NUEVAS METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS EN EL DESARROLLO BIOFARMACÉUTICO: INNOVACIÓN RESPONSABLE HACIA UN FUTURO SIN ANIMALES

Uno de los principales retos de la sociedad moderna es mejorar la salud mediante estrategias terapéuticas más eficaces, seguras y personalizadas. La investigación biomédica evoluciona gracias a avances en biotecnología, ingeniería celular, biología molecular y plataformas ómicas, que permiten comprender los mecanismos de enfermedad e identificar dianas terapéuticas selectivas. Este progreso abre la puerta a tratamientos dirigidos, con menor toxicidad y mayor eficacia.

LIDIA TOMÁS,
Responsable de Estudios Preclínicos *in vitro* en AINIA.

Este cambio se alinea con la *Strategic Research and Innovation Agenda* (SRIA) europea para biotecnología aplicada a la salud, que promueve el desarrollo de herramientas predictivas basadas en modelos humanos, la integración de tecnologías avanzadas para acelerar el descubrimiento de fármacos, la investigación en biomoléculas naturales y compuestos bioactivos, y la transición hacia una innovación biomédica ética y sostenible, reduciendo el uso de animales en investigación.

En este contexto, las Nuevas Metodologías Alternativas (NAMs), modelos in vitro avanzados, sistemas microfisiológicos, biología computacional e inteligencia artificial, están transformando el cribado y la validación preclínica. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) impulsa su adopción mediante la *Regulatory Science Strategy to 2025* y los informes *Horizon Scanning*, que marcan directrices para terapias más predictivas y centradas en la fisiología humana.

AINIA, con el proyecto Pharmanova II, integra estas herramientas en un flujo de trabajo experimental avanzado para evaluar compuestos con actividad antiinflamatoria y potencial frente a enfermedades intestinales y cáncer colorrectal. Su innovación clave está en la implementación y resultados de NAMs, con un enfoque más predictivo y mecanístico.



Cáncer colorrectal e inflamación intestinal

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las patologías con mayor impacto sanitario a nivel mundial, con casi 2 millones de casos en 2020 y más de 900.000 muertes. En España, se

diagnostican más de 43.000 casos anuales, siendo la segunda causa de muerte por cáncer. La evidencia científica muestra que la inflamación intestinal crónica, como en enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, está estrechamente relacionada con la carcinogénesis.

Factores como la dieta occidental, rica en grasas y baja en fibra, alteran la microbiota intestinal y generan un entorno inflamatorio que favorece mutaciones genéticas, proliferación celular descontrolada y angiogénesis, procesos clave en la progresión tumoral. Aunque existen tratamientos eficaces, aminosalicilatos, corticoides, inmunosupresores y agentes biológicos, presentan efectos secundarios y respuesta variable, lo que impulsa la búsqueda de alternativas más seguras y dirigidas a nuevas dianas moleculares.

En este escenario, las biomoléculas naturales, derivadas de microorganismos, plantas o compuestos metabólicos, representan una fuente prometedora de nuevos agentes terapéuticos. Sin embargo, para garantizar su eficacia y seguridad, es imprescindible contar con metodologías robustas y predictivas que permitan validar su mecanismo de acción en modelos fisiológicamente relevantes.

NAMs: hacia modelos más humanos, predictivos y éticos

La baja predictividad de los modelos animales, con un 80–90 % de los fármacos fallando en ensayos clínicos, ha impulsado una transición estratégica hacia las *Nuevas Metodologías de Alternativas* (NAMs). Estas metodologías buscan ofrecer alternativas o enfoques más representativos de la fisiología humana, reduciendo el uso de animales y mejorando la eficiencia en el desarrollo de medicamentos.

Entre los principales métodos se encuentran los modelos in vitro avanzados, que incluyen líneas celulares humanas modificadas genéticamente, sistemas de co-cultivo y tecnologías tridimensionales. En este ámbito, destacan los organoides y esferoides, capaces de reproducir la arquitectura y funcionalidad de tejidos humanos, y los órganos-en-chip (OoC), que integran microfluídica para simular parámetros fisiológicos dinámicos como flujo, presión y gradientes químicos. Además, las NAMs abarcan modelos computacionales e inteligencia artificial, que permiten predecir interacciones moleculares y toxicidad, así como aproximaciones in chemico para el análisis mecanístico de compuestos.

La bioimpresión 3D, aunque aún en fase emergente, representa una tendencia futura para generar estructuras tisulares complejas y modelos multicelulares más sofisticados. Su potencial para combinarse con organoides y sistemas OoC abre nuevas posibilidades para la investigación biomédica avanzada.

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) impulsa estas tecnologías mediante iniciativas como *"Horizon Scanning"* y la *"Regulatory Science Strategy to 2025"*, fomentando la adopción de modelos más humanos y éticos en la evaluación preclínica. Este enfoque no solo responde a principios regulatorios y éticos, sino que también mejora la predictividad y reduce el riesgo de fracaso en fases clínicas.

En este contexto, Pharmanova II aplica NAMs de forma integrada, evolucionando desde un cribado básico de biomoléculas hacia plataformas funcionales y predictivas capaces de generar resultados translacionales. El proyecto combina líneas celulares modificadas, sistemas intestino-en-chip y modelos tridimensionales, creando un pipeline que acerca la investigación preclínica a la realidad fisiológica humana y sienta las bases para terapias innovadoras frente a inflamación intestinal y cáncer colorrectal.

Pharmanova II: integración de NAMs en investigación aplicada

Pharmanova II tiene como objetivo desarrollas metodología *in vitro* que permita identificar biomoléculas con potencial terapéutico frente a inflamación intestinal y cáncer colorrectal (CCR). En este sentido añade un valor diferencial al incorporar de forma sistemática Nuevas Metodologias Alternativas (*New Approach Methodologies (NAMs)*), alineadas con las estrategias regulatorias europeas (EMA, SRIA) y orientadas a reducir el uso de animales, aumentar la predictividad y acelerar la innovación.

Plataforma avanzada de cribado celular:

Pharmanova II ha desarrollado una plataforma de cribado celular que representa un salto cualitativo respecto a los sistemas convencionales. Esta plataforma se basa en 2 líneas celulares humanas modificadas mediante la tecnología CRISPR incorporando dos modelos clave: uno reportero de NF-κB, que permite monitorizar la activación de rutas inflamatorias, y otro con inflamación endógena para la simulación de un microambiente patológico sin necesidad de inducción externa.

La validación de estas líneas se ha realizado mediante técnicas moleculares avanzadas como qPCR, western blot, secuenciación dirigida y ensayos funcionales de luciferasa, garantizando robustez y reproducibilidad. Una vez confirmada su funcionalidad, estas plataformas se han utilizado para evaluar biomoléculas naturales y compuestos proporcionados por empresas colaboradoras como Monteloeder y Terra Nova Foods, demostrando su utilidad como herramienta predictiva para la identificación de compuestos con actividad antiinflamatoria. Además, estas líneas están preparadas para integrarse en modelos dinámicos como el intestino-en-chip y en sistemas tridimensionales, reduciendo tiempos de desarrollo y disminuyendo el uso de animales en fases preclínicas.

Sistema dinámico: intestino-en-chip

Tras la fase de cribado, el proyecto evoluciona hacia un modelo de intestino-en-chip que integra tecnologías de microfluídica y co-cultivos celulares, reproduciendo condiciones fisiológicas más próximas al entorno intestinal humano. Este



enfoque permite simular gradientes dinámicos de flujo, interacciones célula-célula y exposición controlada a compuestos, ofreciendo una plataforma avanzada para estudios preclínicos.

En Pharmanova II, el sistema se ha optimizado mediante la incorporación de una línea celular modificada que posibilita la monitorización in situ del biomarcador inflamatorio seleccionado y la evaluación directa de la respuesta frente a compuestos bioactivos. El modelo permite controlar el flujo, la exposición a compuestos y las condiciones microambientales, así como analizar parámetros como secreción de citoquinas, expresión génica y viabilidad celular. Todo ello proporciona datos en condiciones in vitro que resultan más representativas que los modelos estáticos convencionales.Su diseño permite ensayos paralelos y comparativos, aumentando reproducibilidad y reduciendo costes.

Esferoides intestinales: antesala de organoides. Como paso intermedio hacia modelos más complejos, Pharmanova II ha permitido incorporar la tecnología de esferoides intestinales, obtenidos a partir de células humanas de carcinoma colorrectal mediante cultivo en agitación. Estos esferoides son estructuras tridimensionales que reproducen parcialmente la arquitectura y funcionalidad del tejido intestinal. La obtención y caracterización de este modelo se lleva a cabo mediante tecnologías avanzadas de cultivo celular, microscopía de fluorescencia y confocal, análisis de marcadores celulares y estudios de expresión génica en rutas inflamatorias. Además, el proyecto ha desarrollado un modelo de esferoide inflamado, que permite evaluar el efecto de compuestos con potencial actividad antiinflamatoria en un contexto tridimensional más cercano a la fisiología intestinal.

Resultados destacados

Pharmanova II ha generado resultados concretos que evidencian la madurez de las Nuevas Metodologías Avanzadas (*New Approach Methodologies (NAMs)*) implementadas y marcan un avance significativo para la aplicación de las mismas en la búsqueda de compuestos con potencial terapéutico.

Un sistema de cribado celular avanzado mediante la generación de líneas celulares editadas mediante CRISPR que muestran activación específica de rutas inflamatorias, como NF-κB, y permiten discriminar compuestos con actividad antiinflamatoria, incluyendo extractos validados de empresas colaboradoras como Monteloeder y Terra Nova Foods.

Un modelo dinámico y 3D, el intestino-en-chip desarrollado y optimizado que mantiene un estado inflamado estable, lo que posibilita analizar efectos antiinflamatorios y medir parámetros fisiológicos, moleculares y funcionales de manera integrada. Además, de esferoides intestinales funcionales. los esferoides intestinales obtenidos presentan estructuras tridimensionales organizadas, con marcadores epiteliales, que pueden responder a estímulos inflamatorios y reflejar los efectos moduladores de los compuestos candidatos.

La integración de cribado celular, intestino-en-chip y esferoides conforma un pipeline completo que reduce la dependencia de modelos animales y aumenta la predictividad preclínica. Este enfoque consolidado permite evaluar biomoléculas de forma rápida, segura y cercana a la fisiología humana, cumpliendo con las recomendaciones de la EMA y la SRIA europea, y generando evidencia robusta de eficacia y seguridad que respalda futuras aplicaciones terapéuticas frente a la inflamación intestinal y cáncer colorrectal.

Impacto y conclusión

La integración sistemática de Nuevas metodologias de análisis (*New Approach Methodologies (NAMs)*) constituye un modelo responsable, eficiente y alineado con las estrategias regulatorias europeas. Con este proyecto Pharmanova II demuestra que es posible incorporar tecnologías de vanguardia en investigación preclínica mediante un pipeline que combina cribado celular avanzado, sistemas dinámicos como intestino-en-chip y modelos tridimensionales como esferoides, cumpliendo con los principios de las 3Rs (Reemplazar, Reducir, Refinar).

La adopción de modelos *in vitro* avanzados incrementa la predictividad de los resultados, ofreciendo datos más representativos de la respuesta real de biomoléculas en pacientes. Esto permite identificar de forma temprana compuestos prometedores, acelerar la innovación terapéutica y reducir el riesgo de fracaso en fases clínicas.

Además, se refuerza la transferencia tecnológica, cumpliendo con las recomendaciones de la SRIA europea y la EMA, y en el desarrollo y validación de NAMs aplicadas a la industria farmacéutica.

En resumen, Pharmanova II ha permitido desarrollar un flujo de trabajo integral, que combina cribado celular, organ-on-chip, esferoides y modelos predictivos, generando evidencia sólida de eficacia y seguridad. Un enfoque que impulsa la innovación responsable y contribuye a transformar la investigación farmacéutica hacia modelos más éticos, sostenibles y predictivos.