

## Disposición Farmacocinética y Biodistribución del Anticuerpo Monoclonal *ior EGF/R3* en Ratas, Conejos y Perros

Eduardo FERNANDEZ-SANCHEZ <sup>1\*</sup>, Jorge DUCONGE <sup>1</sup>, Amarilys SURROCA <sup>1</sup>, Yamilé PERDOMO <sup>2</sup>, Carlos GONZALEZ & María de los Angeles BECQUER

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacocinética, Dpto. de Farmacología/ CIEB, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

**RESUMEN.** El anticuerpo monoclonal *ior EGF/r3*, por sus propiedades bloqueadoras del receptor al factor de crecimiento epidérmico, presenta propiedades relevantes en la terapia del cáncer. Se realizó su estudio de caracterización farmacocinética en ratas Wistar a tres niveles de dosis: 0,5, 1 y 2 mg, bolus i.v. Mediante un Análisis por Radioreceptor se obtuvieron las concentraciones a diferentes intervalos, desde 30 min hasta 96 h, en réplicas de 5x. Las dosis mayores se ajustaron a un transcurso bi-exponencial, mientras que en la dosis de 0,5 mg sólo fue posible alcanzar un ajuste mono-exponencial. Se estimaron los parámetros característicos y se encontraron diferencias fundamentales en el  $t_{1/2\beta}$  (31,66-68,07 h,  $p<0,05$ ) y en el CL (1,35-2,68 mL/h,  $p<0,05$ ). Se reporta una conducta dosis-dependiente. No se reportan altas captaciones a órganos, con excepción del hígado y riñón, órganos asociados al aclaramiento del monoclonal, aunque sus valores no sobrepasan al 7,03% de radio-actividad/órgano. Se estudió también su farmacocinética en conejos y perros. Los datos fueron en ambos casos ajustados a transcurros bi-exponenciales. En ambos se demuestra una regularidad farmacocinética, sin notables diferencias entre animales, mostrando parámetros confiables para su aplicación clínica. El  $t_{1/2\beta}$  alcanzó valores de 35,31 y 34,99 h, respectivamente, lo cual ratifica su potencialidad para una administración terapéutica.

**SUMMARY.** "Pharmacokinetic Disposition and Biodistribution of the Monoclonal Antibody *ior EGF/r3* in rats, dogs and rabbits". MoAb *ior EGF/r3* is well known by its antitumoral properties due to its anti-EGFr action. This survey was focused on the pharmacokinetic analysis of this drug in three different species, i.e., Wistar rats (at three dosage: 0.5, 1 and 2 mg), F1 rabbits and Beagle dogs, by bolus iv administration. The serum MoAb concentrations in rats were measured by radiobinding assay at several time points ranging from 30 min to 96 h, as 5 replication. At higher doses the pharmacokinetic biexponential decay profiles were fitted according to bicompartamental analysis, but at lower 0.5 mg dose the data points were better fitted using a monocompartmental modeling approach. It was reported the pharmacokinetic parameters with significant differences for  $t_{1/2\beta}$  (31.66-68.07 h,  $p<0.05$ ) and CL (1.35-2.68 mL/h,  $p<0.05$ ); showing a dose- dependence disposition pattern. There no exist significant uptake of the <sup>99m</sup>Tc- *ior EGF/r3* into the organs, but liver and kidney, which are both associated with its elimination clearance, although their values were not higher than 7.03 percentage of radioactivity/total organ weight. The pharmacokinetically characterized drug in rabbits and dogs was better fitted to biexponential elimination profiles. The regularity of the drug disposition time course was provided in both species, without significantly differences between animals. Finally, the elimination half-lives of 35.3 h (rabbits) and 35 h (dogs), supported its potential for further clinical administration.

### INTRODUCCION

El anticuerpo monoclonal (AcM) *ior EGF/r3*, una inmunoglobulina de tipo IgG2a, reconoce el receptor al factor de crecimiento epidérmico con una alta afinidad, siendo capaz de inhibir la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a su receptor, con una constante de inhi-

bición  $10^{-9}$  M, y muestra un patrón de reconocimiento inmunohistoquímico similar al AcM anti receptor al factor de crecimiento epidérmico (anti EGFr) de la firma Amersham <sup>1</sup>.

El AcM *ior EGF/r3* provoca una inhibición del crecimiento sin efectos citotóxicos relevantes, lo que sugiere un papel citostático por blo-

KEY WORDS: Monoclonal Antibody *ior EGF/ r3*, Pharmacokinetics, Biodistribution.

PALABRAS CLAVE: Anticuerpo monoclonal *ior EGF/r3*, Farmacocinética, Biodistribución.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia.

queo de la función fisiológica del EGFr. Ningún efecto tóxico fue observado a dosis acumuladas mayores de 1 g. Este AcM inhibe la autofosforilación del receptor, probablemente por bloqueo de la dimerización del mismo <sup>2</sup>. Además del valor que el *ior EGF/r3* puede presentar para confirmar el diagnóstico de algunos carcinomas escamosos y adenocarcinomas, este AcM puede ofrecer un medio para la evaluación del potencial proliferativo de tumores humanos, lo que permite un mayor y mejor pronóstico de los pacientes, particularmente aquellos con cáncer de mama y de pulmón <sup>3</sup>.

La alta expresión del EGFr en tumores epidermoides poco diferenciados ofrece la posibilidad de considerar al anticuerpo como otra vía para el tratamiento oncoespecífico. En este sentido se reportan internacionalmente trabajos orientados al uso de los AcMs anti-EGFr, similares al *ior EGF/r3* <sup>4-7</sup>.

La gran aplicación prevista para los anticuerpos monoclonales en general inevitablemente exige la realización de determinados estudios que garanticen inocuidad y eficacia, al ser administrados a un paciente; de ahí el reclamo, entre otros, de los estudios farmacocinéticos, preclínicos y clínicos. En dependencia del diseño experimental y sus objetivos, se han reportados para otros anticuerpos monoclonales estudios preclínicos en ratones, ratas, curieles, conejos, perros y monos <sup>8-9</sup>.

El presente trabajo se orienta a la caracterización farmacocinética del AcM *ior EGF/r3* en diferentes especies de mamíferos: perros Beagle, conejos F1 y ratas Wistar, estudiando, además, en esta última, la posible existencia de conductas dosis-dependientes sobre su disposición sistémica, así como el establecer su patrón de biodistribución. No obstante, dado que este anticuerpo murino ya encuentra una aplicación como método de diagnóstico <sup>10</sup>, es de interés reportar estos valores farmacocinéticos, ya que los mismos significarán aportes sustanciales al desarrollo posterior de la aplicación terapéutica, a partir de una versión humanizada de dicho anticuerpo.

Como toda nueva entidad terapéutica, a fin de definir posteriormente su administración en clínica en correspondencia con la regularidad manifiesta en su conducta de disposición, las agencias regulatorias orientan la realización de estudios farmacocinéticos en diferentes especies animales <sup>11</sup>, incluyendo roedores y no roedores, aunque las mismas no sean especies relevantes para la respuesta farmacodinámica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Producto a Ensayar**

AcM *ior EGF/r3*, con Kd de  $10^{-9}$  M, obtenido en los laboratorios del Centro de Inmunología Molecular (CIM), La Habana, Cuba; por inmunización de ratones con el receptor al EGF, purificado a partir de una fracción de placenta humana por una cromatografía de alta afinidad. El producto ensayado, *ior EGF/r3*®, se corresponde a la formulación comercializada por la firma CIMAB S.A., Cuba, preparado como inyectable mediante las Buenas Prácticas de Producción, según los Procedimientos Normalizados de Trabajo de las áreas de producción del CIM. El envase se corresponde a viales que contienen 50 mg de AcM *ior EGF/r3* en 10 mL de solución buffer, para una concentración de 5 mg/mL. El lote empleado se liberó con alta afinidad al EGFr en tejido fresco por inmunohistoquímica. Presente menos de 1 pg de DNA por dosis; esterilidad y pirógenos de la solución de acuerdo a la USP XXII y ausencia de virus murino por el listado de la norma ECCMP (III/859/86'EN) de la Unión Europea.

### **Animales de Experimentación**

Se utilizaron ratas machos de la línea Wistar, de peso aproximado 250 g, 4 conejos machos, de la línea F1, entre 1,9 y 2,2 Kg de peso, y 5 perros machos, de la raza Beagle, entre 12 y 14 Kg de peso, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los mismos se mantuvieron en las condiciones de cría vigentes en el Bioterio del Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB), en correspondencia con lo estipulado en los Procesos Normalizados de Trabajo, para la temperatura (20-22 °C), humedad (50%), dieta de pienso ratonina, conejilla y para perros, según proceda, y agua ad libitum, fotoperíodos (12h x 12h) y espacio vital. Todos los animales se mantuvieron en ayunas desde la noche anterior, sin restricción a la toma de agua. Después de la administración del fármaco se les mantuvo libre acceso a la toma de alimentos y agua.

### **Experimento Farmacocinético**

#### **Ratas**

Se realizaron administraciones bolus i.v., a tres niveles de dosis: 0,5, 1 y 2 mg. de AcM *ior EGF/r3*. Después de la administración, las muestras se tomaron para cada dosis a los siguientes tiempos: 30 min, 1, 2, 4, 8, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72 y 96 h. Para cada valor de tiempo se tomaron réplicas de 5 ratas.

Previo a la administración del AcM y a la toma de muestra, las ratas se anestesiaron con atmósfera de éter dietílico. La sangre fue tomada de la vena cava abdominal y se transfirió a tubos colectores. La obtención del suero se llevó a cabo dejando que ocurriera la retracción del coágulo espontáneamente, seguido de 15 min de centrifugación a 3000 r.p.m., en centrífuga refrigerada Sigma 2k15. El suero se transfirió a tubos destinados a la cuantificación del AcM.

#### *Conejos*

El fármaco se administró a una dosis de 3 mg, mediante administración bolus i.v. Tanto para la administración de la dosis como para la toma de muestra, los animales se colocaron en cepos, a fin de garantizar su inmovilidad. La administración del AcM se realizó por la vena marginal de la oreja e igualmente para la recolección de muestras sanguíneas, pero correspondiendo a la vena de la oreja opuesta.

Se establecieron tiempo de medición de 5, 10, 15, 25, 45 min, 1, 1,5, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 28, 36 y 48 h posteriores a la administración. La sangre recolectada se transfirió a tubos colectores y seguidamente se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la espontánea retracción del coágulo. Se centrifugaron a 3000 r.p.m. en centrífuga Sigma 2K15, durante 15 min, para la separación del suero, el cual fue destinado a la cuantificación del AcM *ior EGF/r3*.

#### *Perros*

Por medio de un bolus i.v. se administró una dosis de 2 mg, inyectándose el producto a ensayar por la vena femoral. Se recolectaron muestras sanguíneas a los tiempos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 32, 48, 56, 72 y 96 h.

Las muestras de sangre se recolectaron en correspondientes tubos y se mantuvieron en reposo hasta la formación y retracción del coágulo, centrifugándose a 3000 r.p.m. en centrífuga Sigma 2K15, durante 15 min, y transfiriéndose el suero a otros tubos destinados a la cuantificación del AcM *ior EGF/r3*.

### **Cuantificación de la concentración sérica del AcM *ior EGF/r3***

#### *Ratas*

La cuantificación de los niveles séricos del ACM se realizó a través de un Análisis por Radioreceptor (RRA), descrito previamente<sup>12</sup>. Este método presenta un coeficiente de variación inter- e intra-ensayo de 5%, y una sensibilidad de 1ng/mL.

#### *Conejos y Perros*

El AcM se cuantificó por un método ELISA directo tipo sandwich. En la determinación de la concentración de IgG total de ratón (IgGr) se utilizó anti-IgGr, obtenida en carnero e IgGr diluida en suero humano como patrón, como captura y un conjugado anti-IgGr marcado con la enzima fosfatasa alcalina (FA) como revelador. Se recubrieron placas Maxisorp (Nunc) con 50 µL de anticuerpo anti IgGr (10 µg/mL) y en tampón de recubrimiento (carbonato de sodio/bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9,6) y se incubaron en cámara húmeda durante 18 h a 4 °C. Se lavaron las placas 4 veces con 150 µL de solución salina fosfato (0,15 M, pH 7,2 con 0,05 de Tween 20). Se aplicaron 50 µL de muestras diluidas en solución salina fosfato en suero de ternera al 0,5% inactivado y 0,05% de Tween 20, en cada pozo de las microplacas incubadas una hora a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron y secaron las placas de la forma descrita y se añadieron 50 µL en cada pozo de la solución del anticuerpo anti-IgGr/FA, incubando a 37 °C durante 1 h. Se lavaron las placas, se disolvieron 50 µL de reactivo colorante (5 mg de p-nitrofenilfosfato, Koch Light) en 5 mL de solución de dietanolamina 1M, pH 9,8 y se añadió en cada pozo. Se determinó absorbancia a 405 nm en fotómetro de placa (Titterket Multiscan). El método establece coeficientes de variación intra e inter-ensayos de 6,5 y 5,7%, respectivamente, para el recobrado del rango desde el 92 hasta el 96% y la sensibilidad de 10 mcg/mL, de IgGr como mínimo detectable.

### **Análisis Farmacocinético**

Los valores de las concentraciones séricas del monoclonal se grafican, a partir de su valor medio y su desviación estándar, para cada uno de los tiempos experimentales de muestreo previamente establecidos. En el caso de los perros y los conejos, se estimaron los parámetros farmacocinéticos correspondientes a cada animal por separado, a partir del ajuste de los datos experimentales correspondientes a cada caso. Mientras que para las ratas se estiman los respectivos parámetros farmacocinéticos, correspondientes al perfil promedio, para al menos 5 animales por tiempo de muestreo.

Cada uno de estos perfiles farmacocinéticos se ajusta mediante un enfoque clásico de modelación compartimental mamilar, de acuerdo a la ecuación poli-exponencial de mejor ajuste, del tipo:  $C(t) = \sum A_i \cdot e^{-\lambda_i t}$ ; donde,  $A_i$  y  $\lambda_i$  son los respectivos coeficientes y exponentes de la ecuación.

ción poli-exponencial que caracteriza cada una de las fases visualizadas del perfil de disposición sistémico del producto estudiado, y  $C(t)$  son los valores de concentración en cada tiempo experimental.

El modelo fue seleccionado según los siguientes criterios estadísticos: Criterio de Información de Akaike (AIC) <sup>13</sup> y test de Schwartz (SC) <sup>14</sup>. Para los ajustes de las curvas al modelo compartimental, y el cálculo de sus parámetros farmacocinéticos característicos, se utilizó el software WINONLIN Professional. v2.1 <sup>15</sup>, mediante el método de regresión cuadrática no lineal de Gauss-Newton (modificado por Levenberg-Hartley). Por su parte, el área bajo la curva de concentraciones en el tiempo (AUC), el tiempo medio de residencia (MRT), el volumen área ( $V_z$ ) y otros parámetros basados en el cálculo de los momentos de las curvas de disposición, fueron determinados utilizando un enfoque no-compartimental, mediante la regla de los trapecios lineal/log lineal.

**Estudios de Biodistribución**

*Técnicas de Marcaje*

Se utilizó el AcM *ior EGF/r3*, marcado con <sup>99m</sup>Tc en sus formas reducidas elaborado en los laboratorios del Centro de Inmunología Molecular para fines diagnóstico. El método de reducción y marcaje empleado es una modificación reportada por Iznaga-Escobar *et al.* <sup>16</sup>, para el AcM *ior EGF/r3*, a partir de las propuestas por Schwarz y Steintrass en 1987.

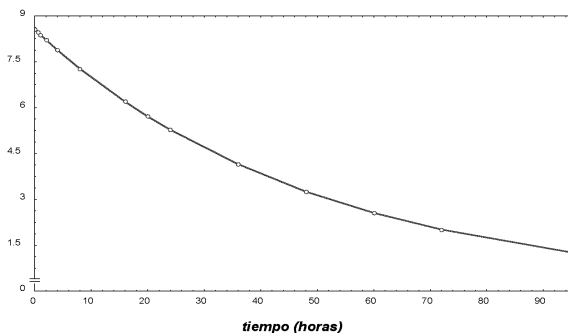
**Ensayo de Biodistribución**

El AcM <sup>99m</sup>Tc-*ior EGF/r3* (200  $\mu$ Ci/mg en 3.5 mL) se administró, mediante bolus i.v., por la vena de la cola de ratas Wistar machos, de 250 g, con dosis unitarias de 1 mg. Después de la administración, a los tiempos de: 1, 4, 8, 16, 24 y 48 horas, se extrae la sangre por el plexo ocular e inmediatamente se perfunde el animal, para eliminar restos de coágulos sanguíneos. Para cada instante de tiempo se toman 3 ratas. La perfusión se realiza administrando solución Ringer mediante un catéter que se coloca en el corazón y hasta que se observe palidez en el hígado. Posteriormente se extraen los órganos deseados (riñón, hígado, páncreas, bazo, estómago, intestino delgado, pulmón, cerebro y cerebelo) empleando materiales quirúrgicos (pinzas, tijeras, espátula y guantes) y se pesan en una balanza analítica FX 2000 AND, obteniéndose 1 g de cada uno de ellos una vez pesados. Dichas muestras se conservan a temperatura de  $\pm 4$  °C

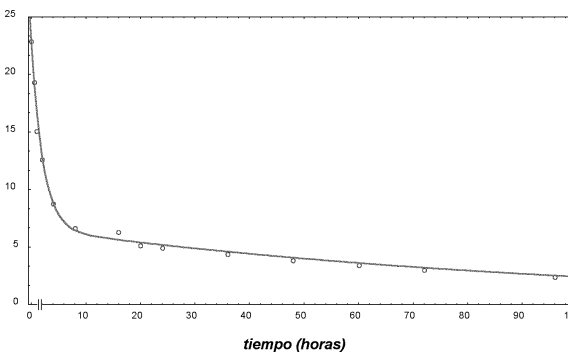
hasta que se efectúa la lectura en el contador gamma (Automatic Gamma Counter, 1227 Clinigamma) y la actividad por órgano se expresa como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g).

**RESULTADOS Y DISCUSION**

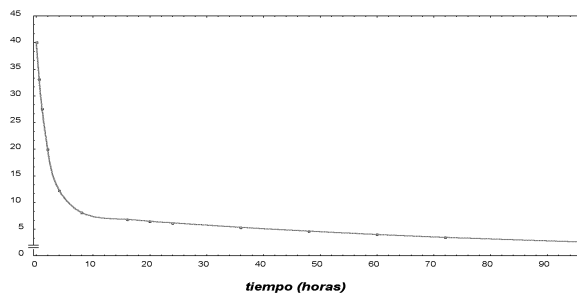
De inicio podemos presuponer que la resolución de los transcurros farmacocinéticos para definir su ajuste a un modelo dado, va a estar afectada por una dependencia de la dosis administrada, siendo factible visualizarlo a través de las Figuras 1, 2 y 3, donde se presentan los respectivos perfiles farmacocinéticos a las diferentes dosis ensayadas. A los niveles de 1 y 2 mg, el ajuste conlleva a una modelación característica de dos compartimentos, lo cual queda ponderado a través de los coeficientes de regresión de 0,98 y 0,99, respectivamente, así como por los resultados logrados al emplear los criterios de selección del modelo óptimo. Sin embargo, el nivel de dosis de 0.5 mg nos refiere una modelación mono-compartimental.



**Figura 1.** Perfil farmacocinético ajustado a un transcurso mono-exponencial ( $r=0.84$ ) del AcM *ior EGF/r3* en ratas Wistar (5 réplicas/ tiempo de muestreo), mediante administración *bolus* i.v. de una dosis de 0.5 mg.



**Figura 2.** Perfil farmacocinético ajustado a un transcurso bi-exponencial ( $r=0.98$ ), para el AcM *ior EGF/r3* en ratas Wistar (5 réplicas/ tiempo) mediante una administración *bolus* i.v. de una dosis de 1 mg.



**Figura 3.** Perfil farmacocinético ajustado a un transcurso bi-exponencial ( $r=0.99$ ), para el AcM *ior EGF/r3* en ratas Wistar (5 réplicas/ tiempo), mediante una administración *bolus* i.v. de una dosis de 2 mg.

En la Tabla 1 se muestran los valores de los parámetros obtenidos, resaltando que la caracterización bi-compartimental en ambos casos presenta un valor de  $t_{1/2\alpha}$  de 1,41 y 1,48 h semejantes en ambos casos, dosis de 1 y 2 mg, y característicos de una rápida fase de distribución, típica de los transcurso farmacocinéticos de moléculas biotecnológicas <sup>17</sup>. En todas las dosis, los valores estimados del volumen aparente de distribución resultaron superiores al volumen sanguíneo de la especie, lo cual indica que la molécula es capaz de distribuirse ampliamente por procesos de capilaridad, fenómeno de transporte atribuido a los anticuerpos monoclonales <sup>18</sup>.

Si analizamos los valores de la fase terminal, encontramos que los  $t_{1/2\beta}$  presentan diferencias notables, no observadas con los tiempos de vida media en la fase de distribución. Si recordamos que la dosis de 0,5 mg no manifiesta resolución de una fase de distribución cinéticamente distinguible, la reflexión anterior nos permite asumir que la farmacocinética del AcM *ior EGF/r3* presenta un fenómeno dosis dependiente, consideración a tener en cuenta en aplicaciones clínicas del monoclonal. En el mismo cálculo de los parámetros puede observarse que no existe una tendencia a correlacionar los  $t_{1/2\beta}$  y el CL, pudiendo ser una explicación en cuanto a que en los niveles de dosis estudiados no existe saturación de los mecanismos de biotransformación como las vías fundamentales de la eliminación desde la sangre. Tampoco los valores de volumen de distribución presentan una constancia, aunque en sí refieren una similar explicación a las características de interiorización corporal del AcM, sin desvirtuar las posibles relaciones de la captación a órganos. El AUC, presenta un aumento con relación al aumento de las dosis, siendo este incremento no proporcional a los correspondientes a las dosis, ya que para las dosis altas el incremento del AUC tiende a ser menor, prueba fehaciente de la no-linealidad.

Parámetro	Niveles de dosis		
	2 mg	1 mg	0.5 mg
$t_{1/2\beta}$ (h)	56.71	68.07	-
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.41	1.48	-
$\beta$ ( $h^{-1}$ )	0.012	0.010	-
$a$ ( $h^{-1}$ )	0.49	0.47	-
Vc (mL)	49.90	43.65	-
AUC ( $\mu g \cdot h/mL$ )	744.46	664.88	370.46
CL (mL/h)	2.68	1.54	1.35
Vz (mL)	281.96	147.68	61.67
MRT (h)	75.10	91.97	48.62
$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu g/mL$ )	40.07	22.89	8.56
$t_{1/2e}$ (h)	-	-	31.66
$K_e$ ( $h^{-1}$ )	-	-	0.02
Vd (mL)	-	-	58.47
Vss (mL)	201.27	141.63	-

**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos característicos del AcM *ior EGF/r3*, en ratas Wistar, a tres niveles de dosis. Administración *bolus* intravenosa.

Todos los aspectos antes mencionados, indican una cinética dosis dependientes del AcM *ior EGF/r3*, lo cual resulta de particular interés clínico, ya que se requiere en el sujeto humano analizar los distintos efectos de la dosis en cuanto a sus posibles manifestaciones farmacológicas y toxicológicas, más aún cuando la expresión del EGF en humanos sí presentará sitios de enlazamiento específico, y los sistemas efectores de la respuesta inmune pueden responder interactuando con el AcM *ior EGF/r3*, ya que el mismo es de origen murino, mediante respuesta HAMA (*Human Anti-Mouse Antibody*).

En cuanto a los ensayos de biodistribución, en la Tabla 2 se expresan los valores de captación de los órganos más indicativos. Con excepción del riñón y del hígado, prácticamente la captación es muy baja, y de escasa consideración durante las horas observadas. Aunque la captación a hígado y riñón no es alta (<10%), debe considerarse que ambos se encuentran asociados a los mecanismos de eliminación, de ahí sus más altos valores.

Los mecanismos de captación hepática del anticuerpo monoclonal radio-marcado de origen murino han demostrado que son más rápidamente bio-transformados que los policlonales humanos <sup>17</sup>. Los factores que inciden en ello son la variabilidad de la especie, los efectos del radio-marcaje y las posibles diferencias de cantidad, naturaleza y/o posición de las entidades de

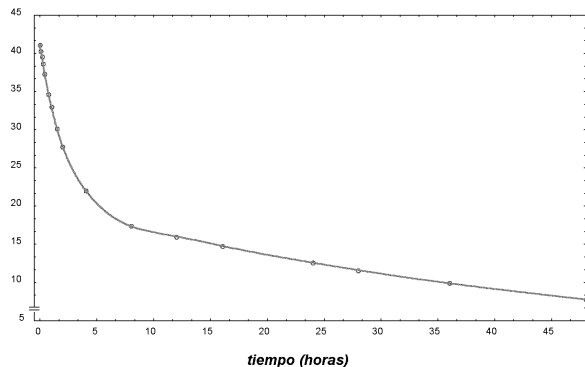
Órganos	Tiempo (horas)					
	1	4	8	16	24	48
Hígado	1.81	2.31	2.30	3.05	3.58	2.34
Riñón	2.23	5.14	7.03	5.41	6.31	4.95
Pulmón	0.31	0.35	0.24	0.39	0.48	0.31
Páncreas	0.04	0.10	0.19	0.10	0.16	0.07
Estómago	0.07	0.11	0.22	0.36	0.32	0.21
Intestino	1.21	1.36	1.35	1.55	0.68	0.93
Cerebro	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	0.06
Bazo	-	0.13	0.07	0.06	0.05	0.12

**Tabla 2.** Porcentaje de la radioactividad (%DI/g) asociada al AcM <sup>99m</sup>Tc-ior EGF/r3, en ratas Wistar (3 animales por tiempo de muestreo), respecto al peso total del órgano. Administración *bolus* intravenosa. Dosis 200  $\mu$ Ci.

carbohidratos. Aunque no se conoce a fondo su mecanismo de aclaramiento, la captación hepática de la IgG y el aclaramiento del anticuerpo monoclonal en el riñón mediante los fragmentos, parecen ser las rutas de eliminación que establecen la generalidad.

Algunos autores <sup>19</sup> plantean que las células hepáticas poseen un receptor para la porción Fc del anticuerpo monoclonal que es el responsable de la captación hepática de los anticuerpos monoclonales radio-marcados. Todavía se desconoce si estos receptores son para los carbohidratos predominantes en la región Fc o para residuos aminoácidos de este fragmento, describiéndose una rápida formación de metabolitos marcados con el radio-ligando, de bajo peso molecular, posterior a la inyección endovenosa del anticuerpo, sugiriéndose que probablemente los metabolitos citados de este anticuerpo pueden quedar adheridos al hígado. El mecanismo para la retención se desconoce, siendo una posible explicación la incapacidad de los hepatocitos para depurar la molécula marcada.

En referencia a la unión de estas inmunoproteínas a las células del tumor sólido, para lograr su radiolocalización para el diagnóstico clínico, se puede preconizar que la salida del compartimento vascular y la entrada al espacio intersticial se puede efectuar sin contratiempo, dado que la molécula no parece tener afinidad particular por ningún órgano, salvo los implicados en su depuración, hígado y riñón, y puede acceder al tumor desde la vasculatura vía la red de capilares tortuosos que constituyen parte integral del tumor, los cuales son más permeables que las de los órganos normales y representan una barrera significativa a través de las cuales pueden pasar las inmuno-proteínas largas.



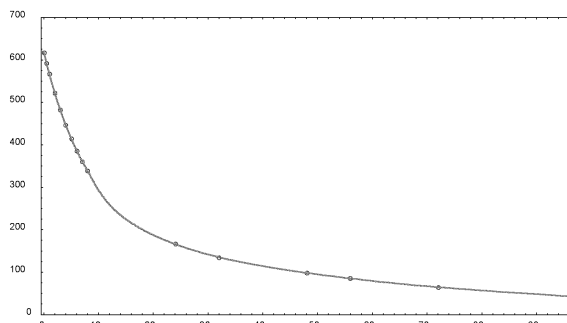
**Figura 4.** Perfil farmacocinético ajustado a un transcurso bi-exponencial para describir la trayectoria de disposición sistémica del AcM *ior EGF/r3* en conejos F1 machos, mediante la administración de un *bolus* i.v., dosis de 3 mg. Los datos experimentales utilizados para el ajuste se corresponden a los valores promedios (n=4) de concentración estimada.

En la Figura 4 se observa el perfil farmacocinético promedio, en la experiencia con conejos. A partir de su análisis, se puede referir que su patrón de disposición sistémico muestra una trayectoria regular, con distribución predominante hacia los órganos altamente irrigados de la cavidad central, y una suave depuración sistémica desde el lecho vascular, que resulta lógica para una inmunoglobulina murina. De esta manera se justifica un ajuste bi-exponencial, para el cual se obtuvo un alto coeficiente de regresión,  $r = 0,97$ , lo que ratifica la validez del modelo bi-compartimental propuesto para los correspondientes perfiles individuales.

En la Tabla 3 se relacionan los parámetros farmacocinéticos para cada animal con su correspondiente valor promedio. Resalta que en cada uno de los animales se alcanzaron un alto valor de regresión (0,97-0,98) y cada uno de

Parámetro	Conejos F1				
	1	2	3	4	Media (±DS)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.36	1.04	1.77	2.63	1.69 (±0.69)
$t_{1/2\beta}$ (h)	36.05	24.72	37.78	42.69	35.31 (±7.60)
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	0.51	0.67	0.39	0.26	0.46 (±0.17)
$\beta$ (h <sup>-1</sup> )	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02 ((0.01)
Vss (mL)	108.17	118.0	121.20	144.63	123.0 ((5.45)
Vc (mL)	74.0	63.3	84.6	82.4	76.1 ((9.69)
MRT (h)	50.3	34.3	52.5	57.3	48.6 ((9.98)
CL (mL/h)	2.15	3.44	2.31	2.52	2.61 ((0.58)
Coefficiente de regresión	0.98	0.97	0.97	0.98	-

**Tabla 3.** Parámetros farmacocinéticos del AcM *ior EGF/r3*, en Conejos F1 (n=4). Administración *bolus* intravenoso. Dosis 3 mg. Ajuste bi-compartimental.



**Figura 5.** Perfil farmacocinético característico para describir la trayectoria de disposición sistémica de los niveles de AcM *ior EGF/r3* en perros Beagle machos, en conformidad al ajuste bi-exponencial de los datos experimentales posteriores a una administración *bolus* i.v. de 2 mg.

ellos correspondió afirmativamente a los criterios estadísticos AIC y SC, para el ajuste bi-exponencial, mediante un modelo abierto bi-compartimental.

Analizando los valores obtenidos, de los parámetros para cada animal se puede distinguir que no existieron diferencias marcadas entre los sujetos estudiados. El tiempo de vida media de eliminación osciló entre las 24,7-42,7 h, siendo aproximadamente cercano al valor promedio (35,3 h) en dos de los sujetos. Idénticamente los valores del volumen aparente de distribución y de aclaramiento guardan relación con lo manifestado en la especie roedora (rata Wistar) anteriormente descrita.

Igualmente, en la Figura 5 se representa el perfil promedio ajustado, obtenido en la especie canina (perros Beagle), donde se refleja un coeficiente de regresión de 0,99, lo que ratifica la selección del modelo bi-compartimental, cumplimentándose por los criterios estadísticos AIC y SC. De igual forma se observa el ajuste individual en valores oscilantes ente 0,98-0,99. En la Tabla 4 se presentan los valores de los paráme-

Parámetro	Perros Beagle					
	1	2	3	4	5	Media (±DS)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	3.32	3.06	7.31	1.51	1.67	2.09 (±2.1)
$t_{1/2\beta}$ (h)	32.31	37.63	39.50	24.64	40.88	34.99 (±3.6)
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	0.20	0.22	0.11	0.45	0.41	0.28 (±0.13)
$\beta$ (h <sup>-1</sup> )	0.021	0.018	0.017	0.028	0.017	0.017 (±0.004)
Vss (L)	6.07	3.73	3.54	3.27	3.98	5.90 (±1.13)
Vc (L)	2.79	2.78	2.74	2.65	1.10	2.41 (±0.67)
MRT (h)	30.8	51.0	52.2	31.4	55.0	46.8 (±9.79)
CL (mL/h)	197.1	73.1	68.0	104.5	75.5	103.7 (±45.01)
Coefficiente de regresión	0.99	0.99	0.98	0.99	0.99	-

**Tabla 4.** Parámetros farmacocinéticos del AcM *ior EGF/r3*, en Perros Beagle (n= 5). Administración *bolus* intravenoso. Dosis 2 mg. Ajuste bi-exponencial.

tros obtenidos en cada uno de los perros y su valor promedio.

Analizando el conjunto de valores obtenidos en perros, se observa que la constante  $\beta$  no presenta gran variabilidad inter-sujetos, oscilando en un rango de 0,017-0,028. Dicho parámetro es de gran importancia a los intereses de definir su aplicación clínica perspectiva. Sin embargo,  $\alpha$  muestra una gran variabilidad si se tiene en cuenta que es la constante híbrida que caracteriza la velocidad de distribución, para alcanzar el equilibrio entre el compartimento central y periférico. En este caso las diferencias pueden estar dadas por simultanear en esa fase los procesos de eliminación por biotransformación, los cuales dependen del nivel de actividad intrínseca en cada sujeto. Diferente es el comportamiento de la constante  $\beta$ , cuya regularidad puede explicarse. La misma se manifiesta en el proceso neto de eliminación, posterior al pseudo-equilibrio de distribución, donde ya se han equilibrado los mecanismos condicionantes.

El volumen del compartimento central, VC, aunque oscila en un rango entre 1,1 y 3,23 L, sugiere una regularidad manifiesta para valores cercanos a 2,74 L. Aunque el volumen de distribución aparente no expresa correspondencia anatómica corporal, es índice que para estos valores de volumen de distribución, el fármaco interioriza hacia el espacio extravascular, preconizando que en el sujeto humano puede existir una captación periférica a órganos que expresan el receptor al factor de crecimiento epidérmico con alta densidad, como será el caso de los carcinomas epidermoides<sup>3</sup>.

En general los parámetros observados para

los animales estudiados alcanzan valores semejantes en cuanto al orden de los dígitos, con relación a otros trabajos reportados en la literatura para anticuerpos e inmunoglobulinas de similar procedencia<sup>20-22</sup>.

## CONCLUSIONES

Las especies animales estudiadas, ratas, conejos y perros, cumplimentan una regularidad farmacocinética en la caracterización del perfil de disposición sistémico del AcM *ior EGF/r3*, lo cual ratifica su posible uso terapéutico oncoespecífico. Al analizar los resultados obtenidos podemos concluir que los patrones de disposición sistémica del AcM *ior EGF/r3* son descritos preferentemente mediante una modelación bi-compartimental clásica. En la especie roedora, se manifiesta un fenómeno dosis dependiente, que debe tenerse en consideración, en el escalado terapéutico de ensayo clínico Fase I, para corroborar su incidencia en los efectos tóxicos y terapéuticos. Los valores de biodistribución presentan una baja captación a órganos, garantizando la utilización del diagnóstico radio-inmune, sin riesgo de un efecto tóxico debido a la permanencia o acumulación del ligando marcado.

En las otras dos especies estudiadas, la no observada variación inter-sujeto permite confiar en establecer regímenes de dosificación del AcM con repetidos valores de acumulación y estacionariedad, para una población dada. Estos parámetros reportados para una entidad de origen murino resultan de valor comparativo, al analizar la estrategia actual de humanización del AcM *ior EGF/r3*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fernández, A., R. Pérez, A. Macías, A. Velanda, I. Alvarez & M. Ramos (1989) *Interferón y Biotecnol.* **6**: 289-98.
2. Suárez, E. (1992) *Interferon y Biotecnol.* **9**: 57-66.
3. Macías, A., E. Azevedo, R. Pérez, I. E. Rastquit & I. Skoog (1984) *Anticancer Res.* **6**: 849-51.
4. Baselga, J. & J. Mendelshon. (1994) *Breast Cancer Res. Treat.* **29**: 127-38.
5. Brady, L W, A.M. Markoe, D.V. Woo, B.E. Amendola, U. Karlsson & M.A. Rackover (1990) "Iodine 125-labeled Anti-epidermal Growth Factor Receptor- 425 in the treatment of Glioblastoma Multiforme", en: "The present and future role of Monoclonal antibodies in the management of cancer" ( J.M. Varth & J.L. Meyer, eds.) *Front Radiat. Ther. Oncol., Basel, Karger* **24**: 151-60.
6. Mendelsohn, J. (1987) *Trans. Assoc. Am. Phys.* **100**: 173-8.
7. Bender, H., H. Takakashi , K. Adachi, P. Beise, S. Liang, M. Prewett et al. (1992) *Cancer Res.* **52**: 121-6.
8. Moltholf, C.F.M., H.M. Pinedo, H.M.M. Schlieper, H.W. Nijman & F. Boven. (1992) *Br. J. Cancer* **65**: 677-83.
9. Mc Clrukan, M.B., J.I. Valentine, I. Arnold & S.M. Owens. (1993) *J. Pharm.Exp.Ther.* **266**: 1433-45.

10. Ramos-Suzarte, M., N. Rodríguez, J.P. Oliva, N. Iznaga-Escobar, A. Perera, A. Morales, M. Cordero, L. Torres, G. Pimentel, M. Boron, J. Gonzalez, O. Torres, T. Rodríguez & R. Pérez. (1999) *J. Nucl. Med. & Biol.* **40**: 768-75.
11. Food and Drug Administration U.S.A. (1997) "Points to Consider in the manufacturing and testing of MoAb products human use: Preclinical and Clinical Studies", 22-26.
12. Fernández-Sánchez, E., J. Duconge, R. Castillo, I. García, I. Beausoleil, A. Macías. (2002). *J. of Pharmacy and Pharmacology.* 54: 59-64.
13. Akaike, H. (1976) *Math. Sci.* **14**: 5-11.
14. Schwartz, G. (1978) *Ann. Stat.* **6**: 461-9.
15. WINNONLIN Professional, Version 2.1 (1997) Pharmsight Inc., NC.
16. Iznaga-Escobar, N, L.A. Torres, A. Morales, M. Ramos, I. Alvarez & N. Pérez (1998) *J. Nuclear Med. Biol.* **25**: 17-23.
17. Veng-Pedersen, P., J.A. Widness, L.M. Pereira, C. Peters, R.L. Schmidt & L.S. Lowe (1995) *J. Pharm. Sci.* **84**: 760-7.
18. Sands, H. (1990) *Cancer Res.* **50**: 8095-135.
19. Schlom, J., P. Horan Hand, J.W. Greiner, D. Colcher, S. Shrivastav & J.A. Carrasquillo (1990) *Cancer Res.* **50** (Suppl 9): 820-7.
20. J. Mordenti & J.D. Green. (1991) en: *New Trends in Pharmacokinetics*, A. Rescigno & A.K. Thakur (eds.), 411-24, New York; Plenum Press.
21. Mordenti, J., S.A. Chen, J.A. Moore, B.L. Ferraiolo & J.D. Green (1991) *Pharm. Res.* **8**: 1351-9.
22. Azuma, J.T., T. Kurimoto, S. Tsuji, N. Mochizuki, S. Fujimaga & Y. Matsumoto. (1995) *J. of Immunother.* **10**: 278-85.

