CUALIFICACIÓN DEL EQUIPO

	ALERTA	ACCIÓN
Temperatura del Incubador	< 35 °C o > 38 °C	< 34,5 °C o > 38,5 °C
CO_2 del Incubador	> 7%	> 10%

Grado	muestra de aire ufc/m^3	placas de sedimentación (diámetro 90 mm) ufc/4 horas (b)	placas de contacto (diámetro 55 mm) ufc/placa	impresión de guantes 5 dedos ufc/guante
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS			
CUALIFICACIÓN OPERATIVA			
Fecha: 23/11/2018	**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DEL *DISPLAY*			
TEMPERATURA	CO_2		
36,5 °C	5%		
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES			
Negativo			
Fecha: 30/11/2018	**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DEL *DISPLAY*			
TEMPERATURA	CO_2		
36,6 °C	5%		
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES			
Negativo			
FECHA: 07/12/2018	**Realizado por:** NVM		
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto		
MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DEL *DISPLAY*			
TEMPERATURA	CO_2		
36,4 °C	5%		
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES			
Negativo			
Observaciones: Ninguna.			
LIMPIEZA DEL INCUBADOR			
Fecha: 01/10/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 22/10/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 27/11/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorización: Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Observaciones: Ninguna.			

TABLA 13: Informe de cualificación de la centrífuga SPECTRAFUGETM 6C

Hoja de registro: Informe de Cualificación de la Centrífuga SPECTRAFUGE™ 6C (AP-03)			
Impreso 1/UTA/R1/PCA03/02			
EQUIPO CUALIFICADO: Centrífuga SPECTRAFUGE™ 6C (AP-03).			
DESCRIPCIÓN: se trata de una Centrífuga que permite centrifugar un volumen máximo de 6 tubos de 15 mL y que alcanza una velocidad máxima de centrifugación de 6.500 rpm (4.000 g), lo que garantiza las condiciones requeridas para centrifugar suspensiones celulares (400 g). AP-03: Centrífuga SPECTRAFUGE™ 6C; Nº de Serie: 000017212348.			
EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN LA CUALIFICACIÓN			
Ensayo:			
Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
FECHA DE INICIO: 01/10/2018		**FECHA DE FIN: 06/05/2019**	
VERIFICADO POR: NVM **Fecha: 07/08/2020**		**ACEPTADO POR: SBP** **Fecha: 11/08/2020**	

CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN					
FECHA DE INICIO: 01/10/2018			**FECHA DE FIN: 01/10/2018**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Situar la Centrífuga en su ubicación dentro del aislador.**	**La Centrífuga no tiene daños y se ajusta al espacio asignado en el interior del Aislador.**	**La inspección visual de la Centrífuga indica que no tiene daños.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
2	**Confirmar que la Centrífuga es instalada de manera apropiada.**	**La Centrífuga se instala en el Aislador y queda lista para su uso. No hay sitios inaccesibles para su limpieza.**	**La Centrífuga se ajusta al espacio reservado en el Aislador y queda instalada correctamente. No hay sitios inaccesibles para la limpieza.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
3	**Confirmar que el flujo de aire del Aislador no se afecta por la instalación la Centrífuga.**	**El *display* del Aislador marca que el flujo de aire no se altera tras la colocación de la Centrífuga.**	**Tras la colocación de la Centrífuga en su ubicación dentro del Aislador el *display* del Aislador no muestra que el flujo de aire se altere.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
4	**Confirmar que la Centrífuga viene acompañado de la documentación (instrucciones, certificado de conformidad) proporcionada por el proveedor.**	**El manual de instrucciones y el certificado de conformidad están disponibles.**	**La Centrífuga viene acompañada del certificado de conformidad y las instrucciones que quedan archivados.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
5	**Confirmar que los sistemas electrónicos de control de la Centrífuga están disponibles.**	**Los sistemas electrónicos de control de la Centrífuga están a la vista y enun lugar accesible.**	**Los sistemas electrónicos de control de la Centrífuga están en el lugar indicado en el diseño.**	**APTO**	**01/10/2018 NVM**
6	**Crear el PNT de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones de la Centrífuga.**	**El PNT ha sido creado así como los Registros que este genera.**	**Se redactó y se aprobó el PNT PA03 de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones de la Centrífuga.**	**APTO**	**08/08/2018 NVM**

OBSERVACIONES: **Ninguna.**
DESVIACIONES: **Ninguna.**
RESULTADO: **La Centrífuga queda cualificada en instalación.**

CUALIFICACIÓN OPERATIVA					
FECHA DE INICIO: 09/10/2018			**FECHA DE FIN: 24/12/2018**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Prueba del panel de control.**	**Los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.**	**La inspección visual de los diferentes dispositivos del panel de control indica que estos operan de la manera prevista.**	**APTO**	**09/10/2018 NVM**
2	**Limpiar la Centrífuga de acuerdo a las instrucciones proporcionadas durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**La Centrífuga se limpia adecuadamente.**	**La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.**	**APTO**	**01/10/2018 (inici NVM 22/10/2018 (tras NVM 27/11/2018 (en c NVM**
3	**Realización de monitorizaciones ambientales durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**Las monitorizaciones realizadas no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.**	**No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante tres semanas consecutivas en reposo.**	**APTO**	**23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM**
OBSERVACIONES: **Ninguna.**					
DESVIACIONES: **Ninguna.**					
RESULTADO: **La centrífuga queda cualificada en operación.**					

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL					
FECHA DE INICIO: 03/01/2019			**FECHA DE FIN: 06/05/2019**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Realizar la limpieza de la Centrífuga (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.**	**La limpieza de la Centrífuga se realiza fácilmente y no se obtiene contaminación microbiana en la monitorización ambiental efectuada tras su realización.**	**La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.**	**APTO**	**03/01/2019 (reposo) NVM 08/03/2019 (producción) NVM 10/04/2019 (producción) NVM**
2	**Realizar una monitorización ambiental de la Centrífuga (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.**	**Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamiento según corresponda) no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.**	**No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante cuatro meses consecutivos.**	**APTO**	**04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM**
3	**Centrifugar las suspensiones celulares obtenidas tras la digestión enzimática de los cultivos celulares obtenidos simulando tres producciones consecutivas.**	**Se forma un *pellet* al centrifugar las suspensiones celulares.**	**La inspección visual de los tubos indica que se ha formado un *pellet* tras la realización de la centrifugación.**	**APTO**	**04/03/2019 Lote 1901 NVM 03/04/2019 Lote 1902 NVM 06/05/2019 Lote 1903 NVM**

OBSERVACIONES: **Ninguna.**
DESVIACIONES: **Ninguna.**
RESULTADO: **La centrífuga queda cualificada en funcionamiento dado que se forma un *pellet* celular tras la realización de la centrifugación.**
CONCLUSIONES: **Se han cumplido todos los criterios de aceptación.** **La centrífuga queda cualificada.**

ANEXO I. LÍMITES PERMITIDOS PARA LA CUALIFICACIÓN DEL EQUIPO

Grado	muestra de aire ufc/m^3	placas de sedimentación (diámetro 90 mm) ufc/4 horas (b)	placas de contacto (diámetro 55 mm) ufc/placa	impresión de guantes 5 dedos ufc/guante
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS

CUALIFICACIÓN OPERATIVA	
Fecha: 23/11/2018	**Realizado por:** NVM
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES	
Negativo	
Fecha: 30/11/2018	**Realizado por:** NVM
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES	
Negativo	
FECHA: 07/12/2018	**Realizado por:** NVM
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES	
Negativo	
Observaciones: Ninguna.	

LIMPIEZA DE LA CENTRÍFUGA			
Fecha: 01/10/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorizació Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 22/10/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorizació Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 27/11/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorizació Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Observaciones: Ninguna.			

TABLA 14: Informe de cualificación del microscopio EVOS® XL

Hoja de registro: Informe de Cualificación del Microscopio EVOS® XL (AP-04)

Impreso 1/UTA/R1/PCA04/02

EQUIPO CUALIFICADO: Microscopio EVOS® XL (AP-04).

DESCRIPCIÓN: se trata de un Microscopio de 14,2 kg de peso que permite la observación del crecimiento celular con objetivos de 2x, 4x, 10x, 20x y 40x. Además, dispone de una cámara de 3 megapíxeles, que permite la realización de fotos y la descarga de las mismas mediante un puerto usb.

AP-04: Microscopio EVOS® XL; Nº de Serie: 1-800-955-6288.

EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN LA CUALIFICACIÓN			
Ensayo:			
Instrumento	**Marca**	**Modelo**	**Nº de Serie**
FECHA DE INICIO: 01/10/2018		**FECHA DE FIN: 08/05/2019**	
VERIFICADO POR: NVM **Fecha: 07/08/2020**		**ACEPTADO POR: SBP** **Fecha: 11/08/2020**	

CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN					
FECHA DE INICIO: 01/10/2018			FECHA DE FIN: 01/10/2018		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Situar el Microscopio en su ubicación dentro del Aislador.	El Microscopio no tiene daños y se ajusta al espacio asignado en el interior del Aislador.	La inspección visual del Microscopio indica que no tiene daños.	APTO	01/10/2018 NVM
2	Confirmar que el Microscopio es instalado de manera apropiada.	El Microscopio se instala en el Aislador y queda listo para su uso. No hay sitios inaccesibles para su limpieza.	El Microscopio se ajusta al espacio reservado en el Aislador y queda instalado correctamente. No hay sitios inaccesibles para la limpieza.	APTO	01/10/2018 NVM
3	Confirmar que el flujo de aire del Aislador no se afecta por la instalación del Microscopio.	El *display* del Aislador marca que el flujo de aire no se altera tras la colocación del Microscopio.	Tras la colocación del Microscopio en su ubicación dentro del Aislador el *display* del Aislador no muestra que el flujo de aire se altere.	APTO	01/10/2018 NVM
4	Confirmar que el Microscopio viene acompañado de la documentación (instrucciones, certificado de conformidad) proporcionada por el proveedor.	El manual de instrucciones y el certificado de conformidad están disponibles.	El Microscopio viene acompañado del certificado de conformidad y las instrucciones que quedan archivados.	APTO	01/10/2018 NVM
5	Confirmar que los sistemas electrónicos de control del microscopio están disponibles.	Los sistemas electrónicos de control del Microscopio están a la vista y en un lugar accesible.	Los sistemas electrónicos de control del Microscopio están en el lugar indicado en el diseño.	APTO	01/10/2018 NVM
6	Crear el PNT de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones del Microscopio.	El PNT ha sido creado así como los Registros que este genera.	Se redactó y se aprobó el PNT PA04 de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones del Microscopio.	APTO	08/08/2018 NVM

OBSERVACIONES:
Ninguna.

DESVIACIONES:
Ninguna.

RESULTADO:
El microscopio queda cualificado en instalación.

CUALIFICACIÓN OPERATIVA

FECHA DE INICIO: 09/10/2018			FECHA DE FIN: 24/12/2018		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Prueba del panel de control (encendido, unidad usb, selector del objetivo, selector del anillo de fases, enfoque, programa de creación de imágenes).	Los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.	La inspección visual de los diferentes dispositivos del panel de control indica que estos operan de la manera prevista.	APTO	09/10/2018 NVM
2	Limpiar el Microscopio de acuerdo a las instrucciones proporcionadas durante tres semanas consecutivas en reposo.	El Microscopio se limpia adecuadamente.	La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.	APTO	01/10/2018 (inici NVM 22/10/2018 (tras NVM 27/11/2018 (en c NVM
3	Realización de monitorizaciones ambientales durante tres semanas consecutivas en reposo.	Las monitorizaciones realizadas no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.	No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante tres semanas consecutivas en reposo.	APTO	23/11/2018 NVM 30/11/2018 NVM 07/12/2018 NVM

OBSERVACIONES: Ninguna.

DESVIACIONES: Ninguna.

RESULTADO: El Microscopio queda cualificado en operación.

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

FECHA DE INICIO: 03/01/2019			FECHA DE FIN: 08/05/2019		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Realizar la limpieza del Microscopio (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	La limpieza del Microscopio se realiza fácilmente y no se obtiene contaminación microbiana en la monitorización ambiental efectuada tras su realización.	La limpieza se realiza fácilmente. No se obtuvo contaminación microbiana en los controles que se efectuaron tras su realización.	APTO	03/01/2019 (reposo) NVM 08/03/2019 (producción) NVM 10/04/2019 (producción) NVM
2	Realizar una monitorización Ambiental del Microscopio (en reposo o en funcionamiento según corresponda) durante un periodo de cuatro meses.	Las monitorizaciones realizadas (en reposo o en funcionamiento según corresponda) no exceden los límites que determina la parte IV de la Guía de NCF.	No se obtiene contaminación microbiológica en la monitorización realizada durante cuatro meses consecutivos.	APTO	04/01/2019 (reposo) NVM 07/02/2019 (reposo) NVM 11/03/2019 (producción) NVM 12/04/2019 (producción) NVM
3	Realizar la visualización de los cultivos celulares obtenidos simulando tres producciones consecutivas.	Se visualizan los cultivos celulares a diferentes aumentos pudiendo realizar y descargar fotos .	Se realizan fotos de a los cultivos obtenidos y se descargan en un usb para su archivo.	APTO	22/02-07/03/20 Lote 1901 NVM 20/03-08/04/20 Lote 1902 NVM 24/04-08/05/20 Lote 1903 NVM

OBSERVACIONES: **Ninguna.**
DESVIACIONES: **Ninguna.**
RESULTADO: **El microscopio queda cualificado en funcionamiento dado que se pueden visualizar los cultivos obtenidos, hacerles fotos y descargarlas mediante una memoria usb.**
CONCLUSIONES: **Se han cumplido todos los criterios de aceptación.** **El microscopio queda cualificado.**

ANEXO I. LÍMITES PERMITIDOS PARA LA CUALIFICACIÓN DEL EQUIPO

Grado	muestra de aire ufc/m^3	placas de sedimentación (diámetro 90 mm) ufc/4 horas (b)	placas de contacto (diámetro 55 mm) ufc/placa	impresión de guantes 5 dedos ufc/guante
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS

CUALIFICACIÓN OPERATIVA	
Fecha: 23/11/2018	**Realizado por:** NVM
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES	
Negativo	
Fecha: 30/11/2018	**Realizado por:** NVM
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES	
Negativo	
FECHA: 07/12/2018	**Realizado por:** NVM
FUNCIONES DEL *DISPLAY*	Apto
MONITORIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIABLES	
Negativo	
Observaciones: Ninguna.	

LIMPIEZA DEL MICROSCOPIO			
Fecha: 01/10/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorizació Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 22/10/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorizació Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Fecha: 27/11/2018	**Realizado por: NVM**	**Resultado de la monitorizació Negativo**	**Aceptado por: SBP**
Observaciones: Ninguna.			

TABLA 15: Informe de cualificación de los frigoríficos Liebherr 7085 483 01 y Liebherr 7083 001 01

Hoja de registro: Informe de Cualificación de los Frigoríficos

Liebherr 7085 483 01 (AP-05_01) y Liebherr 7083 001 01 (AP-05_02)

Impreso 1/UTA/R1/PCA05/02

EQUIPO CUALIFICADO: Frigorífico Liebherr 7085 483 01 (AP-05_01) y Liebherr 7083 001 01 (AP-05_02).

DESCRIPCIÓN: se trata de dos Frigoríficos que se emplean para conservar las materias primas con capacidades de 121 L (AP-05_01: 4 baldas) y de 130 L (AP-05_02: 2 baldas).
AP-05_01: Frigorífico Liebherr 7085 483 01; Nº de Serie: 84.880.258258.3.
AP-05_02: Frigorífico Liebherr 7083 001 01; Nº de Serie: 83.529.060.7.

EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN LA CUALIFICACIÓN

Ensayo: Control de la temperatura.

Instrumento	Marca	Modelo	Nº de Serie
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040131 (AP-07_02)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040133 (AP-07_03)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040134 (AP-07_04)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040135 (AP-07_05)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	2101904019 (AP-07_06)

FECHA DE INICIO: 22/07/2019	**FECHA DE FIN: 17/08/2020**
VERIFICADO POR: NVM Fecha: **19/08/2020**	**ACEPTADO POR: SBP** Fecha: **21/08/2020**

CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

	FECHA DE INICIO: 22/07/2019		FECHA DE FIN: 22/07/2019		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Situar los Frigoríficos en su Ubicación, el Liebherr 7085 483 01 (AP-05_01) dentro de la Sala de Elaboración de Estériles y el Liebherr 7083 001 01 (AP-05_02) en el Almacén.	Los Frigoríficos no tienen daños y se ajustan al espacio asignado para ellos.	La inspección visual de los Frigoríficos indica que no tienen daños.	APTO	22/07/2019 NVM
2	Confirmar que los Frigoríficos se instalan de manera apropiada.	Los Frigoríficos se instalan y quedan listos para su uso. No hay sitios inaccesibles para su limpieza.	Los Frigoríficos se ajustan al espacio reservado y están instalados correctamente. No hay sitios inaccesibles para la limpieza.	APTO	22/07/2019 NVM
4	Confirmar que los Frigoríficos vienen acompañados de la documentación proporcionada por el proveedor.	El manual de instrucciones está disponible.	Los Frigoríficos disponen de las instrucciones y estas quedan archivadas.	APTO	22/07/2019 NVM
5	Confirmar que los sistemas electrónicos de control de los Frigoríficos están disponibles.	Los sistemas electrónicos de control de los Frigoríficos están a la vista y en un lugar accesible.	Los sistemas electrónicos de control de los Frigoríficos están en el lugar indicado en el diseño.	APTO	22/07/2019 NVM
6	Crear el PNT de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones de los Frigoríficos.	El PNT ha sido creado así como los Registros que este genera.	Se redactó y se aprobó el PNT PA05 de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones de los Frigoríficos.	APTO	08/08/2018 NVM

OBSERVACIONES:
Los frigoríficos ya estaban disponibles en la institución. Se comprueban los parámetros indicados simulando que se hubier comprado nuevos.

DESVIACIONES:
Ninguna.

RESULTADO:
Los frigoríficos quedan cualificados en instalación.

CUALIFICACIÓN OPERATIVA

FECHA DE INICIO: 02/09/2019			FECHA DE FIN: 02/09/2019		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Prueba del panel de control.**	**Los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.**	**La inspección visual de los diferentes dispositivos del panel de control indica que estos operan de la manera prevista.**	**APTO**	**02/09/2019 NVM**
2	**Verificación de la recuperación tras un fallo en el suministro eléctrico.**	**Tras un corte del suministro eléctrico los Frigoríficos vuelven a funcionar correctamente.**	**Tras un corte del suministro eléctrico el aparato recupera.**	**APTO**	**02/09/2019 NVM**
3	**Limpiar el Frigorífico de acuerdo a las instrucciones proporcionadas.**	**Los Frigoríficos se limpian adecuadamente.**	**La limpieza se realiza fácilmente.**	**APTO**	**02/09/2019 NVM**

OBSERVACIONES:
Los frigoríficos ya estaban disponibles en la institución. Se comprueban los parámetros indicados simulando que se hubier comprado nuevos.

DESVIACIONES:
Ninguna.

RESULTADO:
Los frigoríficos quedan cualificados en operación.

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL

FECHA DE INICIO: 03/09/2019			FECHA DE FIN: 17/08/2020		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Realizar una monitorización diaria de la temperatura de los Frigoríficos situando un termómetro con sonda debidamente calibrado durante cinco días consecutivos en cada balda de cada Frigorífico, anotando la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada.**	**La monitorización de la temperatura realizada (en funcionamiento) no excede de los límites de acción.**	**Se sitúa el *Data Logger* AP-07_02 en el Frigorífico AP-05_01 y el *Data Logger* AP-07_03 en el Frigorífico AP-05_02. Los valores de temperatura detectados están dentro de los límites de alerta, pero nunca sobrepasan los de acción.**	**APTO**	**16/09/2019-25/10/2019 (AP-05_01) NVM** **03/09/2019-04/10/2019 (AP-05_02) NVM**
2	**Realizar una monitorización diaria de la temperatura de los Frigoríficos situando un termómetro con sonda debidamente calibrado en cada balda durante una semana, anotando la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada descargando el pdf semanal.**	**La monitorización de la temperatura realizada (en funcionamiento) no excede de los límites de acción.**	**Se sitúa el *Data Logger* AP-07_02, en la balda 1, el AP-07_04, en la balda 2, el AP-07_05, en la balda 3, y el AP-07_06, en la balda 4_suelo, del Frigorífico Liebherr 7085 483 01 (AP-05_01) y el *Data Logger* AP-07_03, en la balda 1, el AP-07_04, en la balda 2, el AP-07_05, en la balda3, y el AP-07_06, en la balda 4_suelo, del Frigorífico Liebherr 7083 001 01 (AP-05_02). Los valores de temperatura detectados están dentro de los límites de alerta, pero nunca sobrepasan los de acción.**	**APTO**	**10/08/2020-17/08/2020 (AP-05_01) NVM** **13/07/2020-20/07/2020 (AP-05_02) NVM**

OBSERVACIONES:
Los Frigoríficos ya estaban disponibles en la institución. Se comprueban los parámetros indicados simulando que se

hubieran comprado nuevos.

DESVIACIONES:

Ninguna.

RESULTADO:

Los Frigoríficos quedan cualificados en funcionamiento dado que los resultados obtenidos están dentro de los límites establecidos.

CONCLUSIONES:

Se han cumplido todos los criterios de aceptación. Los frigoríficos quedan cualificados.

ANEXO I. LÍMITES PERMITIDOS PARA LA CUALIFICACIÓN DEL EQUIPO

	ALERTA	ACCIÓN
Temperatura de los Frigoríficos	< 2 °C o > 8 °C	< 0 °C o > 10 °C

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL AP-05_01

Balda: 1		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
03/09/2019	5,7	5,8	6,7
04/09/2019	5	5,1	6,8
05/09/2019	4,7	5,9	6,8
06/09/2019	4,7	5,9	6,8
07/09/2019	4,7	5,1	6,8
Balda: 2		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
10/09/2019	4,1	5,7	5,8
11/09/2019	3,8	3,8	5,8
12/09/2019	3,8	4,9	5,8
13/09/2019	3,6	3,7	5,8
14/09/2019	2,4	3,3	6,8
Balda: 3		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
23/09/2019	2,4	3,9	5,8
24/09/2019	2,4	3,8	6,6
25/09/2019	2,4	4,1	6,6
26/09/2019	2,4	4,1	6,6
27/09/2019	2,4	4,0	6,6
Balda: 4_Suelo		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
30/09/2019	2,4	6,6	7,6
01/10/2019	2,4	6,7	7,6
02/10/2019	6,7	6,7	8,6
03/10/2019	6,7	7	8,7
04/10/2019	6,8	7	8,7

Observaciones:

Ninguna.

Fecha: 11/08/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,8	5,3	7,4
2	3,3	3,8	7,5
3	2,6	4,9	8,8
4_Suelo	6,8	7,3	10,2
Fecha: 12/08/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,8	5,4	7,4
2	2,1	4,4	8,8
3	3,3	4,4	7,5
4_Suelo	6,8	7,7	10,2
Fecha: 13/08/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,8	5,3	7,4
2	2,1	4,9	8,8
3	2,4	4,2	7,5
4_Suelo	6,8	7,5	10,2
Fecha: 14/08/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,8	5	7,4
2	2,1	4,9	8,8
3	2,2	4,5	7,5
4	6,8	7,1	10,2
Fecha: 17/08/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,8	5,2	7,4
2	2,1	4,9	8,8
3	2,2	4,6	7,5
4_Suelo	6,8	7,5	10,2
Observaciones: Solo la balda 4 (que es el suelo de la nevera, donde nunca se almacenan productos) está ligeramente por encima del límite de temperatura.			

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL AP-05_02			
Balda: 1		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
16/09/2019	4	4,2	8
17/09/2019	4	4,3	8
18/09/2019	4	7,8	8
19/09/2019	4	4,3	8
20/09/2019	4	4,3	9,5
Balda: 2		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
23/09/2019	3,2	3,5	9,5
24/09/2019	3,2	3,3	9,5
25/09/2019	3,2	3,3	9,5
26/09/2019	3,2	3,6	9,5
27/09/2019	3,2	3,6	9,5
Balda: 3		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
30/09/2019	1,5	2	9,5
01/10/2019	1,2	3,5	9,5
02/10/2019	1,2	2.2	7
03/10/2019	1,2	2,7	7
04/10/2019	1,2	2,7	7
Balda: 4_Suelo		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
21/10/2019	3,7	4,2	7
22/10/2019	3,7	5,6	7
23/10/2019	3,7	4,2	7,2
24/10/2019	3,7	4,3	7,2
25/10/2019	3,7	4,3	7,1
Observaciones: Ninguna.			
Fecha: 14/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,7	4	7,4
2	3,6	3,9	7,5
3	2,1	4,1	7
4_Suelo	4,8	5,1	9,8
Fecha: 15/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,7	3,9	7,9
2	3,6	4,0	8,1
3	2,1	3,7	7,7
4_Suelo	4,5	5,4	9,8
Fecha: 16/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,7	3,8	7,9
2	3,6	3,7	8,1

3	2,1	3,2	7,7
4_Suelo	4,5	4,7	9,8
Fecha: 17/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,7	3,8	9
2	3,6	3,8	8,9
3	2,1	2,7	7,7
4_Suelo	4,5	4,5	9,8
Fecha: 20/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	3,7	4	9,3
2	3,6	3,9	9,2
3	2,3	3,3	7,7
4_Suelo	4,4	4,8	9,8
Observaciones: Ninguna.			

TABLA 16: Informe de cualificación de las estufas Memmert® UNB 500 y Prodintec®

Hoja de registro: Informe de Cualificación de las Estufas

Memmert UNB 500 (AP-08_01) y Prodintec (AP-08_02)

Impreso 1/UTA/R1/PCA08/02

EQUIPO CUALIFICADO: Estufas Memmert UNB 500 (AP-08_01) y Prodintec (AP-08_02).

DESCRIPCIÓN: se trata de dos Estufas que se emplean para incubar las placas y medios de cultivo microbiológicos, las cuales tienen unas dimensiones de 560 (ancho) x 400 (profundo) x 480 (alto)
(AP-08_01: 2 baldas) y de 185 (ancho) x 130 (profundo) x 100 (alto) (AP-05_02: 1 sólo habitáculo).

AP-08_01: Estufa Memmert UNB 500; Nº de Serie: 100-800.
AP-08_02: Estufa Prodintec; Nº de Serie: PR1539.

EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN LA CUALIFICACIÓN

Ensayo: Control de la temperatura.

Instrumento	Marca	Modelo	Nº de Serie
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040133 (AP-07_03)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040134 (AP-07_04)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	21019040135 (AP-07_05)
Data Logger	*Data Logger* LOG200	LOG200	2101904019 (AP-07_06)

FECHA DE INICIO: 22/07/2019	**FECHA DE FIN: 27/07/2020**
VERIFICADO POR: NVM **Fecha: 03/08/2020**	**ACEPTADO POR: SBP** **Fecha: 05/08/2020**

CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

FECHA DE INICIO: 22/07/2019			FECHA DE FIN: 22/07/2019		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	**Situar las Estufas en su ubicación dentro de la Sala de Farmacotecnia de Elaboración de no Estériles.**	**Las Estufas no tienen daños y se ajustan al espacio asignado para ellos.**	**La inspección visual de las Estufas indica que no tienen daños.**	**APTO**	**22/07/2019 NVM**
2	**Confirmar que las Estufas se instalan de manera apropiada.**	**Las Estufas se instalan y quedan listas para su uso. No hay sitios inaccesibles para su limpieza.**	**Las Estufas se ajustan al espacio reservado y están instaladas correctamente. No hay sitios inaccesibles para la limpieza.**	**APTO**	**22/07/2019 NVM**
4	**Confirmar que las Estufas vienen acompañadas de la documentación proporcionada por el proveedor.**	**El manual de instrucciones está disponible.**	**Las Estufas disponen de las instrucciones y estas quedan archivadas.**	**APTO**	**22/07/2019 NVM**
5	**Confirmar que los sistemas electrónicos de control de las Estufas están disponibles.**	**Los sistemas electrónicos de control de las Estufas están a la vista y en un lugar accesible.**	**Los sistemas electrónicos de control de las Estufas están en el lugar indicado en el diseño.**	**APTO**	**22/07/2019 NVM**

6	Crear el PNT de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones de las Estufas.	El PNT ha sido creado así como los Registros que este genera.	Se redactó y se aprobó el PNT PA08 de Funcionamiento, Mantenimiento, Limpieza y Reparaciones de las Estufas.	APTO	10/08/2018 NVM
OBSERVACIONES: Las estufas ya estaban disponibles en la institución. Se comprueba los parámetros indicados simulando que se hubieran compra nuevas.					
DESVIACIONES: Ninguna.					
RESULTADO: Las estufas quedan cualificadas en instalación.					
CUALIFICACIÓN OPERATIVA					
FECHA DE INICIO: 02/09/2019			**FECHA DE FIN: 02/09/2019**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Prueba del panel de control.	Los distintos dispositivos del panel de control funcionan de manera correcta.	La inspección visual de los diferentes dispositivos del panel de control indica que estos operan de la manera prevista.	APTO	02/09/2019 NVM
2	Verificación de la recuperación tras un fallo en el suministro eléctrico.	Tras un corte del suministro eléctrico las Estufas vuelven a funcionar correctamente.	Tras un corte del suministro eléctrico el aparato recupera.	APTO	02/09/2019 NVM
3	Limpiar las Estufas de acuerdo a las instrucciones proporcionadas.	Las Estufas se limpian adecuadamente.	La limpieza se realiza fácilmente.	APTO	02/09/2019 NVM
OBSERVACIONES: Las estufas ya estaban disponibles en la institución. Se comprueba los parámetros indicados simulando que se hubieran compra nuevas.					
DESVIACIONES: Ninguna.					
RESULTADO: Las estufas quedan cualificadas en operación.					
CUALIFICACIÓN FUNCIONAL					
FECHA DE INICIO: 16/09/2019			**FECHA DE FIN: 27/07/2020**		
Nº	**DESCRIPCIÓN**	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	**RESULTADOS**	**APTO/NO APTO**	**FIRMA Y FECHA**
1	Realizar una monitorización diaria de la temperatura de las Estufas situando un termómetro con sonda debidamente calibrado durante cinco días consecutivos, en cada balda de la Estufa Memmert UNB 500 (AP-08_01), o a la izquierda y la derecha del habitáculo de la Estufa Prodintec (AP-08_02), anotando la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada.	La monitorización de la temperatura realizada (en funcionamiento) no excede de los límites de acción.	Se monitoriza las temperaturas de las Estufas, situando el *Data Logger* AP-07_05 en la Estufa Memmert UNB 500 (AP-08_01) y el *Data Logger* AP-07_04 en la Estufa Prodintec (AP-08_02). Los valores de temperatura detectados están dentro de los límites de alerta, pero nunca sobrepasan los de acción.	APTO	16/09/2019-27/09/2019 (AP-08_01) NVM 16/09/2019-27/09/2019 (AP-08_02) NVM
2	Realizar una monitorización diaria de la temperatura de las Estufas	La monitorización de la temperatura realizada (en funcionamiento) no excede de los límites de acción.	Se monitoriza las temperaturas de las Estufas, situando el *Data Logger* AP-07_03, en la balda 1, y el *Data*	APTO	20/07/2020-27/07/2020 (AP-08_01) NVM

	situando un termómetro con sonda debidamente calibrado en cada balda de la Estufa Memmert UNB 500 (AP-08_01) o a la izquierda y a la derecha del habitáculo de la Estufa Prodintec (AP-08_02) durante una semana, anotando la temperatura actual, la máxima y la mínima alcanzada descargando el pdf semanal.		***Logger* AP-07_04, en la balda 2, de la Estufa Memmert UNB 500 (AP-08_01) y el *Data Logger* AP-07_05, a la izquierda, y el *Data Logger* AP-07_06, a la derecha, del habitáculo de la Estufa Prodintec (AP-08_02). Los valores de temperatura detectados están dentro de los límites de alerta, pero nunca sobrepasan los de acción.**		**20/07/2020-27/07/2020 (AP-08_02) NVM**

OBSERVACIONES:
Las estufas ya estaban disponibles en la institución. Se comprueba los parámetros indicados simulando que se hubieran comprado nuevas.

DESVIACIONES: Ninguna.

RESULTADO:
La estufas quedan cualificadas en funcionamiento dado que los resultados obtenidos entán dentro de los límites establecidos.

CONCLUSIONES: Se han cumplido todos los criterios de aceptación.
Las estufas quedan cualificadas.

ANEXO I. LÍMITES PERMITIDOS PARA LA CUALIFICACIÓN DEL EQUIPO

	ALERTA	**ACCIÓN**
Temperatura de la Estufa Prodintec	< 22 °C o > 26 °C	<20 °C o > 28 °C
Temperatura de la Estufa Memmert	< 32 °C o > 36 °C	<30 °C o > 38 °C

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL AP-08_01

Balda: 1		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
16/09/2019	34,9	35,9	37,5
17/09/2019	34,9	36	37,5
18/09/2019	34,8	36,1	37,5
19/09/2019	34,8	36	37,5
20/09/2019	34,8	36,6	37,5
Balda: 2		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
23/09/2019	34,8	36,1	37,7
24/09/2019	34,8	36,1	37,7
25/09/2019	34,8	36,5	37,7
26/09/2019	34,8	36,1	37,7
27/09/2019	34,8	36,3	37,7

Observaciones: Ninguna.

Fecha: 21/07/2020		Realizado por: NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	34,8	36,1	36,3
2	36,2	37,1	37,4
Fecha: 22/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	34,6	36,3	36,3
2	36,1	37,2	37,4
Fecha: 23/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	34,6	36,1	36,3
2	36,1	37,1	37,4
Fecha: 24/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	34,6	36,1	36,3
2	35,9	37,2	37,4
Fecha: 27/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Balda	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
1	34,6	36,2	36,3
2	35,9	37,2	37,4
Observaciones: Ninguna.			

ANEXO II. PRUEBAS REALIZADAS

CUALIFICACIÓN FUNCIONAL AP-08_02

Balda: Izquierda		Realizado por: NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
16/09/2019	25,8	26,2	27,4
17/09/2019	25,8	26,2	27,4
18/09/2019	25,8	26,9	27,4
19/09/2019	25,8	26,9	27,4
20/09/2019	25,7	26,9	27,4
Balda: Derecha		**Realizado por:** NVM	
Fecha	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
23/09/2019	25,7	25,9	27,4
24/09/2019	25,8	26,5	27,3
25/09/2019	25,8	25,9	26,7
26/09/2019	25,7	25,9	26.2
27/09/2019	25,7	26,4	26,7
Observaciones: Ninguna.			
Fecha: 21/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Localización	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
Izquierda	25	25,6	25,6
Derecha	25,5	25,6	25,7
Fecha: 22/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Localización	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
Izquierda	25,6	25,6	25,7
Derecha	25,5	25,6	25,7
Fecha: 23/07/2020		**Realizado por:** NVM	

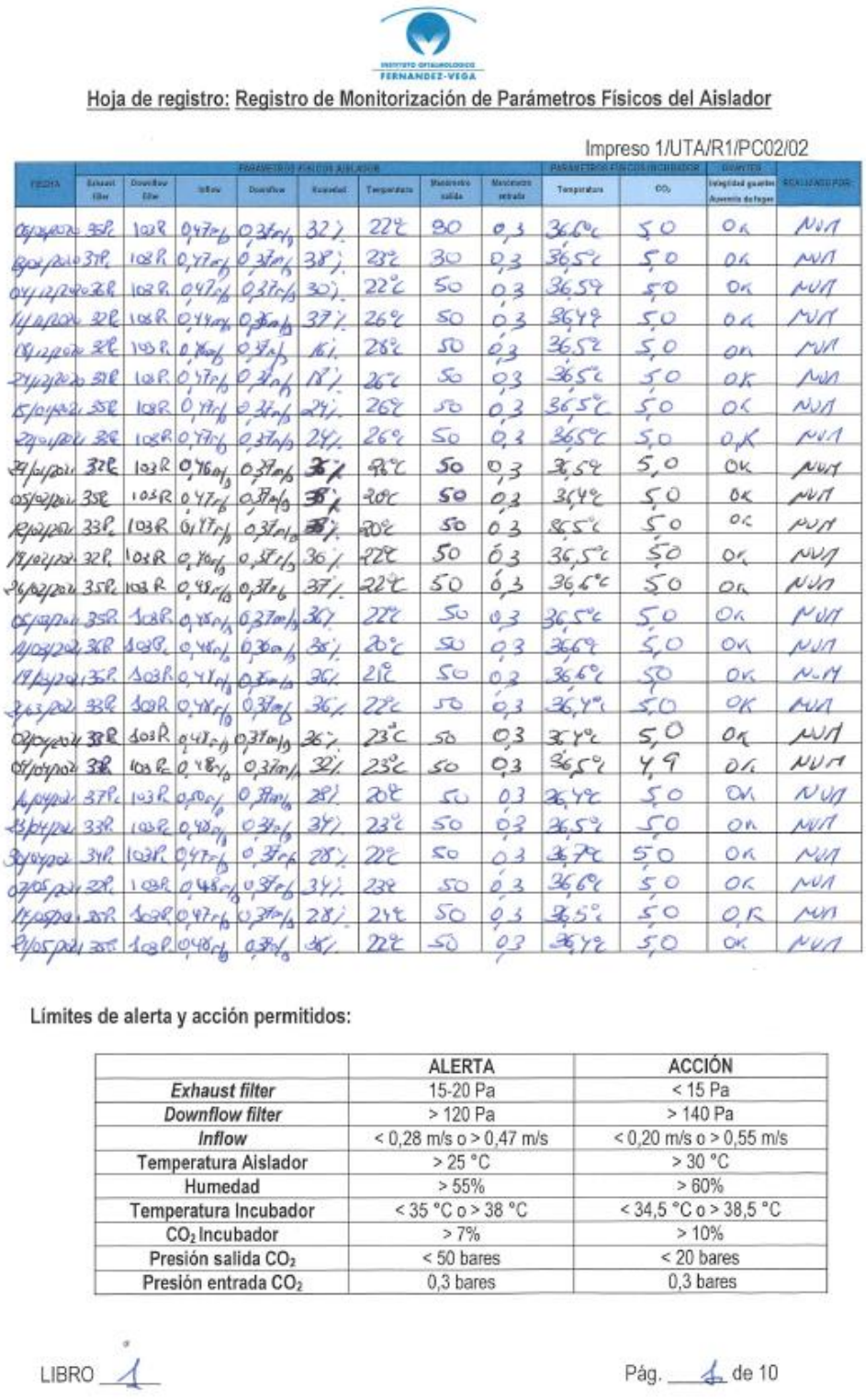
Localización	Mínima (°C)	Actual (°C)	Máxima (°C)
Izquierda	25,6	25,7	25,7
Derecha	25,5	25,7	25,7
Fecha: 24/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Localización	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
Izquierda	25,6	25,6	25,7
Derecha	25,5	25,6	25,8
Fecha: 27/07/2020		**Realizado por:** NVM	
Localización	**Mínima (°C)**	**Actual (°C)**	**Máxima (°C)**
Izquierda	25,5	25,7	25,7
Derecha	25,5	25,7	25,7
Observaciones: Ninguna.			

Tras las cualificaciones iniciales, las posteriores recualificaciones anuales fueron realizadas por una empresa externa debidamente acreditada, quien además calibró la centrífuga, las sondas de temperatura y CO_2 del incubador, así como el resto de aparatos, quedando registrada dicha evaluación en los registros de mantenimiento y reparaciones de los mismos.

2.3. MONITORIZACIÓN AMBIENTAL

2.3.1. MONITORIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

Los resultados recogidos durante las monitorizaciones de los parámetros físicos se encontraron dentro de los límites permitidos y no superaron ni alcanzaron niveles de alerta ni acción. Se muestran los resultados obtenidos de una de las hojas de registro de los parámetros físicos del aislador en la Figura 19.



INSTITUTO OFTALMOLÓGICO FERNÁNDEZ-VEGA

Hoja de registro: Registro de Monitorización de Parámetros Físicos del Aislador

Impreso 1/UTA/R1/PC02/02

FECHA	PARÁMETROS FÍSICOS AISLADOR								PARÁMETROS FÍSICOS INCUBADOR		OBSERVACIONES	REALIZADO POR:
	Exhaust filter	Downflow filter	Inflow	Downflow	Humedad	Temperatura	Manómetro salida	Manómetro entrada	Temperatura	CO_2	Integridad guantes Apuesta de fuga	
05/2/2021	35P.	102R	0,47m/s	0,36m/s	32%	22°C	80	0,3	36,6°C	5,0	OK	NVA
8/02/2021	37P.	102R	0,47m/s	0,37m/s	38%	23°C	30	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
04/12/2020	38P.	102R.	0,47m/s	0,37m/s	30%	22°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
11/2/2021	32P.	102R	0,44m/s	0,36m/s	37%	26°C	50	0,3	36,4°C	5,0	OK	NVA
15/12/2020	32P.	102R.	0,46m/s	0,37m/s	16%	28°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
29/12/2020	31P.	102R.	0,47m/s	0,37m/s	18%	26°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
5/01/2021	35P.	102R.	0,47m/s	0,37m/s	24%	26°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
22/01/2021	35P.	102R.	0,47m/s	0,37m/s	24%	26°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
29/01/2021	32P.	103R	0,46m/s	0,37m/s	36%	23°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
05/02/2021	35P.	103R	0,47m/s	0,37m/s	38%	20°C	50	0,3	36,4°C	5,0	OK	NVA
12/02/2021	33P.	103R	0,47m/s	0,37m/s	36%	20°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
19/02/2021	32P.	103R	0,46m/s	0,37m/s	36%	22°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
26/02/2021	35P.	103R	0,48m/s	0,37m/s	37%	22°C	50	0,3	36,6°C	5,0	OK	NVA
05/03/2021	35P.	103R.	0,48m/s	0,37m/s	36%	22°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
12/03/2021	36P.	103R.	0,48m/s	0,36m/s	35%	20°C	50	0,3	36,6°C	5,0	OK	NVA
19/3/2021	35P.	103R.	0,47m/s	0,36m/s	36%	21°C	50	0,3	36,6°C	5,0	OK	N.V.A
26/3/2021	35P.	103R.	0,48m/s	0,37m/s	36%	22°C	50	0,3	36,4°C	5,0	OK	NVA
02/04/2021	38P.	103R.	0,47m/s	0,37m/s	36%	23°C	50	0,3	36,4°C	5,0	OK	NVA
09/04/2021	38P.	103P.	0,48m/s	0,37m/s	32%	23°C	50	0,3	36,5°C	4,9	OK	NVA
16/04/2021	37P.	103R.	0,50m/s	0,37m/s	28%	20°C	50	0,3	36,4°C	5,0	OK	NVA
23/04/2021	33P.	103P.	0,48m/s	0,37m/s	34%	23°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
30/04/2021	34P.	103R.	0,47m/s	0,37m/s	28%	22°C	50	0,3	36,7°C	5,0	OK	NVA
07/05/2021	32P.	103R.	0,48m/s	0,37m/s	34%	23°C	50	0,3	36,6°C	5,0	OK	NVA
14/05/2021	30P.	103P.	0,47m/s	0,37m/s	28%	21°C	50	0,3	36,5°C	5,0	OK	NVA
21/05/2021	35P.	103P.	0,48m/s	0,37m/s	36%	22°C	50	0,3	36,4°C	5,0	OK	NVA

Límites de alerta y acción permitidos:

	ALERTA	ACCIÓN
Exhaust filter	15-20 Pa	< 15 Pa
Downflow filter	> 120 Pa	> 140 Pa
Inflow	< 0,28 m/s o > 0,47 m/s	< 0,20 m/s o > 0,55 m/s
Temperatura Aislador	> 25 °C	> 30 °C
Humedad	> 55%	> 60%
Temperatura Incubador	< 35 °C o > 38 °C	< 34,5 °C o > 38,5 °C
CO_2 Incubador	> 7%	> 10%
Presión salida CO_2	< 50 bares	< 20 bares
Presión entrada CO_2	0,3 bares	0,3 bares

LIBRO 1 Pág. 1 de 10

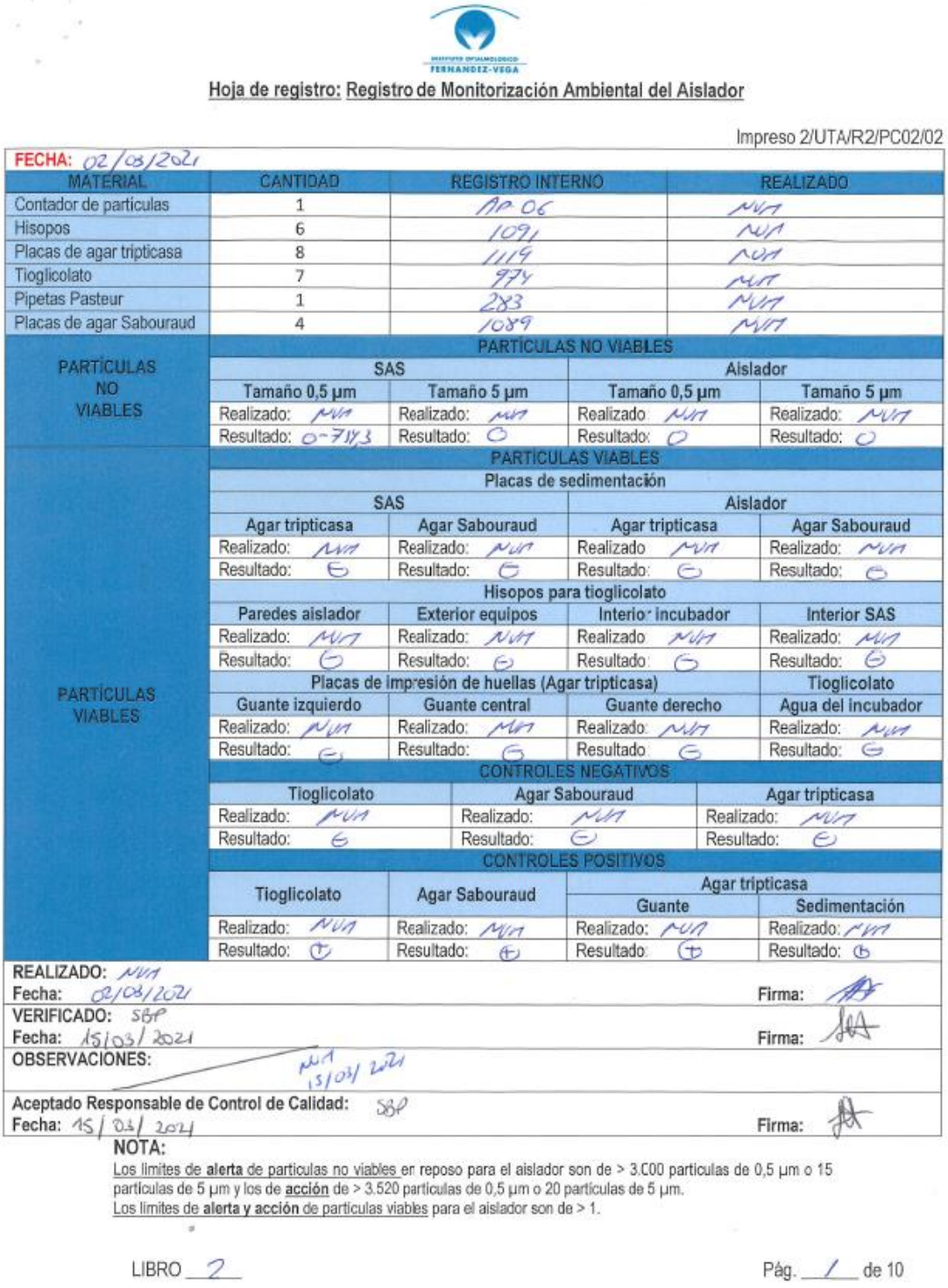
FIGURA 19: Resultados de la monitorización de los parámetros físicos del aislador

2.3.2. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS NO VIABLES

La medida del número de partículas no viables de 0,5 µm y de 5 µm por m^3, tanto del aislador como del SAS, en condiciones de reposo y en producción, se mantuvieron dentro de los límites permitidos, quedando registrados los resultados en los registros de monitorización ambiental del aislador y en las diferentes guías de fabricación, respectivamente. Además, la monitorización de partículas no viables de la sala de elaboración de estériles, realizada por una empresa externa, se mantuvo dentro de los límites permitidos para una sala clase C. En la Figura 20 se muestran los resultados recopilados en una de las hojas de registro de la monitorización de partículas no viables.

2.3.3. MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS VIABLES

No se encontró crecimiento microbiano en la monitorización realizada con muestras pasivas, muestras de superficies, inoculación, e impronta de huellas, en los momentos críticos del proceso de producción del MTA, en las monitorizaciones realizadas entre lotes de fabricación o en su defecto, en las realizadas una vez al mes en ausencia de producción. Los controles microbiológicos internos quedaron registrados en las correspondientes guías de fabricación y en los registros de monitorización ambiental del aislador, respectivamente. Del mismo modo, no se observó crecimiento microbiológico en los controles ambientales realizados por una empresa externa, quedando el informe emitido archivado. En la Figura 20 se muestran los resultados de una de las hojas de registro de la monitorización de partículas viables.



FERNANDEZ-VEGA

Hoja de registro: Registro de Monitorización Ambiental del Aislador

Impreso 2/UTA/R2/PC02/02

FECHA: 02/03/2021

MATERIAL	CANTIDAD	REGISTRO INTERNO	REALIZADO
Contador de partículas	1	AP 06	N/A
Hisopos	6	1091	N/A
Placas de agar tripticasa	8	1119	N/A
Tioglicolato	7	974	N/A
Pipetas Pasteur	1	283	N/A
Placas de agar Sabouraud	4	1089	N/A

PARTÍCULAS NO VIABLES

PARTÍCULAS NO VIABLES	SAS		Aislador	
	Tamaño 0,5 µm	Tamaño 5 µm	Tamaño 0,5 µm	Tamaño 5 µm
	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A
	Resultado: 0-7143	Resultado: 0	Resultado: 0	Resultado: 0

PARTÍCULAS VIABLES

Placas de sedimentación

	SAS		Aislador	
	Agar tripticasa	Agar Sabouraud	Agar tripticasa	Agar Sabouraud
	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A
	Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)

Hisopos para tioglicolato

	Paredes aislador	Exterior equipos	Interior incubador	Interior SAS
	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A
	Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)

	Placas de impresión de huellas (Agar tripticasa)			Tioglicolato
	Guante izquierdo	Guante central	Guante derecho	Agua del incubador
	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A
	Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)

CONTROLES NEGATIVOS

Tioglicolato	Agar Sabouraud	Agar tripticasa
Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A
Resultado: (-)	Resultado: (-)	Resultado: (-)

CONTROLES POSITIVOS

	Tioglicolato	Agar Sabouraud	Agar tripticasa	
			Guante	Sedimentación
	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A	Realizado: N/A
	Resultado: (+)	Resultado: (+)	Resultado: (+)	Resultado: (+)

REALIZADO: N/A
Fecha: 02/03/2021 Firma:

VERIFICADO: SBP
Fecha: 15/03/2021 Firma:

OBSERVACIONES: N/A 15/03/2021

Aceptado Responsable de Control de Calidad: SBP
Fecha: 15/03/2021 Firma:

NOTA:
Los límites de **alerta** de partículas no viables en reposo para el aislador son de > 3.000 partículas de 0,5 µm o 15 partículas de 5 µm y los de **acción** de > 3.520 partículas de 0,5 µm o 20 partículas de 5 µm.
Los límites de **alerta y acción** de partículas viables para el aislador son de > 1.

LIBRO 2 Pág. 1 de 10

FIGURA 20: Resultados de la monitorización de partículas viables y no viables del aislador

Capítulo 2

Capítulo 2: Desarrollo de un sistema de calidad farmacéutico adaptado a la unidad de producción de terapias avanzadas

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. MANUAL DE CALIDAD

Se redactó un manual de calidad, que resume el sistema de calidad farmacéutico desarrollado. El manual de calidad redactado incluye la política de calidad, la estructura organizativa y una breve explicación de cada uno de los requisitos de la parte IV de la Guía de las NCF, que se desarrollaran en detalle a lo largo de este capítulo.

1.2. MANUAL DE RIESGOS. EVALUACIÓN DEL RIESGO DURANTE LA PRODUCCIÓN

Se redactó un manual de riesgos, para definir las etapas críticas del procedimiento de producción del MTA. Para ello, se realizó un diagrama de flujo del procedimiento, y se realizó una tormenta de ideas (*brainstorming*), en la que se buscó definir los riesgos con el objetivo de reducirlos, estableciendo, en caso de ser necesario, los procesos que mitigaran o evitaran cualquier riesgo, cuando este excediera de un nivel aceptable específico (Figura 21).

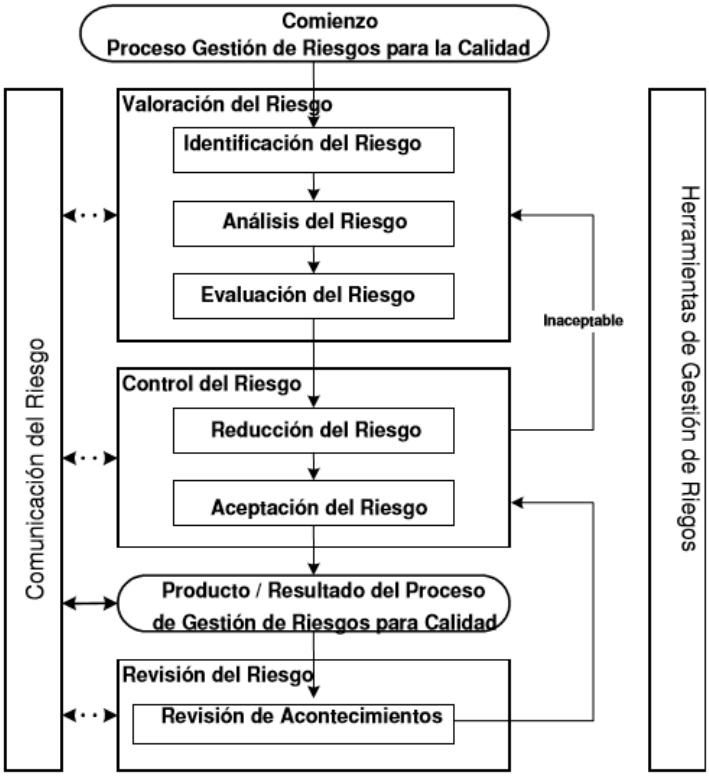


FIGURA 21: Visión general de un proceso de gestión de un riesgo para la calidad (74)

Para definir los riesgos del procedimiento, con el objeto de valorarlos, se dio respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿Qué podría ir mal?
2. ¿Qué probabilidad hay de que eso vaya mal?
3. ¿Cuáles son las consecuencias (gravedad)?

Una vez definidos los riesgos, se estableció el control de los mismos evaluando si estaban por encima de un nivel aceptable, valorando qué se puede hacer para reducir o eliminarlos, y comprobando que no se introdujeran nuevos riesgos al controlar los riesgos identificados.

Se desarrolló un APPCC, en el que, para cada etapa del proceso de fabricación del MTA, se identificaron todos los peligros haciendo un listado de los peligros potenciales, ya fueran naturaleza física, química y/o microbiológica, de acuerdo a:

- Peligros físicos: causados por la presencia de agentes externos al producto.

- Peligros químicos: son los que resultan de un mal tratamiento de las materias primas, descuidos durante el proceso (desde el exceso de materia prima hasta una contaminación cruzada por una inadecuada limpieza).
- Peligros biológicos: consisten en la presencia de agentes patógenos en el producto final o en productos intermedios, causantes de enfermedades y que puede ser debido a contaminación ambiental pudiendo contaminar el MTA en cualquiera de las fases de su proceso de producción.

El análisis de los peligros se centró en los 6 factores principales que afectan o intervienen en la búsqueda de la excelencia en la calidad y que deben ser tenidos en cuenta: el ambiente, las personas, las materias primas, los equipos, los sistemas de monitorización, y los métodos y procedimientos (Figura 3), y consistió en una primera etapa de identificación y una segunda etapa de evaluación de los mismos, teniendo en cuenta su gravedad y la probabilidad de que ocurrieran, haciendo uso de una matriz de doble entrada (Figura 22).

		Probabilidad		
		Alta	Media	Baja
Gravedad	Alta	Riesgo intolerable	Riesgo importante	Riesgo moderado
	Media	Riesgo importante	Riesgo moderado	Riesgo tolerable
	Baja	Riesgo moderado	Riesgo tolerable	Riesgo trivial

FIGURA 22: Clasificación del peligro en función de la probabilidad y la gravedad

Los peligros, que tras su clasificación se consideraron intolerables o importantes, se identificaron como PCC, mientras que los peligros de clasificación moderada, se sometieron al árbol de decisiones para determinar si eran PCC (Figura 23).

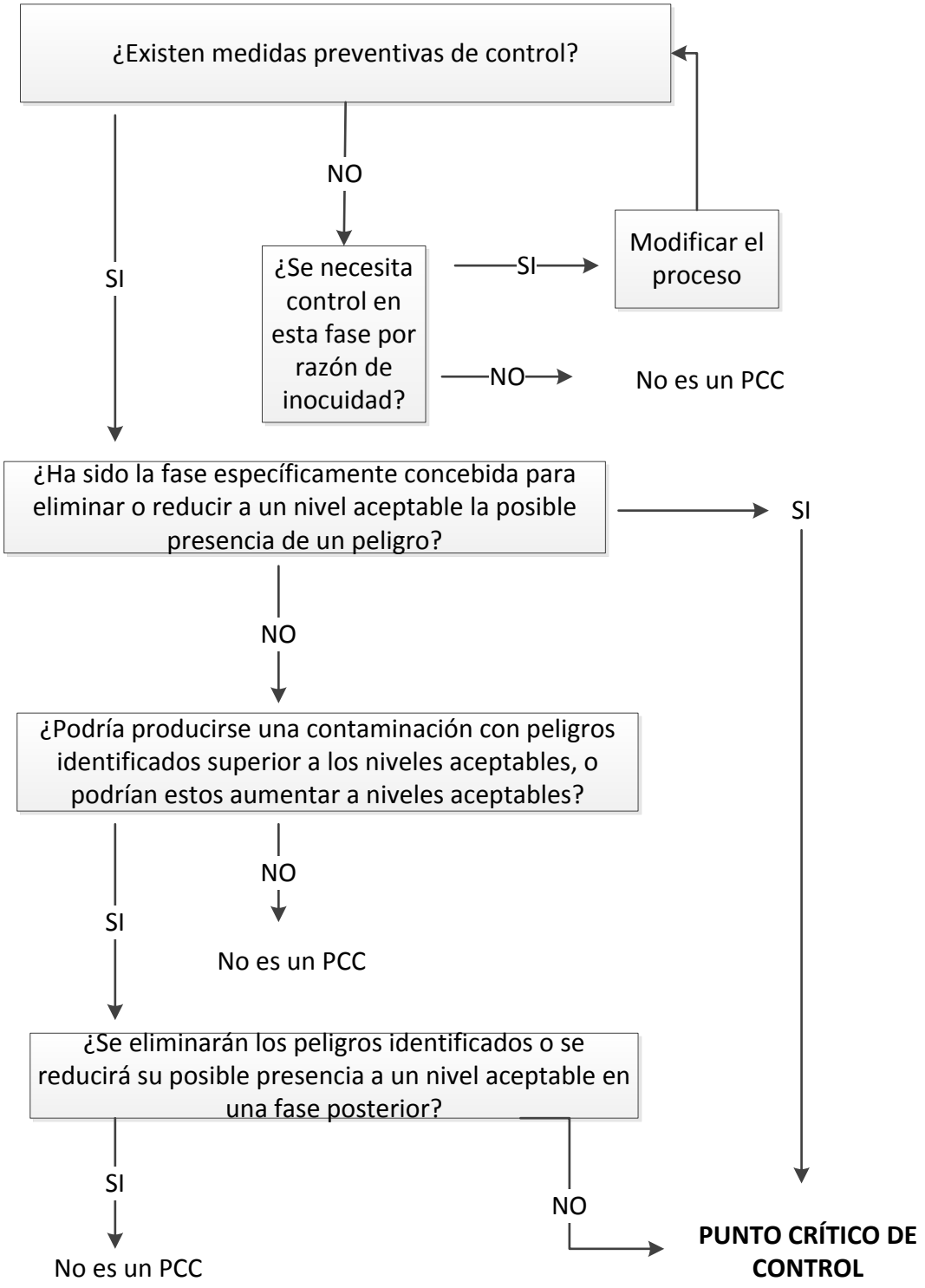


FIGURA 23: Árbol de decisiones para determinar un punto crítico de control. PCC: Puntos Críticos de Control

Para concluir, se definieron los límites críticos entre lo aceptable y lo inaceptable para cada PCC, así como los procedimientos de monitorización diseñados, para establecer si éstos se encontraban dentro o fuera de control.

1.3. REDACCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS GENERALES DE GARANTÍA DE CALIDAD Y REGISTROS

Se redactó toda la documentación que sustenta al sistema de calidad, clasificándola en:

1. Procedimientos: documentación donde se detalla cualquier acción realizada en la producción del MTA.
2. Registros e informes: documentación que se genera a partir de los PNTs.

Para ello, se redactaron todos los PNTs necesarios para establecer, controlar, monitorizar y registrar todas las actividades que de forma directa o indirecta podían afectar a la calidad del producto final, asegurando, con los registros que cada PNT generaba, su trazabilidad y el cumplimiento de las NCF.

Se redactaron 6 grupos de PNTs según la operación que describían:

- PNTs generales: para definir las operaciones y actividades generales relativas a la producción.
- PNTs de control: para describir las operaciones de control medioambiental y control de calidad de producto terminado.
- PNTs de producción: para detallar las operaciones directamente relacionadas con el proceso de producción.
- PNTs de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de aparatos: para definir las operaciones relacionadas con cada aparato.
- PNTs de cualificación: para describir las operaciones de cualificación necesarias para demostrar que los aparatos cumplen con las instrucciones de fábrica y con las NCF.
- PNTs de validación: para describir las operaciones y procesos que deben ser validados para generar una evidencia documentada de que los procesos cumplen con las especificaciones y características definidas.

Todos ellos tienen el mismo formato, y constan, como mínimo, de los siguientes apartados: el objetivo del procedimiento, los responsables de cumplir con el procedimiento, la descripción del procedimiento, la bibliografía y los registros que genera, así como la información que se considera de interés.

Toda la documentación redactada, fue de lectura obligatoria para todo el personal que la iba a aplicar, y junto con la documentación generada, se encuentra archivada en formato papel, existiendo una copia en formato electrónico, que se encuentra guardada en el archivo electrónico del servidor del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, para proteger la documentación contra los daños o la perdida accidental, durante los 30 años que tiene que ser archivada.

Finalmente, se estableció que toda la documentación redactada, sería revisada, cuando se produjera una modificación sustancial o como máximo cada tres años, quedando documentada dicha revisión.

1.4. NO CONFORMIDADES Y GESTIÓN DE ACCIONES CORRECTIVAS Y PREVENTIVAS

Se redactaron los PNTs de no conformidades y de gestión de CAPA, para gestionar las no conformidades que pudieran afectar a la calidad del MTA.

Se definieron las acciones correctivas y preventivas y los objetivos de las mismas, así como los pasos a seguir cuando se detecta una no conformidad.

En el PNT de no conformidades se estableció, que cualquier desviación o incumplimiento respecto a los requisitos y límites especificados en la documentación, originaría un informe de no conformidad. A su vez, se estableció que cualquier persona que detectará una incidencia (suceso que no afecta a un parámetro operacional de fabricación o de la calidad del MTA, y que no contradice algún requisito o instrucción contemplada en algún PNT), debería documentarla en su correspondiente registro, siendo la incidencia estudiada y decidiéndose la idoneidad de la apertura de una no conformidad posteriormente.

En los casos en los que se produjo un informe de no conformidad, se analizó la causa, y se estudió la posibilidad de llevar a cabo acciones inmediatas para subsanarla, definiéndose los plazos de subsanación, los responsables de realizarla, y si era necesario o no generar acciones correctivas (para eliminar la causa de una no conformidad detectada), o acciones preventivas (para eliminar la causa de una potencial no conformidad), de acuerdo a la sistemática de actuación descrita en el PNT de gestión de CAPA.

Se estableció una periodicidad anual para la revisión de las acciones preventivas y correctivas, por los responsables de calidad, de producción y la persona cualificada, para la evaluación del riesgo en los diferentes puntos de la producción.

1.5. DISEÑO DE UN PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN

Se redactó un PMV, en el que se definió el ámbito de aplicación y el alcance de las cualificaciones y validaciones a realizar, con el fin de documentar, de acuerdo a las NCF, que cualquier proceso obtenía los resultados previstos, o que cualquier equipo funcionaba de la manera esperada.

Para ello, se redactaron los procedimientos, y registros que estos generaban, para llevar a cabo la cualificación de los equipos y la validación de los procesos definidos en el PMV, distinguiéndose dos tipos de procedimientos: Procedimientos de Cualificación de Aparatos (PCA) y Procedimientos de Validación de Procesos (PV), en los que se describieron las operaciones a realizar, los límites establecidos, y los criterios de aceptación. Estos procedimientos generaron un informe de la cualificación o de la validación realizada, el cual incluía un resumen de los resultados y las conclusiones obtenidas y, en el caso de que se hubieran producido, cualquier tipo de resultado que no cumpliera con los criterios de aceptación previamente definidos.

En el PMV se describió la metodología para llevar a cabo:

- La capacitación del personal involucrado en el proceso.
- La cualificación de los proveedores que suministran materias primas, material de acondicionamiento, cualquier otro producto necesario, así como servicios prestados.
- La cualificación de los locales, equipos y sus respectivos mantenimientos.
- La validación de la limpieza.
- La validación de la producción.

1.5.1. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL INVOLUCRADO EN EL PROCESO

Para llevar a cabo la capacitación del personal involucrado en el proceso de fabricación del MTA, se llevaron a cabo acciones formativas de la manera descrita en el PNT de formación y en el PNT de validación de la técnica aséptica. Estas acciones formativas estuvieron encaminadas a que todo el personal conociera la Guía de NCF, todos los PNTs desarrollados y las normas de manipulación de productos estériles, esto incluye al personal de producción, al personal de mantenimiento y al personal de limpieza.

Se estableció que se realizarían sesiones formativas al menos una vez al año, siempre que hubiera avances importantes en un área, y cada vez que se produjera una actualización de alguno de los PNTs, teniendo que leer, en este último caso, todo el personal implicado el procedimiento y registrar su lectura.

Por parte del personal de producción se realizó la validación de la técnica aséptica de acuerdo a la metodología establecida por la *United States Pharmacopeia* (USP) (98), simulando los pasos de la producción del MTA utilizando medio de cultivo estéril.

El procedimiento consistió en sustituir el principio activo por un caldo de cultivo enriquecido, tripticasa soja (del inglés *Tryptic Soy Broth*: TSB), simulando todo el proceso de producción del MTA, realizando una impronta de huella de dedos en una placa de agar una vez finalizado el procedimiento. Posteriormente, se incubó, y se examinó la turbidez del caldo de soja, que sería indicadora de contaminación microbiológica, considerándose la validación apta, cuando el resultado era negativo (no se observaba crecimiento microbiológico), y no apta, cuando el resultado era positivo (se observaba crecimiento microbiológico).

Finalmente, se estableció que el personal de producción debía realizar la validación de la técnica aséptica por triplicado al inicio de la producción, y después un mínimo de dos veces al año, o cuando hubiera una modificación sustancial en el procedimiento de producción del MTA, de la manera descrita en el PNT de validación de la técnica aséptica.

1.5.2. CUALIFICACIÓN DE LOS PROVEEDORES

Se llevó a cabo una cualificación de los proveedores de las materias primas, materiales de acondicionamiento, servicios y otros materiales según lo descrito en el PNT de evaluación de

proveedores. Los proveedores fueron evaluados inicialmente en base a su aptitud para cumplir con los requisitos exigidos en cada caso, en función del tipo de producto o servicio que suministraban. Esta evaluación incluyó un análisis de la oferta económica y la comparación con ofertas alternativas, (siempre que sea posible obtener más de una oferta), el análisis de las especificaciones del producto/servicio y/o el análisis del sistema de trabajo del proveedor.

Se exigieron los siguientes documentos referentes a cada materia prima o material de acondicionamiento comprado:

- Ficha técnica del producto.
- Ficha de seguridad (si procede).
- Certificado de análisis (si procede).
- Certificado de esterilidad (si procede).

A través del seguimiento y control (evaluación) se pretendió regular la influencia que las entregas de los productos/prestación del servicio, iban a producir sobre la homologación de los proveedores. El responsable de evaluar fue el responsable de la compra del producto.

Los proveedores en función de los resultados del seguimiento y control se clasificaron en:

- A: proveedores excelentes.
- B: proveedores buenos y alternativos.
- C: proveedores no aptos.
- P: proveedores potenciales.

Además, el proveedor homologado podía estar identificado como proveedor en monopolio, con la letra “M”, que significa que es un proveedor con una buena relación calidad/precio o que es un proveedor elegido por motivos estratégicos.

Los proveedores fueron sometidos a un seguimiento y control continuo, y a su homologación a través de una evaluación anual con una de las siguientes evaluaciones:

- **Evaluación exhaustiva:** esta evaluación se realizó a los proveedores críticos. El responsable de producción decidió cuáles eran sus proveedores críticos en función del volumen de compra, del volumen de pedidos y de lo

importante que era la calidad del producto suministrado para la calidad del MTA. Al menos se evaluó por este método al 10% del total de proveedores. Esta evaluación consistió en el análisis para cada proveedor crítico de la calidad del producto, del servicio y de su sistema de trabajo, la cual quedó registrada en la hoja de registro de evaluación exhaustiva.

- **Evaluación ordinaria:** se evaluó por número de incidencias/no conformidades al resto de los proveedores, para la clasificación de los mismos.

Con los resultados de seguimiento y control de proveedores, el responsable de realizar las compras actualizaba la lista de proveedores y subcontratistas homologados por comprador.

1.5.3. CUALIFICACIÓN DE LOS LOCALES Y APARATOS

Se llevó a cabo la cualificación de todos los locales y aparatos necesarios para la producción del MTA de la manera descrita en el capítulo 1.

1.5.4. VALIDACIÓN DE LA LIMPIEZA

La validación de la limpieza consistió en simular el procedimiento de limpieza definido en el PNT de limpieza de locales.

Se establecieron dos escenarios, uno que respetó las instrucciones del fabricante del producto de limpieza, y otro, en el peor escenario posible, no respetando el tiempo de actuación del producto y realizando la recogida de muestras inmediatamente después su aplicación. Así mismo, se establecieron dos condiciones en cada escenario, la primera fue realizar la limpieza de superficies similares a las habituales de trabajo, y la segunda, la limpieza de una superficie previamente hisopada con bacterias obtenidas en los controles positivos de las monitorizaciones ambientales (bacterias ambientales).

1.5.5. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Se llevó a cabo la validación de la producción de la manera que será descrita en el capítulo 3.

1.6. GESTIÓN DE AUDITORÍAS INTERNAS

Se redactó un PNT para gestionar las auditorías internas, como un procedimiento sistemático, independiente y documentado, para evaluar el cumplimiento de los requerimientos de la Guía de NCF, siendo auditados todos los requisitos de la norma, y la documentación regulatoria en términos de sistema de calidad, producción, instalaciones y procedimientos establecidos.

La frecuencia de la auditoría interna se estandarizó en una vez al año, siendo programada por el responsable de calidad, quien era también el encargado de elaborar el plan anual de auditoría interna, en el que se detallaban todos los documentos que se debían auditar, y que debía ser aprobado por la persona cualificada, pudiendo ser subcontratada su realización a una empresa consultora.

Se llevó a cabo una revisión de los siguientes puntos:

- Personal:
  - Formación.
  - Higiene.
- Locales:
  - Área de almacenamiento de materias primas y material de acondicionamiento.
  - Área de control de calidad.
  - Área de producción (monitorización ambiental).
- Equipos:
  - Mantenimiento, limpieza, reparaciones.
  - Calibraciones.
- Documentación:
  - Especificaciones e instrucciones.
  - Registros e Informes.
  - Desviaciones.
  - Buenas prácticas de documentación.

  - Gestión de la documentación, conservación de documentos.
  - Trazabilidad de datos.
- Materias primas y material de acondicionamiento (proveedores).
- Producción.
- Cualificaciones y validaciones:
  - Validación del proceso.
  - Validación de los métodos analíticos.
  - Cualificación de locales y equipos.

Para la realización de la auditoría, el responsable de calidad fue chequeando y valorando con ayuda del registro del plan anual de auditoría interna, cada uno de los requisitos indicados en el mismo, revisando registros, realizando inspecciones visuales, etc.

Tras la realización de la auditoría, el responsable de calidad elaboró el informe de auditoría interna en el que se especificaban los documentos revisados, las desviaciones encontradas, y los informes de no conformidad que se hubieran generado, abriéndose, en caso de ser necesario, las correspondientes acciones preventivas y correctivas según el PNT anteriormente descrito.

2. RESULTADOS

2.1. MANUAL DE CALIDAD

El sistema de calidad farmacéutico, desarrollado de acuerdo a los apartados especificados en la parte IV de las NCF, se plasma en el manual de calidad. La política de calidad desarrollada en el mismo, se basa en proporcionar un MTA de fabricación no industrial seguro, utilizando células limbares adheridas a una membrana de fibrina, para curar la insuficiencia límbica o déficit limbar, esperando proporcionar a los pacientes resultados satisfactorios, fiables y reproducibles.

2.2. MANUAL DE RIESGOS

Se realizó un diagrama de flujo del proceso de fabricación del MTA (Figura 24). A continuación, se verificó el diagrama de flujo, confirmándose que todas las operaciones realizadas estaban

incluidas, y posteriormente se realizó la evaluación del riesgo en cada una de las fases que conforman el procedimiento de fabricación del MTA.

Para ello, tal y como se muestra en la Tabla 17, dentro de cada etapa de la producción se identificaron y clasificaron los peligros, y las operaciones en las que podrían aparecer. Se describieron los mismos y sus causas, así como las medidas preventivas que se podían establecer para evitarlos, determinándose finalmente, la probabilidad y gravedad del riesgo y si la operación era o no un PCC.

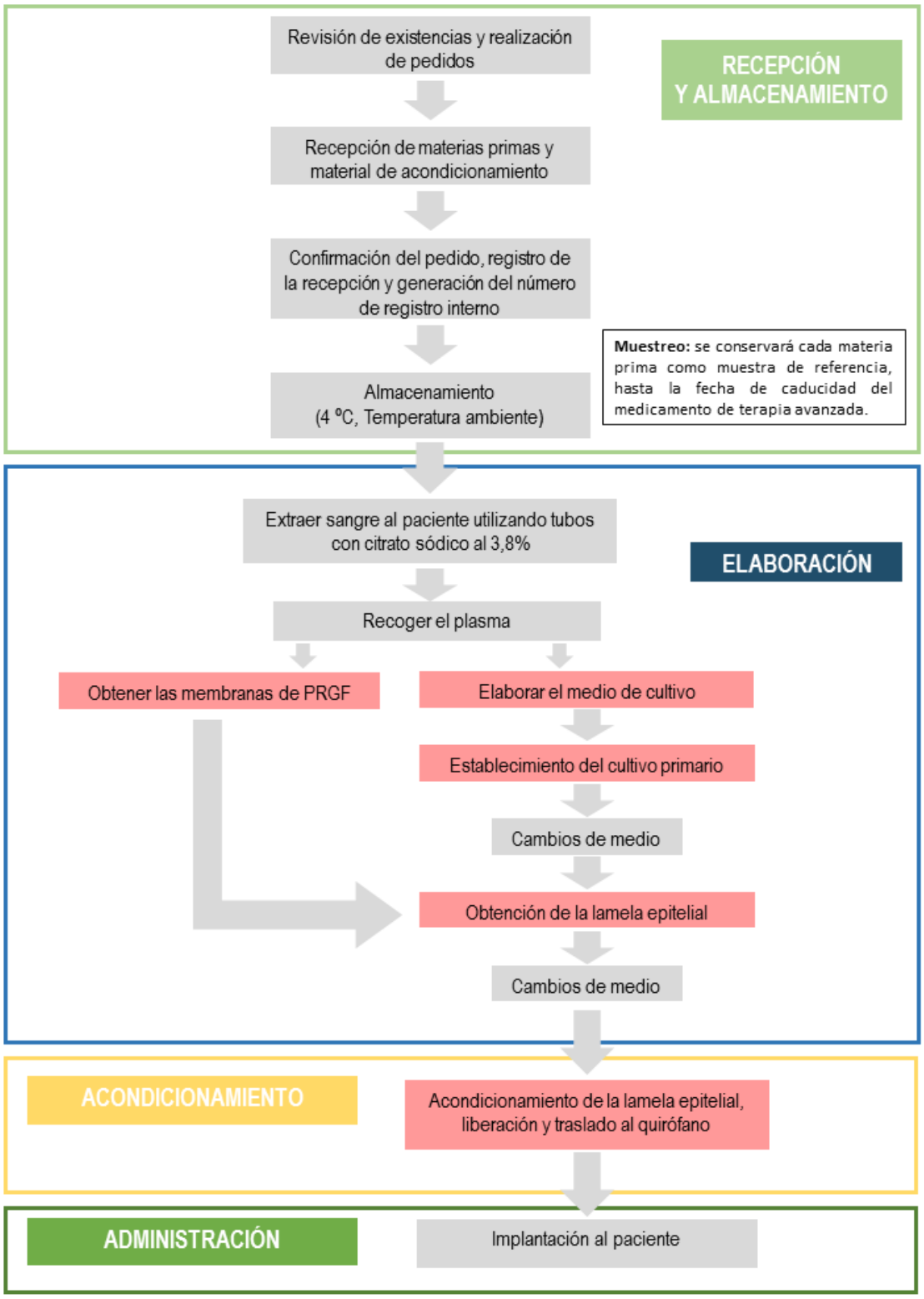


FIGURA 24: Diagrama de las fases de la producción del medicamento de terapia avanzada. PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento

TABLA 17: Evaluación del riesgo para cada etapa dentro de la producción del medicamento de terapia avanzada. MP: Materia prima. PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento. PCC: Punto crítico de control

OPERACIÓN	PELIGRO	TIPO PELIGRO	DESCRIPCIÓN	CAUSAS	MEDIDAS PREVENTIVAS	RIESGO	PCC
ETAPA 1: RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO							
OPERACIÓN	**PELIGRO**	**TIPO PELIGRO**	**DESCRIPCIÓN**	**CAUSAS**	**MEDIDAS PREVENTIVAS**	**RIESGO**	**PCC**
Revisión de existencias y realización de pedidos	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Presencia de agentes patógenos.	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias (manos).	Uso de vestimenta obligatoria y buenas prácticas de higiene personal.	Probabilidad: Baja Gravedad: Baja **RIESGO TRIVIAL**	NO
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Rotura/Derrame de materias primas. Presencia de materiales extraños (cabello, polvo…).	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias. Defectos de orden en almacén.	Formación continua del personal y aplicación de los procedimientos.	Probabilidad: Media Gravedad: Baja **RIESGO TOLERABLE**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ■ OTROS	Mezcla de MP en almacén.	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias. Defectos de orden en almacén.	Se realizará el recuento de cada producto de manera individual sobre la mesa habilitada. Formación continua del personal y aplicación de los procedimientos. Todo bien etiquetado.	Probabilidad: Baja Gravedad: Baja **RIESGO TRIVIAL**	

Recepción, Desembalaje Inspección visual del contenido	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Presencia de agentes patógenos. Contaminación de fábrica de las materias primas y material de acondicionamiento.	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias (manos). Defecto producto, fallo por parte del proveedor.	Uso de vestimenta obligatoria y buenas prácticas de higiene personal. Solicitud de certificado de esterilidad a cada lote adquirido.	Probabilidad: Baja Gravedad: Baja **RIESGO TRIVIAL**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Rotura/Derrame de materias primas. Presencia de materiales extraños (cabello, polvo…).	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias o lo transporta.	Se realizará el desembalaje en la zona habilitada. Formación continua del personal y aplicación de los procedimientos.	Probabilidad: Media Gravedad: Baja **RIESGO TOLERABLE**	NO
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ■ OTROS	Error en la recepción de MP.	Persona/s que realiza/n el pedido. Proveedor. Almacén situado en laboratorio de investigación.	Formación continua del personal implicado y aplicación de los procedimientos. Evaluación de proveedores. Todo bien señalizado.	Probabilidad: Media Gravedad: Baja **RIESGO TOLERABLE**	
Confirmación del Pedido, Registro de la Recepción y Generación del	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO	Presencia de agentes patógenos.	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias (manos).	Uso de vestimenta obligatoria y buenas prácticas de higiene personal.	Probabilidad: Baja Gravedad: Baja **RIESGO TRIVIAL**	NO

Número de Registro Interno		☐ OTROS					
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Rotura/Derrame de materias primas. Presencia de materiales extraños (cabello, polvo…).	Persona/s que realiza/n la revisión de existencias.	Se realizará el desembalaje en la zona habilitada. Formación continua del personal y aplicación de los procedimientos.	<u>Probabilidad</u>: Media <u>Gravedad</u>: Baja **RIESGO TOLERABLE**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ■ OTROS	Error al etiquetar una materia prima con su número de registro.	Persona/s que realiza/n el registro. Sistema informático no validado. No hay código de barras para evitar errores.	Validación Sistema Informátco e implantación de código de barras	<u>Probabilidad</u>: Baja <u>Gravedad</u>: Baja **RIESGO TRIVIAL**	
Almacenamiento	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Crecimiento de agentes patógenos: bacterias y hongos.	Ambiente.	Controlar que las condiciones de almacenamiento son las adecuadas.	<u>Probabilidad</u>: Baja <u>Gravedad</u>: Baja **RIESGO TRIVIAL**	NO
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO	Contaminación con productos de limpieza.	Persona, Ambiente.	Zonas de almacenamiento separadas y controladas.	<u>Probabilidad</u>: Baja <u>Gravedad</u>: Baja	

		☐ FÍSICO ☐ OTROS				**RIESGO TRIVIAL**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Presencia de materiales extraños (cabello, polvo…). Rotura.	Persona, Ambiente.	Control de las operaciones de limpieza de las zonas de almacenamiento.	Probabilidad: Media Gravedad: Baja **RIESGO TOLERABLE**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de materias primas.	Ambiente.	Monitorización ambiental.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
ETAPA 2: ELABORACIÓN							
OPERACIÓN	**PELIGRO**	**TIPO PELIGRO**	**DESCRIPCIÓN**	**CAUSAS**	**MEDIDAS PREVENTIVAS**	**RIESGO**	**PCC**
Extraer sangre al paciente	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación con agentes patógenos.	Persona/s (paciente, persona que realiza la extracción).	Revisión del historial médico del paciente y resultados de serologías. Uso de vestimenta obligatoria y buenas prácticas de higiene personal.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	NO

					Desinfección de la zona antes de la extracción. Utilización de kits individuales siguiendo las recomendaciones del fabricante.		
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación cruzada.	Persona/s (se mezclan los tubos de dos extracciones a dos pacientes).	Efectuar la extracción de manera individual. Capacitación continua/periódica del personal. Identificación de los tubos de extracción.	<u>Probabilidad</u>: Baja <u>Gravedad</u>: Alta **RIESGO MODERADO**	
Obtener las membranas de PRGF. **Obtener PRGF.** **Elaborar el medio de cultivo.** **Establecimiento del cultivo primario.**	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación con agentes patógenos.	Ambiente. Equipo. Persona.	Controlar las condiciones ambientales del aislador (esterilidad). Control de la esterilidad de los equipos (micropipetas). Formación del personal.	<u>Probabilidad</u>: Media <u>Gravedad</u>: Alta **RIESGO IMPORTANTE**	SI
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ☐ FÍSICO	Contaminación cruzada.	Persona que realiza la operación (medio de cultivo de un lote anterior, producto diferente al compartir	Identificación de los productos. El producto nunca estará expuesto durante las operaciones de limpieza de	<u>Probabilidad</u>: Baja <u>Gravedad</u>: Alta **RIESGO MODERADO**	

Obtención de la lamela epitelial.		☐ OTROS		nevera). Contaminación con productos de limpieza.	la superficie del aislador. Formación continua del personal implicado y aplicación de los procedimientos.		
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Presencia de material extraño (plástico del embalaje, cristal del vial del cloruro de calcio, cristal del vial de ácido tranexámico).	Persona que realiza la operación.	El producto nunca estará expuesto. Los embalajes serán inmediatamente retirados de la superficie de trabajo.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de productos intermedios.	Equipo.	Monitorización ambiental.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
Cambios de medio del cultivo primario **Cambios de medio de la lamela**	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación con agentes patógenos.	Ambiente. Equipo. Persona.	Controlar las condiciones ambientales del aislador (esterilidad). Control de la esterilidad de los equipos (micropipetas). Formación del personal.	Probabilidad: **Baja** Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	NO

epitelial	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación cruzada.	Persona que realiza la operación (medio de cultivo de un lote anterior, producto diferente al compartir nevera con otros). Contaminación con productos de limpieza.	Identificación de los productos. El producto nunca estará expuesto durante las operaciones de limpieza de la superficie del aislador. Formación continua del personal implicado y aplicación de los procedimientos.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de productos intermedios.	Equipo.	Monitorización ambiental.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
Obtener el PRGF. **Obtener las membranas de PRGF.**	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	El Plasma se activa, no hay retracción del coágulo. La membrana no se forma, la membrana se rompe.	Persona que realiza la operación (proporciones no adecuadas). Equipo (temperatura fuera de rango).	Formación continua del personal implicado y aplicación de los procedimientos. Control de la temperatura del incubador.	Probabilidad: Media Gravedad: Baja **RIESGO TOLERABLE**	SI
Establecimiento del Cultivo	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO	El cultivo primario se seca, los explantes flotan.	Persona que realiza la operación.	Formación continua del personal implicado y aplicación de los	Probabilidad: Media Gravedad:	SI

Primario.		■ FÍSICO ☐ OTROS		Ambiente.	procedimientos. Comprobar la correcta humedad del incubador.	Media **RIESGO MODERADO**	
ETAPA 3: CONSERVACIÓN (Si precisa)							
OPERACIÓN	**PELIGRO**	**TIPO PELIGRO**	**DESCRIPCIÓN**	**CAUSAS**	**MEDIDAS PREVENTIVAS**	**RIESGO**	**PCC**
Conservación.	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Crecimiento de agentes patógenos: bacterias y hongos.	Ambiente.	Controlar que las condiciones de almacenamiento en el incubador son las adecuadas.	Probabilidad: **Baja** Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	NO
	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de materias primas.	Equipo.	Monitorización ambiental.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
ETAPA 4: ACONDICIONAMIENTO							
OPERACIÓN	**PELIGRO**	**TIPO PELIGRO**	**DESCRIPCIÓN**	**CAUSAS**	**MEDIDAS PREVENTIVAS**	**RIESGO**	**PCC**
Acondicionamiento final	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO	Contaminación con agentes patógenos.	Ambiente. Equipo. Persona.	Controlar las condiciones ambientales del aislador (esterilidad). Control de la esterilidad de los equipos (micropipetas).	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	SI

		☐ OTROS			Formación del personal.		
ETAPA 5: DISPENSACIÓN/ADMINISTRACIÓN							
OPERACIÓN	**PELIGRO**	**TIPO PELIGRO**	**DESCRIPCIÓN**	**CAUSAS**	**MEDIDAS PREVENTIVAS**	**RIESGO**	**PCC**
Traslado al quirófano.	SI	☐ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ■ FÍSICO ☐ OTROS	Caída.	Accidente.	Formación del personal del material y fármacos con los que tratan	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	NO
Implantación al paciente.	SI	■ BIOLÓGICO ☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación con agentes patógenos.	Ambiente. Equipo. Persona.	Formación del personal en quirófano.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	NO
	SI	☐ BIOLÓGICO ■ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS	Contaminación cruzada.	Persona que realiza la operación.	Identificación de los productos. El producto nunca estará expuesto en quirófano hasta el momento de la implantación. Formación continua del personal implicado y aplicación de la técnica aséptica en quirófano.	Probabilidad: Baja Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	
	SI	☐ BIOLÓGICO	Presencia de material extraño.	Persona que realiza la operación.	El producto nunca estará expuesto.	Probabilidad: Baja	

		☐ QUÍMICO ☐ FÍSICO ☐ OTROS			Los embalajes serán inmediatamente retirados de la superficie de trabajo.	Gravedad: Alta **RIESGO MODERADO**	

Posteriormente, los peligros identificados como de riesgo moderado fueron sometidos al árbol de decisión (Figura 23). Finalmente se concluyó que los procesos identificados como PCC eran:

1. Obtención de las membranas de PRGF.
2. Obtención del PRGF (suplemento del medio de cultivo).
3. Establecimiento del cultivo primario.
4. Obtención de la lamela epitelial (MTA).
5. Acondicionamiento final del MTA.

En todos los PCC, se establecieron los límites críticos para todos los peligros identificados:

- Si el origen del peligro era biológico, lo que se entiende por una contaminación con agentes patógenos, el límite crítico establecido, ya sea de las determinaciones microbiológicas del producto, o de las determinaciones microbiológicas de los guantes (persona), equipos y ambientales, se muestran en la Tabla 18.

TABLA 18: Determinación y límites para el peligro de contaminación con agentes patógenos. UFC: Unidades formadoras de colonias (71, 99)

Determinación	Límites
Recuento total de aerobios	< 1 UFC
Recuento total de anaerobios	< 1 UFC
Micoplasma	Sin crecimiento
Endotoxinas	< 5 EU/mL

- Si el peligro era físico, por una variación en la temperatura o en parámetros físicos de la monitorización, que puedan producir una desestabilización de productos intermedios, el límite se muestra en la Tabla 19.

TABLA 19: Determinación y límites para el peligro físico

Determinación	Límites
Exhaust filter	< 15 Pa
Downflow filter	> 140 Pa
Inflow	< 0,20 m/s o > 0,55 m/s
Temperatura del Aislador	> 30 °C
Humedad del Aislador	> 60%
Temperatura del Frigorífico	< 0 °C y > 10 °C
Temperatura del Incubador	< 34,5 °C y > 38,5 °C.

Para establecer si los PCC se encontraban dentro o fuera de control se definieron los procedimientos de monitorización de cada uno de los PCC identificados por fases del proceso de fabricación del MTA (Tabla 20).

TABLA 20: Procedimientos de monitorización en cada punto crítico de control. PCC: Punto crítico de control

Etapa: ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO	
PCC (biológico)	**Contaminación con agentes patógenos.**
¿Quién?	Personal de producción.
¿Qué?	1. Tioglicolato del plasma y de un explante. 2. Tioglicolato al agua del incubador. 3. Impresión de huellas de los guantes en placas de agar tripticasa. 4. Placas de sedimentación de agar tripticasa y agar *Sabouraud*. 5. Hisopado de los equipos y superficie del aislador. 6. Recogida de parámetros físicos.
¿Cuándo?	1. Tras la activación del plasma, una vez realizadas las membranas del sobrenadante de la misma y una vez sembrados los explantes (se reserva uno para el tioglicolato). 2, 3, 4 y 5. Al finalizar el procedimiento. 6. Al inicio del procedimiento.
¿Cómo?	1. Con una micropipeta y una punta de 1000 µL se recoge 1 mL de la muestra de plasma y se inocula en un tubo de tioglicolato. Con unas pinzas se introduce un explante en otro tubo de tioglicolato. 2. Con una pipeta Pasteur se recoge 1 mL del agua del incubador y se inocula en un tubo de tioglicolato. 3. Se realiza una impresión de huellas de cada guante en una placa de agar tripticasa. 4. Se colocan placas abiertas de agar tripticasa y agar *Sabouraud* sobre la superficie del aislador durante la duración del procedimiento. 5. Se hisopa dada uno de los equipos del aislador (incubador, centrífuga y microscopio). Asimismo se hisopa la superficie del aislador. 6. Se recogen los parámetros físicos indicados por el *display* del aislador.
Registros o documentación	Tanto la realización de la toma de muestras como los resultados obtenidos quedan reflejados en la guía de fabricación correspondiente.
PCC (físico)	**Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de productos.**
¿Quién?	Personal de producción.
¿Qué?	Control de la temperatura del frigorífico y del incubador.
¿Cuándo?	Diariamente.
¿Cómo?	Los *Data Logger* situados en el frigorífico y en el incubador recogen datos cada 15 minutos y una vez al mes se descargan los informes generados. Además, se realiza un registro diario de la temperatura del frigorífico anotándose la temperatura máxima, mínima y media y del incubador anotándose en los puntos críticos del proceso de fabricación los valores de temperatura máximo y mínimo desde el inicio de la producción hasta el punto crítico correspondiente, y los valores de temperatura que muestra el *display* en estos tres puntos críticos y una vez a la semana.
Registros o documentación	Registro para el frigorífico y las guías de fabricación para el incubador.

Etapa: OBTENCIÓN DE LAS LAMELAS EPITELIALES	
PCC (biológico)	**Contaminación con agentes patógenos.**
¿Quién?	Personal de producción.
¿Qué?	1. Tioglicolato del sobrenadante de la suspensión celular una vez centrifugada. 2. Tioglicolato al agua del incubador. 3. Impresión de huellas de los guantes en placas de agar tripticasa. 4. Placas de sedimentación de agar tripticasa y agar *Sabouraud*. 5. Hisopado de los equipos y superficie del aislador. 6. Recogida de parámetros físicos.
¿Cuándo?	1. Tras la tripsinización de los cultivos primarios, se centrifugan las células y antes de resuspender se recoge la muestra de sobrenadante. 2, 3, 4 y 5. Al finalizar el procedimiento. 6. Al inicio del procedimiento.
¿Cómo?	1. Con una micropipeta y una punta de 1000µL se recoge 1mL de del sobrenadante y se inocula en un tubo de tioglicolato. 2. Con una pipeta Pasteur se recoge 1 mL del agua del incubador y se inocula en un tubo de tioglicolato. 3. Se realiza una impresión de huellas de cada guante en una placa de agar tripticasa. 4. Se colocan placas abiertas de agar tripticasa y agar *Sabouraud* sobre la superficie del Aislador durante la duración del procedimiento. 5. Se hisopa dada uno de los equipos del aislador (incubador, centrífuga y microscopio). Asimismo, se hisopa la superficie del Aislador. 6. Se recogen los parámetros físicos indicados por el *display* del aislador.
Registros o documentación	Tanto la realización de la toma de la muestra como el resultado obtenido quedan reflejados en la guía de fabricación correspondiente.
PCC (físico)	**Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de productos.**
¿Quién?	Personal de producción.
¿Qué?	Control de la temperatura del frigorífico y del incubador.
¿Cuándo?	Diariamente.
¿Cómo?	Los *Data Logger* situados en el frigorífico y en el incubador recogen datos cada 15 minutos y una vez al mes se descargan los informes generados. Además, se realiza un registro diario de la temperatura del frigorífico anotándose la temperatura máxima, mínima y media y del incubador anotándose en los puntos críticos del proceso de fabricación los valores de temperatura máximo y mínimo desde el inicio de la producción hasta el punto crítico correspondiente, y los valores de temperatura que muestra el *display* en estos tres puntos críticos y una vez a la semana.
Registros o documentación	Registro para el frigorífico y las guías de fabricación para el incubador.

Etapa: ACONDICIONAMIENTO DE LA LAMELA EPITELIAL, LIBERACIÓN Y TRASLADO AL QUIRÓFANO	
PCC (biológico)	**Contaminación con agentes patógenos.**
¿Quién?	Personal de producción (toma de muestras). Echevarne (ensayos)
¿Qué?	1. Bact-Alert®, endotoxinas y micoplasma. 2. Tioglicolato al agua del incubador. 3. Impresión de huellas de los guantes en placas de agar tripticasa. 4. Placas de sedimentación de agar tripticasa y agar *Sabouraud*. 5. Hisopado de los equipos y superficie del aislador. 6. Recogida de parámetros físicos.
¿Cuándo?	1. Antes del acondicionamiento de la lamela epitelial. 2, 3, 4 y 5. Al finalizar el procedimiento. 6. Al inicio del procedimiento.
¿Cómo?	1. Con una micropipeta y una punta de 1000µL se recoge 0,2mL, 0,4mL y 0,5mL y se introducen en tres contenedores primarios y estos a su vez en tres contenedores secundarios y se realiza el envío de las muestras al laboratorio externo para su análisis. 2. Con una pipeta Pasteur se recoge 1 mL del agua del incubador y se inocula en un tubo de tioglicolato. 3. Se realiza una impresión de huellas de cada guante en una placa de agar tripticasa. 4. Se colocan placas abiertas de agar tripticasa y agar *Sabouraud* sobre la superficie del aislador durante la duración del procedimiento.
Registros o documentación	Tanto la realización de la toma de la muestra como el resultado obtenido quedan reflejados en la guía de fabricación correspondiente. Además el resultado del informe enviado por el laboratorio de microbiología queda archivado.
PCC (físico)	**Variación en la temperatura que pueda producir una desestabilización de productos.**
¿Quién?	Personal de producción.
¿Qué?	Control de la temperatura del frigorífico y del incubador.
¿Cuándo?	Diariamente.
¿Cómo?	Los *Data Logger* situados en el frigorífico y en el incubador recogen datos cada 15 minutos y una vez al mes se descargan los informes generados. Además, se realiza un registro diario de la temperatura del frigorífico anotándose la temperatura máxima, mínima y media y del Incubador anotándose en los puntos críticos del proceso de fabricación los valores de temperatura máximo y mínimo desde el inicio de la producción hasta el punto crítico correspondiente, y los valores de temperatura que muestra el *display* en estos tres puntos críticos y una vez a la semana.
Registros o documentación	Registro para el frigorífico y las guías de fabricación para el incubador.

2.3. Redacción de los procedimientos generales de garantía de calidad y registros

Los protocolos redactados clasificados por categorías fueron los siguientes:

- ***Procedimientos generales (PG):***

- PG01 de elaboración de procedimientos normalizados de trabajo: donde se explica cómo elaborar un PNT, la clasificación de los mismos, qué puntos deben contener, qué formato y contenido, cómo se redactan y cuando realizar la revisión, así como la entrada en vigencia de los mismos, su archivo y distribución, la revisión y control de cambios, el listado de los mismos y cómo enumerar los registros que éstos generan.
- PG02 de limpieza de locales: describe de forma clara el proceso a seguir para asegurar la correcta limpieza de los locales, la periodicidad de la misma, indicaciones generales para llevar a cabo la limpieza según el protocolo redactado, y la retirada de residuos.
- PG03 de acceso al área de elaboración de estériles: describe el proceso a seguir para acceder y salir de la sala de elaboración de estériles.
- PG04 de introducción de materiales al aislador: describe el proceso a seguir para la entrada y salida de material en la unidad de producción de terapias avanzadas.
- PG05 de funciones y responsabilidades: describe las funciones y responsabilidades de las personas clave, que son: la persona cualificada, el responsable de producción y el responsable del control de calidad, también incluye el reconocimiento de firmas de todo el personal implicado.
- PG06 de formación: describe el procedimiento de formación de todo el personal, incluidos los departamentos de mantenimiento y limpieza, se detalla la frecuencia y el contenido de la formación a impartir, tratado en el actual capítulo.
- PG07 de higiene personal: establece programas de higiene y los adapta a las diferentes zonas, incluye procedimientos relativos a la salud, prácticas higiénicas y ropa de todo el personal, así como la vestimenta para cada área y el correcto lavado de manos.
- PG08 de no conformidades: establece el procedimiento del control de las no conformidades explicadas en este capítulo.
- PG09 de gestión de productos: describe los pasos a seguir para una correcta gestión de los productos, incluida la realización de pedidos, la recepción del material de partida/materia prima y del material de acondicionamiento, la

cuarentena, la aceptación de los mismos previo control de conformidad, así como la gestión del stock disponible y gestión de salida de materiales. Establece una zona destinada al almacenamiento del material de partida/materia prima y del material de acondicionamiento que permita una localización rápida y fácil, así como un máximo aprovechamiento del espacio respetando las condiciones de conservación.

- PG10 de evaluación de proveedores: define la evaluación de proveedores y subcontratistas cuyos productos o servicios puedan influir en la calidad de los productos obtenidos, el procedimiento a llevar a cabo, así como la clasificación de los proveedores en función de los resultados de seguimiento y control. Detalla las evaluaciones exhaustiva y ordinaria, así como su frecuencia, tratadas en este capítulo.
- PG11 de auditorías internas: describe el procedimiento para definir el plan de auditorías descrito en este capítulo.
- PG12 de sistema acciones correctivas y preventivas: describe el procedimiento de cómo llevar la gestión de CAPA descritas en el presente capítulo.
- PG13 de revisión anual del producto: describe el procedimiento para llevar a cabo la revisión anual de las producciones realizadas, que se detallará en el capítulo 3.

- ***Procedimientos de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de aparatos (PA):*** describen las operaciones para el correcto funcionamiento y mantenimiento de los equipos que han sido tratados en el capítulo 1:
  - PA01 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del aislador.
  - PA02 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del incubador.
  - PA03 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de la centrífuga.
  - PA04 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del microscopio.
  - PA05 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de los frigoríficos.

- PA06 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del contador de partículas.
- PA07 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de los datta logger.
- PA08 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de las estufas.
- PA09 de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de las micropipetas y del pipeteador automático.

- ***Procedimientos de producción (PP):***
  - PP01 de producción de lamelas epiteliales: describe todas y cada una de las operaciones de la producción del MTA, se detallará en el capítulo 3.
  - PP02 de etiquetado: define el proceso a seguir para el etiquetado de productos finales e intermedios y para etiquetar las muestras relativas a los controles ambientales.

- ***Procedimientos de control (PC):***
  - PC01 de controles del producto: definen los controles de calidad en el producto final, y los controles microbiológicos para llevar a cabo la liberación del lote, se describirán en el capítulo 3.
  - PC02 de monitorización de las condiciones ambientales: describe las medidas de control ambiental que debemos realizar, y el procedimiento para llevarlas a cabo, incluyendo la monitorización de parámetros físicos, la monitorización de partículas viables y la monitorización de partículas no viables, que se han descrito en el capítulo 1.

- ***Procedimientos de cualificación:*** describen los procedimientos para realizar las cualificaciones de los equipos que han sido tratados en el capítulo 1.
  - PCA01 de cualificación del aislador.
  - PCA02 de cualificación del incubador.
  - PCA03 de cualificación de la centrífuga.
  - PCA04 de cualificación del microscopio.

- PCA05 de cualificación de los frigoríficos.
- PCA08 de cualificación de las estufas.

- ***Procedimientos de validación***:
  - PV01 de validación de la producción de lamelas epiteliales, se tratarán en el capítulo 3.
  - PV02 de validación de la técnica aséptica: por parte del personal implicado en la producción, se describe en el presente capítulo.
  - PV03 de validación de la limpieza, se describe en el presente capítulo.

En cuanto a los registros generados fueron los siguientes:

- ***Registros generales:***
  - PG01_R01: Registro de distribución de procedimientos.
  - PG01_R02: Registro de revisión/cambio de un procedimiento.
  - PG02_R01: Registro de limpieza.
  - PG03_R01: Registro de entrada y salida de la sala de elaboración de estériles.
  - PG05_R01: Registro de firmas reconocidas.
  - PG06_R01: Informe de evaluación de la formación.
  - PG06_R02: Registro de formación.
  - PG06_R03: Registro de solicitud de formación.
  - PG08_R01: Registro de incidencias.
  - PG08_R02: Informe de no conformidad.
  - PG09_R01: Registro del stock del almacén.
  - PG10_R01: Evaluación del proveedor potencial.
  - PG10_R02: Lista de proveedores y subcontratistas homologados por comprador.
  - PG10_R03: Evaluación exhaustiva.
  - PG10_R04: Evaluación ordinaria.
  - PG11_R01: Plan anual de auditoría interna.

- PG11_R02: Informe de auditoría interna.
- PG12_R01: Informe de apertura de acciones correctivas/preventivas.
- PG13_R01: Informe de revisión anual del producto.

- **Registros de producción:**
  - XXXX-Nº Historia clínica del paciente: Guías fabricación. (XXXX: Año de la producción).

- **Registros de aparatos:**
  - AP-01_R01: Registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del aislador AISLAISO4-PP-1800.
  - AP-05_R01: Registro de temperatura diaria de los frigoríficos.
  - AP-05_R02: Registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de los frigoríficos.
  - AP-06_R01: Registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del contador de partículas HHPC 3+ (0.3µm).
  - AP-07_R01: Registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones del data logger.
  - AP-08_R01: Registro de temperatura diaria de las estufas.
  - AP-08_R02: Registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de las estufas.
  - AP-09_R01: Registro de funcionamiento, mantenimiento, limpieza y reparaciones de las micropipetas y del pipeteador automático.

- **Registros de control:**
  - PC01_R01: Solicitud de análisis de producto farmacéutico.
  - PC02_R01: Registro de monitorización de parámetros físicos del aislador.
  - PC02_R02: Registro de monitorización ambiental del aislador.
  - PC02_R03: Registro de monitorización temperatura diaria almacén.

- **Registros de cualificación:**

- PCA-01_R01: Informe de cualificación del aislador AISLAISO4-PP-1800.
- PCA-02_R01: Informe de cualificación del incubador 27-MINICELL NB-203.
- PCA-03_R01: Informe de cualificación de la centrífuga SPECTRAFUGETM 6C.
- PCA-04_R01: Informe de cualificación del microscopio EVOS® XL.
- PCA-05_R01: Informe de cualificación del frigorífico Liebherr 7082 269 00 y Liebherr 7082 269 01.
- PCA-08_R01: Informe de cualificación de la estufa Memmert UNB 500 y de la Estufa Prodintec.

- **Registros de validación:**
  - PV-01_R01: Guía de validación de la producción de lamelas epiteliales.
  - PV-02_R02: Informe de validación de la técnica aséptica.
  - PV-03_R01: Informe de validación de la limpieza.

Para asegurar la integridad de toda la documentación, una vez aceptada por las personas responsables (responsable de producción, responsable de calidad y persona cualificada) se procedió al escaneo de los PNTs firmados y de los registros e informes rellenos.

2.4. NO CONFORMIDADES Y GESTIÓN DE ACCIONES CORRECTIVAS Y PREVENTIVAS

Durante las producciones realizadas para llevar a cabo la puesta a punto del procedimiento de elaboración del MTA en la unidad de producción de terapias avanzadas y durante la validación de la producción, se detectaron desviaciones que dieron lugar a la apertura de informes de no conformidad. El listado de las no conformidades detectadas aparece detallado en la Tabla 21. Asimismo, se indica el proceso en el que fueron detectadas, la acción inmediata implantada y la acción preventiva o correctiva, si procede, que generó.

TABLA 21: No conformidades detectadas durante las producciones realizadas en la unidad de producción de terapias avanzadas

NO CONFORMIDAD: Crecimiento de colonias en monitorización de aislador realizado por empresa externa.	
Proceso en el que se detecta	Monitorización ambiental.
Acción a realizar	Revisión de las monitorizaciones internas realizadas. Realización de monitorización ambiental posterior y se programan monitorizaciones ambientales sucesivas durante un mes.
Verificación del cierre	La acción ha sido eficaz. La realización de los controles microbiológicos internos son negativos, por lo que no se descarta una posible contaminación de la muestra enviada.
NO CONFORMIDAD: Crecimiento de colonias en placa de agar tripticasa del guante izquierdo.	
Proceso en el que se detecta	Monitorización ambiental.
Acción a realizar	Intensificar la desinfección del material que se introduce en el aislador.
Verificación del cierre	La acción ha sido eficaz. No se ha vuelto a detectar contaminación microbiológica.
NO CONFORMIDAD: En puntos concretos de la producción se detecta la temperatura del incubador fuera de rango.	
Proceso en el que se detecta	Producción. Guía de fabricación 1901.
Acción a realizar	1. Revisión de la temperatura en los momentos de apertura de puerta en las producciones. 2. Estudiar el efecto de la apertura de la puerta del incubador durante las producciones. Test de puerta abierta.
Verificación del cierre	La acción ha sido eficaz. Al estudiar el efecto de la apertura de la puerta en la temperatura del incubador, se observa que la temperatura se recupera aproximadamente a los 2 minutos, pero el tiempo de temperatura fuera de rango no sobrepasa los 30 segundos. Los resultados obtenidos muestran que las temperaturas fuera de rango son puntuales, en momentos necesarios de apertura de puerta del incubador, no viéndose afectada la calidad de los lotes producidos. No genera una acción correctiva.
NO CONFORMIDAD: Crecimiento bacteriano en el control microbiológico final.	
Proceso en el que se detecta	Control microbiológico. Guía de Fabricación 1905.
Acción a realizar	Rechazo del lote.
Verificación del cierre	La acción ha sido eficaz.
NO CONFORMIDAD: Crecimiento bacteriano en el control microbiológico final.	
Proceso en el que se detecta	Control microbiológico. Guía de Fabricación 2101.
Acción a realizar	Rechazo del lote.
Verificación del cierre	La acción ha sido eficaz. Genera acción correctiva de implantación de un control microbiológico intermedio realizado por una empresa externa.

2.5. DISEÑO DE UN PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN

2.5.1. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL INVOLUCRADO EN EL PROCESO

Anualmente, el responsable de calidad programó un plan de formación para que todo el personal (personal de producción, de mantenimiento y de limpieza), recibiera formación, impartiendo nociones básicas de las NCF, y explicando los PNTs relacionados con cada una de sus áreas:

- Personal de producción: todos los PNTs.
- Personal de limpieza y mantenimiento: PNT de acceso al área de elaboración de estériles y PNT de higiene personal.
- Personal de limpieza: PNT de limpieza.

Tras recibir la formación, el personal fue evaluado por el responsable de calidad, quedando la formación registrada y evaluada en un informe (Figura 25).

Anexo I. Hoja de registro: Informe de Evaluación de la Formación
PNT nº ficha UTA/R1/PG06/02: Informe de Evaluación de la Formación

Impreso 1/UTA/R1/PG06/02

PERSONAL EVALUADO:

FECHA:

PERSONAL EVALUADOR:

CONOCIEMIENTO	RESULTADO	OBSERVACIONES
Lavado de manos	Apto □ No Apto □	
Vestimenta	Apto □ No Apto □	
Colocación guantes	Apto □ No Apto □	
Limpieza de la zona de preparación de Medicamentos de Terapia Avanzada	Apto □ No Apto □	
Introducción de materiales a través del SAS	Apto □ No Apto □	
Utilización de equipos	Apto □ No Apto □	
Realización validación técnica aséptica	Si □ No □ (Ver Hoja Registro de la Validación Técnica Aséptica)	
Gestión de residuos	Apto □ No Apto □	
Preparación Medicamento de Terapias Avanzadas	Apto □ No Apto □	
Limpieza posterior	Apto □ No Apto □	
Orden laboratorio	Apto □ No Apto □	
Monitorización ambiental	Apto □ No Apto □	
Control huella guantes	Apto □ No Apto □	

RESULTADO FINAL:

FIRMA:

FIGURA 25: Plantilla del informe de evaluación de la formación de personal

Por último, el personal de producción, llevó a cabo la validación de la técnica aséptica por triplicado, previo inicio a la validación de la producción, siendo los resultados de la misma los que se detallan a continuación:

- Los parámetros físicos del aislador y del incubador durante la validación permanecieron dentro de los límites establecidos, no desviándose ninguno de ellos durante el proceso.
- Se obtuvo crecimiento microbiano en las placas de agar tripticasa y en los tubos de tripticasa de soja utilizados como controles positivos.
- No se obtuvo crecimiento microbiano en ninguno de los controles negativos utilizados.
- No se obtuvo crecimiento microbiológico en los caldos de cultivo de tripticasa de soja, empleados en el proceso de validación.

Con todo lo anterior, y una vez aceptado el informe de validación de la técnica aséptica (Figura 26) por el responsable de calidad, se concluyó que los técnicos de producción, eran aptos para trabajar en condiciones de asepsia y poder realizar producciones en la unidad de producción de terapias avanzadas.

PNT nº ficha UTA/R1/PV02/02: Informe de Validación de la Técnica Aséptica

Impreso 1/UTA/R1/PV02/02

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ASÉPTICA			
FECHA:		**REALIZADO POR:**	
1. Recoger del almacén de la Unidad de Terapias Avanzadas el material que a continuación se detalla y anotar en la Guía de Fabricación el número de registro de cada producto.			
Material Sin número de Registro			
Gradilla	**Pipeteador automático**		**Contenedor de residuos**
Material	**Cantidad**		**Número de Registro Interno**
Bolsas de residuos	1		
Viales de TSB de 10 mL	6		
Tubos de 15 mL	8		
Jeringas de 50 mL	2		
Filtros de 0,22 µm	2		
Pipetas de 5 mL	2		
Placa de 12 pocillos	2		
Pipeta Pasteur	4		
Bolsa de transporte	2		
Placas de agar tripticasa	5		
Hisopos	2		
MONITORIZACIÓN PARÁMETROS FÍSICOS DEL AISLADOR			
Exhaust filter	**Downflow filter**	**Inflow**	**Downflow**
Resultado:	Resultado:	Resultado:	Resultado:
Humedad	**Temperatura**	**Manómetro salida**	**Manómetro entrada**
Resultado:	Resultado:	Resultado:	Resultado:
MONITORIZACIÓN PARÁMETROS FÍSICOS DEL INCUBADOR			
Temperatura	**CO_2**	**Temperatura máxima y mínima**	
Resultado:	Resultado:	Resultado:	
METODOLOGÍA			
1. Trasvasar dos viales de TSB a un tubo de 15 mL previa filtración esterilizante con una jeringa de 50 mL conectada a un filtro de 0,22 µm. Con una pipeta de 5 mL pipetear el volumen en los pocillos de una placa de 12 pocillos. Repetir el procedimiento con otros dos viales de TSB. 2. Incubar las placas de 12 pocillos en el incubador durante 4 minutos. Observar las placas con el microscopio de contraste de fases. 3. Con una pipeta Pasteur pipetear el TSB de la placa de 12 pocillos en un tubo de 15 mL. Repetir el procedimiento con otra Pasteur, partiendo de la segunda placa de 12 pocillos. Centrifugar los dos tubos 2 minutos a 0,4 rcf (2.100 rpm). Con una pipeta Pasteur pipetear 2 alícuotas de TSB de cada tuvo a 2 tubos de 15mL e introducir cada pack de dos tubos en una bolsa de transporte. 4. Realizar una impronta de huellas de cada guante del aislador en tres placas de agar tripticasa y los controles positivos y negativos de las placas de agar tripticasa y del TSB. Introducir las bolsas con las muestras, los tubos y las placas en la estufa a 30-37 °C durante 14 días y anotar los resultados obtenidos.			
RESULTADOS			
BOLSA 1		**BOLSA 2**	
Resultado Tubo 1:	Resultado Tubo 2:	Resultado Tubo 1:	Resultado Tubo 2:
Guante derecho	**Guante central**	**Guante izquierdo**	
Resultado:	Resultado:	Resultado:	
CONTROLES			
NEGATIVOS		**POSITIVOS**	
Resultado Agar tripticasa:	Resultado TSB:	Resultado Agar tripticasa:	Resultado TSB:
OBSERVACIONES:			
DESVIACIONES			
RESULTADO FINAL			
CONCLUSIONES			
Efectuado por: **Fecha:**			
Verificado por: **Fecha:**			
Aceptado por: **Fecha:**			

Pág. _____ de _____

FIGURA 26: Plantilla del informe de validación de la técnica aséptica

2.5.2. CUALIFICACIÓN DE LOS PROVEEDORES

Antes de llevar a cabo la compra de cualquier materia prima, material de acondicionamiento, material de partida o contrato de cualquier servicio se analizó los posibles proveedores de las

mismas. Una vez elegido el posible proveedor, se le realizó una evaluación (Figura 27), permaneciendo como proveedor potencial en el listado de proveedores durante un año. Transcurrido ese año, se les realizó una evaluación exhaustiva (Figura 28) u ordinaria (Figura 29), en función del volumen de compra, y que fueran considerados o no como proveedores estratégicos, categorizándolos en función de la puntuación obtenida, y actualizando la lista de proveedores. La evaluación de los proveedores se realizó rellenando los informes recogidos en las Figuras 27, 28 y 29, correspondientes a la evaluación de proveedores potenciales, evaluación ordinaria y evaluación exhaustiva.

PNT nº ficha UTA/R1/PG10/02: Evaluación del Proveedor Potencial

Impreso 1/UTA/R1/PG10/02

C. I. F. / N. I. F.		**Fecha**	
Nombre/razón social			
Actividad			
Dirección			
Población			
Código Postal		**WEB**	
Telefonos		**Fax**	
Persona de contacto		**Tlfno.**	

VALORACION:	(Marcar con una X)		
1. ¿TRABAJA CON ALGÚN OTRO DEPARTAMENTO DEL IOFV?	SI	NO	¿Cuál?
2. ¿DISPONE DE CERTIFICADO DE CALIDAD?	SI	NO	Fecha caducidad:
3. ¿DISPONE DE CERTIFICADO MEDIOAMBIENTAL?	SI	NO	Fecha caducidad:
4. ¿DISPONE DE ALGÚN OTRO CERTIFICADO/ACREDITACIÓN?	SI	NO	**¿Cuál?**
5. PLAZO ENTREGA (marque): **____A DEMANDA ____DIARIO ____ CADA 2/3 DIAS ____SEMANAL ____ QUINCENAL**			
6. SU PRODUCTO ES (marque): **____ ÚNICO ____ MÁS BARATO QUE SU COMPETENCIA ____RECOMENDADO**			
7. CONDICIONES DE PAGO (marque): **____PAGO POR ADELANTADO ____30 DÍAS ____ 60 DÍAS**			

Criterios puntuación: **Puntuación:** Aceptado con **12** puntos

	NO	**SI**		
1.	0	1	**5.**	5, 4, 3, 2, 1
2.	0	1	**6.**	10, 8, 6
3.	0	1	**7.**	0, 1, 2
4.	0	1		

Aceptado: **SI____** **No____**

Fecha: _____

Fdo. Responsable de Producción:

Resultado de la Evaluación

FIGURA 27: Informe de evaluación de proveedor potencial

PNT nº ficha UTA/R4/PG10/02: Evaluación Ordinaria

Impreso 4/UTA/R4/PG10/0

FECHA	NOMBRE	CIF	Nº DE NC GRAVES	Nº DE NC LEVES	CLASIFICACIÓN	OBSERVACIONES	EVALUADO POR

Proveedores A: NC GRAVES = 0 y NC LEVES = 0	**Proveedores B** 1 ≤ NC GRAVES ≤ 5 o 1 ≤ NC LEVES ≤ 15
Proveedores C (No aptos) NC GRAVES ≥ 5 o NC LEVES ≥ 15	

FIGURA 28: Informe de evaluación ordinaria de un proveedor

PNT nº ficha UTA/R3/PG10/02: Evaluación Exhaustiva

Impreso 3/UTA/R3/PG10/02

PROVEEDOR:_____ FECHA EVALUACIÓN: _____
PERIODO: _____ PERSONA QUE LA REALIZA: _____

Conteste a estas afirmaciones donde 1 significa que está totalmente en desacuerdo con la afirmación, y que 5 está totalmente de acuerdo.

AFIRMACION	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
El producto/servicio se adapta a nuestras expectativas					
Las hojas de pedido/solicitud remitidas al proveedor nunca han sido perdidas					
El pedido mínimo exigido por el proveedor cumple con tus expectativas					
El proveedor no tiene roturas de stock/Deficiencias en sus servicios					
El proveedor cuando tiene una rotura de stock/deficiencia de servicio te avisa con tiempo suficiente.					
El proveedor cuando tiene una rotura de stock/deficiencia de servicio te avisa y te ofrece soluciones alternativas					
El plazo de entrega del producto/servicio se adapta a tus expectativas (es corto, rápido, etc.)					
El plazo de entrega del producto/servicio/resultados se adapta a lo pactado con el proveedor					
El pedido/muestras, durante su transporte, nunca se ha extraviado					
El/la proveedor/subcontrata responde o tiene capacidad para responder a las incidencias con prontitud y eficiencia					
El/la proveedor/subcontrata responde adecuadamente a tus dudas, preguntas, etc.					
El/la proveedor/subcontrata te informa de nuevos productos, cambios, etc.					
El/la proveedor/subcontrata tiene una atención telefónica correcta					
El/la proveedor/subcontrata se adapta a las condiciones de pago de IOFV					

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN: (suma puntuaciones) _____

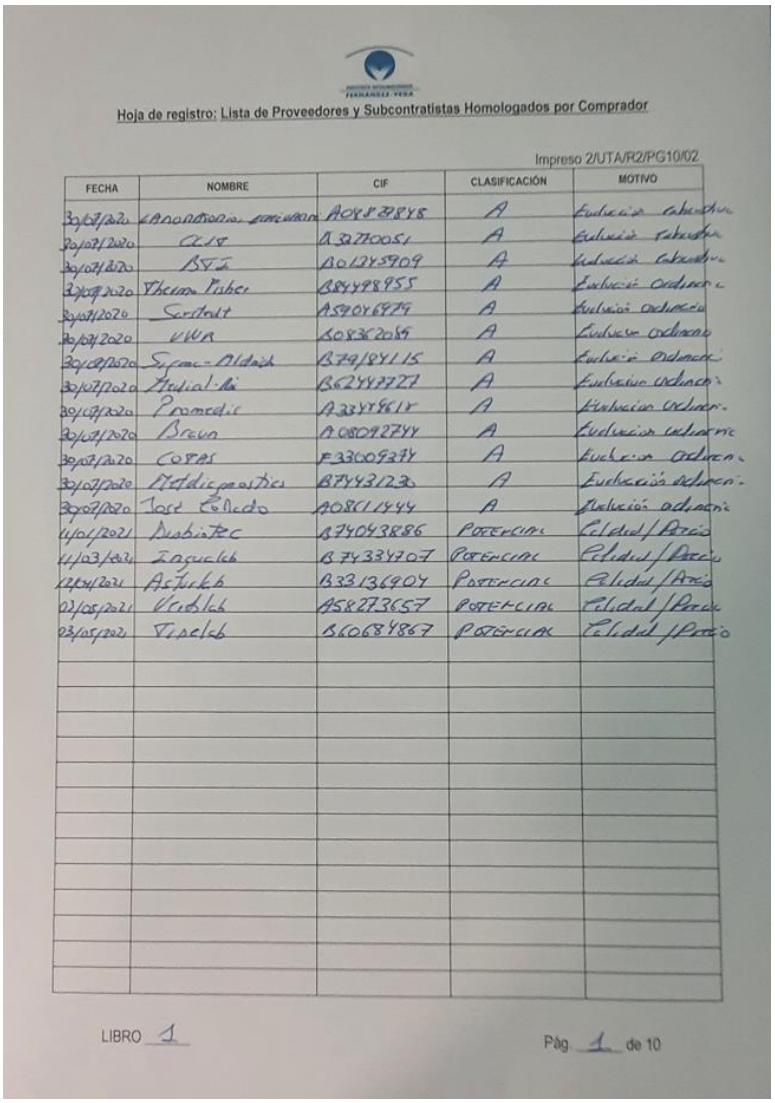
NUMERO DE NC DEL PERIODO: _____

CLASIFICACIÓN DEL PROVEEDOR:

Proveedores A:	**Proveedores B**	**Proveedores C** (No aptos)
Puntuación ≥ 45 puntos	20≤Puntuación≤ 44	Puntuación < 20 puntos
NC GRAVES = 0 y	1≤NC GRAVES ≤ 5 o 1≤NC LEVES ≤ 15	NC GRAVES > 5 o NC LEVES > 15
En el caso de que no se distinga entre NC leve y grave se considerara grave (1 NC grave equivale a 3 NC Leves).		
Si el proveedor resulta clasificado en dos categorías diferentes el evaluador elegirá la clasificación final.		

FIGURA 29: Informe de evaluación exhaustiva de un proveedor

La clasificación de proveedores durante el periodo 2019-2021 en función de la evaluación realizada se muestra en la Figura 30.



Hoja de registro: Lista de Proveedores y Subcontratistas Homologados por Comprador

Impreso 2/UTA/R2/PG10/02

FECHA	NOMBRE	CIF	CLASIFICACIÓN	MOTIVO
30/07/2020	[illegible]	A08838848	A	Evolución [illegible]
30/07/2020	Alis	A32700051	A	Evolución [illegible]
30/07/2020	BTS	A01245909	A	Evolución [illegible]
30/07/2020	Thermo Fisher	B84498955	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	Sorbent	A59016979	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	KWA	B08362089	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	Sigma-Aldrich	B79/84115	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	Medialab	B62447777	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	Promedic	A33478618	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	Braun	A08092744	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	COBAS	F33009274	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	Medicpastics	B74431730	A	Evolución ordinaria
30/07/2020	José Collado	A08611444	A	Evolución ordinaria
4/01/2021	Diabiotec	B74043886	POTENCIAL	Calidad/Precio
11/03/2021	Ingeclab	B74334707	POTENCIAL	Calidad/Precio
12/04/2021	Activlab	B33136904	POTENCIAL	Calidad/Precio
03/05/2021	Viralab	A58273657	POTENCIAL	Calidad/Precio
03/05/2021	Tiralab	B60684867	POTENCIAL	Calidad/Precio

LIBRO 1

Pàg 1 de 10

FIGURA 30: Proveedores cualificados en la unidad de terapias avanzadas en el periodo 2019-2021

2.5.3. CUALIFICACIÓN DE LOS LOCALES Y EQUIPOS

Los resultados de la cualificación de todos los equipos necesarios para la producción del MTA se mostraron en el capítulo 1.

2.5.4. VALIDACIÓN DE LA LIMPIEZA

Se realizó la validación de la limpieza en los escenarios y condiciones definidas en la sección de material y método, con el limpiador desinfectante a validar: CR36 (José Collado, Madrid, España).

Los resultados obtenidos mostraron que había crecimiento microbiológico en las distintas superficies hisopadas previamente a la realización de la limpieza, en tanto que tras la limpieza, no se observó crecimiento microbiológico incluso en las peores condiciones planteadas (no dejando actuar el desinfectante el tiempo estipulado por el fabricante), o con la superficie previamente hisopada con bacterias ambientales, lo que demostró la eficacia del desinfectante y del protocolo de limpieza, concluyendo que el limpiador era eficaz con el protocolo de limpieza establecido, en los dos escenarios planteados, y que era eficaz durante tres meses tras su apertura.

2.5.5. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Los resultados de la validación de la producción se muestran en el capítulo 3.

2.6.Gestión de auditorías internas

En el año 2020, una empresa consultora fue la encargada de realizar la primera auditoría de toda la documentación generada hasta la fecha, siguiendo las directrices de la parte IV de la Guía de NCF, revisando el almacén de materias primas, los controles de calidad realizados, el área de producción, la documentación del sistema de calidad y el análisis de riesgos.

Posteriormente, la empresa consultora realizó un informe en el que se incluían una serie de recomendaciones y observaciones de mejora, no encontrando desviaciones que dieran lugar a la generación de no conformidades, si bien si se detectó que había documentación que podía ser completada y mejorada.

Concluyendo que en ese momento no se cumplía con los requisitos mínimos de la parte IV de la Guía de NCF. Posteriormente se trabajó en las desviaciones encontradas completando la documentación y procedimientos que ayudan a dicho cumplimiento, desarrollando un plan maestro de validación, un estudio de estabilidad, un manual de riesgos, la revisión anual del producto y un manual de calidad.

Un año después, tras la actualización y ampliación de la documentación sugerida por la consultora, se realizó internamente la auditoría siguiendo el PNT descrito, tras la cual se

comprobó que se cumplía con la documentación y normativa exigida actualmente para el cumplimiento de la Guía de NCF.

Capítulo 3

Capítulo 3: Producción del medicamento de terapia avanzada (lamela epitelial) para el tratamiento de la insuficiencia límbica, en la unidad de producción diseñada

1. MATERIAL Y MÉTODO

1.1. PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA

1.1.1. ELABORACIÓN EL MEDIO DE CULTIVO Y DE LAS MEMBRANAS DE PRGF

Para la realización del procedimiento, se obtuvo sangre de donantes voluntarios, siguiendo la regulación 98/2002 (100), previa firma del consentimiento informado, y tras recibir información sobre las posibles consecuencias del estudio a realizar, cumpliendo los Principios de la Declaración de Helsinki (Código de Protocolo: 2020.050; Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias; 23 de marzo del 2020).

Las muestras de sangre de cada voluntario, fueron procesadas de acuerdo al protocolo descrito por *Anitua et al*. (101, 102). Para ello, se recogió la sangre en tubos de 9 mL con citrato sódico 3,8% como anticoagulante, se centrifugó a 580g durante 8 minutos a temperatura ambiente y se recogió el plasma, el cual fue utilizado como suplemento del medio de cultivo y para la elaboración de las membranas de PRGF (Figura 31).

- Medio de cultivo: una parte del plasma se activó con 50 µL/mL de $CaCl_2$ al 10% (B. Braun, Barcelona, España) a 37 °C durante 30 minutos y el sobrenadante obtenido tras la formación y retracción del coágulo de fibrina, el PRGF líquido, se utilizó para preparar el medio de cultivo, con la siguiente composición: 30 mL de DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), 15 mL de Ham F12 (Thermo Fisher Scientific) y 5 mL del PRGF. El medio de cultivo obtenido, se filtró a través de un filtro de 0,20 µm de membrana de poliestirensulfona (Thermo Fisher Scientific), se acondicionó en doble

contenedor de polipropileno, y se almacenó a 4 °C hasta su uso en la nevera de la sala de elaboración de estériles.

- Membranas: otra parte del plasma se recogió, y 10 mL se activaron con 500 µL de $CaCl_2$ al 10% en un pocillo de una placa Petri de 6 pocillos, incubándose a 37 °C durante 30 minutos o hasta la formación de un gel. Una vez que el gel se formó, las membranas de PRGF se elaboraron al introducir los geles en un conformador con soporte de 100 µm (BTI, Vitoria, España) y presionar durante unos segundos. Las membranas se colocaron en un *insert cellcrown* (Scaffdex, Tampere, Finlandia), para su mejor manejo y transporte, y se acondicionaron en un doble contenedor de polipropileno, cubiertas por el plasma sobrante, quedando almacenadas a 4 °C hasta su uso.

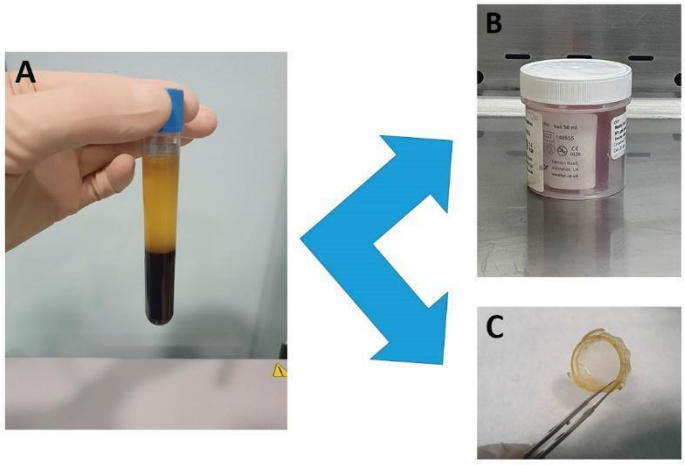


FIGURA 31: Elaboración partiendo del plasma del paciente (A): el medio de cultivo (B) y las membranas de PRGF (C)

1.1.2. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE LIMBO ESCLEROCORNEAL

Se obtuvieron explantes de limbo esclerocorneal procedentes de donantes cadavéricos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (CCST) de acuerdo con el Reglamento (CE) Nº 23/2004 (103). Para ello, la región del limbo esclerocorneal fue cuidadosamente diseccionada de acuerdo a su posición anatómica, y cortada en 13 explantes de aproximadamente 1-2 mm^2 que fueron almacenados a 4 ° C en una botella de Eusol (Alchimia,

Ponte San Nicolò, Italia) hasta su uso. En la unidad de producción de terapias avanzadas, se colocaron 12 explantes en una placa de cultivo de 12 pocillos con el medio de cultivo previamente descrito, y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5% en el incubador.

1.1.3. CAMBIOS DE MEDIO DE CULTIVO

Durante los primeros días de cultivo, se realizó un seguimiento diario de los explantes, añadiendo medio de cultivo según necesidad, evitando que los explantes flotaran en el medio de cultivo o se secaran. Una vez visualizadas las células limbares con el microscopio de contraste de fases, el medio de cultivo se cambió cada 2-3 días.

1.1.4. OBTENCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA (LAMELA EPITELIAL)

Los cultivos de células limbares fueron examinados cada día utilizando el microscopio de contraste de fases situado en la unidad de producción de terapias avanzadas. Cuando se obtuvieron cultivos confluentes y con una morfología adecuada (células pequeñas, redondeadas y uniformes), se realizaron fotos con el microscopio de contraste de fases, y los cultivos fueron tripsinizados, reservando uno de ellos para la realización de pruebas de inmunofluorescencia.

Las suspensiones de células limbares de los cultivos tripsinizados, se centrifugaron a 0,4 rcf (2.100 rpm) durante 10 minutos, posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo suplementado con ácido tranexámico a 1,5 mg/mL (Amchafibrin®; Meda Pharma, Madrid, España) y se contaron con un hemocitómetro. Finalmente, las células limbares fueron sembradas (>300.000 células por membrana) sobre las membranas de PRGF preparadas anteriormente (MTA: lamela epitelial) situadas cada una de ellas en un pocillo de una placa cultivo de 6 pocillos con medio de cultivo y se cultivaron en el incubador de la unidad de producción de terapias avanzadas, cambiándoles el medio cada 24-72 horas.

1.1.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA

Entre las 72 horas y 7 días de cultivo, las lamelas epiteliales fueron acondicionadas en doble contenedor y etiquetadas. Una de las lamelas epiteliales fue fijada para la realización de

pruebas de inmunofluorescencia (MTA de retención), en tanto que la otra, lamela epitelial (MTA que se implanta al paciente), fue liberada una vez chequeados todos los controles de calidad del proceso y producto realizados hasta el momento.

1.1.6. PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizaron pruebas de inmunofluorescencia en el cultivo primario y en el MTA de retención frente a los marcadores citoqueratina (CK) de alto peso molecular (Referencia: M0630, Agilent Dako, Santa Clara, CA, Estados Unidos) y p63-α (Referencia: 4892S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Estados Unidos), para identificar las células epiteliales corneales y las células madre limbares respectivamente, calculando el % de células madre (% de células p63-α).

Para ello, un pocillo del cultivo celular primario y el MTA de retención fueron fijados con metanol durante 10 minutos, lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces durante otros 10 minutos, permeabilizadas con triton 0,3% durante 5 minutos, lavadas de nuevo en PBS, e incubadas con los anticuerpos primarios (CK, 1:40; p63-α, 1:100) conteniendo un 10% de suero de cabra (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) como agente bloqueante, durante la noche. Al día siguiente, las células inmunomarcadas se visualizaron mediante inmunocitoquímica indirecta, se tiñeron con 4 ',6-DiAmidino-2-FenilIndol (DAPI) para visualizar los núcleos y se examinaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B (Leica, Wetzlar, Alemania).

1.2. CONTROLES DE CALIDAD

1.2.1. MONITORIZACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL DEL PROCESO

Como se detalló en el capítulo 2, se realizó un APPCC, para identificar los PCC del procedimiento de producción del MTA, siendo monitorizadas el número de partículas viables y no viables, así como el resto de parámetros físicos en los puntos críticos del procedimiento:

1. Obtención de las membranas de PRGF, obtención del PRGF (suplemento al medio de cultivo) y establecimiento del cultivo primario.
2. Obtención de la lamela epitelial.

3. Acondicionamiento final del MTA.

1.2.2. CONTROLES DE CALIDAD DEL PRODUCTO

Se definieron los siguientes controles de calidad para el producto terminado (MTA):

- **Morfología de las células limbares en el cultivo primario:** examinar la morfología mediante microscopia de contraste de fases que constatasen la morfología óptima de las células de los cultivos realizados.
- **% de células p63-α en el cultivo primario:** se determinó el % de células p63-α mediante inmunofluorescencia. Para ello, una vez realizada la inmunofluorescencia para el marcador p63-α de la manera anteriormente descrita, se capturaron cinco fotografías de campos aleatorios utilizando una cámara Leica DFC310FX con un objetivo de 20x, contándose, las células con tinción positiva para p63-α del total de células positivas para DAPI (%) utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos).
- **Número de células de células del MTA y presencia de células madre:** comprobar la presencia de células en los MTA con el microscopio de contraste de fases, y realizar un DAPI y una inmunofluorescencia para el p63-α, de la forma descrita anteriormente, para constatar el número de células por cm2 (capturando fotografías de cinco campos aleatorios con un objetivo de 20x) y la presencia de células madre en el MTA de retención, respectivamente.
- **Controles microbiológicos:** realizar controles microbiológicos, con la metodología descrita en el capítulo 2, a las siguientes muestras: plasma del paciente, explantes del limbo corneal, cultivo primario el día en el que se obtienen las lamelas epiteliales y al MTA el día de la liberación del mismo. En este último estudio microbiológico (estudio final), al igual que en el estudio microbiológico del medio de cultivo del cultivo primario (estudio intermedio externo), verificar la ausencia de bacterias, hongos, micoplasmas y endotoxinas.

Para ello, se recogieron tres alícuotas de 0,2 mL, 0,4 mL, y 0,5 mL, debido a que, según Farmacopea Europea (83), para realizar el control microbiológico de lotes inferiores a 10 mL, el volumen a inocular, deberá de ser al menos de 0,1 mL. Los estudios intermedios y finales de bacterias, hongos, micoplasmas y endotoxinas fueron subcontratados a una empresa externa, Laboratorios Echevarne (Barcelona, España), la cual tuvo que llevar a cabo previamente la validación de la promoción del crecimiento de los medios de cultivo, donde se comprobó que los métodos seleccionados para el estudio microbiológico eran adecuados para permitir el crecimiento de los posibles microorganismos presentes, siguiendo las indicaciones dadas por la Farmacopea Europea(83). A continuación, se detallan brevemente los procedimientos llevados a cabo:

- **Promoción del crecimiento para el estudio de bacterias y hongos**: el ensayo de promoción del crecimiento fue realizado con Bact-Alert® Microbial Detection System, el cual es un sistema automático de incubación de medios de cultivo para el crecimiento microbiano, en el que las botellas de los medios propios del Bact-Alert® van provistas de un sensor de CO_2 monitorizado en continuo por los lectores del aparato incubador, de manera que cuando el aparato detecta en una botella un aumento de CO_2 de forma exponencial, propia del crecimiento microbiano, se emite una señal visual, alertándose de un posible positivo.

  Los medios de cultivo utilizados fueron iAST para crecimiento aerobio (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) e iNST para crecimiento anaerobio (BioMérieux). Para comprobar la idoneidad del método de ensayo se inocularon microorganismos representativos de bacterias aerobias, bacterias anaerobias, hongos y levaduras a los medios de cultivo seleccionados a los que previamente se les inyectó la muestra del MTA.

  Las cepas inoculadas en el medio iAST fueron *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Micrococcus luteus* ATCC 4698. Las cepas inoculadas en el medio iNST fueron *Clostridium sporogenes* ATCC 19404 y *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

- **Validación del procedimiento específico para la detección y cuantificación de endotoxinas:** la validación de la detección y cuantificación de endotoxinas se realizó mediante el método cinético cromogénico, método D de la Farmacopea Europea (83). Con este método, se pretendió encontrar un rango de concentración o dilución del producto para el que las interferencias del propio producto que pudieran provocar inhibición o potenciación en la detección de las endotoxinas fueran eliminadas o minimizadas, sin que afectara a la posible endotoxina presente. La detección de endotoxinas se realizó sobre diluciones preparadas a partir de la muestra remitida del MTA, no superando estas diluciones la Máxima Dilución Válida (MDV).
- **Estudio de no interferencia de matriz en la detección de micoplasma por PCR**: se siguió el protocolo para el estudio de no interferencia de matriz en la detección de micoplasma validado en Laboratorio Echevarne. El estudio se realizó con el kit Venor®GeM Mycoplasma Detection, empleándose especies de micoplasma a 10 UFCs como control de sensibilidad.

1.3. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIAS AVANZADAS

Se redactó el PNT de validación de la producción de lamelas epiteliales en el que se describió el procedimiento a seguir para validar el proceso de producción del MTA. En este PNT se contempló la realización de una validación prospectiva, con el objetivo de demostrar mediante evidencias debidamente documentadas que el proceso de producción cumplía con lo previsto en el PNT de producción de lamelas epiteliales y que el producto obtenido cumplía con las características definidas en la ficha técnica (Anexo 1).

La validación consistió en la realización de tres lotes consecutivos de producción, para los que se utilizó limbo esclerocorneal de 3 donantes cadáver, cumpliendo con la regulación de la Directiva Europea 23/2004 relativa a las normas de calidad y seguridad para la donación de células y tejidos humanos (103). Cada lote se realizó en las mismas condiciones que se especifican en el PNT de producción de lamelas epiteliales, rellenando las correspondientes guías de validación, en las que se incluía una breve descripción del procedimiento, los parámetros de puntos críticos y sus límites asociados, la relación de equipos utilizados, junto su estado de calibración, y los controles en proceso propuestos con sus criterios de aceptación.

1.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA

Se entiende por estabilidad la capacidad de un medicamento para conservar sus propiedades químicas, físicas y microbiológicas dentro de los límites de calidad especificados, a lo largo de su tiempo de conservación en un ambiente controlado.

Se realizó un estudio de estabilidad con el objetivo de conocer el tiempo que el MTA producido, podía conservarse en el interior del incubador, manteniendo sus características, antes de ser acondicionado para su traslado al quirófano e implantado al paciente.

La realización del estudio de estabilidad, se llevó a cabo durante la realización de los tres lotes de validación de la producción, siguiendo las indicaciones del PNT de producción de lamelas epiteliales, que pueden resumirse en las siguientes etapas:

1. Preparación del medio de cultivo y de las membranas a partir del PRGF obtenido de la sangre del paciente y establecimiento del cultivo primario de limbo esclerocorneal.
2. Cambios de medio del cultivo primario.
3. Obtención de las lamelas epiteliales.
4. Cambio de medio de la lamela epitelial.
5. Liberación del MTA.

El estudio de estabilidad se centró en las etapas 4 y 5: cambio de medio de la lamela epitelial y liberación del MTA respectivamente, para demostrar que el periodo de vida útil dado al MTA en la ficha técnica (hasta 7 días) era adecuado, conservando el medicamento sus especificaciones.

Para ello, se realizaron tres lotes del MTA de acuerdo al protocolo descrito en la guía de validación de la producción de lamelas epiteliales, en los que, una vez establecido el cultivo primario, y obtenidos cultivos confluentes de células limbares, los cultivos se tripsinizaron, se contaron, y se sembró el mismo número de células limbares (> 300.000 células/membrana) sobre dos membranas de PRGF. Transcurridas 72 horas, una de las lamelas epiteliales fue fijada con metanol frío durante 10 minutos, y a la otra se le cambio el medio de cultivo. Transcurridas otras 48 horas, se le cambió el medio de cultivo de nuevo. Finalmente, transcurridas otras 48 horas (7 días desde el día del pase) se fijó la segunda lamela epitelial.

A los tres lotes fabricados se les realizaron los controles de calidad descritos en el punto 1.2.2. de este capítulo, siendo los criterios de aceptación para los MTA producidos, que estos se mantuvieran dentro de las siguientes especificaciones:

- Integridad de las lamelas epiteliales producidas durante el periodo de conservación.
- Número de células dentro del rango establecido (entre 79.000-316.000 células epiteliales corneales alogénicas viables por cm^2).
- Esterilidad durante el periodo de vida útil.

1.5. Diseño de un plan de revisión anual de producto

Se planificó una Revisión Anual del Producto (RAP), que consiste en una evaluación que revisa los estándares de calidad de los productos, para así determinar las necesidades de cambios en sus especificaciones, producción o procedimientos de control, permitiendo establecer evidencia documentada de las condiciones generales en las cuales se encuentra el proceso de manera cualitativa y cuantitativa, determinando la reproducibilidad del proceso y el establecimiento de acciones preventivas y/o correctivas, en caso de ser necesario, que mejoren la calidad del medicamento.

Parar ello, se redactó un PNT en el cual se detalló el procedimiento a seguir, el cual consistió en llevar a cabo el análisis y la evaluación de los datos recopilados en las guías de fabricación correspondientes al periodo de un año, que abarca desde enero a diciembre, verificando la idoneidad de las especificaciones definidas en la ficha técnica del MTA, analizando los problemas detectados o la posibilidad potencial de que surgieran, e identificando las mejoras del proceso que repercutían en la calidad del producto.

2. Resultados

2.1. Producción del medicamento de terapia avanzada

Durante el año 2019, se realizaron cinco lotes del MTA en la unidad de producción de terapias avanzadas siguiendo el sistema de cultivo desarrollado a nivel experimental (104), si bien se

introdujeron pequeñas modificaciones, resultado de la adaptación del sistema de cultivo establecido a las nuevas condiciones de trabajo.

En los lotes realizados, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos a nivel experimental, pudiéndose observar que las células limbares comenzaban a proliferar desde el explante a los 3-4 días obteniéndose cultivos confluentes con morfología indiferenciada (células pequeñas, redondeadas y uniformes) a los 15 días, positivas para el factor de transcripción p63-α, marcador característico de células madre (Figura 32).

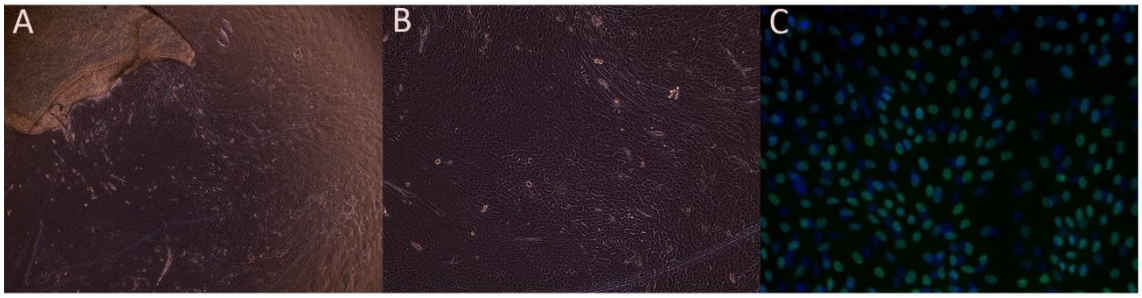


FIGURA 32: Microscopia de contraste de fases de las células limbares proliferando desde el explante (A: 40x) y de las células limbares confluentes (B: 100x). Microscopia de inmunofluorescencia de las células limbares confluentes con los núcleos de todas las célul células limbares marcados en azul (DAPI), y en verde, las células positivas para factor de transcripción p63-α (C: 200x)

Por otro lado, los resultados de los estudios de inmunofluorescencia llevados a cabo en el MTA, demostraron que expresaban nuevamente marcadores característicos de las células limbares indiferenciadas (Figura 33).

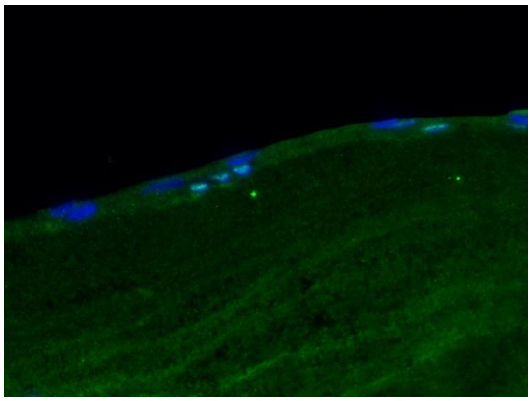


FIGURA 33: Microscopia de inmunofluorescencia del MTA (lamela epitelial), con los núcleos de todas las células limbares marcados en azul (DAPI). En verde, las células positivas para el factor de transcripción p63-α (marcador característico de las células indiferenciadas). 400x

2.2. CONTROLES DE CALIDAD

2.2.1. CONTROLES DE CALIDAD DEL PROCESO

En los 5 lotes fabricados para poner a punto el sistema de producción en la nueva instalación, el recuento de partículas viables y no viables, así como el resto de parámetros monitorizados, durante los tres puntos críticos del proceso productivo, se mantuvieron dentro de los límites marcados (Tabla 22), obteniéndose una no conformidad, tratada en el capítulo 2, respecto a los límites de temperatura del incubador. Tras el estudio de la misma, se concluyó que las temperaturas del incubador fuera de rango eran puntuales (en momentos necesarios de apertura de puerta del incubador), no viéndose afectada la calidad de los lotes producidos.

TABLA 22: Controles de calidad del proceso durante la puesta a punto de la producción

Controles de calidad del proceso						
Lote	Partículas viables			Partículas no viables		
	Proceso crítico 1	Proceso crítico 2	Proceso crítico 3	Proceso crítico 1	Proceso crítico 2	Proceso crítico 3
1	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
2	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
3	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
4	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
5	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0

2.2.2. CONTROLES DE CALIDAD DEL PRODUCTO

En los cinco lotes producidos, se realizaron fotos a los cultivos primarios que constataron la morfología óptima los cultivos realizados (Figura 32). Asimismo, las pruebas de inmunofluorescencia realizadas en el pocillo del cultivo primario fijado (Figura 33), verificaron que él % de células madre del cultivo primario estaban dentro de del rango establecido (> 3%). Además, se comprobó la integridad visual de las lamelas epiteliales, y la presencia de células sobre las mismas con el microscopio de contraste de fases, constatando que el número de células limbares por cm^2 en la lamela epitelial, se encontraba dentro de los límites establecidos en la ficha técnica (79.000-316.000 células/cm^2), con la excepción de en un lote (lote 5), donde el número de células por cm^2 del MTA, estaba ligeramente por debajo del límite permitido en la ficha técnica (Tabla 23).

TABLA 23: Resultados de los controles de calidad del producto durante la puesta a punto de la producción

Controles de calidad del producto				
Lote	Cultivo primario	MTA		
	Células p63-α positivas	Número de células	p-63α	Control microBIOLÓGICO
1	59,68%	86.750 células/cm^2	Positivo	Negativo
2	56,67%	147.422 células/cm^2	Positivo	Negativo
3	67,24%	210.489 células/cm^2	Positivo	Negativo
4	82.75%	196.784 células/cm^2	Positivo	Negativo
5	64,15%	77.436 células/cm^2	N/A	Positivo

Por otro lado, los resultados obtenidos en el ensayo de validación de promoción del crecimiento, realizado para validar los medios de cultivo y por tanto los estudios microbiológicos, fueron los siguientes:

- Promoción del crecimiento de los medios de cultivo en Bact-Alert®: se detectó crecimiento en todas las muestras de medio de cultivo, inoculadas con los microorganismos, a las que se había añadido muestras del MTA, por lo que se concluyó que el método para verificar la esterilidad en el MTA era adecuado y no inactivaba ningún crecimiento microbiano, pudiéndose utilizar los medios de cultivo seleccionados (iNST e iAST), observándose crecimiento en un tiempo inferior a 2 días. Por lo que se demostró que el MTA no tenía actividad antimicrobiana o bien que ésta había sido adecuadamente neutralizada.
- Elección de la dilución para la detección de endotoxinas: teniendo en cuenta las cantidades de endotoxina recuperadas en cada dilución y réplica, se concluyó que la dilución de trabajo para ensayos rutinarios en muestras del MTA sería de 1/10.
- Ensayo de detección de micoplasmas por PCR: los resultados obtenidos en cuanto a la detección de micoplasmas mediante PCR mostraron que el 100% de las especies de micoplasmas probadas eran detectadas.

Con los resultados obtenidos, se pudo concluir la validación de los medios y los ensayos elegidos para realizar el control microbiológico de bacterias, hongos, endotoxinas y micoplasma en las muestras remitidas de producto final del MTA.

Por último, en los estudios microbiológicos realizados a los 5 lotes producidos (Tabla 23), se detectó crecimiento bacteriano, correspondiente a la cepa *Staphilococcus epidermidis* en uno

de ellos (lote 5). Esto conllevó la apertura y ejecución de un informe de no conformidad, de la manera detallada en el capítulo 2.

2.3. VALIDACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO DE TERAPIAS AVANZADAS

Tras la cualificación de las instalaciones y de los aparatos, se procedió a la validación prospectiva de la producción, mediante la elaboración de tres lotes consecutivos del MTA. En los tres lotes fabricados, el número de partículas viables y no viables se mantuvieron dentro de los límites permitidos en los tres puntos críticos de la fabricación del MTA (Tabla 24).

TABLA 24: Resultados de la monitorización de partículas viables y no viables de los tres puntos críticos durante la validación de la producción

Lote	Partículas viables			Partículas no viables		
	Proceso crítico 1	Proceso crítico 2	Proceso crítico 3	Proceso crítico 1	Proceso crítico 2	Proceso crítico 3
1	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
2	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
3	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0

Además, en los tres lotes realizados, las células comenzaron a proliferar desde el explante al pocillo de cultivo después de 4-8 días, obteniéndose una monocapa de células limbares confluentes tras aproximadamente 15 días de cultivo (Figura 34). El análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia mostró que estas células eran CK y p63-α positivas, siendo el porcentaje de células p63-α positivas en el cultivo primario (Tabla 25) del 76,38 ± 1,49 % (72,03-80,31%) un porcentaje dentro del límite establecido en la ficha técnica (> 3%).

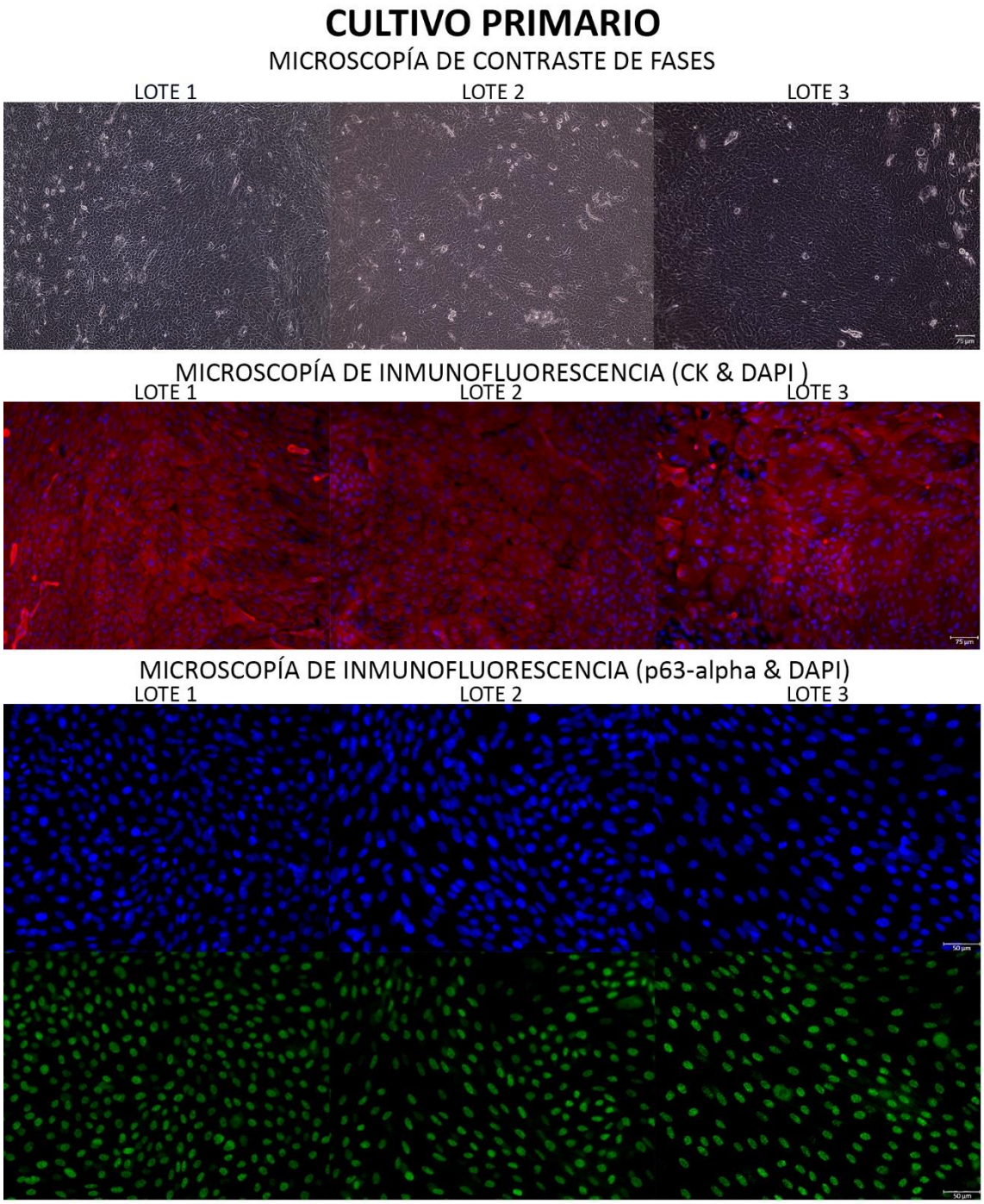


FIGURA 34: Microscopía de contraste de fases (escala: 75 µm) e inmunofluorescencia de las células limbares del cultivo primario en las que las células CK positivas aparecen en rojo (escala: 75 µm), las p63-α positivas en verde (escala: 50 µm) y el DAPI aparece en azul (escala: 50 µm). CK: citoqueratina. DAPI: 4 ',6-DiAmidino-2-FenilIndol

TABLA 25: Resultados de los controles de calidad del producto durante la validación de la producción

Lote	Cultivo primario	MTA		
	Células p63-α positivas	Número de células	Células p63-α positivas	Microbiología
1	72,03%	141.967 células/cm^2	82,37%	Negativo
2	76,79%	171.504 células/cm^2	44,89%	Negativo
3	80,31%	104.466 células/cm^2	44,55%	Negativo

El análisis del MTA mediante DAPI (Figura 35) concluyó que el número de células madre limbares (Tabla 25) era de 139.306 ± 10.160 células/cm^2 (104.446–171.504 células/cm^2), cumpliendo con los límites establecidos en ficha técnica (79.000-316.000 células/cm^2), siendo además CK y p63-α positivas (Figura 35), con un porcentaje de células p63-α positivas del 57,27 ± 5,91% (44,55-82,37%).

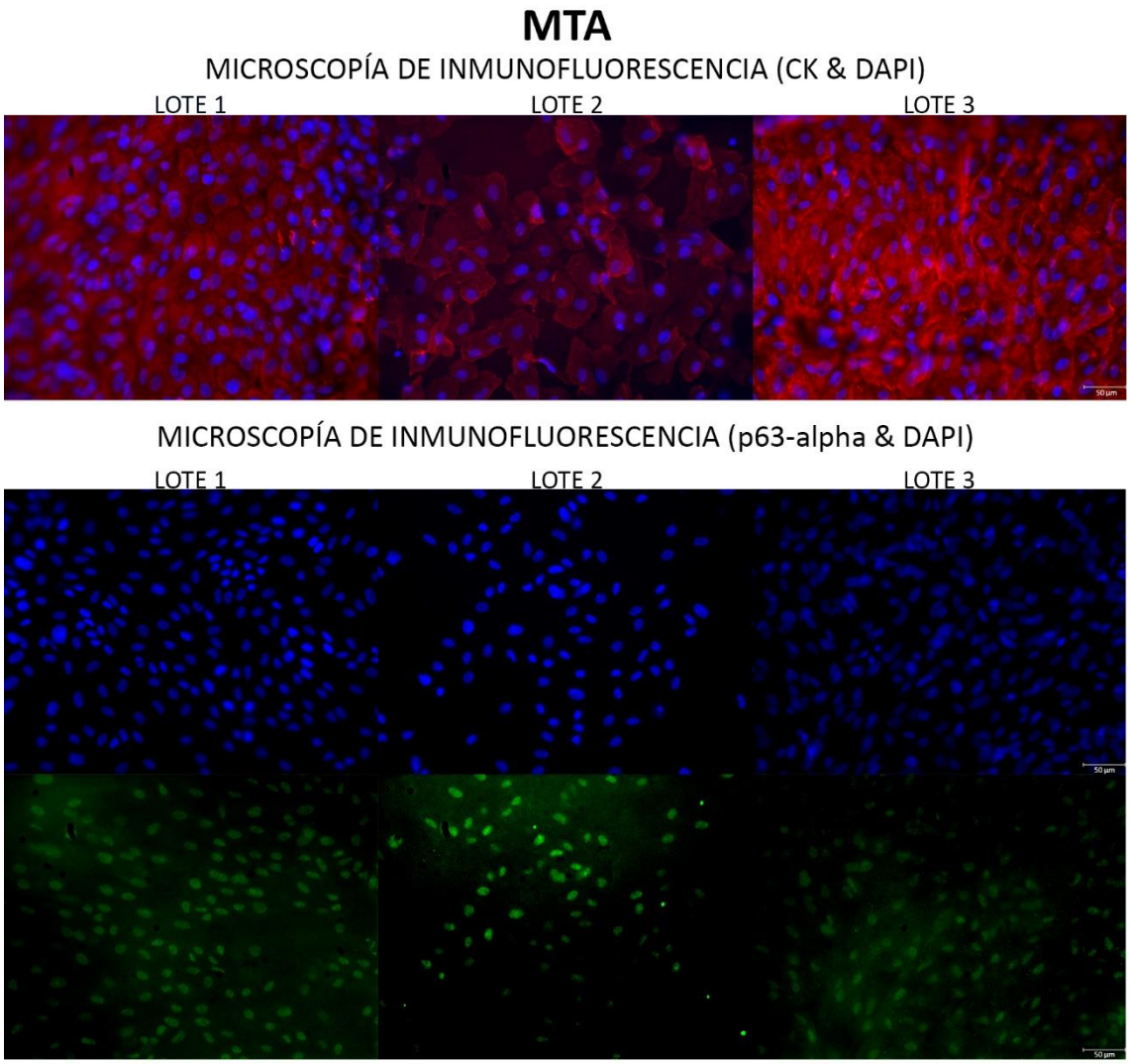


FIGURA 35: Microscopia de inmunofluorescencia del medicamento de terapia avanzada, donde se muestra en rojo la CK, en verde las células p63-α positivas y en azul el DAPI (escala 50 µm). MTA: Medicamento de terapia avanzada. CK: citoqueratina

Finalmente, no sé obtuvo contaminación microbiológica en los estudios microbiológicos iniciales (plasma del paciente), intermedios (sobrenadante del cultivo primario) y finales (MTA) realizados, en los tres lotes fabricados (Tabla 25).

2.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO DE TERAPIA AVANZADA

La realización del estudio de estabilidad quedó documentada en las tres guías de validación de la producción de lamelas epiteliales y en el informe de estabilidad (Figura 36), donde se indicaron las operaciones realizadas y donde se muestran los resultados obtenidos, respectivamente. Se pudo observar que, en los tres lotes de validación realizados, los MTA fabricados cumplieron con los criterios de integridad, esterilidad y número de células dentro de los límites establecidos en la ficha técnica, pudiendo concluir, que el MTA puede conservarse en el interior del incubador durante un periodo de 7 días, manteniendo sus características, antes de ser acondicionado para su traslado al quirófano y ser implantado al paciente.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD

VERSIÓN: 01
Fecha: 13-08-2020

Anexo I. Informe de Estabilidad

REGISTRO DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD					AÑO: 2021	
CRITERIOS	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	Membrana 1 (3 días)	Membrana 2 (7 días)	Membrana 1 (3 días)	Membrana 2 (7 días)	Membrana 1 (3 días)	Membrana 2 (7 días)
Integridad	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Número de Células	141.967	149.950	171.504	133.584	104.446	127065
Esterilidad	+	+	+	+	+	+

OBSERVACIONES:

Las membranas han cumplido los criterios de integridad, número de células y esterilidad, en los tres lotes fabricados.

CONCLUSIÓN:

El Medicamento de Terapias Avanzadas producido en la UTA, puede conservarse en el interior del Incubador 27-MINICELL NB-203M durante un periodo de 7 días, manteniendo sus características, antes de ser acondicionado para su traslado al quirófano, e implantado al paciente.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

Integridad de las Lamelas Epiteliales.

Número de células: 79.000-316.000 células/cm².

Esterilidad durante el periodo de vida útil (Resultado +: es estéril; Resultado -: no es estéril.

FIRMA DEL RESPONSABLE DE PRODUCCIÓN:

FECHA: 16/08/2021

FIRMA DEL RESPONSABLE DE CALIDAD:	FIRMA DE LA PERSONA CUALIFICADA:
FECHA: 16/08/2021	FECHA: 16-8-2021

FIGURA 36: Informe del estudio de estabilidad del medicamento de terapia avanzada

2.5. DISEÑO DE UN PLAN DE REVISIÓN ANUAL DE PRODUCTO

Siguiendo el PNT de revisión anual del producto, se revisaron las producciones de 2019, ya que el 2020, debido a la pandemia provocada por el SARS-COV2, no hubo producciones. Como resultados más importantes de la revisión realizada, la cual se muestra al completo en la Figura 37, cabe destacar que:

- El tiempo medio de duración del cultivo primario fue de 14,4 ± 0,75 días.
- El tiempo medio de duración de un lote fue de 17,6 ± 1,03 días.
- La media de cultivos de morfología óptima por lote fue de 6,4 ± 1,21 cultivos.

- La media de células limbares obtenidas en el cultivo primario fue de 1.245.000 ± 419.533 células.
- La media del % de células p63-α positivas en el cultivo primario fue del 66,10 ± 4,54%.
- La media de células sembradas sobre las membranas de PRGF fue de 785.000 ± 236.590 células/membrana.
- La media de células por cm2 en el MTA fue de 143.776 ± 27.319 células/cm2.

Por otro lado, en tres de los lotes fabricados se encontraron desviaciones relacionadas con la temperatura del incubador, en momentos puntuales de la producción, que conllevaron la apertura de un informe de no conformidad, como se ha detallado previamente en el capítulo 2. Tras el estudio de la desviación, se llevó a cabo la liberación de estos tres lotes, ya que quedó analizado, y debidamente justificado, que la desviación ocurrida no afectaba a la calidad de los MTA producidos.

En cuanto a los otros dos lotes, uno de ellos fue liberado y el otro rechazado (lote 5) ya que el número de células por cm^2 en el MTA estaba ligeramente por debajo del límite permitido en la ficha técnica y se detectó crecimiento bacteriano en el MTA, si bien, como se explica en el capítulo 2, esta desviación conllevó la apertura de un informe de no conformidad y la instauración de una medida correctiva consistente en la introducción en la fabricación de un control microbiológico intermedio externo de bacterias, micoplasma y endotoxinas.

<table>
<tr><td colspan="3">INFORME DE LA REVISIÓN ANUAL DEL PRODUCTO</td><td>AÑO: 2019.</td></tr>
<tr><td colspan="2">FECHA DE APERTURA: 30/07/2020.</td><td colspan="2">INICIADA POR (Cargo): NVM (Responsable de producción).</td></tr>
<tr><td colspan="2">NOMBRE DEL PRODUCTO: LiCexST 79.000 y 316.000 células/cm^2 equivalente de tejido vivo.</td><td colspan="2">COMPOSICIÓN: Membrana circular de fibrina autóloga que contiene entre 79.000-316.000 células/cm2 células epiteliales corneales alogénicas viables entre las cuales un promedio de >3% son células madre limbares, así como células amplificadoras derivadas de células de célula madre y células terminalmente diferenciadas, adheridas a una capa de soporte de fibrina de 5,3 cm^2 de área.</td></tr>
<tr><td colspan="4">LOTES FABRICADOS: 5.</td></tr>
<tr><td>LIBERADOS: 1.</td><td>RECHAZADOS: 1.</td><td colspan="2">LIBERADOS CON DESVIACIONES: 3.</td></tr>
</table>

REVISIÓN DEL RENDIMIENTO (TIEMPO)											
DURACIÓN MEDIA DEL LOTE: 17,6 ± 1,030 días.						**DURACIÓN MEDIA DEL CULTIVO PRIMARIO: 14,4 ± 0,748 días.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
15 días	21 días	16 días	18 días	18 días	N/A	12 días	16 días	14 días	16 días	14 días	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DURACIÓN DE LAS ETAPAS											
Elaboración y Establecimiento del Cultivo Primario: 1h 28 ± 19,89 min.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
48 min	1h 54 min	1h 39 min	37 min	2h 22 min	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Obtención de Lamelas Epiteliales: 1h 45 ± 22,93min.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
1h 20 min	2h 28 min	36 min	2h 42 min	1h 39 min	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Acondicionamiento y Traslado: 46 ± 7,58 min.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
36 min	38 min	1h 15 min	47 min	34 min	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CAMBIOS DE MEDIO CULTIVO PRIMARIO: 8,4 ± 0,75 veces.						**CAMBIOS DE MEDIO LAMELA EPITELIAL: 1,6 ± 0,24 veces.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
7	9	8	11	7	N/A	**2**	**2**	**1**	**1**	**2**	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

REVISIÓN DE LOS DATOS DEL PROCESO											
VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO OBTENIDO: 120 ± 12,25 mL.						**MEMBRANAS DE PRGF REALIZADAS: 2,2 ± 0,37.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
100 mL	100 mL	150 mL	150 mL	100 mL	N/A	2	1	3	2	3	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NÚMERO DE EXPLANTES SEMBRADOS: 12.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
12	12	12	12	12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NÚMERO DE EXPLANTES DE LOS QUE SE OBTUVIERON CULTIVOS: 6,4 ± 1,21.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
5	4	6	6	11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Número de cultivos óptimos: 6,4 ± 1,21.						**Número de cultivos no óptimos: 0.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
5	4	6	6	11	N/A	0	0	0	0	0	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
NÚMERO DE EXPLANTES UTILIZADOS: 6,4 ± 1,21.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
5	4	6	6	11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Se pasaron a membrana: 4,4 ± 0,40.						**Se fijaron: 2 ± 1.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
4	3	5	5	5	N/A	1	1	1	1	6	N/A

LOTE 7	LOTE 8	LOTE 9	LOTE 10	LOTE 11	LOTE 12	LOTE 7	LOTE 8	LOTE 9	LOTE 10	LOTE 11	LOTE 12
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NÚMERO DE CÉLULAS OBTENIDAS: 1.245.000 ± 419.553.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
500.000	225.000	2.600.000	1.400.000	1.500.000	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Número de membranas sembradas: 1,6 ± 0,40.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
1	1	2	1	3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NÚMERO DE CÉLULAS/MEMBRANA: 785.000 ± 236.590.											
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
500.000	225.000	1.300.000	1.400.000	500.000	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Membranas utilizadas (paciente): 0.						**Se fijaron: 1,6 ± 0,40.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
0	0	0	0	0	N/A	1	1	2	1	3	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

REVISIÓN DE LOS CONTROLES REALIZADOS											
PARÁMETROS FÍSICOS											
AISLADOR						**INCUBADOR**					
Aptos: 5. **No Aptos: 0.**						**Aptos: 2.** **No Aptos: 3 (puntual).**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A	No apto punt.	No apto punt.	Apto	No apto punt.	Apto	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CONTROLES AMBIENTALES											
PARTÍCULAS NO VIABLES						**PARTÍCULAS VIABLES**					
Aptos: 5. **No Aptos: 0.**						**Aptos: 5.** **No Aptos: 0.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A	Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CONTROLES DEL PRODUCTO											
MICROBIOLOGÍA											
INTERNOS						**EXTERNOS**					
Suplemento del medio de cultivo Aptos: 5 **Suplemento del medio de cultivo no Aptos: 0**						**BACTERIAS Aptos: 4.** **BACTERIAS no Aptos: 1 (venia del limbo).**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A	Validación	Validación	Apto	Apto	No apto	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Membrana de PRGF Aptos: 5						**HONGOS Aptos: 5.**					

Membrana de PRGF no Aptos: 0						**HONGOS no Aptos: 0.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A	Validación	Validación	Apto	Apto	Apto	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
EXPLANTE Aptos: 5. **EXPLANTE no Aptos: 0.**						**MICOPLASMA Aptos: 3.** **MICOPLASMA no Aptos: 0.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A	Validación	Validación	N/A	Apto	N/A	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SOBRENADANTE Aptos: 5. **SOBRENADANTE no Aptos: 0.**						**ENDOTOXINAS Aptos: 1.** **ENDOTOXINAS no Aptos: 0.**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
Apto	Apto	Apto	Apto	Apto	N/A	N/A	N/A	N/A	Validación	N/A	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
COMPOSICIÓN											
%p63-α: 66,10 ± 4,54%						**DAPI (Células/cm^2): 143.776 ± 27.319 (media ± ESM)**					
LOTE 1	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**	**LOTE 1**	**LOTE 2**	**LOTE 3**	**LOTE 4**	**LOTE 5**	**LOTE 6**
59,68%	56,67%	67,24%	82,75%	64,15%	N/A	86.750	147.422	210.489	196.784	77.436 86.350 58.809	N/A
LOTE 7	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**	**LOTE 7**	**LOTE 8**	**LOTE 9**	**LOTE 10**	**LOTE 11**	**LOTE 12**
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

RESULTADOS DEL INFORME					
PROBLEMAS DETECTADOS: la temperatura del incubador estuvo fuera de rango, puntualmente, en relación a momentos de apertura de la puerta. En su momento se abrió un informe de no Conformidad y se estudió el efecto de la apertura de la puerta durante la cualificación del incubador, concluyéndose que esta desviación no afecta a la producción. En uno de los cinco lotes producidos, el número de células sobre la membrana estuvo ligeramente por debajo de los límites definidos, además se detectó crecimiento bacteriano en el producto final, que generó la apertura de un informe de no conformidad.					
MEJORAS DEL PROCESO PROPUESTAS: mayor control sobre la apertura de puerta del incubador. Abrirla durante el menor tiempo posible. En caso de tener que abrirla de manera consecutiva, dejar recuperar la temperatura del incubador antes de abrir.					
ACCIONES CORRECTIVAS/PREVENTIVAS PROPUESTAS: ninguna.					
CONCLUSIONES: cuatro de los cinco lotes producidos cumplen los criterios de calidad definidos.					
CUMPLE				**X**	**NO CUMPLE**
FECHA DE CIERRE:					**REALIZADO POR: NVM**
¿Generó acción correctiva?	**SI**		**NO**	**X**	**NÚMERO DE ACCIÓN:**
¿Generó acción preventiva?	**SI**		**NO**	**X**	
FIRMA DEL RESPONSABLE DE CALIDAD: SBP FECHA DE APROBACIÓN: 31/07/2020			FIRMA DE LA PERSONA CUALIFICADA: AMI FECHA DE APROBACIÓN: 31/07/2020		

FIGURA 37: Informe de la revisión anual del producto de 2019

Discusión

Discusión

Los MTA han supuesto el nacimiento de una nueva era de medicamentos de uso humano (105), y suponen una evolución en la terapéutica, para tratar enfermedades incurables con los medicamentos comercializados y con las técnicas quirúrgicas disponibles actualmente.

Durante años, carecieron de regulación debido a que sus características los hacían diferentes a los medicamentos de síntesis química, haciendo que fueran más difíciles de regular con la legislación que existía para éstos últimos (106).

En respuesta a los rápidos avances en este campo, se aprobó en 2007, y con entrada en vigor en 2008, el Reglamento (CE) Nº 1394/2007 del Parlamento Europeo (20), el cual regula la autorización de los MTA por procedimiento centralizado a través de la EMA, asegurando requisitos fundamentales como son: la seguridad, la calidad y la eficacia (107-109). Este reglamento también ayuda a clasificar los MTA, una tarea difícil en muchas ocasiones, ya que su clasificación depende del grado de manipulación sustancial al que son sometidos o de la función que ejerzan en el donante y en el receptor (110).

Este Reglamento surgió de la necesidad de evitar la fragmentación que se estaba sufriendo en Europa, donde se estaban aprobando los MTA de manera diferente sin criterios comunes, considerándolos como medicamentos o como tejidos en función del criterio de la agencia reguladora encargada de su revisión y autorización. La gran ventaja tras la aplicación de la nueva normativa fue también la creación del CAT, una comisión que clasifica y evalúa los MTA (111), y que está en constante comunicación con los productores de los mismos (63).

Con el Reglamento (CE) Nº 1394/2007 se pretendía facilitar el acceso y la equidad de los nuevos MTA a los pacientes. Para ello se han creado por parte de la EMA, planes de acción e iniciativas para apoyar a los investigadores y productores de MTA con el objetivo de hacer llegar estos medicamentos al mayor número de pacientes (112-114), como es el caso del plan PRIME, gracias al cual, pequeñas y medianas empresas productoras de MTA se pueden beneficiar de facilidades para el desarrollo y la comercialización de estos medicamentos (115).

El Reglamento (CE) Nº 1394/2007 se aprobó con la condición de que se concediera un periodo de transición de tres años para el registro de producto en el mercado nacional, así pues en Europa, concretamente en Inglaterra, en 2008, se publicó la primera producción de terapia avanzada que consistía en la expansión *ex vivo* de células madre limbares cumpliendo con la

normativa vigente (116), y años más tarde, en 2015 en España, se publicó el primer trabajo de una serie de casos tratados con células madre para la regeneración corneal cumpliendo las NCF (117).

Sin embargo, la estimación de tres años fue optimista, lo cual se demuestra con los datos obtenidos una década después de su aprobación, en 2017, donde sólo seis MTA habían sido aprobados y tres de ellos se tuvieron que retirar por razones comerciales y no de seguridad (118, 119). Actualmente, existen en el mercado 10 terapias génicas, 1 terapia celular, 10 productos de ingeniería de tejidos y 1 vacuna antitumoral aprobadas por la EMA de manera centralizada (120). Esto es consecuencia de que la rentabilidad económica que se debe mantener para la producción de MTA (121) resulta inviable debido a las exigencias normativas que requiere su producción (122). Si a ello se suma, que la mayoría de las enfermedades a tratar con los MTA son consideradas enfermedades raras, que afectan a 1 de cada 2.000 personas, se abre más la brecha entre los costes de producción y la rentabilidad.

Otro hándicap para conseguir la traslación clínica de los resultados alcanzados a nivel experimental, es la gran diferencia en términos regulatorios entre las dos grandes agencias del medicamento, la EMA y la Agencia americana del medicamento (*U.S. Food and Drug Administration*: FDA) (80), a pesar de que llevan años de colaboración, y trabajan para reforzarla en cuanto a la regulación y seguimiento de los MTA aprobados (123, 124). Dentro de la UE también existen diferencias entre las agencias reguladoras nacionales en cuanto a guías de producción y financiación de los MTA (125), es por ello que se debe de realizar estos esfuerzos de colaboración entre agencias reguladoras y fabricantes, para lograr la comercialización de los MTA desarrollados y que éstos puedan llegar a los pacientes (126).

El éxito del avance en la ciencia en cuanto a la investigación y producción de terapias avanzadas, no se logra si no se consiguen trasladar a la práctica clínica, y que los pacientes puedan beneficiarse de los tratamientos desarrollados (127). Para conseguirlo, tienen que colaborar activamente los productores de MTA y las agencias reguladoras para buscar soluciones y poder hacer llegar los tratamientos a los pacientes (128). En este sentido, en países como Alemania, ya se ha iniciado la producción de MTA, cumpliendo las NCF, en pequeños laboratorios, para hacer llegar una terapia avanzada a pacientes con ulceras venosas crónicas resistentes al tratamiento habitual (129).

Para facilitar la producción a pequeña escala de los MTA, el Reglamento (CE) Nº 1394/2007 contempla el criterio de “exención hospitalaria”, esto incluye MTA producidos en el entorno

de un hospital para un solo paciente, donde el hospital es el responsable del seguimiento de la producción y de garantizar las condiciones estrictas de calidad que requiere la fabricación de medicamentos, que son las NCF (71). El procedimiento de autorización de los MTA que se acojan a este criterio de exclusión, depende de las autoridades nacionales, en el caso de España, de la AEMPS, la cual tiene que velar por el cumplimiento del RD 477/2014 (64), que regula los medicamentos preparados ocasionalmente, de acuerdo a criterios de calidad, administrados en una institución hospitalaria y bajo la responsabilidad de un clínico. La AEMPS deberá acreditar que el centro productor cumple las NCF y autorizar el uso del MTA para una indicación concreta. Estos MTA responden a una prescripción médica individual, y el proceso de producción es exclusivo para un solo paciente.

En un futuro próximo es esperable que, el número de MTA aprobados por esta vía de "exención hospitalaria" aumente exponencialmente, debido a que actualmente se está viviendo un periodo de aumento de solicitudes de autorización de uso de MTA por parte de instituciones hospitalarias.

La normativa en cuanto a producción y sistema de calidad exigible a estos medicamentos de "exención hospitalaria" es igual de exigente que la aplicada a los medicamentos aprobados por autorización centralizada a través de la EMA. De manera que para asegurar que cumplen con la calidad exigible, las instalaciones de producción de los MTA, deben ser entornos muy controlados, como las salas blancas tradicionales, con la gran limitación que supone sus costes de instalación y mantenimiento, que incrementan notablemente los gastos de producción. En este aspecto, existe de nuevo una enorme diferencia entre las agencias regulatorias europea (EMA) y americana (FDA), ya que aunque ambas exigen un ambiente clase A para la producción de MTA, el entorno de trabajo exigible por la EMA es grado B, mientras que por la FDA es grado C(80). Esto demuestra que en Europa la legislación en cuanto a la producción de MTA es más estricta, comparada con la de la legislación americana (130).

El uso de instalaciones que requieran un simple mantenimiento, cumpliendo con las NCF son una alternativa real a las salas blancas convencionales, existiendo en el mercado instalaciones sofisticadas, destinadas a la producción celular y de MTA en la industria farmacéutica, como por ejemplo son *Cell Processing Workstation System*® (Panasonic), *Isocell pro*® (Tecomak) y *Cell Processing Isolator*® (ESCO), los cuales se presentan como sistemas integrados en los que se realiza toda la producción. Sin embargo, estos sistemas han sido diseñados para la producción en continuo de grandes lotes de producto, no para una producción aislada de lotes, por lo que estas innovadoras instalaciones también carecen de rentabilidad para la producción de

pequeños volúmenes de MTA de manera aislada, como es el caso de la producción de un medicamento para el tratamiento de la insuficiencia límbica, donde debido al tamaño del globo ocular, con sólo unos pocos cm^2 del mismo va a ser suficiente para tratar esta patología.

En el presente trabajo de investigación, se lleva a cabo el desarrollo de una unidad de producción con la que realizar la traslación a la práctica clínica de la elaboración de un MTA para el tratamiento de los pacientes que sufren insuficiencia límbica o déficit limbar. El medicamento producido, se obtiene gracias al cultivo de células madre limbares sobre una membrana de PRGF y es considerado una terapia avanzada, en concreto un producto de ingeniería tisular, al no estar incluido el cultivo celular en las manipulaciones no sustanciales recogidas en el Anexo I del Reglamento (CE) Nº 1394/2007 y al tener como objetivo terapéutico la regeneración de tejido dañado, respectivamente.

La producción del MTA desarrollado a nivel experimental, se acoge al criterio de "exención hospitalaria", debido a que va a ser producido, dentro del SFH de un hospital monográfico en oftalmología, el Instituto Oftalmológico Fernández Vega, para un paciente en concreto, siendo el hospital el responsable de garantizar todas las medidas de control, debiendo cumplir el RD 477/2014.

El SFH además de ser de ayuda en la producción del MTA, debido a su amplia experiencia en la elaboración de medicamentos, también es un pilar básico a la hora de realizar la farmacovigilancia cuando se empiece a utilizar el medicamento desarrollado en pacientes, un punto muy importante e imprescindible para establecer un procedimiento seguro de vigilancia postimplantación (131).

Para la producción del MTA, se ha desarrollado una instalación no convencional, consistente en un diseño aislado del ambiente exterior, un aislador, de acuerdo a lo establecido en el punto 9.41 de la parte IV de las NCF.

La idea de la producción de MTA dentro de aisladores, ha sido revisada recientemente por *Zanini et al*. (80), donde resalta las ventajas de producir MTA dentro de sistemas cerrados. Estas instalaciones se deben adaptar al cumplimiento de las normas ISO 14644-7 (132), teniendo que tener una diferencia de presión positiva respecto al ambiente que les rodea y una rápida y fácil descontaminación lo que asegura su esterilidad, siendo esta superior a la ofrecida por los sistemas abiertos.

Tomando como referente a los aisladores que actualmente existen en el mercado, en este trabajo de investigación se diseñó una unidad de producción de terapias avanzadas, utilizando un aislador en el que se incluyó todo el equipamiento necesario para llevar a cabo la producción, sin necesidad de exponer los productos intermedios al ambiente exterior durante la producción.

Durante el diseño de la unidad de producción de terapias avanzadas, se llevó a cabo el establecimiento de los requerimientos que debían cumplir los aparatos necesarios para llevar a cabo la fabricación del MTA, y posteriormente, se realizó una búsqueda de los mismos, siendo un hándicap el tener que adaptarlos al limitado espacio disponible en la instalación elegida. Y es que, a pesar de que la producción de MTA necesita un equipamiento reducido (un incubador, una centrífuga y un microscopio), las dimensiones de la mayoría de los equipos existentes en el mercado eran muy superiores a los requerimientos de usuario especificados, y no permitían su instalación en el espacio disponible.

Para el cumplimiento de las NCF, toda instalación para la producción de terapias avanzadas debe de estar debidamente cualificada. La cualificación de la unidad de producción demostró que cumple con las NCF, ya que el ambiente de trabajo es ISO 4 (grado exigible para la producción de los medicamentos), tiene presión positiva (lo que disminuye los riesgos de contaminación), tiene flujo laminar sin turbulencias (lo que evita las interferencias del mismo y minimiza la contaminación) y tiene unos parámetros físicos dentro de los límites establecidos previamente.

Para verificar el ambiente de grado A necesario para la producción de MTA, se desarrolló un plan de monitorización que permitió detectar fallos y llegar al cumplimiento de los criterios de calidad requeridos según las NCF. El plan de monitorización ambiental realizado durante la instalación y cualificación de la unidad de producción, así como el llevado a cabo durante las producciones, permitieron identificar procedimientos susceptibles de mejora, ayudando a llevar a cabo una mejora continua en el procedimiento de producción del MTA.

Para asegurar una correcta producción es vital desarrollar un sistema de calidad farmacéutico, el cuál es una herramienta de mejora continua durante la producción de los MTA, para poder cumplir con las NCF. Son sistemas “vivos” que cambian con el tiempo adaptándose a las mejoras, con las acciones correctivas y preventivas que se van introduciendo en los procesos, los equipos... (133, 134).

En este trabajo de investigación se tuvo que implementar un sistema de calidad farmacéutico adaptado a esta instalación novedosa para el cumplimiento de las NCF. En este sentido, el sistema de calidad desarrollado es similar al de las salas blancas convencionales, por lo que, desde el punto de vista documental, la producción del MTA no se beneficia de la simplicidad de la instalación para el cumplimiento de las NCF, teniéndose que redactar todos los procedimientos de trabajo y los registros necesarios para asegurar la trazabilidad y monitorizar todas las etapas de la producción, y de esta forma garantizar el cumplimiento de las NCF.

El manual de riesgos elaborado, donde se analizaron todas las etapas en la producción del MTA, ha servido para identificar los PCC en la producción, en los que se estableció una monitorización continua para controlar todos los parámetros que pudieran afectar a la calidad del producto final (partículas viables, no viables, parámetros físicos, así como los controles microbiológicos del producto). La realización del análisis de los riesgos del proceso de producción, de auditorías internas, y de la revisión anual del producto, permitieron detectar los puntos débiles en el sistema de producción, procediendo a su mejora continua mediante la realización de las acciones correctivas oportunas.

Las actividades de validación y cualificación desarrolladas para asegurar que los procesos y los equipos cumplen con las NCF (71), deben ser detalladas en el PMV (122). En este trabajo de investigación, se ha elaborado un PMV, donde se detalla la capacitación del personal involucrado en la producción del MTA, la cualificación de los proveedores de materiales y servicios, la cualificación de los locales y equipos, así como la validación de procesos como son la limpieza y la producción.

La capacitación del personal se ha logrado mediante la realización y evaluación de acciones formativas anuales tras las cuales, todo el personal involucrado en la unidad de producción ha demostrado ser conocedor de las NCF y de los procedimientos que le aplican. Incluida en esta capacitación, la validación de la técnica aséptica es vital para asegurarnos que los trabajadores implicados en la producción realizan su trabajo de manera segura, sin incurrir en un aumento del riesgo de contaminación microbiológica durante las etapas de la elaboración del MTA. En este trabajo de investigación se tuvo que adaptar el procedimiento de validación de la técnica aséptica a las características particulares de la producción, demostrando el personal que está capacitado para trabajar en las condiciones de asepsia que requiere la fabricación del MTA.

La producción de MTA de acuerdo a las NCF requiere que todas las materias primas y el material de acondicionamiento utilizados cumplan la calidad exigida por la Farmacopea

Europea (83) y tenga marcado CE, respectivamente. La traslación clínica de los resultados experimentales, se encuentra con el hándicap de que muchos productos contienen la indicación de aptos para su uso solo en investigación, no existiendo actualmente en el mercado una alternativa disponible que cumpla con los requisitos marcados por las NCF. Este hecho es entendido por las agencias regulatorias, quienes permiten el uso de estos productos, que han demostrado no suponer un riesgo para los pacientes, si bien exigen que los proveedores de los mismos sean cualificados con los mismos criterios que los proveedores de productos farmacéuticos. La producción del MTA que se realiza en este trabajo de investigación no es una excepción, y también cuenta con materias primas con indicación de aptas para su uso solo en investigación, habiéndose realizado la evaluación anual de todos los proveedores, lo cual asegura en último término, la calidad de todos los materiales implicados en la producción del MTA.

En el PMV se define también la cualificación de los equipos implicados en el proceso de producción del MTA, que ha permitido garantizar una producción fiable, homogénea y reproducible, demostrando que los equipos funcionan correctamente, sin existir desviaciones que puedan afectar al proceso de producción y comprometer la calidad del producto final.

La validación de la limpieza en la industria farmacéutica tiene dos objetivos, por un lado, medir la contaminación química cruzada entre productos (80), que puedan tener efectos nocivos en la administración a los pacientes, esto puede ocurrir cuando en una misma línea de producción se elabora más de un fármaco diferente (135), y por otro lado, medir la contaminación microbiológica (136), demostrando que con el protocolo de limpieza establecido se elimina cualquier microorganismo que pueda poner en peligro la producción de medicamentos. En este aspecto, la instalación desarrollada para la producción del MTA, evita la posibilidad de que exista riesgo de mezclado y contaminación, al tratarse de una producción de lotes únicos. Por otro lado, los resultados de la validación de la limpieza realizada, han demostrado que ésta cumple con el objetivo descrito demostrando su eficacia.

En el presente trabajo de investigación, el MTA objeto de la traslación a la práctica clínica, consiste en una expansión *in vitro* de células madre limbares utilizando el PRGF como único suplemento del medio de cultivo y como *scaffold* que permite el crecimiento y el trasplante de las células (102), el cual ha demostrado su eficacia *in vivo*, regenerando la superficie corneal en un modelo animal de quemaduras precursoras de la insuficiencia límbica (137, 138).

La producción del MTA utilizando PRGF como único suplemento del medio de cultivo, ha demostrado una mayor proliferación celular, una mayor eficiencia en la formación de colonias y un aumento en la expresión de células madre p63-α con respecto al uso del suero bovino fetal (SBF) en estudios previos (102, 104). Esto supone una ventaja competitiva frente al MTA comercializado (53), al evitar el uso de productos xenogénicos que pueden aumentar la posibilidad de aparición de reacciones alérgicas y reacciones adversas (139, 140), que presentan variaciones en cuanto a inmunogenicidad entre lotes (141) y en los que existe la posibilidad de transmisión de enfermedades debido a priones, bacterias o virus (142). Además, el uso de estos productos debe de cumplir las normas europeas de la EMA respecto al uso de productos xenogénicos para la expansión celular (143).

El MTA producido utiliza como soporte para el crecimiento y trasplante de las células madre limbares una membrana de fibrina de origen autólogo, elaborada a partir de la propia sangre del paciente, una membrana, que ha demostrado ser apta para su uso en clínica (144). Además, ofrece otras ventajas como la rapidez y facilidad en su obtención, minimiza la transmisión de enfermedades y favorece la restauración de la superficie ocular y la homeostasis en el entorno de una cirugía para implante de células madre limbares aumentando su tasa de éxito (145). De nuevo, esto supone una ventaja frente al MTA comercializado, el Holoclar® (53), y frente otros MTA actualmente en ensayo clínico, en los que el *scaffold* es una matriz de fibrina no autóloga (53, 58, 146), y también frente a otras terapias avanzadas en los que el *scaffold* utilizado es la membrana amniótica (147-150) o el colágeno (151).

Para asegurar la calidad del producto final, se deben definir los controles de calidad (118), éstos, al tratarse de terapias tan complejas, van a ser más exigentes que los realizados en las fórmulas magistrales y preparados oficinales elaborados a diario por los SFH, y deben estar establecidos y definidos en la guía de producción. Para la elaboración del MTA se redactó una guía de fabricación en la que se han definido los siguientes controles del producto: la morfología de las células limbares en el cultivo primario, el % de células p63-α en el cultivo primario, el número de células por cm^2 y la presencia de células madre en el MTA y finalmente los controles microbiológicos.

Como para todos los medicamentos, uno de los controles de calidad imprescindible y que demuestra la ausencia de bacterias, hongos, así como la ausencia de endotoxinas y micoplasmas (152), es el control microbiológico de la esterilidad en el producto final. Antes de realizar el test de esterilidad, se debe demostrar que ninguno de los componentes presentes

en el producto final interfiere con el método de detección elegido, para ello es necesario llevar a cabo el ensayo de promoción de crecimiento según el capítulo 2.6.1 de la Farmacopea Europea (83). Para el control de esterilidad del MTA producido se ha elegido la inoculación directa para detectar cualquier contaminación en el producto final, uno de los dos métodos establecidos en la Farmacopea Europea.

La validación de la producción del MTA, realizada con la elaboración de tres lotes consecutivos dentro de la unidad de producción, confirma la reproducibilidad del proceso de fabricación, demostrando que el producto final cumple todos los controles de calidad definidos en la ficha técnica. Así pues los cultivos primarios mostraron una morfología óptima; el porcentaje de células madre limbares en el cultivo primario (p63-α) estuvo por encima del límite establecido en la ficha técnica (> 3%), siendo ligeramente superior (76.38 ± 1.49%) al % obtenido en investigaciones previas (63.00 ± 1.93%)(104); el contaje celular por cm^2 del producto final se situó en el rango definido (79.000 - 316.000 células/cm^2), el cual es el mismo que el establecido en la ficha técnica del Holoclar® (53); se demostró la presencia de células madre en el MTA, y se demostró la esterilidad del producto final (104).

Dentro del compromiso por una mejora continua que requieren los sistemas de calidad farmacéuticos, se realizaron controles de calidad en el cultivo primario y en el MTA, para constatar, mediante la realización de una inmunofluorescencia frente a la CK, la morfología óptima de las células limbares y para establecer el % de p63-α en el producto final, si bien, estos controles del producto aún no han sido incluidos como requisitos del MTA en su ficha técnica.

Los resultados obtenidos en los tres lotes fabricados han mostrado un % de p63-α en el MTA final del 57,27% (44,55-82,37%). La presencia de p63-α en el MTA es la que va a ejercer la acción potencialmente regenerativa de las células madre limbares(153), y nos va a asegurar la respuesta al tratamiento(150), habiéndose demostrado que un % de p63-α >3% es eficaz en los pacientes (52).

Finalmente, la realización del estudio de estabilidad permitió establecer un periodo de vida útil del MTA de 7 días, conservado en el incubador, periodo de tiempo en el que se garantiza que el medicamento cumple con las características definidas en su ficha técnica.

Previo a su uso en la práctica clínica, los MTA desarrollados deben de asegurar su eficacia y seguridad a través de ensayos clínicos (EECC) bien diseñados (154), cumpliendo con la regulación marcada por el RD 1090/2015 y el Reglamento (UE) Nº 536/2014 del Parlamento

Europeo (155, 156), que regulan los EECC con medicamentos de uso humano. La expansión de células madre limbares, ha demostrado su seguridad y eficacia en los EECC HLSTM01 (135 pacientes y 8 años de seguimiento) y HLSTM02 (29 pacientes y 8 años de seguimiento) (157, 158), siendo el Holoclar®, el primer medicamento de terapia avanzada aprobada por la EMA (159, 160), es por ello, que las células limbocorneales son consideras una de las tres terapias avanzadas consolidadas en Europa (64), motivo por el cual no le va a ser exigible la realización de un EECC al MTA desarrollado en el presente trabajo de investigación.

Aunque existen estudios que han demostrado que los MTA ofrecen soluciones y tratamientos igual de costo efectivas que las cirugías convencionales para el tratamiento de ciertas patologías (161), el coste final de los MTA y la equidad en el acceso de estos fármacos para los pacientes sigue siendo un problema primordial (162), ya que los gastos en los que se debe incurrir en cuanto a investigación básica, investigación clínica e instalaciones para llevar a cabo una producción que cumpla la regulación establecida (71), son muy elevados haciendo que los MTA sean inaccesibles para los sistemas sanitarios tanto públicos como privados. Además, la mayoría de las terapias avanzadas carecen de financiación pública (118, 163), como actualmente ocurre con el Holoclar® (158).

Se ha demostrado que la producción de MTA dentro de aisladores reduce significativamente el coste de mantenimiento frente a las salas blancas convencionales, ya que los costes del sistema HVAC en cuanto a construcción, mantenimiento y consumo de energía son significativamente menores en los sistemas cerrados, los llamados sistemas “A en D”, que en los sistemas abiertos, las tradicionales salas blancas o sistemas “A en B”, estimandose un ahorro del 30% en los gastos de producción (80). Si a esto le sumamos el no tener que invertir en investigación clínica, por estar exentos de realizar un ensayo clínico, los costes finales del MTA producido, en la instalación diseñada, van a ser menores que el MTA comercial actualmente disponible en el mercado, aumentando de manera exponencial la accesibilidad de los pacientes a estos tratamientos.

La instalación, a pesar de tener las ventajas discutidas, no deja de tener sus limitaciones. Por un lado, el reducido espacio de trabajo que queda después de la instalación de todos los aparatos dentro del aislador y la producción individual por lotes, pueden limitar el uso de instalaciones similares en otros campos y en otras especialidades que requieran mayores producciones de MTA. Por otro lado, los guantes del aislador dificultan el trabajo ordinario, siendo la destreza que se debe adquirir a la hora de tener que trabajar en el aislador superior a la de los sistemas abiertos, donde se trabaja con guantes estériles.

Estas limitaciones se podrían solucionar ideando instalaciones más amplias, añadiendo más módulos unidos, disponiendo de más de un aislador dentro de una misma sala, así como invirtiendo más horas en la formación y entrenamiento del personal de producción, para desarrollar una mayor destreza.

Pese a estas limitaciones, la unidad de producción de terapias avanzadas desarrollada, ofrece una ventaja muy importante, y es que aumenta exponencialmente la accesibilidad de los tratamientos de terapia avanzada a los pacientes, al reducir los costes de producción. Esto junto con el desarrollo de nuevos biomateriales (164, 165) y nuevas tecnologías como la impresión 3D en el campo de la medicina personalizada (166), puede llegar a traducirse en poder fabricar en cualquier lugar del mundo corneas artificiales, cubriendo la deficiencia de donantes de córnea y la necesidad de tejidos a implantar que sufren algunos países, reduciendo el número de pacientes con ceguera. También podría servir como instalación para la fabricación de terapias avanzadas de cualquier especialidad médica, ya sea terapia celular, ingeniería de tejidos o terapia génica, haciendo llegar estos medicamentos al mayor número posible de pacientes que actualmente sufren patologías sin posibilidad de tratar con los recursos y medios disponibles.

Futuros proyectos

Futuros proyectos

1. Eficacia de la aplicación del medicamento desarrollado en pacientes con insuficiencia límbica.
2. Producción de medicamentos de terapia avanzada para la regeneración endotelial.
3. Producción de otros medicamentos de terapia avanzada para oftalmología.
4. Impresión en 3D en el entorno diseñado.

Conclusiones

Conclusiones

1. Se ha diseñado y desarrollado una unidad de producción de terapias avanzadas, reducida, adaptada para la producción en oftalmología, que cumple con los requisitos exigidos según la guía de Normas de Correcta Fabricación.

2. La unidad de producción de terapias avanzadas ha aprobado todas las cualificaciones pertinentes (cualificación de instalación, cualificación operativa y cualificación funcional) que exigen las Normas de Correcta Fabricación.

3. Se ha desarrollado un sistema de calidad adaptado a la unidad de producción de terapias avanzadas.

4. Dentro de la unidad de producción, se ha fabricado un medicamento de terapia avanzada, la expansión ex vivo de células madre limbocorneales alogénicas sobre una membrana de fibrina autóloga, para el tratamiento de la insuficiencia límbica.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

1. López-Paniagua M, de la Mata A, Galindo S, Blázquez F, Calonge M, Nieto-Miguel T. Advanced Therapy Medicinal Products for the Eye: Definitions and Regulatory Framework. Pharmaceutics. 2021;13(3):347.
2. Fundamentos y principios de oftalmología. 2011-2012: Sección2. Sociedad Española de Oftalmología. ISBN: 978-84-8086-978-2. 2011.
3. Solinís M, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2015;95(Pt B):331-42.
4. Dale S. Aldrich CMB, William Brown, Wiley Chambers, Jeffrey Fleitman, Desmond Hunt, Margareth R. C. Marques, Yana Mille, Ashim K. Mitra, Stacey M. Platzer, Tom Tice, George W. Tin. Ophthalmic Preparations. USP-NF STANDARDS. 2013;39(5).
5. Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G, Heng JS, Khaw PT, Brocchini S. Principles of pharmacology in the eye. British journal of pharmacology. 2017;174(23):4205-23.
6. De Campos A. M. SA, Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. Int J Pharm. 2001;224(1-2):159-68.
7. Haripriya A, Chang DF. Intracameral antibiotics during cataract surgery: evidence and barriers. Current opinion in ophthalmology. 2018;29(1):33-9.
8. Meyer CH, Krohne TU, Charbel Issa P, Liu Z, Holz FG. Routes for Drug Delivery to the Eye and Retina: Intravitreal Injections. Developments in ophthalmology. 2016;55:63-70.
9. Lee K, Song HB, Cho W, Kim JH, Kim JH, Ryu W. Intracorneal injection of a detachable hybrid microneedle for sustained drug delivery. Acta biomaterialia. 2018;80:48-57.
10. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española. 5ª Edición.2015.
11. Real Decreto 175/2001, de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales. 2001.
12. Guía de buenas prácticas de preparación de medicamentos en servicios de farmacia hospitalaria. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Junio 2014.
13. Allen LV, Jr. Basics of sterile compounding: Ophthalmic Preparations, Part1: Ophthalmic solutions. Int J Pharm Compound. 2016;20(5).

14. Allen LV, Jr. Basics of sterile compounding: Ophthalmic Preparations, Part 2: Suspension and oinments. Int J Pharm Compound. 2016;20(6):399-404.

15. McElhiney LF. Compounding Guide for Ophthalmic Preparations. American Pharmacist Association.(APhA publications) 2013. (ISBN: 978-1-58212-177-2)

16. American Society of Hospital Pharmacists. ASHP technical assistance bulletin on pharmacy-prepared ophthalmic products. American journal of hospital pharmacy. 1993;50:1462–3.

17. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios., (2015).

18. Iglesias-Lopez C, Obach M, Vallano A, Agustí A. Comparison of regulatory pathways for the approval of advanced therapies in the European Union and the United States. Cytotherapy. 2021;23(3):261-74.

19. Smith CIE, Blomberg P. [Gene therapy – from idea to reality]. Lakartidningen. 2017;114.

20. Reglamento (CE) Nº 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada, (2007).

21. Chuang K, Fields MA, Del Priore LV. Potential of Gene Editing and Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) in Treatment of Retinal Diseases. The Yale journal of biology and medicine. 2017;90(4):635-42.

22. DiCarlo JE, Mahajan VB, Tsang SH. Gene therapy and genome surgery in the retina. The Journal of clinical investigation. 2018;128(6):2177-88.

23. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB. Gene therapy comes of age. Science (New York, NY). 2018;359(6372).

24. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. TerCel, Red de Terapia Celular. Libro Blanco de Terapia Celular en España. Disponible en: https://www.red-tercel.com/index.asp2015.

25. Buzhor E, Leshansky L, Blumenthal J, Barash H, Warshawsky D, Mazor Y, et al. Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases. Regenerative medicine. 2014;9(5):649-72.

26. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. Journal of pediatric surgery. 2016;51(1):8-12.

27. Directiva 93/42/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1993, relativa a los productos sanitarios. , (1993).

28. Directiva 90/385/CEE del Consejo, de 20 de junio de 1990, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los productos sanitarios implantables activos, (1990).

29. Jain S. DL. Combined advanced therapy medicinal products: Eu regulatory requirements, pathways and processes. Regulatory Rapporteur 2015;12:10-3.

30. The portal for rare diseases and orphan drugs. Disponible en: https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=171673. (Último acceso: 07/04/2021). .

31. Thej C, Balasubramanian S, Rengasamy M, Walvekar A, Swamynathan P, Raj SS, et al. Human bone marrow-derived, pooled, allogeneic mesenchymal stromal cells manufactured from multiple donors at different times show comparable biological functions in vitro, and in vivo to repair limb ischemia. Stem cell research & therapy. 2021;12(1):279.

32. Li K, Li X, Shi G, Lei X, Huang Y, Bai L, et al. Effectiveness and mechanisms of adipose-derived stem cell therapy in animal models of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. Translational neurodegeneration. 2021;10(1):14.

33. Shariati A, Nemati R, Sadeghipour Y, Yaghoubi Y, Baghbani R, Javidi K, et al. Mesenchymal stromal cells (MSCs) for neurodegenerative disease: A promising frontier. European journal of cell biology. 2020;99(6):151097.

34. Tanna T, Sachan V. Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases. Current stem cell research & therapy. 2014;9(6):513-21.

35. Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease. 2020;1866(4):165260.

36. Courtine G, Sofroniew MV. Spinal cord repair: advances in biology and technology. Nature medicine. 2019;25(6):898-908.

37. Ehsanipour A, Sathialingam M. Injectable, macroporous scaffolds for delivery of therapeutic genes to the injured spinal cord. APL bioengineering. 2021;5(1):016104.

38. Clough JN, Omer OS, Tasker S. Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances. Gut. 2020;69(5):942-52.

39. Csobonyeiova M, Polak S, Danisovic L. Generation of Pancreatic β-cells From iPSCs and their Potential for Type 1 Diabetes Mellitus Replacement Therapy and Modelling. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. 2020;128(5):339-46.

40. Chellappan DK, Yap WS, Bt Ahmad Suhaimi NA, Gupta G, Dua K. Current therapies and targets for type 2 diabetes mellitus. Panminerva medica. 2018;60(3):117-31.

41. Cho J, D'Antuono M, Glicksman M, Wang J, Jonklaas J. A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus. American journal of stem cells. 2018;7(4):82-93.

42. Lih E, Park W, Park KW, Chun SY, Kim H, Joung YK, et al. A Bioinspired Scaffold with Anti-Inflammatory Magnesium Hydroxide and Decellularized Extracellular Matrix for Renal Tissue Regeneration. ACS central science. 2019;5(3):458-67.

43. Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V, Fabris L, Spirli C, Strazzabosco M. Liver diseases in the dish: iPSC and organoids as a new approach to modeling liver diseases. Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease. 2019;1865(5):920-8.

44. Gari M, Alsehli H, Gari A, Abbas M, Alkaff M, Abuzinadah M, et al. Derivation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. Tissue engineering and regenerative medicine. 2016;13(6):732-9.

45. World Health Organization (2021). Blindness and Vision Impairment. Disponible en: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-andvisual-impairment (Último acceso: 12/08/2021).

46. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. The Lancet Global health. 2021;9(2):e144-e60.

47. Maeda A, Mandai M, Takahashi M. Gene and Induced Pluripotent Stem Cell Therapy for Retinal Diseases. Annual review of genomics and human genetics. 2019;20:201-16.

48. Sengillo JD, Justus S, Tsai YT, Cabral T, Tsang SH. Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics. 2016;172(4):349-66.

49. Ghareeb AE, Lako M, Figueiredo FC. Recent Advances in Stem Cell Therapy for Limbal Stem Cell Deficiency: A Narrative Review. Ophthalmol Ther. 2020;9(4):809-31.

50. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet. 1997;349(9057):990-3.

51. European Medicines Agency. EU/3/08/579. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphandesignations/eu308579 (Último acceso: 10/11/2021).

52. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. New England Journal of Medicine. 2010;363(2):147-55.

53. EPAR Holoclar®. European Medicine Agency. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/holoclar. (Último acceso: 22/07/2021).

54. Dolgin E. Next-generation stem cell therapy poised to enter EU market. Nature biotechnology. 2015;33(3):224-5.

55. Calonge M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M. Goals and Challenges of Stem Cell-Based Therapy for Corneal Blindness Due to Limbal Deficiency. Pharmaceutics. 2021;13(9):1483.

56. Calonge M, Herreras J-M, Pérez I, Fernández I, Galindo S, Nieto-Miguel T, et al. A Randomized Controlled Trial of Cultivated Limbal Epithelial Cells Compared to Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Corneal Failure due to Limbal Stem Cell Deficiency. Investigative ophthalmology & visual science. 2017;58(8):3372-.

57. Galindo S, de la Mata A, López-Paniagua M, Herreras JM, Pérez I, Calonge M, et al. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art. Stem cell research & therapy. 2021;12(1):60.

58. González-Andrades M, Mata R, González-Gallardo MDC, Medialdea S, Arias-Santiago S, Martínez-Atienza J, et al. A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. BMJ. 2017;7(9):e016487.

59. Clinical Trials. Disponible en: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=%22cell+therapy%22+OR+%22tissue+engineering%22+AND+%22Eye+Diseases%22. (Último acceso: 20/08/2021).

60. EPAR Luxturna®. European Medicine Agency. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna. (Último acceso: 26/03/2021).

61. Reglamento (CE) n° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos (2004).

62. European Medicines Agency, Committee for advanced therapies (CAT). Diponible en: https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-advanced-therapies-cat. (Último acceso: 26/06/2021).

63. Schneider CK, Salmikangas P, Jilma B, Flamion B, Todorova LR, Paphitou A, et al. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. Nature reviews Drug discovery. 2010;9(3):195-201.

64. Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización demedicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial., (2014).

65. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundidode la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios., (2015).

66. Autorización de uso de medicamentos de terapia avanzada. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/terapias-avanzadas/autorizaciones-de-uso-de-medicamentos-de-terapia-avanzada/. (Último acceso: 27/06/2021)

67. Ficha técnica: NC1 Suspensión celular en plasma autólogo, 100-300x106 células – Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. AEMPS. 2019.

68. Ficha técnica: ARI-0001 dispersión para perfusión, que contiene 0,1 - 1 x 106 células/kg – Hospital Clínic de Barcelona. AEMPS. 2021.

69. Guía de Normas de Correcta Fabricación. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/. (Último acceso: 20/09/2021).

70. Capítulo 1. Sistema de Calidad Farmacéutico. Parte I – Requisitos básicos para medicamentos. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario., (Revisión Agosto 2012).

71. Parte IV. Directrices sobre normas de correcta fabricación específicas para Medicamentos de Terapia Avanzada. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, (2018).

72. Anexo I. Fabricación de medicamentos estériles. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario., (2009).

73. Lipsitz YY, Timmins NE, Zandstra PW. Quality cell therapy manufacturing by design. Nature biotechnology. 2016;34(4):393-400.

74. ICH guideline Q9 on quality risk management. EMA/CHMP/ICH/24235/2006, (2006).

75. Capítulo 2. Personal. Parte I – Requisitos básicos para medicamentos. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario. , (Revisión Agosto 2013).

76. Capítulo 3. Locales y equipos. Parte I – Requisitos básicos para medicamentos. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario, (Revisión Agosot 2014).

77. International Standards Organization, ISO-14644-1, Salas limpias y locales anexos controlados. Parte 1: Clasificación de la limpieza del aire mediante la concentración de partículas. (ISO 14644-1:2015).

78. Cobo F, Grela D, Concha A. Airborne particle monitoring in clean room environments for stem cell cultures. Biotechnology journal. 2008;3(1):43-52.

79. De la Rubia Nieto A. HAA. Nuevas Tecnologías en la Elaboración de Medicamentos. ISBN: 978-84-92512-07-2. 2011.

80. Zanini C, Severina F. Good design practices for an integrated containment and production system for advanced therapies. Biotechnology and bioengineering. 2020;117(8):2319-30.

81. Capítulo 4. Documentación. Parte I – Requisitos básicos para medicamentos. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario. Revision Enero 2011.

82. Parte II – Requisitos básicos para sustancias activas usadas como materiales de partida. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario. Revisión Agosto 2014.

83. Farmacopea Europea (Ph. Eur.) 10ª Edición.

84. Capítulo 5. Producción. Parte I – Requisitos básicos para medicamentos. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario., (Revisión Agosto 2014).

85. International Standards Organization, ISO-9001:2015. Sistemas de gestión de la calidad (2015).

86. PROINTER . Disponible en: https://prointer.es/que-es-una-sala-blanca-o-limpia-definicion-tipos-y-caracteristicas/. (Último acceso: 2/09/2020).

87. A story of an early tech transfer success: Willis Whitfield and the clean room. Disponible en: https://www.energy.gov/nnsa/articles/story-early-tech-transfer-success-willis-whitfield-and-clean-room. (Último acceso: 15/05/2021).

88. International Standards Organization, ISO-14644-4, Salas limpias y locales anexos controlados. Parte 4: Diseño, construcción y puesta en servicio. (ISO 14644-4:2001).

89. International Standards Organization, ISO-14644-2. Salas limpias y locales anexos controlados. Parte 2: Seguimiento para proporcionar evidencias del desempeño en relación con la limpieza del aire mediante la concentración de partículas. (ISO 14644-2:2015).

90. Sala blanca modular. Disponible en: https://www.terrauniversal.com/softwall-cleanrooms.php. (Último acceso: 25/03/2021).

91. Soluciones modulares, salas blancas. Disponible en: https://montajesdelsaz.com/servicios/soluciones-modulares/. (Último acceso 15/05/2021).

92. Soluciones modulares, salas blancas. Disponible en: https://ingelyt.com/salas-blancas/construccion-de-salas-blancas/soluciones-modulares/. (Último acceso 15/05/2021).

93. Lehmann R, Gallert C, Roddelkopf T, Junginger S, Thurow K. Biomek Cell Workstation: A Flexible System for Automated 3D Cell Cultivation. Journal of laboratory automation. 2016;21(4):568-78.

94. ISOCell Pro®. Disponible en: https://www.tecomak.com/product/isocell-pro-1/ (Último acceso: 10/08/2021).

95. Cell Processing Work Station Panasonic®. Disponible en: https://cleanroomtechnology.com/news/article_page/Sanyo_launches_stand-alone_cell_processing_workstation/57408. (Último acceso: 10/08/2021).

96. Morrison C. $1-million price tag set for Glybera gene therapy. Nature biotechnology. 2015;33(3):217-8.

97. UNE-EN 1822-1:2020: Filtros absolutos (EPA, HEPA y ULPA). Parte 1: Clasificación, principios generales del ensayo y marcado., (2020).

98. Food and Drug Administration. 797 Pharmaceutical compoundig sterile prepartios. USP 2008.

99. European Pharmacopoeia 10th Edition.

100. Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 2003, por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes y por la que se modifica la Directiva 2001/83/CE (2002).

101. Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Lloves J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. Experimental eye research. 2015(135):118-26.

102. Riestra Ayora AC. Plasma rico en factores de crecimiento. Desarrollo y estandarización de su aplicación por vía oftálmica. ISBN-13 978-84-608-9770-5. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2016.

103. Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, (2004).

104. Riestra AC, Vazquez N, Chacon M, Berisa S, Sanchez-Avila RM, Orive G, et al. Autologous method for ex vivo expansion of human limbal epithelial progenitor cells based on plasma rich in growth factors technology. The ocular surface. 2017;15(2):248-56.

105. Green H. The birth of therapy with cultured cells. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2008;30(9):897-903.

106. Pellegrini G, Rama P, Di Rocco A, Panaras A, De Luca M. Concise review: hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine. Stem cells (Dayton, Ohio). 2014;32(1):26-34.

107. De Wilde S, Coppens DGM, Hoekman J, de Bruin ML, Leufkens HGM, Guchelaar HJ, et al. EU decision-making for marketing authorization of advanced therapy medicinal products: a case study. Drug discovery today. 2018;23(7):1328-33.

108. Kolkundkar U GS, Majumdar A. . Cell therapy manufacturing and quality control: current process and regulatory challenges. J Stem Cell Res Ther 2014;;4(9):75-82.

109. Kellathur SN, Lou H-X. Cell and tissue therapy regulation: worldwide status and harmonization. Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization. 2012;40(3):222-4.

110. Lamas-Díaz MJ, Hernández-García C. Advanced therapies. Farmacia Hospitalaria. 2020;44:1-2.

111. Celis P. CAT--the new committee for advanced therapies at the European Medicines Agency. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz. 2010;53(1):9-13.

112. Advanced therapy medicinal products: Overview. (European Medicines Agency). Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview. (Último acceso: 24/06/2021).

113. Advanced therapy medicines: exploring solutions to foster development and expand patient access in Europe. Outcome of a multi-stakeholder meeting with experts and regulators held at EMA on Friday 27 May 2016. 2016.

114. Issues identified by stakeholders: follow-up from EMA's ATMP workshop. 2017.

115. PRIME (European Medicien Agency). Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/prime-priority-medicines. (Último acceso: 24/06/2021).

116. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, et al. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. Ophthalmology. 2008;115(11):1989-97.

117. Ramirez BE, Sanchez A, Herreras JM, Fernandez I, Garcia-Sancho J, Nieto-Miguel T, et al. Stem Cell Therapy for Corneal Epithelium Regeneration following Good Manufacturing and Clinical Procedures. BioMed research international. 2015;2015:408495.

118. Morrow D, Ussi A, Migliaccio G. Addressing Pressing Needs in the Development of Advanced Therapies. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2017;5:55.

119. MACI: atrix-applied characterised autologous cultured chondrocytes. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002522/human_med_001660.jsp&mid=WC0b01ac058001d124, (Último acceso: 11/08/2021).

120. Paul Ehrlich Institute: Federal Institute for Vaccines and Biomedical Drugs. Advanced Therapiy Medicinal Products (ATMP). Disponible en: https://www.pei.de/EN/medicinal-products/atmp/atmp-node.html;jsessionid=24B354517A420A8363D4679B4BB666EC.intranet241. (Último acceso: 20/07/2021).

121. Moutsatsou P, Ochs J, Schmitt RH, Hewitt CJ, Hanga MP. Automation in cell and gene therapy manufacturing: from past to future. Biotechnology letters. 2019;41(11):1245-53.

122. Martín PG, Martinez AR, Lara VG, Naveros BC. Regulatory considerations in production of a cell therapy medicinal product in Europe to clinical research. Clinical and experimental medicine. 2014;14(1):25-33.

123. Reinforced EU/US collaboration on medicines. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/news/reinforced-euus-collaboration-medicines. (Último acceso: 20/06/2021).

124. Ronfard V, Vertès AA, May MH, Dupraz A, van Dyke ME, Bayon Y. Evaluating the Past, Present, and Future of Regenerative Medicine: A Global View. Tissue engineering Part B, Reviews. 2017;23(2):199-210.

125. Ten Ham RMT, Hoekman J, Hövels AM, Broekmans AW, Leufkens HGM, Klungel OH. Challenges in Advanced Therapy Medicinal Product Development: A Survey among Companies in Europe. Molecular therapy Methods & clinical development. 2018;11:121-30.

126. Atkins JW, West K, Kasow KA. Current and Future Cell Therapy Standards and Guidelines. Hematology/oncology clinics of North America. 2019;33(5):839-55.

127. Mason C, Dunnill P. Translational regenerative medicine research: essential to discovery and outcome. Regenerative medicine. 2007;2(3):227-9.

128. Boráň T, Menezes-Ferreira M, Reischl I, Celis P, Ferry N, Gänsbacher B, et al. Clinical Development and Commercialization of Advanced Therapy Medicinal Products in the European Union: How Are the Product Pipeline and Regulatory Framework Evolving? Human gene therapy Clinical development. 2017;28(3):126-35.

129. Kerstan A, Niebergall-Roth E, Esterlechner J, Schröder HM, Gasser M, Waaga-Gasser AM, et al. Ex vivo-expanded highly pure ABCB5(+) mesenchymal stromal cells as Good Manufacturing Practice-compliant autologous advanced therapy medicinal product for clinical use: process validation and first in-human data. Cytotherapy. 2021;23(2):165-75.

130. Tulina MA, Pyatigorskaya NV. Specificity of Good Manufacturing Practice (GMP) for Biomedical Cell Products. Bulletin of experimental biology and medicine. 2018;164(4):579-82.

131. Torralba Arranz A ÁAL, Folguera Olías C, Martín Donaire T, Sánchez Ruiz R, Regidor Luengo C, Cabrera Marín JR, Gonzalo Daganzo RM. Terapias avanzadas: la experiencia de un hospital terciario. OFIL. 2014;24(4):7.

132. International Standards Organization, ISO-14644-7, Salas limpias y locales anexos controlados. Parte 7: Dispositivos de separación (campanas de aire limpio, cajas de guantes, aisladores, minientornos) (ISO 14644-7:2004).

133. Motschman TL, Moore SB. Corrective and preventive action. Transfusion science. 1999;21(2):163-78.

134. Christine Günther AH, Ralf Huss. Advances in Pharmaceutical Cell Therapy: World scientific.

135. Tanyous JN. Cleaning Validation: Complete Guide for Health - Based Approach in Chemical Cross - Contamination Risk Assessment. PDA journal of pharmaceutical science and technology. 2019;73(2):204-10.

136. Raj A. Cleaning validation in pharmaceutical industries. Journal of Atoms and Molecules. 2014;4:779-83.

137. Sánchez-Ávila RM VN, Chacón M, Persinal-Medina M, Brea-Pastor A, Berisa-Prado S, Fernández-Vega-Cueto L, Anitua E, Meana Á, Merayo-Lloves J. Fibrin-Plasma Rich in Growth Factors Membrane for the Treatment of a Rabbit Alkali-Burn Lesion. . International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(11):5564.

138. Sanchez Avila R. Regeneración de la superficie ocualr y cornea con Plasma Rico en Factores de Crecimiento. ISBN 978-84-09-01774-4. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2018.

139. Brejchova K, Trosan P, Studeny P, Skalicka P, Utheim TP, Bednar J, et al. Characterization and comparison of human limbal explant cultures grown under defined and xeno-free conditions. Experimental eye research. 2018;176:20-8.

140. Dereli Can G, Akdere Ö E, Can ME, Gümüşderelioğlu M. A simple and efficient method for cultivation of limbal explant stem cells with clinically safe potential. Cytotherapy. 2019;21(1):83-95.

141. Witzeneder K, Lindenmair A, Gabriel C, Höller K, Theiß D, Redl H, et al. Human-derived alternatives to fetal bovine serum in cell culture. Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2013;40(6):417-23.

142. Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. ISSN: 1687-966X Stem cells international. 2011;2011:504723.

143. European Medicines Agency. Guideline on xenogeneic cell-based medicinal products. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/xenogeneic-cell-based-medicinal-products. 2009.

144. Sanchez-Avila RM, Merayo-Lloves J, Riestra AC, Berisa S, Lisa C, Sanchez JA, et al. Plasma rich in growth factors membrane as coadjuvant treatment in the surgery of ocular surface disorders. Medicine (Baltimore). 2018;97(17):e0242.

145. Alvarado-Villacorta R, García-Carmona KP, Martínez-Pardo ME, Vázquez-Maya L. Allogeneic Limbal Epithelial Transplantation Modified With Solid Platelet-Rich Plasma for Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. Cornea. 2020;39(10):1311-4.

146. Pellegrini G, Lambiase A, Macaluso C, Pocobelli A, Deng S, Cavallini GM, et al. From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU. Regenerative medicine. 2016;11(4):407-20.

147. Dhamodaran K, Subramani M, Jeyabalan N, Ponnalagu M, Chevour P, Shetty R, et al. Characterization of ex vivo cultured limbal, conjunctival, and oral mucosal cells: A comparative study with implications in transplantation medicine. Molecular vision. 2015;21:828-45.

148. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. Cornea. 2000;19(1):65-71.

149. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. Ophthalmology. 2001;108(9):1569-74.

150. Serna-Ojeda JC, Garcia-Mejia M, Graue-Hernandez EO, Navas A, Garfias Y. Short-Term Results Analysis in the Allogenic Transplantation of Limbal Stem Cells Expanded on Amniotic Membrane in Patients with Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2020;36(4):238-46.

151. Chae JJ, Ambrose WM, Espinoza FA, Mulreany DG, Ng S, Takezawa T, et al. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency. Acta ophthalmologica. 2015;93(1):e57-66.

152. Soncin S, Lo Cicero V, Astori G, Soldati G, Gola M, Sürder D, et al. A practical approach for the validation of sterility, endotoxin and potency testing of bone marrow mononucleated cells used in cardiac regeneration in compliance with good manufacturing practice. Journal of translational medicine. 2009;7:78.

153. Di Iorio EB, V.; Ruzza, A.; Ponzi, D.; Pellefrini, G.; de Luca, M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. . Roc Natl Acad Sci 2005(P102):9523-8.

154. Bobba S, Di Girolamo N, Munsie M, Chen F, Pébay A, Harkin D, et al. The current state of stem cell therapy for ocular disease. Experimental eye research. 2018;177:65-75.

155. Reglamento (UE) N°536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de abril de 2014 , sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, (2014).

156. Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos, (2015).

157. Bharate SS, Bharate SB. Modulation of thermoreceptor TRPM8 by cooling compounds. ACS Chem Neurosci. 2012;3(4):248-67.

158. Informe de Posicionamiento Terapéutico de células epiteliales corneales humanas autólogas, expandidas ex vivo, entre las que se encuentran células madre (Holoclar®) en el tratamiento de pacientes adultos con deficiencia de células madre limbares debida a quemaduras oculares por agentes físicos o químicos. IPT, 47/2016. 2016.

159. Pellegrini G, Ardigò D, Milazzo G, Iotti G, Guatelli P, Pelosi D, et al. Navigating Market Authorization: The Path Holoclar Took to Become the First Stem Cell Product Approved in the European Union. Stem cells translational medicine. 2018;7(1):146-54.

160. Bakker AC, Langer B. [Cell-based therapies - an innovative therapeutic option in ophthalmology: Treating corneal diseases with stem cells]. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz. 2015;58(11-12):1259-64.

161. Magrelli FM, Merra A, Pellegrini G. Surgery Versus ATMPs: An Example From Ophthalmology. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2020;8:440.

162. Koh MB, Suck G. Cell therapy: promise fulfilled? Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization. 2012;40(3):214-7.

163. Bubela T, McCabe C, Archibald P, Atkins H, Bradshaw SE, Kefalas P, et al. Bringing regenerative medicines to the clinic: the future for regulation and reimbursement. Regenerative medicine. 2015;10(7):897-911.

164. Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE, du Toit LC, Ally N, Pillay V. Hydrogel Biomaterials for Application in Ocular Drug Delivery. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2020;8:228.

165. Eldem T, Eldem B. Ocular Drug, Gene and Cellular Delivery Systems and Advanced Therapy Medicinal Products. Turk J Ophthalmol. 2018;48(3):132-41.

166..Zhang B, Xue Q, Li J, Ma L, Yao Y, Ye H, et al. 3D bioprinting for artificial cornea: Challenges and perspectives. Medical engineering & physics. 2019;71:68-78.

Acrónimos y abreviaturas

Acrónimos y abreviaturas

A

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.

ATMP: Advanced therapy medicinal products.

C

CAPA: Acciones Correctivas y Acciones Preventivas.

CAT: Comité de Terapias Avanzadas.

CCST: Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias.

D

DAPI: 4 ',6-diamidino-2-fenilindol.

DMAE: degeneración macular asociada a la edad.

DQ: Cualificación de diseño.

E

EECC: ensayos clínicos.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos.

F

FDA: U.S. Food and Drug Administration.

G

GMP: Good Manufacturing Practice.

H

HEPA: High Efficiency Particle Arresting.

HVAC: Heating, ventilation and air conditioning system.

I

IQ: Cualificación de instalación.

ISO: International Standards Organization.

M

MDV: máxima dilución válida.

MTA: medicamentos de terapia avanzada.

N

NCF: Normas de Correcta Fabricación.

O

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OQ: Cualificación operativa o de funcionamiento.

P

PA: Procedimientos de Funcionamiento, Mantenimiento y Reparaciones de Aparatos.

PBS: solución salina tamponada con fosfato.

PC: Procedimientos de Control.

PCA: Procedimientos de cualificación de aparatos.

PCC: Puntos Críticos de Control.

PG: Procedimientos Generales.

Ph. Eur: Farmacopea Europea.

PMV: Plan maestro de validación.

PNT: Procedimiento Normalizado de Trabajo.

PP: Procedimientos de Producción.

PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

PQ: Cualificación funcional.

PV: Procedimientos de validación de procesos.

R

RAP: revisión anual del producto.

RBA: Risk based approach.

RD: Real Decreto.

S

SAS: special airlock system.

SBF: suero bovino fetal.

SFH: Servicios de Farmacia Hospitalaria.

T

TSB: Tryptic soy broth.

U

UE: Unión Europea.

URS: especificaciones de los requisitos de usuario

USP: United States Pharmacopeia.

Índices de figuras y tablas

Índice de figuras

FIGURA 1: Partes del ojo 31
FIGURA 2: Clasificación de medicamentos de terapia avanzada en terapia celular o ingeniería de tejidos. Adaptada de *López Paniagua et al.* (1) MTA: Medicamento de Terapia Avanzada. .36
FIGURA 3: Factores que influyen en la excelencia de la calidad 44
FIGURA 4: Willis Whitfield junto a una sala blanca. (www.energy.gov) (87) 51
FIGURA 5: Ejemplo de sala blanca de un hospital (79). Grados del ambiente: A, B y C.....52
FIGURA 6: Ejemplo de sala blanca modular interior (https://www.terrauniversal.com/softwall-cleanrooms.php) (90).....54
FIGURA 7: Ejemplo de salas blancas modulares exteriores (https://ingelyt.com, https://montajesdelsaz.com) (91, 92) 54
FIGURA 8: Biomek Cell Workstation®. 1: Todos los equipos están dentro de la estación de trabajo, 2: Filtros HEPA, 3: Luz UV, 4: Biomek líquido manipulador, 5: Citomat, 6: Ordenador, 7: Elevador, 8: Centrífuga, 9: Válvula selección puerto, 10: Frigorífico, 11: Pa ntalla ordenador (93) 55
FIGURA 9: ISOCell Pro® (www.tecomak.com) (94).....56
FIGURA 10: Cell Processing Work Station Panasonic® (https://cleanroomtechnology.com/) (95) 56
FIGURA 11: Imagen del AISLAISO4-PP-1800 (TDI) 91
FIGURA 12: Planos de la instalación 91
FIGURA 13: Vista general de la unidad de producción de terapias avanzadas 92
FIGURA 14: Incubador 27-Minicell.....104
FIGURA 15: Centrífuga SPECTRAFUGETM 6C 105
FIGURA 16: Microscopio EVOS® XL.....106
FIGURA 17: Frigoríficos Liebherr 7085 483 01, izquierda y Liebherr 7083 001 01, derecha.....107
FIGURA 18: Estufas Memmert UNB 500, izquierda, y Prodintec, derecha 108
FIGURA 19: Resultados de la monitorización de los parámetros físicos del aislador.....133
FIGURA 20: Resultados de la monitorización de partículas viables y no viables del aislador...135
FIGURA 21: Visión general de un proceso de gestión de un riesgo para la calidad (74).....140
FIGURA 22: Clasificación del peligro en función de la probabilidad y la gravedad.....141
FIGURA 23: Árbol de decisiones para determinar un punto crítico de control. PCC: Puntos Críticos de Control 142

FIGURA 24: Diagrama de las fases de la producción del medicamento de terapia avanzada. PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento 152
FIGURA 25: Plantilla del informe de evaluación de la formación de personal 175
FIGURA 26: Plantilla del informe de validación de la técnica aséptica 177
FIGURA 27: Informe de evaluación de proveedor potencial 178
FIGURA 28: Informe de evaluación ordinaria de un proveedor 179
FIGURA 29: Informe de evaluación exhaustiva de un proveedor 180
FIGURA 30: Proveedores cualificados en la unidad de terapias avanzadas en el periodo 2019-2021 181
FIGURA 31: Elaboración partiendo del plasma del paciente (A): el medio de cultivo (B) y las membranas de PRGF (C) 188
FIGURA 32: Microscopia de contraste de fases de las células limbares proliferando desde el explante (A: 40x) y de las células limbares confluentes (B: 100x). Microscopia de inmunofluorescencia de las células limbares confluentes con los núcleos de todas las célul células limbares marcados en azul (DAPI), y en verde, las células positivas para factor de transcripción p63-α (C: 200x) 196
FIGURA 33: Microscopia de inmunofluorescencia del MTA (lamela epitelial), con los núcleos de todas las células limbares marcados en azul (DAPI). En verde, las células positivas para el factor de transcripción p63-α (marcador característico de las células indiferenciadas). 400x 196
FIGURA 34: Microscopía de contraste de fases (escala: 75 µm) e inmunofluorescencia de las células limbares del cultivo primario en las que las células CK positivas aparecen en rojo (escala: 75 µm), las p63-α positivas en verde (escala: 50 µm) y el DAPI aparece en azul (escala: 50 µm). CK: citoqueratina. DAPI: 4 ',6-DiAmidino-2-FenilIndol 200
FIGURA 35: Microscopia de inmunofluorescencia del medicamento de terapia avanzada, donde se muestra en rojo la CK, en verde las células p63-α positivas y en azul el DAPI (escala 50 µm). MTA: Medicamento de terapia avanzada. CK: citoqueratina 201
FIGURA 36: Informe del estudio de estabilidad del medicamento de terapia avanzada 203
FIGURA 37: Informe de la revisión anual del producto de 2019 211

Índice de tablas

TABLA 1: Clasificación del ambiente según normas ISO 45
TABLA 2: Clasificación de los ambientes en función del número de partículas según las Normas de Correcta Fabricación 46
TABLA 3: Especificaciones para partículas viables según las Normas de Correcta Fabricación. (UFC: Unidades Formadoras de Colonia) 46
TABLA 4: Límites de alerta y acción para los parámetros del panel de control del aislador.....76
TABLA 5: Límites de las partículas no viables según la norma ISO (77) 76
TABLA 6: Límites de las partículas viables y no viables según Anexo I de la Guía Normas de Correcta Fabricación (72). UFC: Unidades Formadoras de Colonias 76
TABLA 7: Límites de alerta y acción de los parámetros de temperatura y CO2 del incubador...80
TABLA 8: Límites de alerta y acción de la temperatura de los frigoríficos y las estufas 85
TABLA 9: Límites de alerta y acción para los manómetros del CO2 y para la temperatura del almacén 87
TABLA 10: Informe de cualificación del aislador 94
TABLA 11: Listado de los equipos/instrumentos necesarios para la producción 103
TABLA 12: Informe de cualificación del incubador 27-Minicell NB-203M 111
TABLA 13: Informe de cualificación de la centrífuga SPECTRAFUGETM 6C 116
TABLA 14: Informe de cualificación del microscopio EVOS® XL 119
TABLA 15: Informe de cualificación de los frigoríficos Liebherr 7085 483 01 y Liebherr 7083 001 01 122
TABLA 16: Informe de cualificación de las estufas Memmert® UNB 500 y Prodintec® 128
TABLA 17: Evaluación del riesgo para cada etapa dentro de la producción del medicamento de terapia avanzada. MP: Materia prima. PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento. PCC: Punto crítico de control.....153
TABLA 18: Determinación y límites para el peligro de contaminación con agentes patógenos. UFC: Unidades formadoras de colonias (71, 99) 163
TABLA 19: Determinación y límites para el peligro físico.....163
TABLA 20: Procedimientos de monitorización en cada punto crítico de control. PCC: Punto crítico de control.....164
TABLA 21: No conformidades detectadas durante las producciones realizadas en la unidad de producción de terapias avanzadas 173
TABLA 22: Controles de calidad del proceso durante la puesta a punto de la producción 197

TABLA 23: Resultados de los controles de calidad del producto durante la puesta a punto de la producción.....198
TABLA 24: Resultados de la monitorización de partículas viables y no viables de los tres puntos críticos durante la validación de la producción 199
TABLA 25: Resultados de los controles de calidad del producto durante la validación de la producción.....201

Divulgación científica

Divulgación científica

Publicaciones científicas que apoyan el trabajo de tesis doctoral:

- Berisa-Prado S, Vázquez N, Chacón M, Persinal-Medina M, Alonso-Alonso S, Baamonde B, Alfonso JF, Fernández-Vega-Cueto L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Mini Cleanroom for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP): Bioengineered Corneal Epithelium. *Pharmaceutics*. 2021; 13(8):1282. (Anexo 2)

Publicaciones científicas realizadas durante el periodo de formación:

- Chacón M, Vázquez N, Berisa S, Persinal M, Sánchez M, Baamonde B, Alfonso JF, Fernández-Vega Cueto L, Merayo-Lloves J, Meana Á. QobuR - A new in vitro human corneal epithelial model for preclinical drug screening. Eur J Pharm Biopharm. 2019 Mar; 136:164-173. Epub 2019 Jan 25.
- Sanchez-Avila RM, Merayo-Lloves J, Riestra A C, Berisa S; Lisa C; Sánchez, JA; Muruzabal F, Orive G, Anitua E. Plasma Rich in Growth Factors Membrane as Coadjuvant Treatment in the Surgery of Ocular Surface Disorders. Medicine (Baltimore). 2018 Apr; 97(17):e0242.

Comunicaciones a congresos:

- Alvaro Meana, S. Berisa, M. Chacon, N. Vazquez, M. P. Medina, B. Baamonde, J. Alfonso, L. Fernandez-Vega, J. Merayo-Lloves. Low scale production of advanced therapy medicinal products for limbal stem cell deficiency. ARVO Annual Meeting 2019, 28 Abril, Vancouver.
- Jesus Merayo-Lloves, R. Sanchez-Avila, M. Chacon, N. Vazquez, S. Berisa, M. P. Medina, C. Lisa, M. Naveiras, A. Meana. Plasma Rich in Growth Factors membrane in the treatment of Limbal Stem Cell Deficiency. ARVO Annual Meeting 2019, 28 Abril, Vancouver.
- Berisa Prado S. Fabricación de córneas artificiales en mini salas blancas. XVI Congreso de la Asociación Española de Bancos de Tejidos. 13-15 Junio 2019.
- Berisa Prado S., Meana Infiesta A., Vazquez N, Chacón M. Los Servicios de Farmacia Hospitalaria implicados en la producción de Terapias Avanzadas. Nuevo reto. 64 Congreso Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 17-19 Octubre 2019, Sevilla.

Premios:

- Redes colaborativas y de innovación en Farmacia Hospitalaria 2019 (Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria).

  Ganadores del 2º Premio de Redes colaborativas y de innovación en Farmacia Hospitalaria, patrocinado por SANOFI.

Créditos y financiación

Créditos y financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno del Principado de Asturias (FICYT) cofinanciado por los Fondos de Desarrollo Europeos (FEDER) y la Fundación Telefónica (referencia IDI-2017-000089).

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Instituto Universitario Fernández-Vega y en la Fundación de Investigación Oftalmológica.

Anexos

FICHA TÉCNICA

FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

▼ Este medicamento está sujeto a seguimiento adicional, lo que agilizará la detección de nueva información sobre su seguridad. Se invita a los profesionales sanitarios a notificar las sospechas de reacciones adversas. Ver la sección 4.8, en la que se incluye información sobre cómo notificarlas.

1. NOMBRE DEL MEDICAMENTO

LiCexST-Células limbares alogénicas expandidas *ex vivo* (79.000-316.000 células/cm^2).

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

2.1. Descripción general

Células epiteliales corneales humanas alogénicas, expandidas *ex vivo*.

2.2. Composición cualitativa y cuantitativa

LiCexST está constituido por una membrana circular de fibrina autóloga que contiene entre 79.000-316.000 células epiteliales corneales alogénicas viables por cm^2, entre las cuales más del 3% son células madre limbares (cultivo primario), así como células amplificadoras transitorias (TAC) derivadas de células madre y células terminalmente diferenciadas, adheridas a una capa de soporte de fibrina de 5,3 cm de diámetro. El sistema es mantenido en medio de cultivo.
Para consultar la lista completa de excipientes, ver sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Equivalente de tejido vivo.
Membrana de fibrina.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1. Indicaciones terapéuticas

Tratamiento de pacientes adultos con insuficiencia límbica bilateral o unilateral, de moderada a grave, con neovascularización de la córnea, conjuntivalización de al menos 180 grados.

4.2. Posología y forma de administración

LiCexST debe ser implantado por un cirujano convenientemente cualificado y formado y su uso está restringido únicamente a un ámbito hospitalario.

<u>Posología</u>

La cantidad de LiCexST contiene una dosis de tratamiento individual con el número adecuado de células para cubrir por completo la superficie de la córnea. La dosis recomendada de LiCexST es de 79.000-316.000 células /cm^2.
Cada preparación está destinada a un uso único. El tratamiento se puede repetir si así lo considera indicado el médico responsable.
Tras la cirugía se debe administrar el tratamiento prescrito por el doctor.

<u>Forma de administración</u>

En cirugía.
Se debe realizar bajo condiciones asépticas. Bajo anestesia tópica retrobulbar o peribulbar u otros procedimientos según criterio del cirujano.

Tratamiento postoperatorio

El tratamiento post-operatorio consiste en prednisona oral a 0,8 mg/kg en pauta descendente a lo largo de 4 semanas, con protección gástrica mediante omeprazol 20 mg oral. El tratamiento tópico incluye ciprofloxacino sin conservantes durante una semana y metilprednisolona sin conservantes en pauta descendente durante al menos 1 mes que puede ser sustituido por fluormetolona en función de la evolución. Se administrará Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en colirio, 4 veces al día durante 6 meses.

4.3. Contraindicaciones

Hipersensibilidad conocida a alguno de los excipientes incluidos en la sección 6.1.

4.4. Advertencias y precauciones particulares de empleo, incluidas las que deban tomar las personas que los manipulan, administran o implantan a los pacientes, junto con las que deban tomar los pacientes

LiCexST es un Medicamento de Terapia Avanzada, elaborado para un paciente concreto, no se debe administrar a otro paciente diferente.

4.5. Interacciones con otros medicamentos y otras formas de interacción

No se han realizado estudios de interacciones con otros medicamentos.

Evitar el uso de colirios con conservantes, sobre todo cloruro de benzalconio, ya que puede resultar citotóxico para el epitelio corneal.

4.6. Utilización durante el embarazo y la lactancia

Se debe evitar el uso de LiCexST durante el embarazo y la lactancia por falta de estudios.

4.7. Efectos sobre la capacidad de conducir y de usar máquinas

Debido a los riesgos inherentes a la cirugía se recomienda disminuir el uso de máquinas y limitar la conducción. Seguir las recomendaciones del médico.

4.8. Efectos adversos

Las reacciones adversas más frecuentes son las relacionadas con el procedimiento quirúrgico, las cuales puede presentarse en forma de hemorragia o dolor ocular el día posterior a la cirugía. Según la Ficha Técnica de la terapia consolidada en Europa, las reacciones adversas más graves son la perforación de la córnea y la queratitis ulcerativa, que se pueden presentar en los 3 meses posteriores a la implantación del Medicamento de Terapia Avanzada y que están relacionadas con la inestabilidad del epitelio corneal, así como el síncope vasovagal que se puede presentar durante el primer día después de la operación, como reacción al dolor ocular.

Las reacciones adversas más frecuentes son los trastornos oculares

Es importante notificar cualquier reacción adversa que se presente. Cualquier profesional sanitario o paciente puede llevar a cabo una notificación, para ello se deberá rellenar la tarjeta amarilla (www.notificaram.com).

4.9. Sobredosis (síntomas, procedimientos de urgencia)

No se han notificado casos de sobredosis.

5. Datos preclínicos sobre seguridad

Se ha desarrollado un método de cultivo para la expansión *in vitro* de células limbares, en la que el PRGF se ha utilizado como el único suplemento del medio de cultivo celular, sustituyendo a los factores de origen xenógenico habitualmente utilizados en los medios de cultivo convencionales, pero también, para fabricar la membrana de fibrina sobre la cual se cultivan y transportan las células (Riestra et al., 2017). Asimismo, se ha demostrado que las membranas

de PRGF cultivadas con células limbares autólogas o heterólogas de conejo son capaces de restaurar la superficie ocular en un modelo animal de quemadura ocular (Sánchez-Ávila, 2021).

6. Datos sobre la calidad:

6.1. Lista de excipientes, incluidos los conservantes

DMEM, F12, PRGF autólogo, membrana de PRGF autóloga, Amchafibrin®.

6.2. Incompatibilidades

No se han realizado estudios de compatibilidad con otros productos, se recomienda utilizar colirios postoperatorios sin conservantes.

6.3. Caducidad, en caso necesario tras la reconstitución del medicamento o cuando se abra por primera vez el acondicionamiento primario

Caduca a las 24 horas de su liberación.

6.4. Precauciones especiales de conservación

Conservar entre 15 °C y 25 °C.
No refrigerar ni congelar.
No irradiar (p. ej., rayos X).
No esterilizar.
Mantener en envase primario y acondicionamiento secundario de plástico para protegerlo frente a la contaminación bacteriana, fúngica y vírica.

6.5. Tipo y contenido del envase y equipos especiales de utilización, administración o implantación, en su caso con dibujos explicativos y fotografías

Cada envase contiene un epitelio corneal alogénico humano adherido a un soporte de PRGF, cubierto con medio de cultivo.
El envase primario de polipropileno está contenido dentro de un acondicionamiento secundario también de polipropileno.

6.6. Precauciones especiales e instrucciones de manipulación y eliminación de un Medicamento de Terapia Avanzada ya utilizado, o de material de desecho procedente del mismo.

LiCextST® debe administrarse exclusivamente para un paciente, comprobar que las iniciales del paciente y el número de historia se corresponden con la identificación del lote en el acondicionamiento secundario.

Deberá desecharse los restos no utilizados y el material que ha estado en contacto con el medicamento por los cauces que tenga implantado el centro donde se administre el medicamento, tratando éste como material biológico.

ARTÍCULOS ORIGINALES

Berisa-Prado S, Vázquez N, Chacón M, Persinal-Medina M, Alonso-Alonso S, Baamonde B, Alfonso JF, Fernández-Vega-Cueto L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Mini Cleanroom for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP): Bioengineered Corneal Epithelium. Pharmaceutics. 2021; 13(8):1282

pharmaceutics

MDPI

Article

Mini Cleanroom for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP): Bioengineered Corneal Epithelium

Silvia Berisa-Prado [1,2], Natalia Vázquez [1,2], Manuel Chacón [1,2], Mairobi Persinal-Medina [1,2], Sergio Alonso-Alonso [1,2], Begoña Baamonde [1,2], José F. Alfonso [1,2], Luis Fernández-Vega-Cueto [1,2], Jesús Merayo-Lloves [1,2] and Álvaro Meana [1,2,3,*,†]

[1] Fundación de Investigación Oftalmológica, Instituto Universitario Fernández-Vega, Universidad de Oviedo, 33012 Oviedo, Spain; sberisa@unav.es (S.B.-P.); natalia.vazquez@fio.as (N.V.); m.chacon@fio.as (M.C.); mairobimedina@gmail.com (M.P.-M.); sergio.alonso@fio.as (S.A.-A.); bbaamonde@yahoo.es (B.B.); j.alfonso@fernandez-vega.com (J.F.A.); lfvc@fernandez-vega.com (L.F.-V.-C.); merayo@fio.as (J.M.-L.);
[2] Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain
[3] Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) (U714), ISCII, 28029 Madrid, Spain
* Correspondence: meana@fio.as; Tel.: +34-985-24-01-41; Fax: +34-985-23-32-88
† Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Spain.

Citation: Berisa-Prado, S.; Vázquez, N.; Chacón, M.; Persinal-Medina, M.; Alonso-Alonso, S.; Baamonde, B.; Alfonso, J.F.; Fernández-Vega-Cueto, L.; Merayo-Lloves, J.; Meana, Á. Mini Cleanroom for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP): Bioengineered Corneal Epithelium. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1282. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081282

Academic Editors: Belén Begines and Ana Alcudia

Received: 9 July 2021
Accepted: 13 August 2021
Published: 17 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Among several requirements for the manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) are: following the guidelines of a pharmaceutical quality system, complying with Good Manufacturing Practice (GMP) and access to a cleanroom fulfilling strict environmental conditions (Class A work area and Class B environment). This makes ATMP expensive. Moreover, the production of many of these therapeutic products may also be unprofitable, as in most cases their use is limited to a few patients and to a single batch per manufacturing unit. To reduce costs, ATMP may be produced in a scaled-down system isolated from the external environment (isolator), allowing for placement of this facility in a Class D environment, which is much more permissive and less costly. In this work, we confirm that it is possible to manufacture bioengineered corneal epithelium inside an isolator while fulfilling all the safety assurance standards at an affordable cost for patients. This small-scale ultra-clean working environment complies with GMP guidelines and could be a solution for the high costs associated with conventional cleanroom ATMP production.

Keywords: advanced therapy medicinal products; ophthalmology; hospital pharmacy

1. Introduction

Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) for human use include gene therapy, cell therapy and tissue engineering products. These ATMP offer treatment options for diseases that today lack effective medication. An example is Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD), an orphan disease (171673), for which traditional keratoplasty leads to a poor prognosis as there are few Limbal Stem Cells (LSC) to renew the corneal epithelial surface. The in vitro expansion of LSC has shown satisfactory results, and Holoclar® (Chiesi, Parma, Italy) is the first ATMP used in Europe to treat LSCD after the European Medicine Agency (EMA) granted it marketing authorization [1]. As mouse cells and bovine serum are employed in the production of this drug, it is contraindicated for use in patients who are hypersensitive to xenogeneic proteins [2].

Recently, the Spanish Fundación de Investigación Oftalmológica developed a simple culture method for the in vitro expansion of LSC avoiding xenogeneic components, in which Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) is used as the only culture medium

supplement and to construct a PRGF membrane to culture and transplant the LSC [3]. Under current European legislation, this form of therapy is defined as an ATMP.

In Europe, ATMP are legislated by Regulation (EC) N° 1394/2007 of the European Parliament and of the Council [4]. For ATMP produced for use in a single hospitalized patient, this regulation contemplates "hospital exemption". In Spain, the Real Decreto 477/2014 regulates authorization of the non-industrial manufacture of ATMP, requiring compliance with Good Manufacturing Practice (GMP) and with the medicinal products' law whereby a cleanroom facility is a production requirement [5–7].

Traditional cleanrooms are typically containment rooms where the air is filtered and recirculated through a High Efficiency Particle Arresting (HEPA) filtration system. These installations, containing all the necessary equipment for the production of an ATMP, are expensive to build and maintain. To reduce the costs of traditional cleanrooms and also allowing for their customization, new modular cleanrooms have recently emerged. However, although maintenance costs are lower, the price of their design is even higher than for traditional cleanrooms. These requirements make the manufacture of ATMP expensive, especially as they themselves are unprofitable to produce because their use is limited to few patients and to a single batch per manufacturing unit. An alternative that would reduce costs is to produce the ATMP in a system isolated from the external environment, like an isolator, and to place this system in a Class D environment, which is much more permissive and less costly.

The aim of this work was to design a reduced size, low-cost cleanroom installation that complies with GMP standards for the production of an ophthalmologic ATMP, bioengineered corneal epithelium. Together with our Pharmacy Service, in the present study we developed a mini cleanroom with all the equipment necessary to manufacture a bioengineered corneal epithelium (PRGF scaffold with cultured LSC on top). This ultra-clean workstation was then used to prepare this ATMP which complies with all safety assurance regulations and is affordable for patients.

2. Materials and Methods

2.1. Mini Cleanroom Design

In accordance with GMP, the following user requirement specifications were established:

- Positive pressure Grade A isolator (laminar flow between 0.25 m/s and 0.50 m/s with 90% recirculation of air, International Organization for Standardization (ISO) 4 [6,8]
- Dimensions that allow the installation of all the equipment necessary for production (cell incubator, centrifuge and phase-contrast microscope with monitor)
- Lateral Special Airlock System (SAS) with double door lock
- Universal serial bus (USB), High-Definition Multimedia Interface (HDMI) and alternative current/discontinuous current (AC/DC) connectors

2.2. Qualification of the Mini Cleanroom

The mini cleanroom was required to pass through all stages of qualification planning: Installation Qualification (IQ), Operational Qualification (OQ) and Performance Qualification (PQ) included in the validation master plan. Qualifications were conducted in accordance with predetermined and approved qualification protocols. Previously, the area where the mini cleanroom was located was also qualified.

2.2.1. Installation Qualification (IQ)

IQ was carried out according to the IQ protocol which contains all the required details:

- Isolator model and serial number
- Details of the supplier and manufacturer
- Installation date

- Mini cleanroom designed in accordance with design specification and requirements
- Verification of isolator elements
- Operating and working instructions, maintenance requirements and certificate of OQ at source

During installation, standard operational procedures (SOPs) with the process for operations, maintenance and cleaning of the mini cleanroom were drawn up.

2.2.2. Operational Qualification (OQ)

Complex operational parameters were qualified by the supplier (TDI, Madrid, Spain). OQ was performed "at rest" according to the OQ protocol which contains all the required details and the limits established (Table 1, Table 2 and Table 3):

- Particle counts for cleanroom air quality classification according to ISO 14644-1 [8]
- Airflow velocity measurement
- Testing installed HEPA filter
- Air flow distribution test
- Weekly environmental monitoring (3 weeks) including air sample on individual tryptic soy and Sabouraud's dextrose agar settling plates (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) exposed for less than 4 h. Surface samples including isolator walls and equipment
- Weekly counting particle counts (3 weeks) using an HHPC 3+ counter (0.3 μm) (HACH®, London, OR, Canada)
- Weekly monitoring of control panel parameters ensuring that alert and action limits are not exceeded (3 weeks)
- Weekly cleaning of the mini cleanroom as per SOP (3 weeks)

Table 1. Established alert and action limits for control panel parameters.

	Alert	Action
Exhaust filter	15–20 Pa	<15 Pa
Downflow filter	>120 Pa	>140 Pa
Inflow	<0.28 m/s or >0.47 m/s	<0.20 m/s or >0.55 m/s
Temperature	>25 °C	>30 °C
Humidity	>55%	>60%

Table 2. Non-viable particle counts. ISO: International Organization for Standardization.

ISO 14644-1 Classification						
Concentration of Particles per Cubic Meter of Air						
CLASS	**≥0.1 μm**	**≥0.2 μm**	**≥0.3 μm**	**≥0.5 μm**	**≥1 μm**	**≥5 μm**
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1000	237	102	35	8	-
ISO 4	10,000	2370	1020	352	83	-
ISO 5	100,000	23,700	10,200	3520	832	29
ISO 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8320	293
ISO 7	-	-	-	352,000	83,200	2930
ISO 8	-	-	-	3,520,000	832,000	29,300
ISO 9	-	-	-	35,200,000	8,320,000	293,000

Table 3. Non-viable and viable particle counts. CFU: colony forming units.

Grade	Non-Viable Particle Limits				Viable Particle Limits			
	At Rest		In Operation					
	0.5 μm/m³	5 μm/m³	0.5 μm/m³	5 μm/m³	CFU/m³	Settling Plates (90 mm) CFU/4 h	Contact Plates (55 mm) CFU/plate	Footprint (5 Footprint/Glove)
A	3520	20	3520	20	<1	<1	<1	<1
B	3520	29	352,000	2900	10	5	5	5
C	352,000	2900	3,520,000	29,000	100	50	25	-
D	3,520,000	29,000	-	-	200	100	50	-

2.2.3. Performance Qualification (PQ)

PQ was carried out at rest or in operation according to a PQ protocol which contains all the required details:

- Cleaning of mini cleanroom for four months
- Environmental monitoring of mini cleanroom for four months
- Particle count monitoring of mini cleanroom for four months
- Control panel monitoring for four months

2.3. Quality Program according to GMP Procedures

A quality program was developed in accordance with the Real Decreto 477/2014 and GMP Part IV [5,6] to ensure:

- Adequate staff training
- Appropriate facilities and equipment for intended use with adequate cleaning and maintenance
- A document system with appropriate specifications of the materials used in the production process as well as of the finished product which comply with the defined specifications, keeping the appropriate records.
- A clearly defined production process
- A quality control system independent of the production system
- A self-assessment system
- Quality defects and process deviations are identified, causes are investigated and corrective and/or preventive measures are taken
- Traceability of the ATMP manufactured and the materials used in the production process

2.4. ATMP Production in the Mini Cleanroom

Production was transferred from the basic research laboratory to the mini cleanroom. The first step was to validate the aseptic technique by all the staff involved in ATMP production. Briefly, the steps described in the production guide were simulated using trypticase soy growth (TSG) media. Next, TSG media were incubated for 14 days at 30–37 °C. The aseptic technique was validated if no microbiological contamination was observed. Once validated, three production batches were prepared in the mini cleanroom according to written SOPs:

2.4.1. Preparing the Culture Medium and PRGF Membranes for the Production of Bioengineered Corneal Epithelium

Blood was collected from healthy volunteers after explaining to them the nature and possible consequences of the study and obtaining their written consent. The study protocol adhered to the principles of the Declaration of Helsinki (Protocol Code: 2020.050; Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias; 23 March 2020). Blood samples from each volunteer were processed according to the method described by Anitua et al. [9,10]. Briefly, 81 mL of blood were collected into 9 mL tubes containing 3.8%

(*wt*/*v*) sodium citrate, and the tubes were centrifuged at 580× *g* for 8 min at room temperature.

Plasma was used as the only supplement in the culture medium and as a fibrin scaffold for culturing and delivering LSC [3] (Figure 1). Briefly, the plasma was drawn off, avoiding the buffy coat, incubated with 50 µL/mL of 10% $CaCl_2$ (B. Braun Medical, Barcelona, Spain) at 37 °C for 30 min and the released supernatant (PRGF) was collected:

Culture medium: the culture medium was a 2:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Ham F12 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% PRGF. Once prepared, it was filtered through a 0.20 µm polyethersulfone membrane (Thermo Fisher Scientific), aliquoted and stored at 4 °C in a double container until use.

PRGF membranes: 10 mL aliquots of recovered plasma were incubated with 500 µL of 10% $CaCl_2$ in a 60 × 15 mm cell culture Petri dish at 37 °C for at least 30 min. Once a gel had formed, PRGF membranes were obtained by flattening for 30 s using a 100 µm fibrin membrane shaper (BTI, Vitoria, Spain). The PRGF membranes obtained were placed onto a CellCrown™ insert (Scaffdex, Tampere, Finland) to improve handling and stored with 4 mL of PRGF at 4 °C in a double container until use.

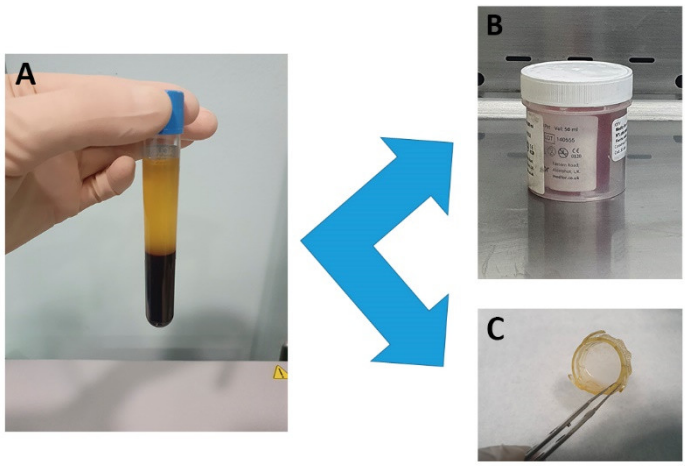


Figure 1. Human plasma (**A**) is used both as supplement (PRGF) for the culture medium (**B**) and as a scaffold (PRGF membrane) (**C**) for culturing and delivering LSC. PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; LSC: Limbal Stem Cell.

2.4.2. Establishing the Primary Culture

Limbus explants from cadaveric donors were obtained from our local Tissue Bank, Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (CCST) according to Regulation (EC) N° 23/2004 [11]. Briefly, the limbal region was carefully dissected according to its anatomical position and then cut into thirteen pieces of approximately 1–2 mm^2 that were stored at 4 °C in an Eusol bottle (Alchimia, Ponte San Nicolò, Italy) until use. In the mini cleanroom, 12 tissue pieces were placed in the wells of a 12-well culture plate with culture medium and cultured at 37 °C, in a 5% CO_2 atmosphere in an incubator.

2.4.3. Medium Changes

A few drops of culture medium were added every day until the LSC began to proliferate from the explant. Hereafter, the culture medium was changed twice a week.

2.4.4. Culturing LSC on the PRGF Membranes to Prepare the Bioengineered Corneal Epithelium

Cultures of LSC were examined every day using the phase-contrast microscope installed in the mini cleanroom. Once confluent, photographs were taken and one of the well cultures was fixed with methanol for 10 min for cytokeratin (CK) with high molecular weight (Ref: M0630, Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) and the transcription factor p63-alpha (Ref: 4892S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) immunofluorescence in order to identify corneal epithelial cells and LSC respectively. The rest of the well cultures were trypsinized, followed by counting cells with a hemocytometer, seeding them (>300,000 cells per membrane) onto a PRGF membrane placed in the well of 6-well culture plate with culture medium and culturing them for 72 h in the same culture medium supplemented with 1.5 mg/mL tranexamic acid (Amchafibrin®, Meda Pharma, Madrid, Spain).

Immunofluorescence analysis was performed in the microscopy facility of the Fundación de Investigación Oftalmológica. Briefly, fixed cells were rinsed with Phosphate Buffered Saline (PBS) solution twice for 10 min and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 for another 5 min. Next, the samples were incubated at 4 °C overnight with primary antibodies (p63-alpha, 1:100; CK, 1:40) containing 10% normal goat serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as a blocking agent. Immunolabeled cells were visualized by indirect immunocytochemistry and stained with 4', 6-DiAmidino-2-PhenylIndole (DAPI) to visualize nuclei. Samples were examined in a Leica DM6000B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and five photos of random fields were captured using a Leica DFC310FX camera at 20x magnification. In the photographs, cells staining positive for p63-alpha out of the total of DAPI positive cells (%) were counted using ImageJ software (NIH, Bethesda, MA, USA).

2.4.5. Final Release of ATMP

After 72 h of culture, the ATMP was packaged in its final primary and secondary containers, labeled and released once subjected to all the quality control checks.

2.4.6. Quality Control

Process Quality Control

To identify the critical manufacturing steps, a risk manual was prepared including a Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). In the critical manufacturing steps, viable and non-viable particle counts were monitored.

Product Quality Control

For the ATMP, the quality controls steps were:

- Examine the morphology by phase-contrast microscopy and CK immunofluorescence and determine the percentage of p63-alpha positive cells (LSC) in the primary culture using the immunofluorescence technique described above
- Count the number of cells of five photos of random fields at 20x magnification in the ATMP by DAPI staining
- Through p63-alpha immunofluorescence, confirm the presence of the LSC in the final ATMP
- Microbiological control of the manufactured ATMP consisting of an initial (plasma and limbal tissue), intermediate (supernatant) and final microbiological analysis by an external laboratory according to Chapter 2.6.1 of the European Pharmacopoeia [12],which previously had validated the growth promotion of the culture medium (aerobes, anaerobes, mycoplasma and endotoxins).

3. Results

3.1. Mini Cleanroom Design

The mini cleanroom consisted of an isolator of positive pressure ISO 4 (AISLAISO4-PP-1800®, TDI, Madrid, Spain) of exterior dimensions 1880 × 780 × 1620 cm, equipped with a lateral SAS with an independent ultraviolet (UV) sterilization system and a double-door lock along with a gas outlet with an electronically controlled valve and USB, HDMI and AC/DC connectors. To ensure air purity, the isolator was fitted with HEPA H14 filters (TDI) with an efficiency of 99.995% according to EN1822 regulation [13], which provides laminar flow of 0.25 m/s to 0.50 m/s with 90% air recirculation.

The equipment needed to produce the ATMP installed inside the isolator facility consisted of a small portable CO_2 incubator (Minicell NB203M, N-Biotek, Gyeonggi-do, Korea), a phase-contrast microscope (EVOX® XL Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific) and a compact centrifuge (Spectrafuge 6C, Labnet, Madrid, Spain) (Figure 2).

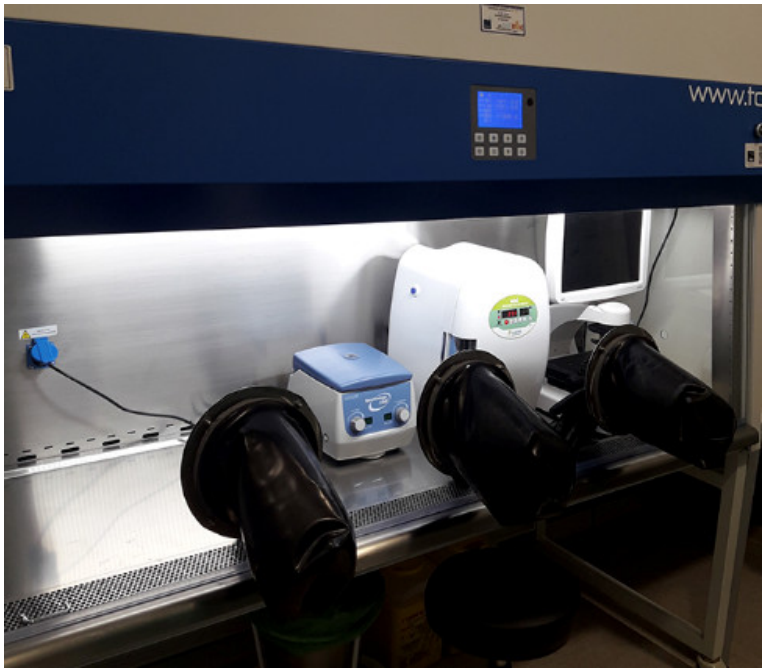


Figure 2. Mini cleanroom.

The mini cleanroom workstation was set up in a qualified Grade C area authorized for the elaboration of sterile products within the Pharmacy Service of the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega.

3.2. Qualification of Mini Cleanroom

3.2.1. Installation Qualification (IQ)

The mini cleanroom complied with user requirement specifications. Below we provide drawings of the mini cleanroom layout and air handling units (Figure 3).

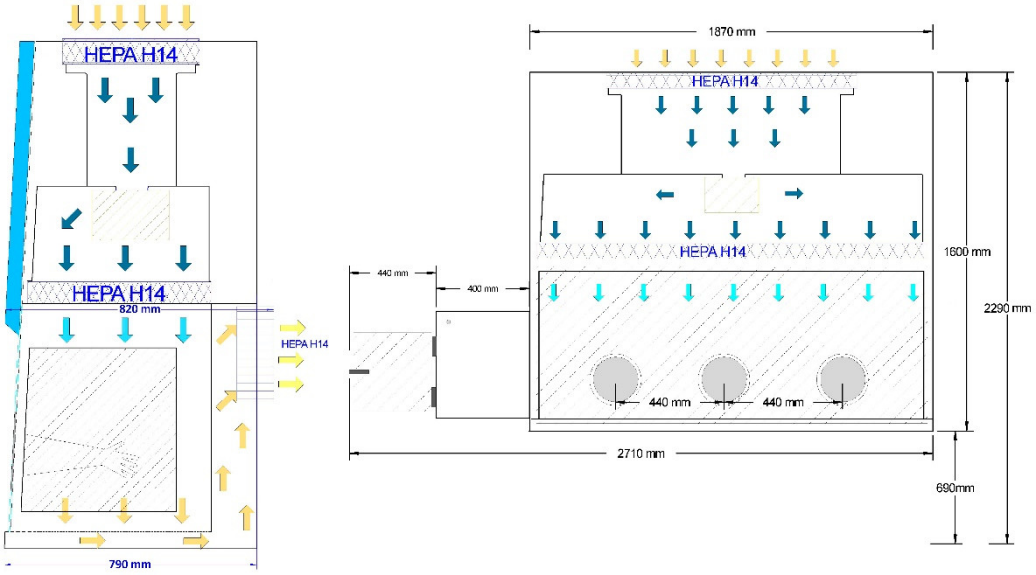


Figure 3. Front and side view of the isolator filtration system. HEPA: High-Efficiency Particle Arresting.

In addition, it was checked that finishes were smooth, defect-free, and without uncleanable recesses, that SAS doors were interlocked to prevent both doors being opened simultaneously, and that panel controls were accessible. Finally, we made sure that instructions and certificates of OQ were available at the source.

3.2.2. Operational Qualification (OQ)

Testing by the external supplier indicated that the mini cleanroom complied with the required ISO 4 classification in terms of non-viable particle counts at rest, having positive pressure and being airtight. In addition, the results of the laminar flow test performed at eight points in the isolator indicated no areas of turbulence in compliance with the standards presented in ISO 14644-1 [8]. Environmental conditions, non-viable particle counts, and control panel parameters were within the allowed limits over the 3 weeks of weekly monitoring. Finally, cleaning was easy to carry out (Table 4).

Table 4. Operational qualification (OQ). ISO: International Organization for Standardization.

ISO 4 Classification Assay								
Points	**Particle Diameter (µm)**							
	0.3 µm		**0.5 µm**		**1 µm**		**5 µm**	
	ft^3	m^3	ft^3	m^3	ft^3	m^3	ft^3	m^3
1	1	35	1	35	1	35	0	0
2	11	300	2	71	1	35	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.3 µm		0.5 µm		1 µm		5 µm	
Mean results	141.00		35.33		23.33		0.00	
FINAL RESULT	**ISO 4**		**ISO 4**		**ISO 4**		**ISO 4**	
Positive pressure test								
Points	**Pressure**		**Correction**		**Pressure + Correction**			
1	32.00 Pa		0.00 Pa		32.00 Pa			
2	29.00 Pa		0.00 Pa		29.00 Pa			
3	33.00 Pa		0.00 Pa		33.00 Pa			
4	31.00 Pa		0.00 Pa		31.00 Pa			
5	30.00 Pa		0.00 Pa		30.00 Pa			
FINAL RESULT: Mean: 31.00 Pa. Positive pressure								

Laminar air flow test					
Points	**Laminar flow**		**Correction**	**Laminar flow + Correction**	
1	0.37 m/s		0.01 m/s	0.38 m/s	
2	0.40 m/s		0.02 m/s	0.42 m/s	
3	0.39 m/s		0.01 m/s	0.40 m/s	
4	0.37 m/s		0.01 m/s	0.38 m/s	
5	0.38 m/s		0.02 m/s	0.40 m/s	
6	0.40 m/s		0.02 m/s	0.42 m/s	
7	0.35 m/s		0.01 m/s	0.36 m/s	
8	0.36 m/s		0.02 m/s	0.38 m/s	
FINAL RESULT: Mean: 0.38 m/s. Laminar flow					
Control panel parameters					
Week	**Exhaust filter**	**Downflow filter**	**Inflow**	**Humidity**	**Temperature**
1	32 Pa	102 Pa	0.46 m/s	32%	20 °C
2	35 Pa	103 Pa	0.50 m/s	30%	20 °C
3	32 Pa	103 Pa	0.46 m/s	42%	22 °C
FINAL RESULT	**33 Pa**	**103 Pa**	**0.47 m/s**	**35%**	**21 °C**

Week	**Non-viable particles**		**Viable particles**		
	0.3 μm	**0.5 μm**	**Passive air**	**Contact plates**	**Footprint**
1	0	0	Negative	Negative	Negative
2	0	0	Negative	Negative	Negative
3	0	0	Negative	Negative	Negative
FINAL RESULT: 0			**FINAL RESULT: Negative**		

3.2.3. Performance Qualification (PQ)

Control panel parameters and viable and non-viable particle counts at rest and in operation were within permissible limits over the four months of continuous monitoring (Table 5).

Table 5. Performance qualification (PQ).

Control Panel Parameters					
Month	**Exhaust Filter**	**Downflow Filter**	**Inflow**	**Humidity**	**Temperature**
1	34 Pa	103 Pa	0.50 m/s	22%	20 °C
2	34 Pa	102 Pa	0.47 m/s	42%	22 °C
3	34 Pa	103 Pa	0.46 m/s	40%	23 °C
4	36 Pa	103 Pa	0.50 m/s	30%	23 °C
FINAL RESULT	**35 Pa**	**103 Pa**	**0.48 m/s**	**34%**	**22 °C**

Month	**Non-viable particles**		**Viable particles**		
	0.3 μm	**0.5 μm**	**Passive air**	**Contact plates**	**Footprint**
1	0	0	Negative	Negative	Negative
2	0	0	Negative	Negative	Negative
3	0	0	Negative	Negative	Negative
4	0	0	Negative	Negative	Negative
FINAL RESULT: 0			**FINAL RESULT: Negative**		

Moreover, all the equipment and instruments used in the manufacture of the ATMP were also qualified and calibrated.

3.3. Quality Program according to GMP Procedures

The quality program implemented covers all aspects of production, from starting materials, premises and equipment, through to staff training and personal hygiene. For this purpose, SOPs were developed providing documented proof that correct procedures were consistently followed at each step of the manufacturing process.

SOPs were classified into:

- General SOPs: for general operations and activities related to the procedure to be carried out
- Control SOPs: describing the operations to carry out for environmental controls of the isolator and quality control of the ATMP
- Production SOPs: describing operations directly related to ATMP production
- Equipment operating and maintenance SOPs: describing the operations to be carried out for proper operation and maintenance of the different devices
- Qualification SOPs: describing the operations that must be carried out to confirm that the qualified devices comply with the manufacturer instructions and with GMP
- Validation SOPs: describing the operations that must be carried out for documented evidence that a process meets the specifications and/or quality characteristics defined

Each SOP consists of the following sections: the purpose of the SOP, the staff responsible for complying with the procedure, the description of the procedure, the references and records generated by the SOP or other information that it is considered of interest.

Moreover, the validation master plan, the risk manual with a HACCP, the stability study and the technical sheet were also written.

3.4. ATMP Production in the Mini Cleanroom

Three batches of our ATMP were produced in the mini cleanroom following the protocol described above.

3.4.1. Process Quality Controls

The HACCP established three critical manufacturing steps: preparation of the culture medium and PRGF membranes and establishing the primary LSC culture; culture of LSC on PRGF membrane; and final release of ATMP. In these steps, we confirmed that viable and non-viable particle counts in the three batches were within permitted limits (Table 6).

Table 6. Process quality control.

Process Quality Control						
Batch	**Viable Particles**			**Non-viable Particles**		
	Critical Step 1	**Critical Step 2**	**Critical step 3**	**Critical Step 1**	**Critical Step 2**	**Critical Step 3**
1	Negative	Negative	Negative	0	0	0
2	Negative	Negative	Negative	0	0	0
3	Negative	Negative	Negative	0	0	0
	FINAL RESULT: Negative			**FINAL RESULT: 0**		

3.4.2. Product Quality Control

In the three batches prepared, LSC began to migrate from the limbal explant onto the culture plate after 4–8 days of culture and a monolayer of LSC, flat and round in shape, was observed on confluent culture plates (day 15) by phase-contrast microscopy (Figure 4). Immunofluorescence analysis (Figure 4) indicated that primary LSC cultures were CK and p63-alpha positive: the percentage of p63-alpha positive cells in the primary LSC culture (Table 7) was 76.38 ± 1.49% (72.03–80.31%), which is slightly higher than the limits established (63.00 ± 1.93%) in prior work [3].

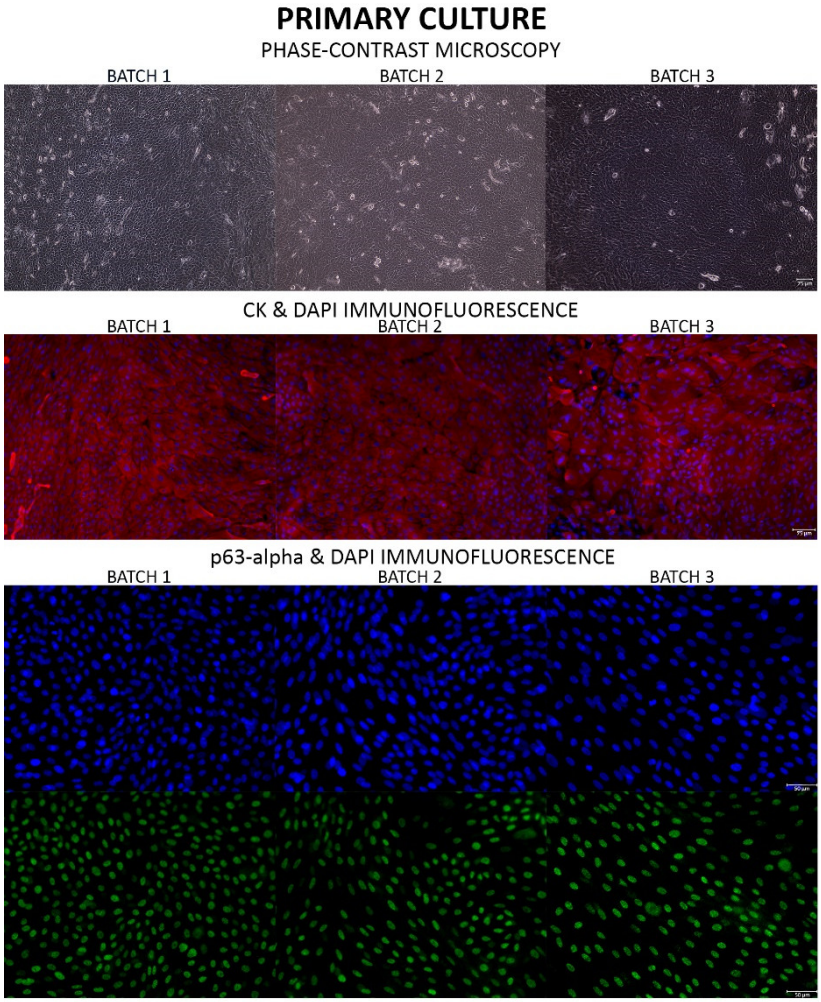


Figure 4. Phase-contrast microscopy (Scale: 75 μm) and immunofluorescence analysis of the LSC primary cultures in which CK positive LSC appear red (Scale: 75 μm), p63-alpha positive LSC appear green (Scale: 50 μm) and DAPI appears blue. LSC: Limbal Stem Cell; CK: cytokeratin.

Table 7. Product quality control.

Product Quality Control				
Batch	**Primary Culture**		**ATMP**	
	p63-alpha Positive LSC	**Number of cells**	**p63-alpha Positive LSC**	**Microbiological Control**
1	72.03%	141,967 cell/cm^2	82.37%	Negative
2	76.79%	171,504 cell/cm^2	44.89%	Negative
3	80.31%	104,446 cell/cm^2	44.55%	Negative

DAPI analysis of the manufactured ATMP revealed an LSC count (Table 7) of 139,306 ± 10,160 cells/cm^2 (104.446–171.504 cells/cm^2), well within the number of cells established for the ATMP in the technical sheet (79,000–316,000 cell/cm^2). Moreover, immunofluorescence analysis of the manufactured ATMP (Figure 5) indicated that ATMP were CK and p63-alpha positive: the percentage of p63-alpha positive cells in the ATMP (Table 7) was 57.27 ± 5.91% (44.55–82.37%).

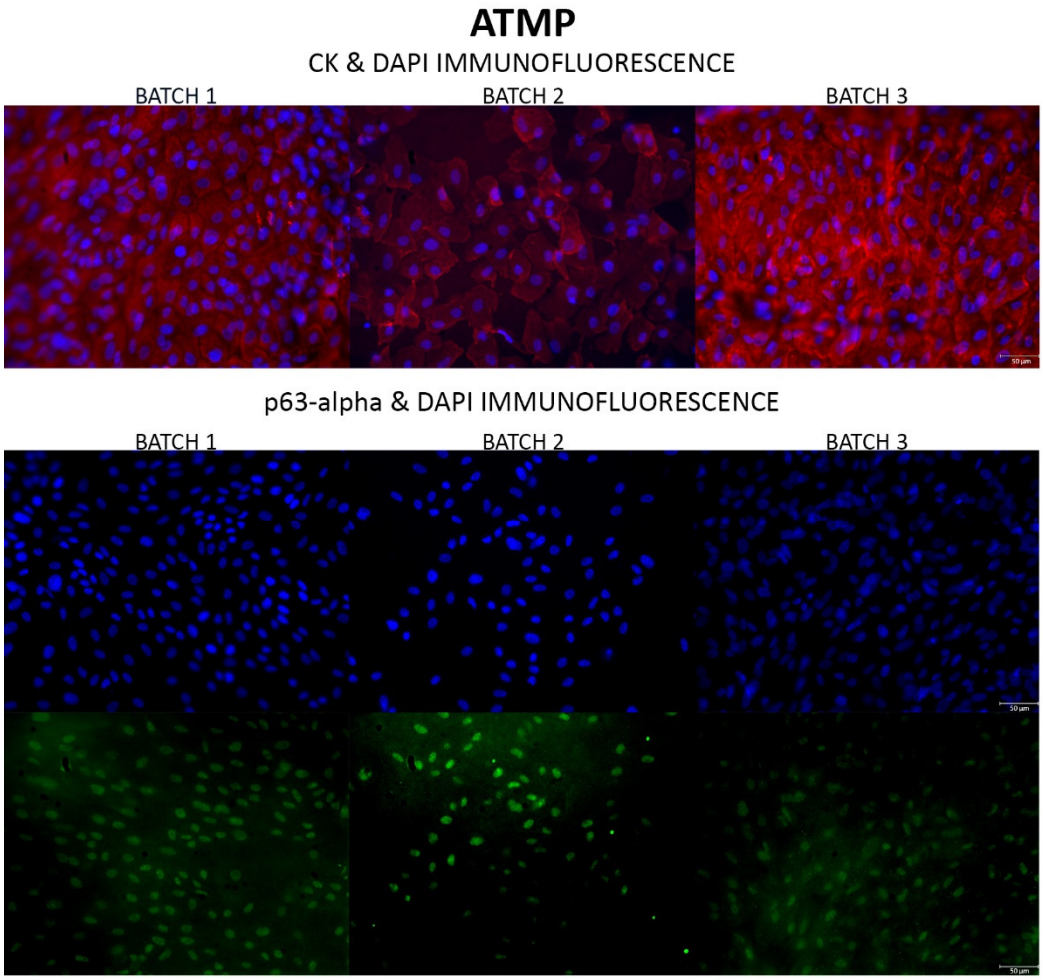


Figure 5. Immunofluorescence analysis of ATMP in which CK positive LSC appear red, p63-alpha positive LSC appear green and DAPI appears blue (Scale: 50 μm). ATMP: Advanced Therapy Medicinal Products; CK: cytokeratin; LSC: Limbal Stem Cell.

Finally, initial (plasma), intermediate (supernatant) and final microbiological checks of the manufactured ATMP (Table 7) indicated no microbiological contamination in any of the batches prepared.

4. Discussion

ATMP are drugs for human use designed to treat diseases that are refractory to currently marketed drugs. The regulation applicable to these drugs is European Regulation (EC) N° 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on ATMP [4], which applies to centralized authorization by the EMA.

ATMP must meet two main requirements to be commercialized and approved by regulatory agencies: confirmed safety assurance and efficacy of the therapy [14], and consistent and rigorous manufacturing with well-defined quality [15] while maintaining economic profitability [16]. Due to the enormous manufacturing challenges that have to be overcome for approval, only two ocular ATMP have been approved in Europe: Luxturna® (Spark Therapeutics, Philadelphia, PA, USA), an ATMP for the treatment of inherited retinal dystrophy [17], and Holoclar®, an ATMP for the treatment of moderate to severe LSCD caused by burns [18,19].

Inherited retinal dystrophy and LSCD are considered rare diseases. In Europe, a rare disease is one that affects 1 person per 2000 and European regulation contemplates

"hospital exemption" to manufacture one ATMP for the treatment of a single patient, within the framework of a hospital institution responsible for ATMP manufacture following the strict quality conditions required for conventional drugs (GMP) [6].

In Spain, the Real Decreto 477/2014 [5] is applicable to ATMP for human use which comply with "hospital exemption". These products are occasionally prepared in accordance with specific quality standards, and used in a hospital institution under the exclusive professional responsibility of a registered physician. They are also required to correspond to an individual medical prescription for a custom-made product intended for a single patient, as defined in Regulation (EC) N° 1394/2007 [4]. The Spanish Agency for Medicines and Health Products (AEMPS) confirms that these ATMP satisfy criteria of quality, safety, efficacy, identification and information [4,5]. Currently, there are two approved drugs according to this Real Decreto [20]: ARI-0001 cellular dispersion for perfusion, a CAR-T cell therapy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (Hospital Clínic de Barcelona, Cataluña, Spain) and autologous bone marrow stem mesenchymal cells, an ATMP developed to treat spinal injury (Hospital Universitario Puerta del Hierro, Madrid, Spain).

The manufacture of these ATMP require authorization by the AEMPS, which includes being approved for complying with GMP. Conventional cleanrooms are ideal for this purpose, yet with the limitation of both installation and maintenance costs, making ATMP treatments inaccessible for most healthcare systems. In ophthalmology, where an ATMP may have a volume of less than 1 mL or in the case of an epithelial corneal lamella graft, a diameter of less than 3 cm, the use of a conventional cleanroom of several square meters is even more unprofitable. This is especially true when manufacturing a small number of batches as in the case of an ATMP manufactured for the treatment of a rare disease.

The use of low-cost infrastructures and simple maintenance, complying with all GMP requirements, is a feasible alternative to conventional cleanrooms. Sophisticated designs currently exist and have been adopted by the pharmaceutical industry to produce cells and ATMP. An example is the Integrated Cell Processing Workstation®, Isocell pro® (Tecomak) and Cell Processing Isolator® (ESCO). This is an integrated system for GMP-compliant processing and preparation of regenerative stem cell and cell therapies. However, these new technologies have been developed for several batches and not for a single batch for one patient. This means that even these infrastructures end up being costly as production is limited.

In previous works, we developed a culture method for the in vitro expansion of LSC, in which PRGF is used as the only culture medium supplement and to construct a PRGF membrane to culture and transplant the LSC [3]. Moreover, we demonstrated that PRGF membranes with autologous or heterologous rabbit LSC were able to restore the corneal surface in a rabbit alkali-burn model [21].

In the present work, we designed a mini cleanroom facility to transfer ATMP production in the research laboratory to a mini cleanroom, of lower installation and maintenance costs and complying with GMP. In this facility, production is carried out in a space isolated from the outside environment, such that LSC can be expanded and monitored throughout the production process. Protocol qualification revealed that the mini cleanroom proposed here complies with the required ISO 4 classification according to ISO 14644-1, had positive pressure, was airtight, had laminar airflow without turbulence, and environmental and control panel parameters were within allowed limits. The benefits of isolators over conventional cleanrooms such as air pressure differential, small footprint and relative ease of decontamination make a good case for their superior sterility assurance potential.

For our proposal, we adapted a quality program to this special workstation, or mini cleanroom, that enables the production of an ATMP with the requirements of quality, safety assurance and efficacy. The work scheme complies with current regulations regarding ATMP requirements. While with this facility we were able to produce an ATMP

saving on installation and maintenance costs, the quality program developed required the same large amount of documentation as for a conventional cleanroom.

The functionality of the mini cleanroom was confirmed through the production of three batches of our ATMP. Cumulatively, these batches revealed that the ATMP had several cells per cm^2 within the limits allowed in the Holoclar® technical sheet approved by the EMA [19]. Moreover, the percentage of p63-alpha positive cells in the primary LSC culture was slightly higher than the limit established in our prior work [3]. Since LSC cultured onto PRGF membranes are difficult to see by phase-contrast microscopy we demonstrated optimal LSC morphology by CK immunofluorescence and we confirmed the presence of a high level of p63-alpha positive cells in the ATMP which sustains the regenerative potential of LSC [22]. This guarantees the efficacy of our ATMP as these cells will proliferate after transplantation and regenerate the ocular surface. In addition, this criterion ensures the reproducibility of our production process.

Despite the described benefits of this affordable installation, because of the limited working space, staff training is required. This could be a drawback for transferring this installation to other specialties that require larger-scale production. However, consumables, cleaning and validation costs, along with operator time and working conditions, are improved in the mini cleanroom approach, thus contributing to the critical goal of procedure optimization and reduction of final product costs. Our design could help with the development of new ophthalmology products such as gene therapy agents for retinal diseases or engineered lamellar endothelial tissue. It should be noted that for many patients needing a cornea transplant, there is no donor cornea available, especially in countries where tissue banks are scarce or lacking. The possibility of new treatment options for corneal transplants manufactured in low-cost laboratories may be an important step forward to treating some causes of blindness and facilitating access to treatments to many patients. Facilities such as that proposed here could be a starting point for new therapies within reach of the few patients who suffer from a rare ophthalmologic disease. Furthermore, this mini cleanroom facility could also be applied to the manufacturing of other types of ATMP which require GMP-quality manufacturing.

5. Conclusions

We here propose an innovative installation, a mini cleanroom, or small-scale GMP-compliant ultra-clean workstation, as a solution for the high costs associated with cleanroom facilities generally used for ATMP production. This design could enable small laboratories to prepare relatively low-budget therapeutic products, thus reaching a greater number of patients.

Author Contributions: Conceptualization, Á.M. and J.M.-L.; Methodology, S.B.-P., N.V., M.C. and Á.M.; Formal analysis, .S.B.-P., N.V. and Á.M.; Investigation, S.B.-P., N.V., M.P.-M. and S.A.-A.; Resources, B.B., J.F.A., L.F.-V.-C., Á.M. and J.M.-L.; Data curation, S.B.-P., N.V. and M.C.; Writing—original draft preparation, S.B.-P., N.V. and Á.M.; Writing—review and editing, S.B.-P., N.V., M.C., M.P.-M., S.A.-A., B.B., J.F.A., L.F.-V.-C., Á.M. and J.M.-L.; Supervision, Á.M. and J.M.-L.; Funding acquisition, L.F.-V.-C., Á.M. and J.M.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by the Government of Principado de Asturias (FICYT) co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER) and by Fundación Telefónica. IDI-2017-000089.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Protocol Code: 2020.050; Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias; 23 March 2020.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All the obtained data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors wish to thank the staff of the tissue bank Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias and the nursing staff of the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega for help with the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pellegrini, G.; Ardigò, D.; Milazzo, G.; Iotti, G.; Guatelli, P.; Pelosi, D.; De Luca, M. Navigating Market Authorization: The PathHoloclar Took to Become the First Stem Cell Product Approved in the European Union. *Stem Cells Transl. Med.* **2018**, *7*, 146–154, doi:10.1002/sctm.17-0003.
2. Dereli, C.G.; Akdere, Ö.E.; Can, M.E.; Aydın, B.; Cagil, N.; Gümüşderelioğlu, M. A completely human-derived biomaterial mimicking limbal niche: Platelet-rich fibrin gel. *Exp. Eye Res.* **2018**, *173*, 1–12, doi:10.1016/j.exer.2018.04.013.
3. Riestra, A.C.; Vazquez, N.; Chacón, M.; Berisa, S.; Sánchez-Ávila, R.M.; Orive, G.; Anitua, E.; Meana, A.; Merayo-Lloves, J. Autologous method for ex vivo expansion of human limbal epithelial progenitor cells based on plasma rich in growth factors technology. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 248–256, doi:10.1016/j.jtos.2017.01.003.
4. Regulation (EC) No. 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on Advanced Therapy. Medicinal Products and Amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No. 726/. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32007R1394 (accessed on 17 March 2021).
5. Real Decreto 477/2014, de 13 de Junio, Por el Que se Regula la Autorización de Medicamentos de Terapia Avanzada de Fabricación no Industrial. Available online: https://www.boe.es/eli/es/rd/2014/06/13/477 (accessed on 8 May 2021).
6. Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 Laying down the Principles and Guidelines of Good Manufacturing Practice in Respect of Medicinal Products for Human Use and Investigational Medicinal Products for Human Use. Available online: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjSzcO53rTyAhUJzhoKHZTNDcgQFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Feur-lex.europa.eu%2FLexUriServ%2FLexUriServ.do%3Furi%3DOJ%3AL%3A2003%3A262%3A0022%3A0026%3Aen%3APDF&usg=AOvVaw3XMXw295TdZCUMsXvFg8sr (accessed on 18 March 2021).
7. Spanish Law of Medicinal Product: Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de Julio, por el Que se Aprueba el Texto Refundido de la Ley de Garantías y uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios. 2006. Available online: https://www.boe.es/eli/es/rdlg/2015/07/24/1 (accessed on 1 June 2021).
8. Clean Rooms and Associated Controlled Environments. Part 1: Classification of Air Cleanliness. International Organization for Standardization. ISO 14644-1:2015. Available online: https://www.une.org/ (accessed on 7 May 2021).
9. Anitua, E.; de la Fuente, M.; Muruzabal, F.; Riestra, A.; Merayo-Lloves, J.; Orive, G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp. Eye Res.* **2015**, *135*, 118–126, doi:10.1155/2018/8086269.
10. Anitua, E.; Muruzabal, F.; Tayebba, A.; Riestra, A.; Perez, V.L.; Merayo-Lloves, J.; Orive, G. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: Preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol.* **2015**, *93*, e605–e614, doi:10.1111/aos.12710.
11. Regulation (EC) No. 2004/23 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on Setting Standards of Quality and Safety for the Donation, Procurement, Testing, Processing, Preservation, Storage and Distribution of Human Tissues and Cells. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32004L0023(accessed on May 8 2021).
12. Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 10th ed.; EDQM: Strasbourg, France, 2019.
13. EN1822 Regulation. Available online: https://www.une.org/ (accessed on 20 April 2021).
14. de Wilde, S.; Coppens, D.G.M.; Hoekman, J.; de Bruin, M.L.; Leufkens, H.G.M.; Guchelaar, H.J.; Meij, P. EU decision-making for marketing authorization of advanced therapy medicinal products: A case study. *Drug Discov. Today.* **2018**, *23*, 1328–1333, doi:10.1016/j.drudis.2018.03.008.
15. Morrow, D.; Ussi, A.; Migliaccio, G. Addressing Pressing Needs in the Development of Advanced Therapies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2017**, *25*, 55, doi:10.3389/fbioe.2017.00055.
16. Moutsatsou, P.; Ochs, J.; Schmitt, R.H.; Hewitt, C.J.; Hanga, M.P. Automation in cell and gene therapy manufacturing: From past to future. *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 1245–1253, doi:10.1007/s10529-019-02732-z.
17. European Medicines Agency. Luxturna. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna (accessed on 4 February 2021).
18. Sacchetti, M.; Rama, P.; Bruscolini, A.; Lambiase, A. Limbal stem cell transplantation: Clinical results, limits, and perspectives. *Stem Cells Int.* **2018**, *18*, 8086269, doi:10.1155/2018/8086269.
19. European Medicines Agency. Holoclar. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/holoclar (accessed on 4 February 2021).
20. Advanced Therapies Approved in Spain. Available online: https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/terapias-avanzadas/autorizaciones-de-uso-de-medicamentos-de-terapia-avanzada/ (accessed on 27 March 2021).

21. Sánchez-Ávila, R.M.; Vázquez, N.; Chacón, M.; Persinal-Medina, M.; Brea-Pastor, A.; Berisa-Prado, S.; Fernández-Vega-Cueto, L.; Anitua, E.; Meana, Á.; Merayo-Lloves, J. Fibrin-Plasma Rich in Growth Factors Membrane for the Treatment of a Rabbit Alkali-Burn Lesion. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5564, doi:10.3390/ijms22115564.
22. Di Iorio, E.; Barbaro, V.; Ruzza, A.; Ponzi, D.; Pellefrini, G.; de Luca, M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9523–9528, doi:10.1073/pnas.0503437102.