Figura 1. Cinética de marcación del anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 con el isótopo radiactivo ^{188}Re.

Estudios de estabilidad *in vitro.*

Retos con Cisteína, DTP A, suero humano y albúmina humana.

La sonda radiactiva ^{188}Re- h-R3 es estable en concentraciones del orden de 100 mM de DTPA y 1.0 mM de cisteína. Aproximadamente más del 92.9 % de la radiactividad permanece asociada con el anticuerpo después de 1 h de reto a 37 °C. Cuando la cisteína fue utilizada a 10 mM y 100 mM resultó en la transquelación total de la radiactividad a la cisteína desde el anticuerpo. Cuando se utilizó suero humano durante las primeras 4 h ocurre una transquelación de un 15 % del ^{188}Re a las proteínas del suero humano y no ocurre oxidación del ^{188}Re a perrenato. Sin embargo en albúmina humana fue estable.

Análisis por Citometría de Flujo.

La inmunorreactividad o actividad biológica del anticuerpo nativo (no reducido), del ^{188}Re-h-R3 y de un anticuerpo anti-HLA del mismo isotipo cuando se utilizó la línea celular H-125 como fuente para el EGF-R se determinó a través de un análisis de inmunofluorescencia indirecta. Como se muestra en la Tabla 1, los porcientos de células positivas fueron de (94.3 ± 1.9) %, (87.6 ± 5.6) % y (0.96 ± 0.51) %, para el h-R3 no reducido, el ^{188}Re-h-R3 y el anti-HLA respectivamente.

Tabla 1. Inmunorreactividad del anticuerpo humanizado h-R3 acoplado al ^{188}Re medido a través de un análisis de Citometría de Flujo en células de adenocarcinoma del pulmón H-l25.

Línea celular	Histología	h-R3 no reducido (% de células positivas)	^{188}Re-h-R3 (% de células positivas)	Anti-HLA (% de células positivas)
H-125	Adenocarcinoma del pulmón	94.311.9	87.6 ± 5.6	0.96 ± 0.51

3.1.2 Marcación del anticuerpo monoclonal h-R3 con ^{99}mTc. Control de la calidad y estudios de estabilidad in vitro

Reducción del AcM con 2-ME: Se utilizó una relación molar de 2,000 moles de 2-ME por mol de AcM. La concentración del anticuerpo reducido y purificado se ajustó a 1 mg/mL (52, 53). **Radiomarcaje con "mTc:** Para la radiomarcación de la sonda se utilizaron 3 mg de anticuerpo, se añadieron 150 µL de metilen disfofonato (MDP) y 40-50 mCi de $^{99m}TcO_4$ lográndose una eficiencia de marcación de 98.5 ± 1.2 % con un contenido de radiocoloides inferiores al 1.5 % (52, 53).

Estabilidad: Se determinó en presencia de albúmina humana y suero humano. Las muestras se almacenaron a 37 °C durante 24 horas y determinó la radioactividad asociada al anticuerpo mediante cromatografía de filtración en gel. Se comprobó que para ambas condiciones el anticuerpo retenía el 92 % del total de radioactividad. Estos resultados fueron corroborados mediante electroforesis en geles de acrilamida al 7.5 (52, 53).

Se determinó además la estabilidad del anticuerpo a temperatura ambiente a las 24 horas encontrándose un 97.8 % del ^{99m}Tc unido al anticuerpo (52, 53).

Inmunorreactividad del AcM: La inmunorreactividad para los anticuerpos reducidos se verificó mediante un ensayo de radiorreceptor (52, 53). El anticuerpo reducido se comparó con el anticuerpo nativo en su capacidad de competir con el ^{125}I-EGF en su unión al EGF-R expresado en un extracto de membrana de placenta. Las curvas como se muestra en la Figura 2 permitieron determinar los valores de concentración de anticuerpo que producen un desplazamiento del 50 % del ^{125}I-EGF. Estos valores resultaron similares para ambos anticuerpos: 5.81 µg/mL y 5.53 µg/mL para el anticuerpo nativo y para el anticuerpo reducido, respectivamente (52, 53).

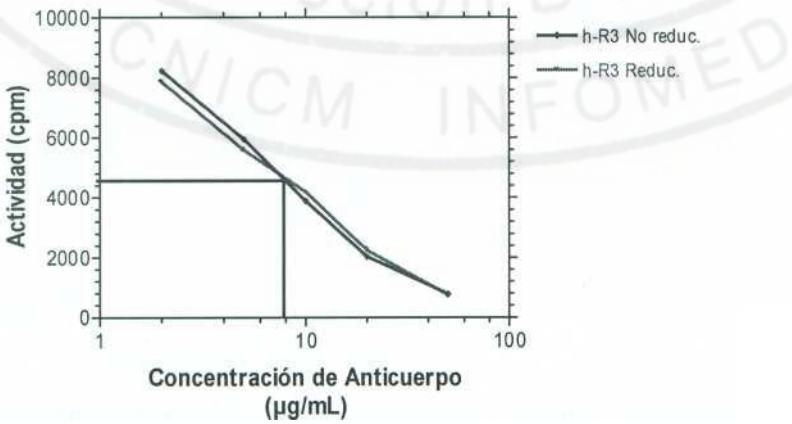

Figura 2. Inmunorreactividad y reconocimiento biológico del antígeno blanco por el anticuerpo humanizado h-R3 acoplado al "^{m}Tc y el anticuerpo nativo (no reducido) h-R3 medido a través de un ensayo de radiorreceptores.

3.2 Estudios de biodistribución en modelos de animales de experimentación

3.2.1 Estudios de biodistribución en ratones atímicos con xenoinjertos de líneas tumorales humanas.

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

Los estudios fueron realizados con tres líneas celulares diferentes utilizando la metodología de Ensayo de Uniones en Equilibrio a las células. Las líneas utilizadas fueron, H-125 adenocarcinoma de pulmón, con una expresión intermedia de EGF-R (2.0 x 10^5 EGF-R/cél.), A431 carcinoma epidermoide de vulva, con alta expresión del EGF-R (2.0 x 10^6 EGF-R/cél.) (65) y la MDA-MB-468 carcinoma mamario, con muy alta expresión del EGF-R (3.6 x 10^6 EGF- R/cél.) (72). Los datos obtenidos de los experimentos UT, UNE y UE se graficaron en gráfico de ^{188}Re-h-R3 añadido (diluciones doble seriadas desde 0.04 a 26.67 nM) en función de^{188}Re-h- R3 unido y las curvas se ajustaron a una hipérbola de saturación como se muestra en la Figura 3.

De los parámetros del ajuste se calculó la constante de disociación **(K_D) y** el número de moléculas de EGF-R por célula (Bo) para cada una de las líneas celulares como se muestra en la Tabla 2.

Los resultado de estos experimentos se muestran en la Tabla 2 y Figura 3. El número de EGF-R por célula determinado para la H-125, A431 y MDA-MB-468 fue (2.26 ± 0.04) x 10^5, (1.13 ± 0.10) x 10^6 y (1.76 ± 0.27) x 10^6 respectivamente y la constante de disociación 5.68 x 10^{-9}, 3.64 x 10^{-9} y 4.26 x 10^{-9} mol/L (48, 65).

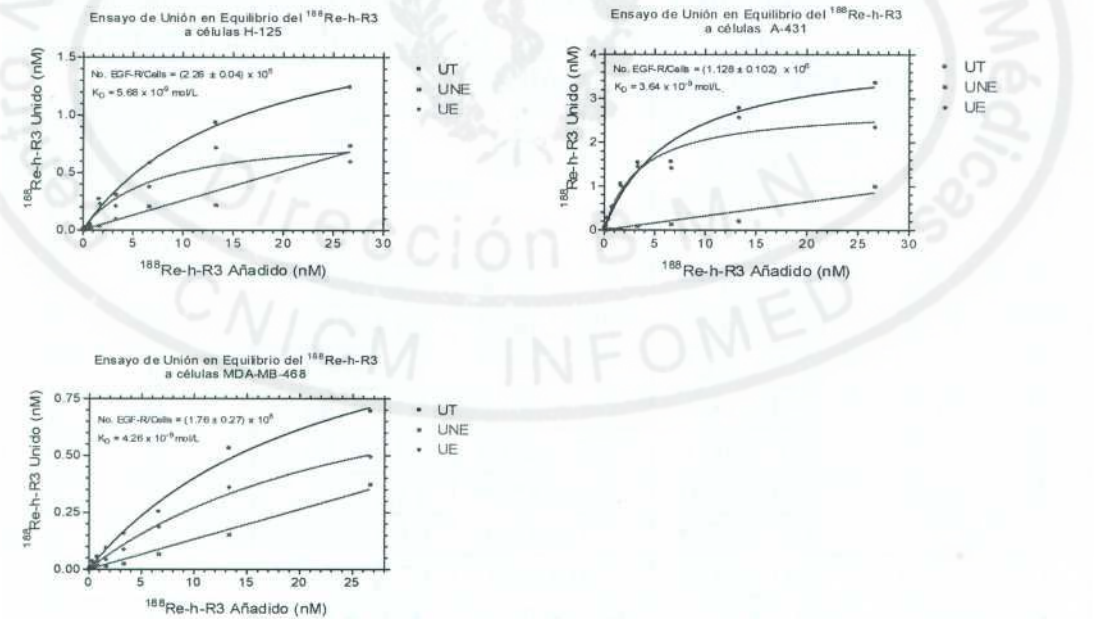

Figura 3. Afinidad de unión del anticuerpo anti-EGF-R humanizado h-R3 al EGF-R en líneas tumorales humanas H-125, A431 y MDA-MB-468 que sobre-expresan el EGF-R (UT = Unión Total, UNE = Uniones no Específicas y UE = Uniones Específicas).

Tabla 2. Propiedades de unión del anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 al EGF-R en líneas celulares de tumores humanos que sobre-expresan el EGF-R.

	Teórico	Experimental	
Línea celular	No. de EGF-R/cél.	No. de EGF-R/cél.	K_D (M, mol/L)
H-125	2.0×10^5	$(2.26 \pm 0.04) \times 10^5$	5.68×10^{-9}
A-431	2.0×10^6	$(1.13 \pm 0.10) \times 10^6$	3.64×10^{-9}
MDA-MB-468	3.6×10^6	(1.76 ± 0.27) xlO^6	4.26×10^{-9}

Biodistribución en ratones atímicos con xenoinjerto de líneas tumorales humanas.

La línea tumoral U-87, es una línea celular con un bajo nivel de expresión del EGF-R por célula en el orden de 10^4 (73), la H-125 con una expresión intermedia del número de EGF-R por célula en el orden de 10^5, y las otras dos A431 y la MDA-MB-468 son líneas celulares de muy alta expresión del número de EGF-R por célula en el orden de 10^6 (72). Los datos de biodistribución muestran una alta acumulación del anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 marcado con ^{188}Re a las 4 y 24 h después de la administración del producto. La acumulación en el tumor fue de (5.28 ± 1.62) % Dl/g, (4.18 ± 1.91) % Dl/g, (6.70 ± 3.64) % DI/g y (4.80 ± 2.18) % DI/g a las 4 h después de la administración para las líneas celulares U-87, H-125, A431 y MDA-MB-468 respectivamente como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Biodistribución del anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 en ratones atímicos con xenoinjerto de cuatro líneas de tumores humanos.

		% DI/g de tejido (media ± DE)			
Línea celular		U-87	H-125	A-431	MDA-MB-468
No. de EGF-R/cél.		5.0×10^4	2.26×10^5	2.0 x IO^6	3.6×10^6
Organo	Tiempo (h)				
Tumor	4	5.28 ± 1.62	4.18 ± 1.91	6.70 ± 3.64	4.80 ± 2.18
	24	3.78 ± 1.02	5.80 ± 1.77	7.10 ± 7.55	20.01 ± 5.77
Sangre	4	13.4 ± 1.71	9.73 ± 2.21	15.4 ± 1.48	16.52 ± 3.47
	24	3.88 ± 0.53	5.44 ±1.16	5.31 ± 0.46	12.15 ± 1.45
Hígado	4	3.08 ± 0.86	9.09 ± 2.06	1.57 ±1.04	19.61 ± 2.91
	24	2.31 ± 1.11	5.89 ± 0.49	0.73 ± 0.24	12.42 ± 6.18
Riñones	4	9.65 ± 1.19	10.2 ± 0.73	6.25 ± 2.36	7.72 ± 0.42
	24	8.28 ± 2.70	3.84 ± 0.75	5.25 ± 0.76	8.78 ± 0.70
Bazo	4	2.33 ± 0.59	6.30 ± 0.63	1.79 ± 1.05	6.49 ± 1.10
	24	1.15 ± 0.56	4.69 ± 1.69	1.27 ± 0.51	5.13 ± 1.63
Intestino Delgado	4	1.71 ± 0.34	3.81 + 1.11	0.73 ± 0.36	1.67 ±0.21
	24	0.73 ± 0.17	2.27 ± 0.37	0.55 ± 0.13	1.89 ± 0.30

Este valor disminuyó hasta (3.78 ± 1.02) % Dl/g a las 24 h para la línea celular U-87, lo que significa que no hubo una real acumulación en este xenoinjerto. Sin embargo estos valores se

vieron incrementados hasta (5.80 ± 1.77) % DI/g, (7.10 ± 7.55) % DI/g y (20.01 ± 5.77) % Dl/g para las líneas H-125, A431 y MDA-MB-468 respectivamente, sugiriendo que hubo realmente una acumulación en el tumor (Tabla 3).

Los datos de acumulación en el tumor para el anticuerpo monoclonal humanizado anti-EGF-R h-R3 mostrados en la Tabla 3 sugieren que existe un umbral en el número de EGF-R por célula por encima del cual este anticuerpo monoclonal con una constante de disociación de unión al EGF-R en el orden de 10^{-9} mol/L se une a las células tumorales que expresan el EGF-R *in vivo* y se acumula en los tumores xenoinjertados cuyo número de EGF-R por célula es mayor o igual a 10^5 y por debajo del cual no ocurre unión, ni existe acumulación en los tumores xenoinjertados.

El porciento de acumulación del anticuerpo humanizado anti-EGF-R h-R3 en el tumor fue considerablemente alto en los dos tiempos de mediciones realizadas y el producto mostró una razón terapéutica (Tumor / tejido normal) muy positiva en los tiempos medidos en la sangre, hígado, riñones, bazo y el intestino delgado. Entre todos los órganos solo se observó una acumulación significativa en los riñones en los tiempos tardíos, sugiriendo que el compuesto utiliza como vía de aclaramiento las vías urinarias. Después de las 24 h de administrado el producto la razón terapéutica (tumor/tejido normal) es > 1 en los principales órganos blanco.

3.2.2 Biodistribución en ratones normales Balb/c y primates no humanos.

Biodistribución en ratones Balb/c.

Entre todos los órganos analizados se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) y se observó acumulación del compuesto en la sangre (12.88 ± 2.07) % Dl/g, hígado (3.73 ± 1.14) % Dl/g, riñones (3.86 ± 1.10) % DI/g, intestino delgado (3.70 ± 1.14) % DI/g y el intestino grueso (4.33 ± 1.72) % Dl/g a 1 h después de la administración del producto. Estos valores disminuyeron hasta (2.18 ± 0.76) % Dl/g, (0.84 ± 0.12) % Dl/g, (1.81 ± 0.15) % Dl/g, (0.43 ± 0.05) % Dl/g y (0.52 ± 0.14) % Dl/g respectivamente a las 72 h después de la administración.

En los restantes órganos (corazón, pulmones, estomago, y el bazo) no se encontraron diferencias significativas en la acumulación, en estos órganos solo se observó una tenue localización del producto.

Biodistribución en primates no humanos.

Cuatro monos babuinos machos procedentes CENPALAB. Los estudios fueron realizados de acuerdo a las Regulaciones Nacionales para el uso y cuidado de animales vertebrados y a las guías para el cuidado de los animales de las instalaciones de primates del CENPALAB.

Estudios de Farmacocinética.

Las curvas de concentración de suero en función del tiempo como se muestra en la Figura 4 fueron ajustadas a una ecuación bi-exponencial con un coeficiente de correlación 0.992 ± 0.011.

De los parámetros del ajuste se obtuvieron los tiempos de vida media, que fueron para el tiempo de vida media de distribución $(ti/2\alpha)$ de 3.63 ± 2.93 h (media ± DE, n = 3) y de eliminación (ti/2β) de 42.19 ± 7.54 h, respectivamente (Tabla 4). El área bajo la curva (AUC) tiempo-concentración

de actividad fue de 134989.70 ± 24040.08 (cpm/mL x- h) y la concentración máxima de actividad (Co) de 9552.39 ± 2314.68 cpm/mL.

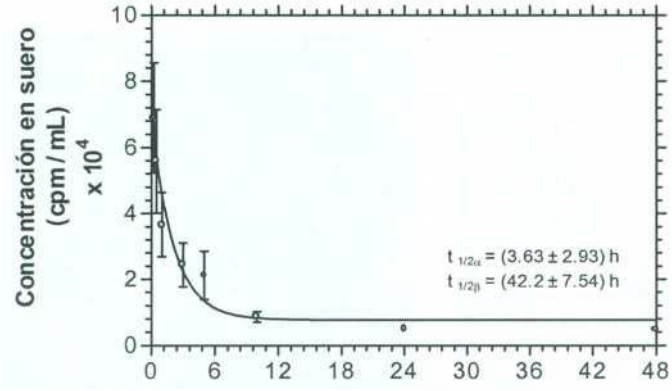

Figura 4. Curva de aclaramiento sérico del anticuerpo humanizado h-R3 acoplado al ^{188}Re en monos babuinos después de una inyección i.v.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos luego de una inyección intravenosa del anticuerpo humanizado h-R3 acoplado al ^{188}Re en monos babuinos.

Parámetro Farmacocinético	Media ± DE
tI/2 *a* (h)	3.63 ± 2.93
tI/2 β(h)	42.19 ± 7.54
AUC (cpm/mL h)	134989.70 ± 24040.08
Co (cpm/ mL)	9552.39 ± 2314.68
V_c (mL/kg)	63.32 ± 24.40
Vss (mL/kg)	172.41 ± 36.85
CLD (mL/h/kg	4.48 ±1.90

Los resultados de los volúmenes aparentes de distribución y el aclaramiento sistèmico medio **(CLD)** se muestran en la Tabla 4.

Estudios de Biodistribución en primates no humanos.

Las curvas de aclaramiento biológico del hígado, corazón, riñones, vejiga urinaria y el tracto gastrointestinal Figura 5A obtenidas como resultado de estudios cuantitativos a través de la imágenes adquiridas en la cámara gamma en 3 de los monos babuinos se muestran en la Figura 5B.

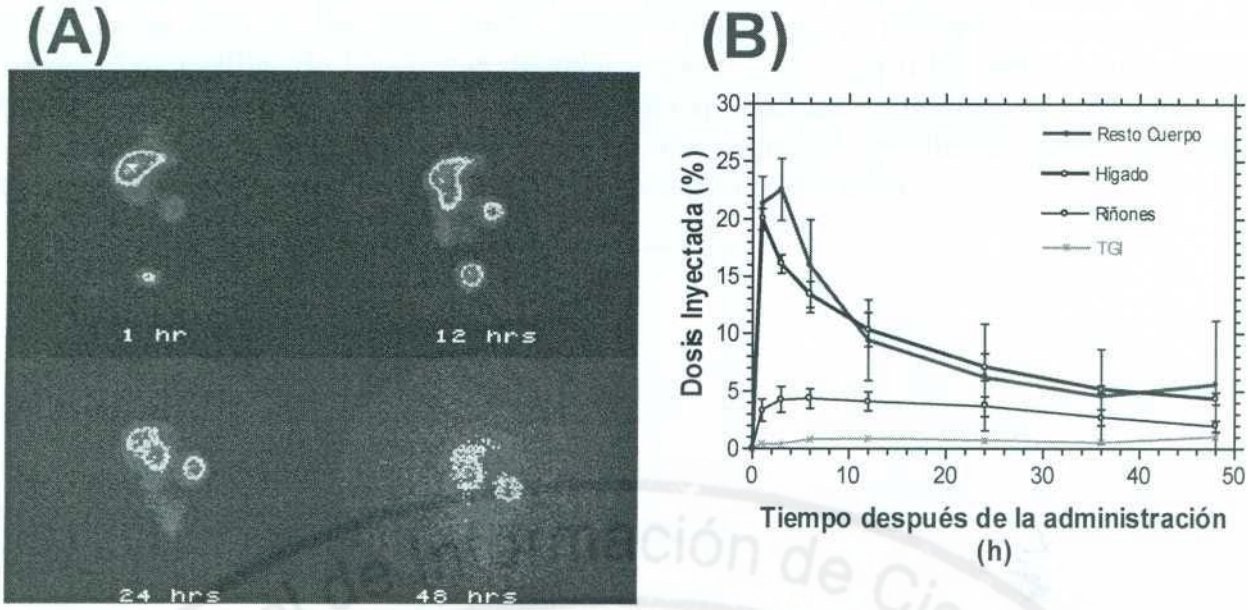

Figura 5. Imágenes planas seriadas de cuerpo entero del ^{188}Re- h-R3 adquiridas a la 1,12, 24 y 48 horas después de la administración del producto (A) y la cinética de acumulación en órganos normales del ^{188}Re-h-R3.

Entre todos los órganos se visualiza una acumulación significativa del compuesto en el hígado (20.01 ± 0.93) % DI, (media ± DE), corazón (1.61 ± 0.58) % DI, tracto gastrointestinal (0.44 ± 0.04) % DI, riñones (3.06 ± 1.76) % DI y la vejiga urinaria (1.07 ± 0.56) % DI a los 5 minutos después de administrado el producto. Estos valores disminuyeron hasta (4.37 ± 0.90) % DI, (0.16 ± 0.01) % DI y (1.47 + 1.46) % DI para el hígado, corazón y riñones a las 48 h después de la administración y aumentaron hasta (1.33 ± 0.36) % DI y (1.07 ± 0.61) % DI para la vejiga urinaria y el tracto gastrointestinal respectivamente, a las 36 h después de la administración del producto. Un patrón de distribución similar fue observado en la interacción del h-R3 en los tejidos normales de los ratones Balb/ c.

3.3 *Estudios de biodistribución del anticuerpo humanizado h-R3 en pacientes*

En un ensayo clínico Fase I se evaluó la farmacocinética, y biodistribución del anticuerpo monoclonal h-R3. En este ensayo se incluyeron 12 pacientes con tumores epiteliales en estadios avanzados (11 mujeres y 1 hombre). La edad promedio fue de 59.3 años con rango entre 35 y 74 años. Los tumores primarios correspondieron a las siguientes localizaciones: ovario (4 pacientes), mama (4 pacientes), pulmón (2 pacientes), estómago (1 paciente) y riñón (1 paciente). Todos los sujetos del ensayo habían concluido el tratamiento oncoespecífico al menos 4 semanas antes de la inclusión.

Estudios de Farmacocinética

El análisis farmacocinético de los datos fue realizado en 11 de los 12 pacientes que recibieron infusiones de h-R3 en las dosis de 50, 100, 200 y 400 mg (3 pacientes por dosis) durante 30 minutos. Los perfiles de las curvas de aclaramiento sérico del h-R3 fueron ajustados como se muestran en la Figura 6 a un transcurso bi-exponencial utilizando el software Winonlin Versión 1.0 (Maryland, EUA) que permitió una regresión no linear por el método de los mínimos cuadrados con un coeficiente de correlación 0.98 ± 0.02.

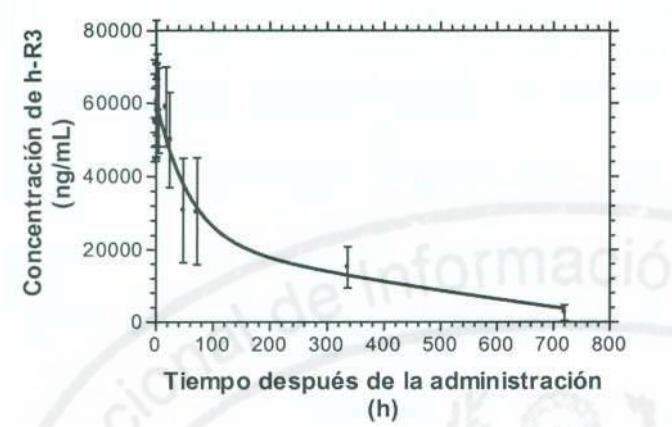

Figura 6. Curva de aclaramiento sérico del anticuerpo humanizado h-R3 en pacientes con tumores de origen epitelial después de recibir una infusión durante 30 minutos. Perfil de aclaramiento para la dosis de 200 mg.

De los parámetros del ajuste se obtuvieron los tiempos de vida media de eliminación para las dosis de 50,100, 200 y 400 mg, que fueron de 62.91 ± 61.88 h, 82.60 + 7.90 h, 302.95 ± 44.15 h y 304.51 ± 41.23 h respectivamente como se muestra en la Tabla 5. Los tiempos de vida media de eliminación aumentan linealmente con la dosis hasta la dosis correspondiente a los 200mg. Para la dosis de 400 mg como se muestra en la Figura 7 estos valores alcanzan la meseta.

Los valores del área bajo la curva (AUC), la concentración máxima Co, el volúmen de distribución y el aclaramiento (CLD) se presentan en la Tabla 5. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de aclaramiento para los 4 niveles de dosis (Prueba de Kruskal- Wallis, $p < 0.05$).

Esta caracterización farmacocinética, por el número de sujetos analizados en cada grupo de tratamiento es considerada como preliminar, pero a pesar de esto los parámetros calculados sugieren una cinética de eliminación del h-R3 no-lineal. El tiempo de vida media del anticuerpo y el AUC incrementaron su valor linealmente como se muestra en las Figuras 7 y 8 y el aclaramiento sistèmico disminuyó con el aumento de la dosis.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos del anticuerpo humanizado h-R3 obtenidos en pacientes con tumores de origen epitelial seguido de una inyección en forma de infusión de 30 minutos de duración.

	Media ± DE			
Parámetro Farmacocinético	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
tl/2 a (h)	2.99 ± 4.99	11.12 ±1.44	22.56 ± 12.26	21.83 ± 8.49
Tl/2 ß (h)	62.91 ± 61.88	82.60 ± 7.90	302.95 ± 44.14	304.51 ±41.23
AUC (ng/ mL • h) x 10^3	45.46 ± 18.49	145.93 ± 17.35	676.43 ± 348.96	474.22 ± 368.82
Co (ng/ mL) x 10^3	27.79 ± 13.92	36.61 ± 9.37	63.23 ± 15.60	46.81 ± 19.91
V_c (mL) x 10^3	2.32 ± 1.58	2.82 ± 0.72	3.26 ± 0.80	9.87 ± 4.80
CLD (mL/h/kg)	1.22 + 0.46	0.69 ± 0.08	0.34 ± 0.18	0.76 ± 0.13

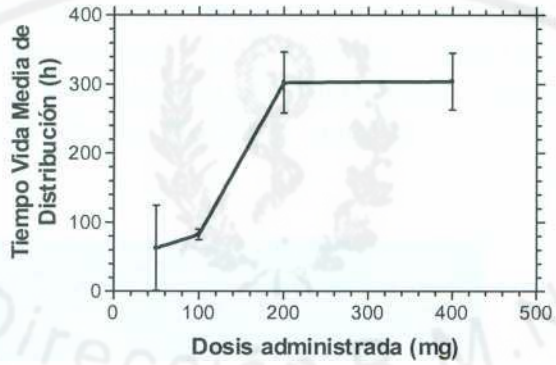

Figura 7. Dependencia del tiempo de vida media de distribución (ti/2p) de la dosis administrada.

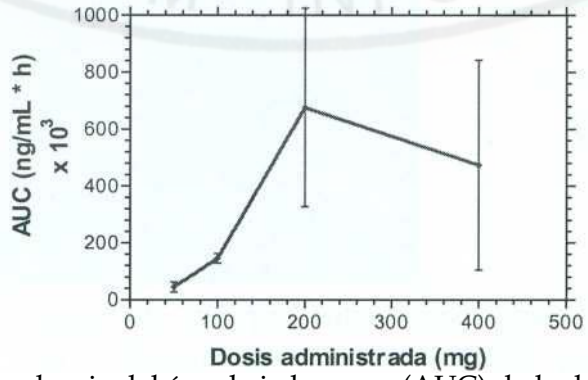

Figura 8. Dependencia del área bajo la curva (AUC) de la dosis administrada.

Este incremento lineal se observa hasta las dosis de 200 mg, porque en el intervalo de dosis entre 200 y 400 mg los valores del tiempo de vida media y del AUC alcanzan valores de meseta o valores de saturación. Mientras que a concentraciones crecientes del anticuerpo en el intervalo entre 200 y 400 mg, se constató una dependencia no lineal del tiempo de vida media y del AUC cuando la concentración aumenta, los valores del tiempo de vida media del anticuerpo alcanzan la meseta, y el AUC disminuye, similar cambio de fase se observa en el comportamiento del aclaramiento sistèmico.

Las concentraciones máximas en suero también fueron dependientes del nivel de dosis. El tiempo de vida media de eliminación (ti/2p) que varió en los rangos de 62.91 ± 61.88 h hasta 304.51 ± 41.23 h para dosis entre 50 y 400 mg fue significativamente superior al tiempo de vida media de la versión murina de este anticuerpo que varió entre 27.3 y 65.89 h (59) y fue semejante a los tiempos que se han reportado para otros anticuerpos anti-EGF-R humanizados o quiméricos (5,74).

Estudios de biodistribución.

Se realizaron estudios de biodistribución en pacientes portadores de tumores de origen epitelial para cuantificar la inmunolocalización específica en los tumores e inespecífica en el resto de los tejidos y órganos normales.

Después de la administración del ^{99m}Tc-h-R3 y h-R3 sin marcar el hígado, el contenido en el corazón y el bazo se visualizaron inmediatamente y esto se mantuvo durante las 24 h después de la administración como se muestra en la Figura 9A.

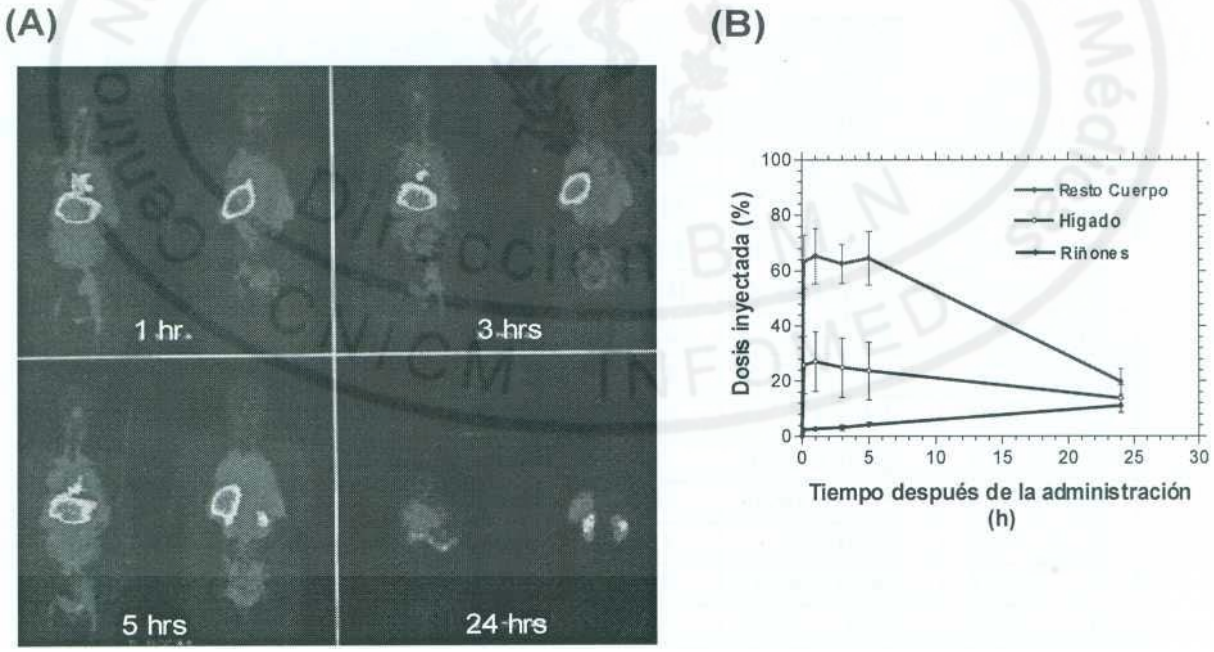

Figura 9. Imágenes seriadas de cuerpo entero anteriores y posteriores del ^{99m}Tc- h-R3 adquiridas a la 1, 3, 5 y 24 h después de la administración (A) y cinética de acumulación en órganos normales del ^{99m}Tc-h-R3 administrado en dosis de 50 mg de anticuerpo en forma de infusión i.v en pacientes portadores de tumores de origen epitelial expresado como porciento de la dosis inyectada (% DI) (B).

Las curvas medias de aclaramiento biológico del resto del cuerpo, el hígado y los riñones obtenidas a través de la cuantificación de las imágenes de la cámara gamma para la dosis de los 50 mg se muestran en la Figura 9B. No hubo suficiente captación en el bazo y el tracto gastrointestinal para ser considerados como órganos fuente.

El contenido en el resto del cuerpo (expresado como porciento de la dosis inyectada) en función del tiempo fue determinado como 100 % menos el % de captación en el hígado, contenido del corazón, bazo, vejiga urinaria, y tumor. Los resultados de las mediciones de la captación en cada uno de los órganos se muestran en la Tabla 6.

Entre los órganos con mayor captación se aprecia una acumulación significativa en el hígado (24.62 ± 10.87 %, media ± DE), (11.79 ± 2.53) %, (9.88 ± 3.79) % y (10.58 ± 0.93), en el contenido del corazón (4.76 ± 0.79) %, (5.85 ± 1.02) %, (3.61 ± 0.69) %, y (4.07 ± 1.64) %, en los riñones (2.67 ± 0.60) %, (2.46 ± 1.11) %, (2.49 ± 0.28) %, y (3.04 ± 1.08) %, en la vejiga (1.36 ± 0.31) %, (25.21 ± 41.32) %, (4.22 ± 1.38) % y (3.29 ± 1.48) y en el bazo (1.44 ± 0.10) %, (1.73 ± 0.11) %, (1.58 ± 0.63) % y (1.33 ± 0.16) % a una hora después de la administración del producto para las dosis de 50,100, 200 y 400 mg respectivamente.

Tabla 6. Biodistribución en órganos normales del ^{99m}Tc-h-R3 en pacientes con tumores de origen epitelial.

		Dosis inyectada (%) (Media ± DE)			
Organos	**Tiempo (h)**	**50 mg**	**100 mg**	**200 mg**	**400 mg**
Contenido en el corazón	1	4.76 ± 0.79	5.85 ± 1.02	3.61 ± 0.69	4.07 ±1.64
	3	4.10 ± 0.37	5.44 ± 1.30	3.18 ± 0.70	3.66 ± 1.40
	5	3.69 ± 0.44	4.82 ±1.09	2.97 ± 0.72	3.25 ± 1.12
	24	1.12 ±0.38	1.98 ± 0.78	1.71 ± 0.94	1.94 ±1.14
Hígado	1	24.62 ± 10.87	11.79 ± 2.53	9.88 ± 3.79	10.58 ± 0.93
	3	22.45 ± 10.75	10.96 ± 1.44	8.43 ± 3.93	8.41 ± 1.06
	5	21.20 ± 10.46	10.36 ± 1.40	6.58 ± 1.98	7.03 ± 1.97
	24	12.18 ± 4.97	10.35 ± 2.37	5.57 ±3.84	5.98 ± 3.07
Bazo	1	1.44 ± 0.10	1.73 ± 0.11	1.58 ± 0.63	1.33 ± 0.16
	3	1.33 ± 0.29	1.72 ±0.12	1.47 ±0.51	1.29 ± 0.40
	5	1.36 ± 0.29	1.57 ±0.21	1.31 ± 0.30	1.08 ± 0.25
	24	0.40 ± 0.34	1.03 ± 0.60	0.80 ± 0.49	0.69 ± 0.39
Riñones	1	2.67 ± 0.60	2.46 ± 1.11	2.49 ± 0.28	3.04 ±1.08
	3	3.19 ± 0.88	3.85 ± 2.29	3.34 ± 0.84	4.32 ± 0.55
	5	4.24 ± 0.96	4.04 ± 2.52	5.78 ± 3.57	5.96 ± 2.31
	24	11.02 ± 2.52	5.93 ± 4.85	8.82 ± 7.77	8.62 ±1.69
Vejiga	1	1.36 ± 0.31	25.21 ±41.32	4.22 ±1.38	3.29 ± 1.48
	3	2.51 ± 0.76	24.08 ± 39.34	6.74 ± 0.73	6.15 ± 2.36
	5	2.24 ± 0.31	22.60 ± 36.76	6.46 ± 6.25	3.13 ± 1.60
	24	0.92 ± 0.89	4.34 ± 3.21	2.16 ± 1.34	3.04 ±1.07

Estos valores se redujeron para el hígado hasta (12.18 ± 4.97) %, (10.35 ± 2.37) %, (5.57 ± 3.84) % y (5.98 ± 3.07) %, para el contenido en el corazón hasta (1.12 ± 0.38) %, (1.98 ± 0.78) %, (1.71 ± 0.94) % y (1.94 ± 1.14) %, para la vejiga hasta (0.92 ± 0.89) %, (4.34 ± 3.21) %, (2.16 ± 1.34) % y (3.04 ± 1.07) % y para el bazo hasta (0.40 ± 0.34) %, (1.03 ± 0.60) %, (0.80 ± 0.49) % y (0.69 ± 0.39) % y aumentaron hasta (11.02 ± 2.52) %, (5.93 ± 4.85) %, (8.82 ± 7.77) % y (8.62 ± 1.69) % para los riñones a las 24 h después de la administración del producto para las dosis de 50,100, 200 y 400 mg respectivamente.

Utilizando las imágenes de inmunogammagrafía adquiridas de cuerpo entero se comparó el aclaramiento biológico del anticuerpo entre los tumores y los tejidos normales. Se calculó el porcentaje de acumulación de la dosis inyectada por gramo de tejido en los tumores de todos los pacientes con imágenes positivas en comparación con el hígado, los riñones y el corazón, 3 de los órganos fuente con mayor captación del AcM h-R3.

El porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido fue significativamente más alto en el tumor que en el hígado, los riñones y el corazón. De igual forma, el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido decreció tras las primeras 24 h después de la administración del producto para los tejidos normales, mientras que se mantuvo relativamente constante para los tumores como se muestra en la Figura 10B.

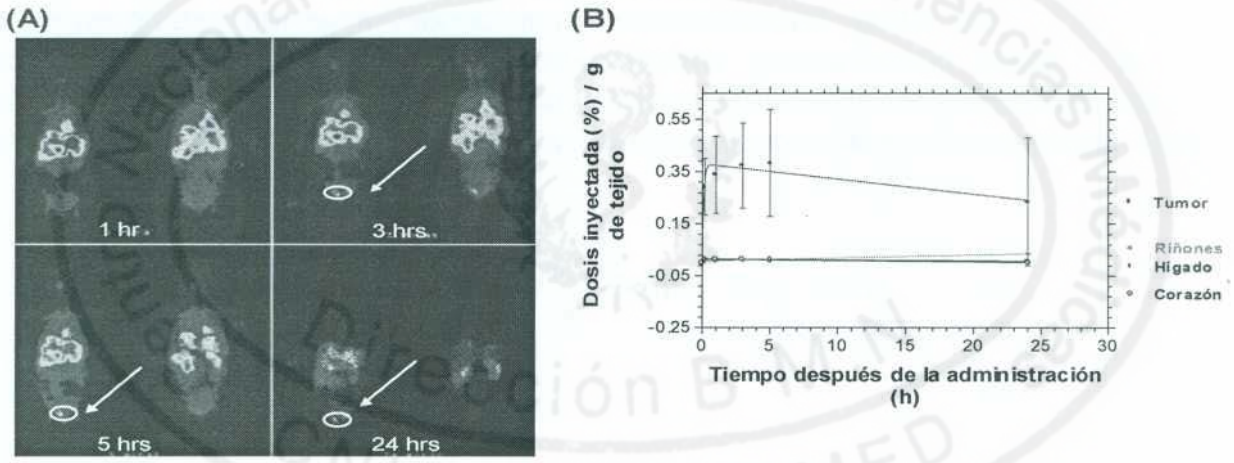

Figura 10. Biodistribución en órganos normales a través de imágenes de cuerpo entero anteriores y posteriores obtenidas a la 1, 3, 5 y 24 h después de la administración del ^{99m}Tc-h-R3 en una cámara gamma (A) y cinética de acumulación en un tumor primario de ovario expresado como porciento de la dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g de tejido) (B).

3.4 Modelo Matemático para la unión cinética de los anticuerpos anti-EGF-R a su receptor.

3.4.1 Desarrollo de modelo.

Sean diferentes órganos y tejidos como el plasma, tumor, hígado y piel, con masas m_p, mm, mHi, y mpi, con número total de moléculas de EGF-R por célula de Bor, Bohi, y Bop,, y donde K_D es la constante de disociación del anticuerpo.

Una vez que el anticuerpo monoclonal es administrado por vía endovenosa las interacciones y el comportamiento de este en los 4 compartimientos se pueden representar a través de la Figura 11.

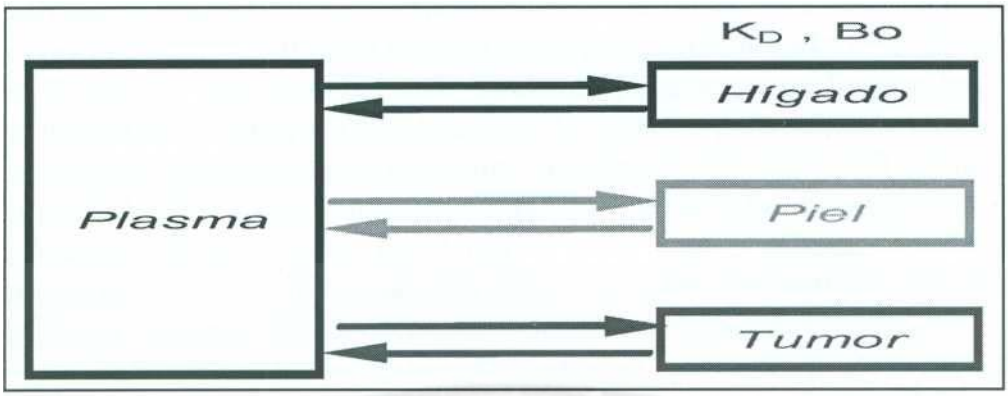

Figura 11. Modelo farmacocinético del anticuerpo monoclonal humanizado anti-EGF-R h-R3, sus interacciones en cuatro compartimientos desde el plasma hasta los tejidos normales y el tumor y viceversa, donde KD es la constante de disociación del anticuerpo por el receptor y Bo es el número de moléculas de EGF-R por célula.

La concentración del anticuerpo monoclonal en plasma, hígado, piel y tumor es una magnitud que se puede medir en estudios de biodistribución ya sea en un modelo de animales experimentales o en pacientes portadores de tumor. Las interacciones y el comportamiento del anticuerpo monoclonal en estos 4 compartimientos se representan a través de las ecuaciones {1-7}:

$$\frac{dC_p(t)}{dt} = -\frac{dC_p(t)}{dt} - D\left[\frac{C_p(t)}{V_p} - \left(\frac{C_{TTu}(t) - C_{BTu}}{V_{Tu}}\right) - \left(\frac{C_{THi}(t) - C_{BHi}}{V_{Hi}}\right) - \left(\frac{C_{TPi}(t) - C_{BPi}}{V_{Pi}}\right)\right] \quad \{1\}$$

$$\frac{dC_{TTu}(t)}{dt} = D_{Tu}\left[\frac{C_p(t)}{V_p} - \left(\frac{C_{TTu}(t) - C_{BTu}}{V_{Tu}}\right)\right] \quad \{2\}$$

$$\frac{dC_{THi}(t)}{dt} = D_{Hi}\left[\frac{C_p(t)}{V_p} - \left(\frac{C_{THi}(t) - C_{BHi}}{V_{Hi}}\right)\right] \quad \{3\}$$

$$\frac{dC_{TPi}(t)}{dt} = D_{Pi}\left[\frac{C_p(t)}{V_p} - \left(\frac{C_{TPi}(t) - C_{BPi}}{V_{Pi}}\right)\right] \quad \{4\}$$

$$C_P(0) = C_{P0}, C_{TTu}(0) = 0, C_{THi}(0) = 0, C_{TPi}(0) = 0 \quad \{5\}$$

$$C_B = \frac{K_D B_o C_f}{1 + K_D C_f} \quad \{6\}$$

$$C_T = C_B + C_f \quad \{7\}$$

donde : C_p (t), C_{TTu} (t), C_{THi} (t) y C_{Tpi} (t) son la concentración total en plasma, tumor, hígado y piel en el tiempo t después de la inyección; C_{BTU}, C_{BHi} y C_{BPi}, son la concentración del anticuerpo que está unida en cada órgano o tejido; V_p, V_{Tu}, V_{Hi} y V_{pi} y D, D_{Tu}, D_{Hi} y D_{pi}, son los