



**CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES**

**Evaluación Farmacodinámica del receptor de EGF como blanco para la terapia específica del Cáncer**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

**Autor: MSc, Normando Enrique Iznaga Escobar**  
**Tutores: DrC. Rolando Pérez Rodríguez**  
**DrC Eduardo M. Fernández Sánchez**

**Ciudad de la Habana**  
2004

## **Glosario de Términos Empleados.**

AcMs: Anticuerpos monoclonales

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASH: Albúmina de Suero Humano

ATA: Antígeno Tumor Asociado

ATCC: Colección Americana de Cultivo de Células

ATP: Adenosintrifosfato

AUC: Área bajo la curva

CDR: Regiones Determinantes de la Complementariedad.

CECMED: Centro Nacional para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio

CIC: Centro de Investigaciones Clínicas

CIM: Centro de Inmunología Molecular

C225: Anticuerpo quimérico que reconoce al EGF-R

DTPA: Ácido disfosfo tetrapentaacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGF-R: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ERBITUX: nombre comercial del anticuerpo monoclonal quimérico C225

EUA: Estados Unidos de América

FACS: Fluorescence Activated Cell Solter

SFB: Suero Fetal Bovino

HAMA: Human Antimouse Antibodies (respuesta en humanos contra anticuerpos murinos) HLA:

Antígeno de Histocompatibilidad IHQ: Inmunohistoquímica

INOR: Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología

IRESSA: nombre comercial de la pequeña molécula inhibidora de los receptores de tirosinas quinasas ZD 1839, cuyo fabricante es la multinacional ASTRAZENECA (Inglaterra)

KDa: Kilodaltos

KDR: Receptor con dominio con actividad quinasa m225: versión murina del anticuerpo C225 mRNA :

Ácido ribonucleico mensajero NSCLC: carcinomas de pulmón de células no pequeñas PBS: Tampón Fosfato Salino

PNO: Procedimientos Normalizados de Operación RDI: Regiones de Interés

SCCHN: Carcinomas escamosos de la cabeza y el cuello

SPECT: Single Photon Emission Computer Tomography (Tomografía computarizada por Emisión de un solo Fotón)

Tarceva: nombre comercial de la pequeña molécula inhibidora de los receptores de tirosinas quinasas OSI 774, cuyo fabricante es la compañía farmacéutica OSI Pharmaceuticals (EUA)

TheraCIM : nombre comercial del anticuerpo humanizado h-R3

UE: Uniones Específicas

UNE: Uniones no específicas

UT: Unión Total

Tabla de Contenido.	Pág.
<b>I. INTRODUCCION.</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Antecedentes.</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Novedad de los resultados. Aplicabilidad.</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Consideraciones finales.</b>	<b>5</b>
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Líneas celulares de tumores humanos y condiciones de cultivo</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Animales de Experimentación</b>	<b>5</b>
2.2.1 Ratones normales Balb/c	5
2.2.2 Ratones atómicos NMRI	5
2.2.3 Primates no humanos.	5
<b>2.3 Anticuerpo Monoclonal</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con <sup>188</sup>Re y <sup>99m</sup>Tc, control de la calidad, estabilidad y determinación de la actividad biológica del compuesto.</b>	<b>6</b>
<b>2.5 Estudios de Biodistribución en modelos de animales experimentales.</b>	<b>6</b>
2.5.1 Biodistribución en ratones atómicos con xenoinjertos de líneas tumorales humanas.	6
2.5.2 Biodistribución en ratones normales Balb/c y primates no humanos.	7
<b>2.6 Estudios de Biodistribución en pacientes.</b>	<b>7</b>
<b>2.7 Estadística.</b>	<b>8</b>
<b>III. RESULTADOS.</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con <sup>188</sup>Re y <sup>99m</sup>Tc, control de la calidad, estabilidad in vitro y determinación de la actividad biológica del compuesto</b>	<b>8</b>
3.1.1 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con Re. Control de la calidad y estudios de estabilidad in vitro	8
3.1.2 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con <sup>99m</sup> Tc. Control de la calidad y estudios de estabilidad in vitro	10
<b>3.2 Estudios de biodistribución en modelos de animales de experimentación</b>	<b>11</b>
3.2.1 <i>Estudios de biodistribución en ratones atómicos con xenoinjertos de líneas tumorales humanas.</i>	
1F	13
3.2.2 Biodistribución en ratones normales Balb/c y primates no humanos.	
<b>3.3 Estudios de biodistribución del anticuerpo humanizado h-R3 en pacientes</b>	<b>15</b>
Estudios de Farmacocinética	16
Estudios de biodistribución.	18
<b>3.4 Modelo Matemático para la unión cinética de los anticuerpos anti-EGF-R a su receptor.</b>	<b>20</b>
3.4.1 Desarrollo de modelo.	20
3.4.2 Cálculos de computación.	22
<b>IV. DISCUSION GENERAL.</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Marcación del anticuerpo h-R3 con <sup>188</sup>Re y <sup>99m</sup>Tc.</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Estudios de biodistribución en modelos de animales experimentales</b>	<b>27</b>
4.2.1 Biodistribución en ratones atómicos con xenoinjertos de líneas tumorales humanas	27
4.2.2 Biodistribución en ratones normales Balb/c y primates no humanos	29

4.3	<b>Biodistribución en pacientes.</b>	<b>30</b>
4.4	<b>Modelo Matemático para la unión cinética de los anticuerpos anti-EGF-R a su receptor</b>	<b>32</b>
V.	<i>CONCLUSIONES.</i>	35
VI.	<i>RECOMENDACIONES.</i>	35
VII.	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.</i>	37
VIII.	<i>ANEXOS</i>	45
8.1	<b>Anexo 1: Publicaciones relacionada</b>	<b>45</b>



## SINTESIS

Durante los últimos años a través de estudios clínicos se ha podido demostrar que anticuerpos y otras entidades biológicas dirigidos contra antígenos que se encuentran expresados en diferentes tejidos normales del organismo pueden ser efectivos en el tratamiento del cáncer.

Aunque existen varios tipos de receptores de membrana celular que utilizan la vía de señalización a través de las tirosinas quinasas, la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R) está en la vanguardia de las investigaciones que utilizan a estos receptores como blanco para el diagnóstico y la terapia del cáncer.

El AcM humanizado h-R3 es un anticuerpo que *in vitro*: bloquea la unión del EGF a su receptor, inhibe la activación de la actividad tirosina quinasa que media la transducción de la señal, inhibe la proliferación celular, induce arresto del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, e inhibe la secreción de factores pro-angiogénicos del tumor e *in vivo*: induce la regresión completa de los xenoinjertos de líneas celulares de tumores humanos en ratones desnudos, inhibe la angiogénesis del tumor e induce apoptosis.

Para caracterizar la acción farmacológica del h-R3 y determinar la existencia de una acumulación diferencial entre tejidos normales y tumor se realizaron estudios de farmacocinética y biodistribución en modelos de animales experimentales (ratones Balb/c normales, ratones atímicos nu/nu y primates no humanos) y en pacientes con tumores de origen epitelial.

Para lograrlo se obtuvieron sondas radiactivas del anticuerpo monoclonal h-R3 marcado con <sup>188</sup>Re y con <sup>99m</sup>Tc, con una alta actividad específica, que reconoce *in vitro e in vivo* al antígeno presente en células de carcinomas de origen epitelial, y que en términos de estabilidad, son estables a temperatura ambiente en solución salina fisiológica después de realizada la marcación.

En los estudios de inmunolocalización en ratones atímicos con xenoinjertos de líneas de tumores humanos no se observó acumulación estadísticamente significativa en los órganos normales. La acumulación, fundamentalmente, se pudo ver en los diferentes tipos de tumores. Los datos de acumulación en el tumor para este anticuerpo anti-EGF-R h-R3 sugieren que existe un umbral de 10<sup>5</sup> moléculas de EGF-R por célula por encima del cual este anticuerpo con una constante de disociación K<sub>D</sub> en su unión al EGF-R de 4.53 ± 1.05 × 10<sup>-9</sup> M se une a las células tumorales que expresan el EGF-R *in vivo* y se acumula en los tumores xenoinjertados con las líneas celulares humanas cuyo número de moléculas de EGF-R por célula es mayor o igual a 10<sup>5</sup>.

Estudios de biodistribución realizados en ratones normales Balb/ c y primates no humanos mostraron que en la mayoría de los órganos y tejidos la acumulación del compuesto es mínima y que ocurría un rápido aclaramiento de los tejidos normales.

Datos de biodistribución y farmacocinética en pacientes mostraron, que el AcM exhibe una cinética no lineal y que después de un tiempo de administrado el producto se evidencia un aclaramiento del anticuerpo en todos los órganos, incluyendo el hígado.

Finalmente, con el modelo matemático farmacodinámico de la interacción cinética de anticuerpos específicos contra el EGF-R en tejidos normales y tumor predice que existe una dependencia entre el efecto farmacocinético, la farmacodinamia del anticuerpo, y la afinidad, donde para una afinidad con valores intermedios (10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> M) ocurrirá el máximo efecto (una alta acumulación en el tumor y muy baja en los tejidos normales como el hígado y la piel), mientras que los anticuerpos con una baja afinidad, tendrán una acumulación muy baja en el tumor y los anticuerpos con muy alta afinidad, inducirán una acumulación rápida en los tejidos normales (el hígado y la piel) reduciendo la razón terapéutica de la acumulación en el tumor a diferencia de los órganos normales.

# I. INTRODUCCION.

## 1.1 Antecedentes.

Aunque existen varios tipos de receptores de membrana celular que utilizan la vía de señalización a través de las tirosinas quinasas, la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R) está en la vanguardia de las investigaciones que utilizan a estos receptores como blanco para el diagnóstico y la terapia del cáncer (1-13). Dentro de esta familia, la mayor parte de las investigaciones están dirigidas a lograr la inhibición del EGF-R (también nombrado erbB1), aunque existen terapias específicas dirigidas contra el erbB2 (14, 15) o que tienen especificidad por más de un miembro de la familia. Actualmente la atención se ha centrado en el EGF-R como resultado de los datos publicados en los últimos 20 años que demuestran la expresión y sobre-expresión de este receptor en varios tipos de tumores, dentro de los que se incluyen cabeza y cuello (16, 17), colon (18), gliomas (19, 20), mama (21-23), ovario (24, 25), páncreas (26), próstata (27, 28), pulmón (29, 30), riñón (31), y vejiga (32). En muchos tumores la expresión, sobre-expresión y las más variadas mutaciones están asociadas con el estadio de la enfermedad (33), la progresión (34), invasión y metástasis (35, 36), mal pronóstico (37, 38), sobrevida reducida (39, 40) y la resistencia a la quimioterapia (22, 34) o la hormonoterapia (34, 41).

Además de los hallazgos descritos anteriormente, investigaciones pre-clínicas *in vitro* han generado considerables evidencias que sustentan el rol del EGF-R y de sus ligandos en la motilidad de la célula tumoral (42), invasión (35, 36), adhesión (43), angiogenesis (44), apoptosis (45), y en el control del ciclo celular (46).

En la actualidad numerosos anticuerpos generados contra el EGF-R se encuentran en la etapa de desarrollo clínico, dentro de estos podemos citar el anticuerpo monoclonal quimérico C225 (5, 6, 9, 47), el anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 (48), el anticuerpo humanizado EMD 72000 (13) y el anticuerpo humano ABX-EGF (49). Otra área de desarrollo que se muestra prometedora corresponde a la de las pequeñas moléculas inhibidoras de los receptores de las tirosinas quinasas (5, 6, 9).

En Cuba, especialmente en el Centro de Inmunología Molecular (CIM, Habana, Cuba) se ha trabajado desde 1989 en la obtención de anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio externo del EGF-R, inicialmente con la versión murina ior egf/r3 (50, 51) y posteriormente con la versión humanizada h-R3 (48).

Los AcMs ior egf/r3 y el h-R3 han constituido una poderosa herramienta para estudios de inmunolocalización (2-4), de biodistribución en tejidos, ya que se acumulan selectivamente en xenoinjertos de líneas celulares de tumores humanos que expresan el EGF-R en ratones desnudos (2, 52-54) y estudio de los mecanismos de acción bioquímica del EGF-R en las células humanas normales y malignas (55, 56).

Durante mucho tiempo ha formado parte del estado del arte para el diseño y desarrollo de nuevas entidades biológicas destinadas al diagnóstico y tratamiento de enfermedades malignas, la idea de que: (i) los antígenos debían ser específicos de tumores, (ii) que los anticuerpos con una alta afinidad son más efectivos como anticuerpos terapéuticos en el tratamiento del cáncer, (iii) y que los tumores sobre-expresan el EGF-R.

Durante algunos años varios AcMs murinos diferentes, incluido el ior egf/r3 (1, 57-60) fueron evaluados en la clínica, sin los resultados esperados. Sin embargo el anticuerpo murino ior egf/r3 (50, 51) generado contra el EGF-R cuando fue marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  se acumulaba en el 84 % de los tumores estudiados (4).

Las reacciones adversas provocadas en los pacientes por la inmunogenicidad de estas proteínas de ratón, impidieron una administración de las mismas por ciclos prolongados (61), lo que limitó su efectividad terapéutica y su utilización en dosis terapéuticas repetitivas. Precisamente este problema ha sido uno de los focos de atención de la ingeniería de anticuerpos, que se ha trazado como objetivo la obtención de anticuerpos recombinantes, con regiones humanas y murinas, que presenten una menor inmunogenicidad (48).

Una vez comprobada la utilidad diagnóstica del AcM ior-egf/r3, se hizo necesaria la obtención de su versión humanizada. El anticuerpo humanizado h-R3 se obtuvo mediante el clonaje de las regiones variables murinas del anticuerpo ior-egf/r3, a una región constante humana de subclase IgG1. El anticuerpo fue reformado usando los marcos humanos de regiones variables homologas a la región variable murina (48).

Hoy estamos enfrentados a otro problema científico debido a la naturaleza del antígeno diana. El anticuerpo humanizado h-R3, anticuerpo que se espera tenga mejores propiedades farmacocinéticas, que su tiempo de vida media en sangre sea mayor que su parental murino y que por su naturaleza pueda ser utilizado a dosis repetida en el tratamiento de tumores, pudiera tener una biodistribución diferente al AcM murino, que lo lleve a una acumulación en órganos normales, ya que se sabe que el EGF-R se sobre-expresa en los tejidos tumorales, pero también se encuentra en forma ubicuota en todos los tejidos epiteliales.

El uso clínico del h-R3 requiere una evaluación farmacodinámica, que permita optimizar la razón terapéutica en pacientes, o sea lograr que exista mayor concentración del anticuerpo en el tumor que en los tejidos normales.

Para la solución de este problema, nos propusimos la siguiente hipótesis científica:

#### **Hipótesis:**

*"Para el AcM humanizado h-R3 que posee una afinidad intermedia, entre  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M, se puede definir un rango de dosis en que la razón terapéutica sea mayor que 1 en tumores que sobre-expresan el EGF-R".*

A fin de responder a la hipótesis científica propuesta, se plantean los siguientes objetivos.

#### **Objetivos.**

1. Obtener sondas radiactivas del AcM humanizado h-R3 marcado con  $^{188}\text{Re}$  y con  $^{99m}\text{Tc}$ , con una alta actividad específica, y reconocimiento *in vitro* e *in vivo* del antígeno presente en células de carcinomas de origen epitelial.
2. Estudiar la biodistribución en ratones atómicos xenoinjertados con tumores humanos con un diferente contenido de EGF-R y evaluar si existe una acumulación diferencial entre tejidos normales y tumor.

3. Estudiar cómo influye el reconocimiento específico del EGF-R en la biodistribución del h-R3 en tejidos normales, de ratones Balb/c (no reconocimiento específico) y primates no humanos (reconocimiento específico positivo).
4. Realizar un estudio de farmacocinética y biodistribución en un escalado de dosis en pacientes portadores de tumores de origen epitelial. Seleccionar la dosis óptima.
5. Desarrollar un modelo matemático farmacodinámico de la interacción cinética de anticuerpos específicos contra el EGF-R en tejidos normales y tumor que permita, la evaluación cuantitativa de la influencia de la afinidad del anticuerpo y del número de moléculas de EGF-R por célula en la acumulación diferencial en tejidos normales y tumorales.

Para la evaluación práctica de tales objetivos la estrategia experimental de la tesis se resume en la siguiente racionalidad:

1. Se seleccionó el método de marcación directa de anticuerpos monoclonales a isótopos radiactivos como método para la obtención de la sonda radiactiva del AcM h-R3 marcado con  $^{188}\text{Re}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con vistas a su uso como método de trazadores radiactivos, de tal forma que se lograra una alta actividad específica, y reconocimiento *in vitro* e *in vivo* del EGF-R presente en la membrana de células tumorales humanas de origen epitelial.
2. Obtenidas las sondas radiactivas del h-R3 marcado con  $^{188}\text{Re}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , realizar un estudio de biodistribución en ratones atómicos con xenoinjertos de líneas celulares de tumores humanos, que implicaría: (i) determinación de la constante de disociación  $K_D$  del anticuerpo h-R3 en su unión al EGF-R y del número de moléculas de EGF-R por célula en líneas celulares de tumores humanos utilizando un ensayo de unión en equilibrio del anticuerpo al EGF-R presente en la membrana de las células tumorales, y (ii) utilizar en los xenoinjertos en ratones atómicos líneas celulares de tumores humanos con diferente nivel de expresión de EGF-R a los efectos de determinar si existe un umbral en el número de moléculas de EGF-R por célula, que permita establecer una acumulación diferencial del anticuerpo *in vivo* en tejidos normales y el tumor.
3. Dado que en los ratones normales Balb/c el anticuerpo h-R3 no reconoce el EGF-R murino y en los primates no humanos existe homología entre el EGF-R de esta especie con el humano, utilizar dos sistemas experimentales diferentes en cuanto al metabolismo para ver cómo influye la biodistribución en tejidos normales para ambas especies.
4. Una vez que se tuvieran datos sobre la afinidad y disposición farmacológica del anticuerpo en xenoinjertos de tumores humanos a través de experimentos realizados en ratones atómicos y caracterizado el perfil de biodistribución en órganos normales en al menos 2 especies de animales, realizar estudios de farmacocinética y biodistribución en un escalado de dosis en pacientes portadores de tumores de origen epitelial, de tal forma que permitiera, una evaluación de los tiempos de vida media del anticuerpo, selección de la dosis óptima y el esquema de tratamiento.

5. Ya caracterizado el comportamiento farmacocinético desarrollar un modelo matemático farmacodinámico de la interacción cinética de anticuerpos específicos contra el EGF-R en tejidos normales y tumor que permita, a partir de los datos experimentales de biodistribución y farmacocinética, la evaluación cuantitativa de la influencia de la afinidad del anticuerpo y del número de moléculas de EGF-R por célula en la acumulación diferencial en tejidos normales y tumorales.

### *1.2 Novedad de los resultados. Aplicabilidad.*

Los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte en todas las edades en Cuba y en el mundo entero. En muchos casos la terapéutica oncoespecífica no consigue evitar la progresión de la enfermedad por lo que se realizan grandes esfuerzos en el estudio de nuevos productos que contribuyan a disminuir su incidencia y mortalidad.

Hasta la fecha la mayoría de los AcMs murinos generados contra el EGF-R y otros antígenos tumorales usados en ensayos clínicos para tratamientos de cáncer han sido poco efectivos. Esta baja efectividad en las pruebas clínicas está asociada fundamentalmente con: (i) el comportamiento farmacológico de la molécula (corto tiempo de vida media en sangre de estos anticuerpos dada su naturaleza murina), (ii) el comportamiento inmunológico (la no posibilidad de realizar varias administraciones del producto a un mismo paciente por la potencialidad de inducir respuesta de anticuerpos humanos (HAMA) contra la proteína de ratón) y (iii) el perfil de toxicidad y seguridad.

En este caso se evalúa el AcM h-R3, anticuerpo humanizado, con mejores propiedades farmacológicas que su parental murino, que permite el tratamiento a dosis repetida, ya que la probabilidad de inducción de respuesta HAMA es muy baja, y que a su vez ha mostrado ser poco tóxico cuando se administra a dosis repetidas garantizando una efectividad en el tratamiento de los pacientes con cáncer cuando se combina con otros tratamientos estándar oncoespecíficos.

Este anticuerpo pudiera mejorar los tratamientos actuales de aquellos pacientes portadores de neoplasias de origen epitelial que sobre-expresen el EGF-R, entre las que se encuentran las principales localizaciones tumorales como el cáncer de pulmón, de colon, de próstata, de mama, el cáncer cérvico-uterino, los carcinomas renales, y los tumores astrocíticos.

El anticuerpo h-R3 es el primer producto de la Biotecnología Cubana con propiedad industrial registrado en nuestro país para el tratamiento del cáncer y constituye el segundo anticuerpo monoclonal registrado en algún país para el tratamiento de tumores sólidos.

Desde el punto de vista metodológico la tesis contribuye al conocimiento de la farmacodinamia de este novedoso producto. La novedad de la misma esta dada por el desarrollo de una nuevo concepto farmacodinámico de antígeno tumor-asociado que deriva de: (i) evidencia experimental de umbral en el número de moléculas de EGF-R por célula tumoral como pre-requisito para la "acumulación" en el tumor y (ii) la evaluación cuantitativa de la influencia de la constante de disociación del anticuerpo y del número de moléculas de EGF-R por célula en la acumulación diferencial en tejidos normales y tumorales a través de un modelo matemático farmacodinámico de interacción cinética de anticuerpos específicos contra el EGF-R.

A partir de esta tesis se pudieron optimizar las dosis óptimas para los esquemas de tratamiento sugiriendo los intervalos de cada administración entre 7 y 14 días.

### 1.3 Consideraciones finales.

La presente tesis está compuesta por los siguientes capítulos: Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión General, Conclusiones, Recomendaciones y Referencias.

Los resultados contenidos en esta tesis han sido sometidos a la crítica internacional a través de revisiones de expertos: Ver **Anexo 1**

## II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Líneas celulares de tumores humanos y condiciones de cultivo fueron utilizadas las líneas celulares U-87 glioblastoma multiforme, H-125 adenocarcinoma de pulmón, A431 carcinoma epidermoide de vulva y MDA-MB-468 carcinoma de mama obtenidas de la Colección Americana de Cultivo de Células (ATCC, Rockville, EUA). (52, 53).

### 2.2 Animales de Experimentación

#### 2.2.1 Ratones normales Balb/c

Se utilizaron ratones Balb/c normales de CENPALAB. Los animales se mantuvieron en en cajas, bajo condiciones controladas de temperatura (20 °C), y humedad (50 %) como ha sido descrito por Morales y cois. (52, 53).

#### 2.2.2 Ratones atómicos NMRI

Los ratones atómicos 4NMRI nu/nu utilizados fueron obtenidos del Centro de Inmunología Molecular (CIM, Habana, Cuba) y se mantuvieron en cajas esterilizadas con filtro, bajo condiciones controladas de temperatura (20 °C), humedad (50 %), dieta de pienso estéril con acceso libre ("*ad libitum*") a la toma de agua y alimentos, fotoperíodos (12 x 12) h según se describe por Morales y colaboradores (52,53).

#### 2.2.3 Primates no humanos.

Se utilizaron monos babuinos machos del CENPALAB (Habana, Cuba) en jaulas individuales y se mantuvieron en condiciones de temperatura, humedad y espacio controlados con un ciclo de luz de 12 x12 h. Para todos los procedimientos los animales fueron ligeramente anestesiados con 5 mg/ kg de ketamina.

### 2.3 Anticuerpo Monoclonal

El AcM h-R3, de isotipo IgG<sub>1</sub> que reconoce el dominio externo del EGF-R, obtenido a través del clonaje de las regiones variables del AcM ior egf/r3, una IgG2a murina y "reformado" a través del trasplante de las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR-grafting) de la inmunoglobulina murina sobre los marcos de la inmunoglobulina humana como fue descrito previamente por Mateo y colaboradores (48).

#### 2.4 *Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con $^{188}\text{Re}$ y $^{99m}\text{Tc}$ , control de la calidad, estabilidad y determinación de la actividad biológica del compuesto.*

**Reducción de AcMs con 2-mercaptoetanol (2-ME):** Los anticuerpos a una concentración de 5 mg/mL se redujeron a través de la reacción con 2,000 moles de 2-mercaptoetanol (2-ME, Sigma, EUA) por cada mol de anticuerpo incubándolos durante 30 minutos a temperatura ambiente según se describe por Morales y colaboradores y Winnard y colaboradores (52, 53, 62).

**Marcación del anticuerpo con  $^{188}\text{Re}$ :** El AcM h-R3 fue acoplado al  $^{188}\text{Re}$  utilizando el método de Schwarz modificado por Winnard y colaboradores en 1996 (62). A 3 mg de anticuerpo reducido se marcaron con 30-40 mCi (1110 - 1480 MBq) de perrenato sódico ( $\text{NaReC}_4$ ) procedente de un generador de  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  (MAP Medical Technologies, Jyvaskyla, Finlandia).

**Marcación del anticuerpo con  $^{99m}\text{Tc}$ :** El AcM h-R3 fue acoplado al  $^{99m}\text{Tc}$  por la vía directa de marcación utilizando el método de Schwarz según fue descrito por Morales y colaboradores (52, 53).

**Control de la calidad:** Se realizó en cromatografía de papel ascendente Whatman 3 MM como fase estacionaria y solución salina 0.9 % y acetona como solventes (52, 53) y en tiras cromatográficas de cromatografía instantánea en capas finas-sílica gel (ITLC-SG, Gelman Science inc, Ann Arbor, EUA) impregnadas en 1 % albúmina humana como fase estacionaria y etanol :  $\text{NH}_4\text{OH}$  : agua (2:1:5 v/v) como solvente para separar los radiocoloides (63).

#### **Estudios de estabilidad in vitro.**

##### **Retos con Cisteína, DTP A, Suero Humano y Albúmina Humana.**

Los estudios de retos con cisteína, DTP A, suero humano y albúmina humana fueron realizados siguiendo la metodología descrita previamente por Hnatowich y colaboradores en 1991 (64).

**Análisis por citometría de flujo:** La inmunorreactividad del compuesto  $^{188}\text{Re}$ -acoplado al AcM humanizado h-R3 se expresó como el porcentaje (%) de células positivas que se obtienen después de sustraer el valor del control negativo y del conjugado para cada punto de la curva estándar (52, 53).

#### 2.5 *Estudios de Biodistribución en modelos de animales experimentales.*

##### 2.5.1 Biodistribución en ratones atómicos con xenoinjertos de líneas tumorales humanas.

###### **Determinación de la constante de disociación. Ensayo de unión en equilibrio a las células.**

Para el cálculo de la constante de disociación se desarrolló un ensayo de unión a las células en el cual se realiza el reconocimiento del EGF-R en las líneas tumorales humanas H-125, A431 y MDA-MB-468 a una concentración de  $4 \times 10^6$  cél./mL por pozo en una placa de cultivo celular de 12 pozos (Costar, EUA). utilizando el anticuerpo monoclonal h-R3 marcado con  $^{188}\text{Re}$  según el método descrito por Reilly y colaboradores (65).

###### **Biodistribución en ratones atómicos con xenoinjerto de líneas tumorales humanas.**

Los ratones atómicos hembras y machos 4NMRI nu/nu fueron inoculados por vía subcutánea en el flanco derecho trasero con una suspensión de  $2.0 \times 10^6$  cel./mL que contenía a las líneas celulares U-87, H-125, A431 y MDA-MB-468.

Para la biodistribución se les administró una solución de 50 ( $\mu\text{g}$  /100  $\mu\text{Ci}$ ) del AcM h-R3 marcado con  $^{188}\text{Re}$  a través de una inyección intravenosa por el plexo ocular, en un volumen total de 100  $\mu\text{L}$ . Grupos de ratones (n = 5) para cada uno de los tumores (U-87, H-125, A431 y MDA-MB-468) se sacrificaron a las 4 y 24 h después de la administración. Se realizó el conteo de las muestras y se determinó el porcentaje de dosis inyectada en cada órgano (52, 53, 64, 65).

### **Biodistribución en ratones normales Balb/c.**

Los estudios de biodistribución fueron realizados según el método descrito en (Morales A. y col., 1999; 2000) en 25 ratones Balb/c hembras (18-20 g , 11 semanas de nacidos) a los cuales les fue administrado el AcM humanizado h-R3 marcado con  $^{188}\text{Re}$  (50  $\mu\text{g}$  de AcM/100  $\mu\text{Ci}$ ) a través de una inyección intraperitoneal en un volumen total de 100  $\mu\text{L}$ . Grupos de ratones ( $n = 5$ ) fueron sacrificados a las 1, 4, 24, 48 y 72 horas después de la administración. Se realizó el conteo de las muestras y se determinó el porcentaje de dosis inyectada en cada órgano (52, 53, 65).

### **Biodistribución en primates no humanos.**

**Administración de la dosis:** Se utilizaron cuatro monos babuinos adultos machos, los cuales recibieron una inyección en forma de bolo endovenoso del AcM h-R3 ( $3.42 \pm 1.42$  mg) marcado con  $^{188}\text{Re}$  ( $5.25 \pm 0.98$  mCi) por la vía de la vena femoral después de ser anestesiados con 5 mg/ kg de ketamina (Laboratorio Reig Jofre SA, Barcelona, España) y 1 mg de diazepam.

**Toma de muestras:** Seguido de la inyección i.v se colectaron muestras de sangre en 3 de los 4 monos en los intervalos de tiempo 10, 20 y 30 minutos y a la 1, 2, 4, 6, 8 10, 24, 36 y 48 horas después de la administración y se realizaron los cálculos necesarios para la corrección por el decaimiento radiactivo del compuesto (2, 3).

**Farmacocinética:** Los datos de actividad en cpm/mL corregidos por el decaimiento físico del radioisótopo se graficaron en función del tiempo y se analizaron utilizando el modelo de dos compartimientos y el software BRASIER (Versión 1.0, ISCTN). De los análisis del modelo ajustando la curva a una ecuación bi-exponencial se obtuvieron los tiempos de vida media. Los restantes términos farmacocinéticos fueron calculados según la metodología de Akaike (66-68) y los volúmenes de distribución y el aclaramiento se calcularon de acuerdo a los métodos estándar (69, 70).

**Biodistribución:** Las imágenes fueron adquiridas a los 5 min, 1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 h después de la administración del radiofármaco utilizando una cámara gamma Sophy DS-7 (Sophy Medical Systems, Canadá) unida por una interfase con el software Imagama Versión 2.0 (INOR, Habana, Cuba) según se describe en (2, 3). El tiempo de adquisición de cada imagen plana anterior y posterior fue de 5 minutos en una matriz de 128x128 (2, 3).

Los datos de biodistribución en porcentaje de la dosis inyectada (% DI) para el cuerpo completo y los órganos fuentes fueron expresados, como la fracción de la actividad administrada que había en cada órgano fuente a cada intervalo de tiempo dividido por la dosis inyectada (2, 3).

### *2.6 Estudios de Biodistribución en pacientes.*

En el estudio con el AcM h-R3 fueron incluidos 12 pacientes con tumores en un ensayo clínico Fase I del CIM y el CIC. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica (CEIC) del CIC y por las autoridades reguladoras, el CECMED. El consentimiento informado fue obtenido por escrito de todos los pacientes incluidos en el estudio (2, 3)

**Administración del producto:** El radiofármaco h-R3 (3 mg) marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (40 mCi) le fue administrado a 12 pacientes en co-administración con (47, 97,197 y 397 mg) del anticuerpo sin marcar a través de una infusión durante 30 minutos. El anticuerpo marcado actuó como un radiotrazador para el estudio de la biodistribución.

**Muestras de sangre:** Se colectaron muestras de sangre del brazo contralateral al de la inyección en 11 de los 12 pacientes. Las extracciones se realizaron a los 5,10, 20, 30 minutos y 1, 3, 5, 8,18, 24, 36, 48, 72, 168 y 720 h. post-tratamiento.

Farmacocinética: Se realizó la determinación de la concentración sérica del h-R3 utilizando un sistema inmunoenzimático tipo ELISA, que contenía a la línea celular A431 pegada a la fase sólida según (52, 53).

Los datos farmacocinéticos fueron evaluados realizando un análisis modelo dependiente como prueba estadística de acuerdo a los criterios de información de Akaike (66-68) utilizando el software Winonlin (Maryland. EUA) que realiza una regresión no lineal por el método de los mínimos cuadrados.

Biodistribución: Las imágenes de cuerpo completo anteriores y posteriores fueron adquiridas a los 5 min, 1, 3, 5 y 24 h después de la administración utilizando una cámara gamma Sophy DS-7 (Sopha Medical Systems, Canadá) usando el cabezal de la cámara a una velocidad de movimiento de 20 cm/min. Los tiempos de adquisición de cada imagen estuvieron alrededor de los 25 minutos. Todas las imágenes fueron almacenadas en la computadora en una matriz de 2048 x 512.

La media geométrica de las imágenes anteriores y posteriores corregidas por el decaimiento físico del radioisótopo se obtuvo utilizando el programa de computación BioDose, Versión 1.0 (CIC). Se dibujaron regiones de interés (RDI) sobre los órganos que mayor captación. El porcentaje de excreción por vía urinaria se determinó a través de mediciones del contenido radiactivo en las colecciones de la orina en intervalos de 3 horas (cantidad de radiactividad excretada de la dosis inyectada corregida por el decaimiento físico del radioisótopo) y dividida por la dosis inyectada (2, 3).

### 2.7 Estadística.

Los datos de los experimentos fueron analizados para obtener los valores medios y la desviación estándar de las réplicas de estos experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos con células, entre los grupos de animales o entre pacientes para el caso de la biodistribución se determinaron con ayuda del Software GraphPad Prism Versión 2.00 (GraphPad Software Inc., CA, EUA) utilizando la prueba pareada t de Student (71) de dos colas cuando era apropiado con un valor de  $p < 0.05$  considerado como significativo.

El análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de aclaramiento del anticuerpo en los pacientes para cada grupo de dosis se comparó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (71).

## III. RESULTADOS.

### 3.1 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con $^{188}\text{Re}$ y $^{99m}\text{Tc}$ , control de la calidad, estabilidad in vitro y determinación de la actividad biológica del compuesto

#### 3.1.1 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con $^{188}\text{Re}$ . Control de la calidad y estudios de estabilidad in vitro

El AcM humanizado reducido se marcó para el caso del  $^{188}\text{Re}$  con una actividad específica de 15 mCi/mg de proteína resultando en más del 98 % de incorporación del  $^{188}\text{Re}$  al anticuerpo después de 5 h determinado a través de cromatografía instantánea en capas finas-sílica gel (ITLC- SG) como se presenta en la Figura 1.

Una cromatografía instantánea en papel de la sonda radiactiva utilizando acetona como solvente mostró que solo un 1 % o menos del perrenato libre migró en el frente del solvente ( $R_f = 1.0$ ) La formación de coloides determinada en tiras de ITLC impregnadas en albúmina fue del orden de  $(1.04 \pm 0.07) \%$  (62).