

PLATAFORMA INNOVADORA DE PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS EN ENTORNOS DE INVESTIGACIÓN

ANTECEDENTES

La inmunoterapia del cáncer basada en el bloqueo de puntos de control inmunológico ha revolucionado el tratamiento del cáncer. En el año 2000 se realizó el primer ensayo clínico usando anticuerpos bloqueantes de CTLA-4, aprobados en 2011 para melanoma. En muy pocos años, el cuadro de uso de anticuerpos bloqueantes ha cambiado radicalmente. Durante los últimos 12 años las terapias con anticuerpos bloqueantes se han aprobado para más de 50 tipos de cáncer (Caroline Robert Nature Communications (PMID: 32732879)). Actualmente se han transformado en los tratamientos oncológicos más extensos, tanto en primeras como en segundas líneas de tratamiento, así como monoterapia o en combinación con quimioterapia. En la actualidad hay más de 3.000 ensayos clínicos en marcha. El mercado de estos productos está creciendo (<https://www.precedenceresearch.com/immune-checkpoint-inhibitors-market>) a un ritmo notable, con la expectativa de alcanzar los 148 mil millones de euros. Sin embargo, el precio de los tratamientos sigue siendo muy alto (aproximadamente 2.500€/dosis/paciente. Un paciente recibe aproximadamente 15 dosis anuales). Y la mayor parte de los pacientes no responden, lo que se traduce en un coste altísimo para los sistemas públicos de salud. Por ejemplo, solo en Navarra, el gasto anual en 2022 de tratamientos de inmunoterapia fue de 30.812.470 €. Además del alto coste de los tratamientos oncológicos, la producción podría ser mejorable mediante la reducción de componentes que suponen desechos altamente químicos y altas cantidades de recursos naturales, como el caso del agua empleada.

Las inmunoterapias contra el cáncer, sobre todo las de bloqueo PD-1 y PD-L1 han revolucionado la oncología, y se aplican rutinariamente a más de 50 distintos tipos tumorales. Sin embargo, hay entre el 50 y el 70% de los pacientes tratados con estas terapias no responde al tratamiento. La razón principal del fallo de estas inmunoterapias se debe a la expansión de células mieloides inmunosupresoras, que inactivan al sistema inmunitario en los pacientes. Esta inactivación hace que no respondan a los anticuerpos terapéuticos, por lo que el proceso de identificación y caracterización de estas moléculas pequeñas es de interés para el desarrollo de nuevos medicamentos y tratamientos, tanto desde la industria farmacéutica como desde el sistema público de investigación. Estos datos ponen en relevancia el potencial impacto de la presente propuesta, facilitando el acercamiento e investigación, por grupos del ecosistema público de investigación, de moléculas pequeñas que logren resultados positivos en ensayos clínicos.

Para poder llevar a cabo dichos estudios, es necesario la producción de moléculas pequeñas. Actualmente, los investigadores biomédicos y clínicos no disponen de una plataforma especializada, incluyendo desde el equipo necesario para el desarrollo de los procesos como los protocolos, técnicas, procedimientos y sistemas de control y validación específicos asociados,

en la producción de moléculas pequeñas en grado clínico y en cantidad suficiente como para poder continuar con las investigaciones clínicas pertinentes. Para validar la plataforma desarrollada, se propone trabajar con un primer caso de uso relacionado con las capacidades reprogramadoras de la molécula oleuropeína, que facilite la construcción y testado de los procesos y su ampliación a otras moléculas pequeñas.

La [Unidad de OncolInmunología de Navarrabiomed](#) posee una muy amplia experiencia en inmunoterapias contra el cáncer, y su aplicación en tratamientos clínicos. Hasta la fecha, el grupo ha identificado perfiles inmunitarios asociados a respuesta o su falta, en pacientes oncológicos tratados con inmunoterapia de bloqueo PD-1/PD-L1. La Unidad de OncolInmunología de Navarrabiomed lleva a cabo estos estudios en colaboración con el [Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Navarra \(HUN\)](#).

ESTADO DEL ARTE

PRODUCCIÓN CONOCIDA DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

Las terapias de bloqueo PD-1/PD-L1 fallan en la mayor parte de los pacientes con cáncer, lo que hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Estas estrategias están actualmente basadas en la combinación de las inmunoterapias con otros tratamientos, que incluyen quimioterapia clásica, tratamientos dirigidos (moléculas pequeñas inhibidoras de rutas de señalización intracelular), y otra gran variedad de compuestos en etapas experimentales. Dentro de éstos, y como se ha mencionado previamente, la oleuropeína, en concreto se estudia como primer caso de uso que permita el correcto desarrollo, parametrización y validación del proceso de fabricación de la plataforma, con el objetivo de lograr un sistema que permita extrapolar los resultados obtenidos a otros casos de uso. Estos objetivos se podrían alcanzar aplicando los principios de la “química verde” para desarrollar plataformas de producción y purificación de moléculas pequeñas no solo más asequibles y menos costosas, sino también menos dañinas medioambientalmente.

Los principios de la “química verde” han enfatizado la necesidad de incorporar las preocupaciones medioambientales mediante la adaptación de estrategias más sostenibles en procesos de síntesis de precisión, como por ejemplo la reducción de la cantidad de agentes químicos, mejorando los mecanismos de las reacciones de síntesis y purificación, y adoptando el uso de solventes benignos medioambientalmente (Abdussalam-Mohammed et al. Chem Meth. 2020. 4:408-423). Por ejemplo, la utilización de catálisis ácidas de Lewis poco agresivas (Procopio et al. J Agr. Food Chem. 2009, 57, 1161-1167). La Sociedad Americana de Química ha elaborado una guía de 12 principios para cumplir con unos amplios objetivos desarrollados por distintas comunidades regulatorias y empresariales, en forma de iniciativas de prevención de la polución (<https://www.acs.org/greenchemistry/>). Los objetivos generales comprenden desde una mejora de la protección de los cultivos, a una mejora de los productos comerciales y medicinas.

La Unidad de investigación de OncolInmunología de Navarrabiomed ha demostrado que la administración de adyuvantes (moléculas pequeñas) en combinación con inmunoterapia revierte la proliferación de diferentes tipos de cáncer en pacientes que no respondían a la inmunoterapia por sí misma. Estas moléculas pequeñas se obtienen a través de colaboraciones

establecidas dentro del ámbito académico, o adquiriéndolas a través de empresas que las proporcionan en cantidades muy pequeñas. Una de las complicaciones más importantes para poder trasladar los resultados obtenidos con pequeñas muestras de moléculas candidatas, es la imposibilidad de obtenerlas en cantidades suficientes y con las características adecuadas para su progreso hacia ensayos clínicos. Como se menciona previamente, esto podría tener relevancia en más de 50 tipos de cáncer (Caroline Robert Nature Communications (PMID: 32732879)) donde actualmente hay más de 3.000 ensayos clínicos en marcha relacionados con tratamientos oncológicos más extensos, tanto en primeras como en segundas líneas de tratamiento, así como monoterapia o en combinación con quimioterapia.

La mayoría de las empresas biotecnológicas que proporcionan los servicios de producción de moléculas pequeñas, lo hacen considerando cada caso individualmente, y generalmente a cantidades industriales, encareciendo y limitando la capacidad de investigadores del sector público de realizar investigación basada en el uso de moléculas pequeñas. Actualmente, los investigadores biomédicos y clínicos no disponen de una plataforma especializada en la producción de moléculas pequeñas a las escalas necesarias y cumpliendo los requisitos necesarios para su progreso hacia ensayos clínicos. Por ello, estaríamos hablando de un TRL de partida 4, prueba de concepto, situación que se pretende contrastar con el mercado a través de la presente CPM.

Para demostrar la eficacia clínica de los distintos fármacos, es necesario su producción y purificación a unas escalas lo suficientemente grandes y en grado clínico para los grupos de investigación de los sistemas públicos de investigación. La creación de una plataforma que implemente técnicas, procesos y protocolos innovadores de producción y purificación de moléculas pequeñas en fase experimental solventaría el cuello de botella en el desarrollo clínico de nuevos fármacos frecuentemente asociado a la investigación pública. Por poner un ejemplo ilustrativo, en el año 2017 en Estados Unidos se aprobaron por la FDA 34 moléculas pequeñas para fines terapéuticos. La inversión anual aplicada para el desarrollo de pequeñas moléculas en total fue de 204.3 billones de dólares (Makurvet, F.D. Medicine in Drug Discovery 2021:9). Estos datos reflejan la desproporción entre los resultados finales y la inversión financiera destinada tanto por grupos de investigación académica como por empresas biotecnológicas para el desarrollo de moléculas pequeñas para tratamiento humano. Los gastos para el desarrollo de un medicamento (molécula pequeña) se han estimado entre los años 2009-2018 en torno a los mil millones de dólares como media por cada molécula que llega al mercado (Wouters et al. JAMA. 2020. 814-853) Estos datos indican claramente que la investigación traslacional pública, en ausencia de la participación de industria, tiene posibilidades muy reducidas de desarrollar hasta el final (desde el descubrimiento hasta el ensayo clínico y aprobación) de un fármaco. Tal y como se indica en los antecedentes del presente anexo, se trata de un mercado innovador con un elevado potencial de crecimiento (<https://www.precedenceresearch.com/immune-checkpoint-inhibitors-market>)

NECESIDAD NO CUBIERTA

La necesidad no cubierta actual, por tanto, se resume en que los investigadores traslacionales públicos requieren contar con la producción de dichas moléculas pequeñas en grado clínico en condiciones y en cantidad suficiente como para poder continuar con las investigaciones clínicas pertinentes y finalmente, desarrollar productos que puedan utilizarse como base en ensayos clínicos. Para poder demostrar la eficacia clínica de dicha plataforma se propone como primer caso de uso, para luego aplicarlo a otras moléculas pequeñas, el de la obtención de la oleuropeína en cantidades suficientes para su uso en ensayos y a un precio asequible para los grupos de investigación de Navarrabiomed y el ecosistema público de investigación. Estas preparaciones tienen que reunir las características adecuadas de pureza, calidad y seguridad requeridas para su aprobación por la EMA (European Medicines Agency) como medicamento. Esta posibilidad no se oferta por las empresas especializadas en el sector, que generalmente proporciona el servicio caso por caso, y generalmente a escalas industriales a un coste tan elevado que resulta una barrera para la progresión de la mayoría de las moléculas en fase experimental hacia ensayos clínicos.

Esta necesidad no cubierta es una de las prioridades en Salud de la Estrategia Española de Ciencia, Tecnología e Innovación 2021-2027, al tratar la innovación en “nuevas terapias”, un desafío estratégico tanto para administraciones como para operadores económicos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una innovadora plataforma optimizada que permita la purificación y producción de moléculas pequeñas en entornos de investigación para los grupos de investigación del Servicio Navarro de Salud, facilitando, acelerando y mejorando el ciclo de descubrimiento de moléculas pequeñas susceptibles de llevar a ensayos clínicos.

Para ello, la plataforma debe permitir que las preparaciones reúnan las características adecuadas de pureza, calidad y seguridad requeridas para su aprobación por la EMA como medicamento.

Como parte del desarrollo, se propone la molécula oleuropeína, como primer caso de uso que permita el correcto desarrollo, parametrización y validación del proceso de fabricación de la plataforma, con el objetivo de lograr un sistema que permita extrapolar los resultados obtenidos a otros casos de uso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Concretamente, la presente Consulta busca identificar soluciones específicas a los siguientes objetivos:

- Facilitar el acceso a los grupos de investigación de Navarrabiomed a una plataforma que produce moléculas pequeñas en grado clínico y en unas condiciones adecuadas para su uso posterior en ensayos clínicos, aumentando el rendimiento de purificación de moléculas pequeñas, y su grado de pureza.

- Mejorar los procedimientos de extracción de moléculas pequeñas en términos de eficiencia medioambiental y sostenibilidad, sin que esto afecte al rendimiento del proceso: disminución del gasto de agua durante el proceso, del uso de disolventes y compuestos con mínimo impacto medioambiental y limitando la utilización de reactivos de grado clínico altamente contaminantes.
- Acelerar el proceso de investigación de nuevas moléculas pequeñas, acortando el proceso de descubrimiento de nuevas terapias.
- Acelerar el proceso de selección de participantes en los ensayos clínicos, incrementando la eficacia de los tratamientos desarrollados a partir de las moléculas pequeñas identificadas y aumentando el número de pacientes finales que pudieran llegar a beneficiarse de los tratamientos desarrollados.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR Y RESULTADOS ESPERADOS

1- DISEÑO FUNCIONAL DE LA PLATAFORMA

2- DESARROLLO E IMPLANTACIÓN DE LA PLATAFORMA

Se diseñará y construirá una plataforma innovadora de purificación y producción de moléculas pequeñas en entornos de investigación en condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP, [EudraLex - Volume 4 \(europa.eu\)](http://eudralex.europa.eu)), para obtener los productos en grado clínico. Serán necesario considerar los siguientes aspectos:

2a. Proceso de obtención de producto inicial bruto y proveedor:

Obtención de las fuentes crudas para la purificación de las moléculas.

2b. Procesamiento y extracción

Los procesos iniciales de extracción y semi-purificación del producto en principio no requerirán condiciones de sala blanca.

2c. Proceso de purificación

Será necesario diseñar un proceso que cumpla con los requerimientos necesarios para establecer un sistema de purificación, muestreo, análisis y control de calidad de acuerdo con normas GMP. Dicho proceso podrá incluir sistemas de purificación por cromatografía. Y para determinar la pureza se podría realizar mediante técnicas de espectrometría de masas y 1H-NMR espectroscopía.

2d. Proceso de empaquetado

Será necesario proceder con el empaquetado del producto purificado en condiciones GMP, en viales adecuados para su posterior uso. Esto incluiría por ejemplo liofilizadores y sistemas automatizados de empaquetado.

2e. Proceso de cultivos celulares

Se realizará el procesado de las muestras biológicas procedentes de donantes humanos y animales de los modelos preclínicos, con el fin de caracterizar perfiles inmunológicos. Preferiblemente sería necesario establecer unas condiciones de bioseguridad 2.

2f. Sistemas de análisis y control de calidad del producto

Será necesario establecer un sistema de muestreo aleatorio de los productos y de cada proceso de producción siguiendo guías GMP.

El protocolo de producción debería incluir el trabajo en condiciones GLP (*Good Laboratory Practices*) y GMP (*Good Manufacturing Practices*), detallando un sistema de seguimiento y calidad de los lotes de producción. Estos apartados incluirían la implementación de técnicas y sistemas analíticos adecuados para garantizar la calidad del producto. Los sistemas de extracción serían unos métodos “verdes” que reducen al mínimo la utilización de solventes orgánicos durante el proceso.

3- VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA Y PRODUCCIÓN DE PRIMERAS UNIDADES

A) Validación de la plataforma innovadora:

Se utilizarían modelos pre-clínicos específicamente con los lotes preparativos de grado clínico. Los diseños experimentales se llevarán a cabo siguiendo las indicaciones de la EMA e incluirán ([La EMA publica la versión 2 de la guía de Implementación EU IDMP 2.0 | Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios \(aemps.gob.es\)](https://www.aemps.gob.es/la-ema-publica-la-version-2-de-la-guia-de-implementacion-eu-idmp-2.0)):

- a. Ensayos de toxicidad.
- b. Farmacocinética y farmacodinámica.
- c. Evaluación de parámetros bioquímicos e inmunológicos.
- d. Eficacia terapéutica y selección de dosis.

Se llevarán a cabo por una plataforma de control de calidad, en condiciones GLP (GMP) para asegurar en todo momento la trazabilidad.

El diseño experimental debería incluir el “sexo” como un factor no estocástico. Se definirán protocolos y estudios a dosis única y a dosis repetidas, y el diseño experimental contemplará la generación de modelos predictivos de farmacodinámica y farmacocinética que complementen los estudios.

El producto final (que se administre vía oral o inyectable) tendrá que adecuarse a los estándares ISO IDMP (Identification of Medicinal Product; [La EMA publica la](https://www.aemps.gob.es/la-ema-publica-la)

[versión 2 de la guía de Implementación EU IDMP 2.0 | Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios \(aemps.gob.es\)](#)), compuesto de cinco estándares separados (identificación única; información regulatoria dosis, unidades de presentación, rutas de administración y empaquetamiento; unidades de medida; información del producto farmacéutico; información regulatoria del producto farmacéutico).

Se incluirán:

3a. Estudios toxicológicos

Se deberá evaluar la dosis IC50 en los modelos utilizados en animales sanos, y la alteración de los órganos (si la hubiere) como hígado, riñones, bazo, o lo que se considere necesario para caracterizar adecuadamente la toxicidad del producto.

3b. Estudios de farmacocinética y farmacodinámica

Se deberá monitorizar la biodisponibilidad del fármaco en suero, la vida media y su metabolización. Estos estudios contemplarán la administración del compuesto a través de distintas rutas:

- Intravenosa.
- Intraperitoneal.
- Subcutánea.
- Oral.

Se pondrá especial atención a la vía oral, calculando la biodisponibilidad y vida media sistémicamente, dado que esta ruta de administración puede compensar en el diseño del protocolo clínico en voluntarios. Se cuantificará la pérdida del compuesto activo tras la administración oral, y su vida media en sangre periférica. En estos estudios, el fármaco se proporcionará en solución salina en los tres casos de administración.

El desarrollo de la formulación para la administración en ensayos clínicos seguirá a los resultados obtenidos.

B) Producción de primeras unidades de moléculas en grado clínico

Con las moléculas que se obtengan de los procesos anteriores, estarán disponibles las primeras unidades para proceder con los ensayos clínicos en un procedimiento posterior.

REQUISITOS MÍNIMOS TENTATIVOS

Los productos finales procedentes de la plataforma tendrán que producirse en condiciones de buenas prácticas de manufactura y adecuarse a los estándares ISO IDMP (Identification of Medicinal Products).

Para el desarrollo de la plataforma y el proceso de producción, purificación, análisis y empaquetamiento, se considerarán varios puntos relevantes:

- Porcentajes relativos de pureza del producto en cada etapa del proceso.
- Análisis físico-químicos aplicados al producto, así como análisis de ausencia de contaminantes de riesgo para uso humano. Se valorará la inclusión de análisis pre-clínicos de toxicidad tanto por procedimientos in vitro como in vivo, que sean relevantes para la aprobación del producto final por la EMA en las condiciones especificadas en la propuesta.
- Coste asociado a cada etapa del proceso, incluyendo los gastos de gestión de residuos.

ANEXO: CASO DE USO

OLEUROPEÍNA COMO MOLÉCULA REPROGRAMADORA DE CÉLULAS MIELOIDES Y POTENCIADORA DEL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA

La oleuropeína es el principal compuesto bioactivo del olivo (*Olea europaea* L. Oleaceae). Es un tipo de secoiridoide bioactivo fenólico conocido por sus efectos farmacológicos beneficiosos. Entre los múltiples efectos para la salud destacamos los efectos cardioprotectores, anticancerígenos, antimicrobianos, antiagregación plaquetaria, antiaterogénicos, neuroprotectores y antioxidantes.

El grupo de Oncoinmunología se ha centrado en su efecto inmunomodulador que es la menos conocida, y sus efectos sobre las inmunoterapias de bloqueo PD-L1/PD-1 en cáncer. No hay estudios en los que se evalúe el efecto de la oleuropeína purificada en células inmunitarias asociadas al microambiente tumoral. Algunos estudios analizan los efectos de extractos concentrados de productos del aceite de oliva, en los que oleuropeína está presente en porcentajes variables. En estos estudios con extractos se ha observado una disminución del ambiente inflamatorio.

Hasta el momento, no se había evaluado el efecto de la oleuropeína en combinación con tratamientos de bloqueo de PD-1/PD-L1 para el tratamiento de neoplasias. Así, su estudio se concentró en la caracterización del efecto de la oleuropeína sobre las distintas poblaciones mieloides supresoras en cuanto a fenotipo y función, además de sus efectos directos e indirectos sobre los linfocitos T. Como antecedentes sobre el caso de uso propuesto, resultados de la Unidad de investigación conforman la base experimental que sustenta la presente propuesta. En concreto, los descubrimientos obtenidos por la Unidad de OncoInmunología actualmente bajo trámite de patente (solicitud presentada en EPO, EP Application No. 23 382 523.1). La Unidad de investigación utilizó proteómica cuantitativa diferencial para estudiar la reprogramación de células mieloides asociadas al cáncer utilizando oleuropeína, un derivado bisfenólico de hojas de olivo (*Olea Europaea*) y de los subproductos desechados de la industria del aceite de oliva, que regula la inflamación y oxidación crónicas. Las inmunoterapias basadas en anticuerpos bloqueadores de la interacción PD-1/PD-L1 se combinaron con oleuropeína en ratones con tumores de pulmón y cáncer colorrectal. La oleuropeína reprogramó a las células mieloides supresoras monocíticas y granulocíticas, así como a los macrófagos asociados al tumor, hacia linajes celulares inmunoestimuladores. Los datos de proteómica cuantitativa diferencial descubrieron las rutas moleculares que se activan y desactivan en cada tipo celular, y que controlan los programas principales de diferenciación. El tratamiento con oleuropeína potenció las capacidades de las células mieloides para activar a los linfocitos T, y potenció el tratamiento con anticuerpo anti-PD-1 independientemente de la forma de administración. Los tratamientos demostraron actividades terapéuticas potentes en cáncer de colon, y en modelos de cáncer de pulmón resistentes a inmunoterapia.

Por lo tanto, el uso de oleuropeína podría mejorar las respuestas clínicas en los pacientes oncológicos, especialmente en aquellos tratados con inmunoterapias de bloqueo PD-1/PD-L1. En línea con esta hipótesis, el tratamiento con oleuropeína de poblaciones inmunitarias aisladas de pacientes oncológicos resultó en la reprogramación de las poblaciones mieloides con perfil inmunosupresor hacia poblaciones inmunocompetentes e inmunoestimuladoras.

Los mecanismos subyacentes al fallo de las inmunoterapias de bloqueo son compartidos por la mayoría de los cánceres humanos para los que estos tratamientos están aprobados ((más de 50 cánceres de acuerdo con lo publicado por Caroline Robert en Nature Communications (PMID: 32732879)), lo que pone de relevancia la importancia de mejorar estas terapias y su potencial impacto positivo en la sociedad.

Como ejemplo ilustrativo y para el caso de uso, la purificación de oleuropeína, se ha demostrado una extracción mejorada utilizando calentamiento dirigido por microondas en solventes de mínimo impacto medioambiental. Esta adaptación en el procedimiento supone un rendimiento máximo en un tiempo de extracción muy corto (10 minutos asociado a una recuperación del 2.17% de oleuropeína), utilizando agua como disolvente principal. Por comparativa, los procedimientos habituales implican sistemas convencionales de calentamiento mediante el reflujado de soluciones de agua/metanol, y tiempos muy prolongados de extracción (480 minutos, asociado a una recuperación de oleuropeína del 0.5%). La incorporación de estos pasos mejorados, aplicables a pequeñas moléculas tanto naturales como de síntesis, mejorarían no solo el impacto ambiental, sino un considerable ahorro de tiempo y coste. Estos principios no son exclusivos al caso de uso, sino que son aplicables a otros productos ya sea procedentes de síntesis, o a partir de materias primas naturales.

Integración de las tecnologías novedosas (más verdes/menos contaminantes), resultando en una reducción del impacto medioambiental del proceso. Esta reducción incluiría la disminución de la generación de residuos químicos altamente contaminantes y la reducción de los costes de eliminación. La Unidad de OncoInmunología ha utilizado una estrategia de extracción de oleuropeína que elimina el uso de solventes orgánicos, basada en una extracción con microondas. Esta estrategia no sólo es aplicable al caso de uso, sino que es ampliable a la purificación de otras moléculas pequeñas, reduciendo el uso de materiales químicos altamente contaminantes.