

volúmenes y las velocidades de aclaramiento o eliminación biológica de primer orden para el plasma, tumor, hígado y piel respectivamente.

El modelo asume que: (i) después de la inyección endovenosa (i.v) la concentración del anticuerpo en el plasma decrece exponencialmente desde una concentración inicial $C_{po}(0) = C_{po}$ y la concentración total en el tumor $C_{Ttu}(0) = 0$, en el hígado $C_{Thl}(0) = 0$ y en piel $C_{TPi}(0) = 0$ (ecuación 5), (ii) las interacciones desde el plasma hacia los tejidos y el tumor es bi- direccional y están gobernadas por la unión del anticuerpo a su receptor CB (ecuación 6) que es una función que depende de la constante de disociación (K_D), del número de moléculas de EGF-R por célula (Bo) y de la concentración libre C_f que esta presente en el órgano o tejido; (iii) la concentración de anticuerpo en el tumor y los tejidos alcanza rápidamente un equilibrio entre las concentraciones de lo que esta unido CB y las concentraciones de lo que está libre C_f de acuerdo a la isoterma de adsorción de Langmuir (ecuación 6) (75) y (jv) la ecuación 7 es una ecuación de balance de masas que refleja que la suma de la concentración unida CB y la concentración libre C_f respectivamente es igual a la concentración total C_T en el órgano o tejido.

3.4.2 Cálculos de computación.

Las simulaciones fueron generadas resolviendo numéricamente por el método de Runge-Kutta las ecuaciones diferenciales 1-4 utilizando las condiciones iniciales descritas en la ecuación 5 y la ayuda del paquete de programas Matemática (Versión 3.0 Wolfram Research Inc., Champaign, IL, EUA). Para dichas simulaciones fueron utilizados los valores de los parámetros que se describen en la Tabla 7.

La resolución por métodos numéricos conduce a la obtención de las curvas de concentración del anticuerpo en función del tiempo en el plasma, y la concentración total C_T y la unida CB en cada uno de los órganos y tejidos (plasma, tumor, hígado y piel).

Para el caso de los tejidos y los órganos (plasma, tumor, hígado y piel) se obtienen funciones de las curvas de concentración en función del tiempo dependiente fundamentalmente de los parámetros $F(D, K_D, Bo, t)$, velocidad de aclaramiento D , constante de disociación del anticuerpo por su receptor K_D y del número de moléculas de EGF-R en cada célula del órgano o tejido Bo . Integrando las funciones que describen las curvas de concentración en función del tiempo para la concentraciones de unión CB de cada órgano o tejido (tumor, hígado y piel) en el tiempo se obtiene el área bajo la curva (AUC). La AUC se puede asumir como un subrogado del efecto farmacodinámico del anticuerpo en ese tejido y va a depender fundamentalmente de la constante de disociación del anticuerpo por su receptor K_D y del número de moléculas de EGF-R en cada célula del órgano o tejido Bo .

Una vez que se tienen los valores de AUC para cada órgano o tejido (tumor, hígado y piel) para un valor determinado de la constante de disociación se puede obtener la dependencia de los valores de AUC en función del valor de la constante de disociación del anticuerpo K_D por su receptor.

Para realizar las simulaciones se utilizaron valores que son característicos de los anticuerpos monoclonales anti-EGF-R. Para la cinética de aclaramiento en plasma, piel, hígado y tumor se utilizaron los valores obtenidos en los estudios de farmacocinética y biodistribución del anticuerpo en pacientes con tumores de origen epitelial después de una administración en forma de infusión durante 30 minutos.

La simulación que se presenta en la Figura 12 muestra el comportamiento del aclaramiento en plasma (C_p), y las concentraciones de unión (C_B) en piel, hígado y tumor después de la administración en forma de infusión cuando la concentración inicial en plasma es 100 nM. Los valores de K_D se fijaron como 10^{-9} M y los valores de B_0 para la piel, hígado y tumor fueron 10^4 , 10^4 y 10^6 moléculas de EGF-R por célula, respectivamente. La concentración en plasma C_p inicialmente decrece a una velocidad muy rápida en la primera fase, seguido por un transcurso más lento de decaimiento en forma bi-exponencial. Las concentraciones de unión C_B en el tumor, hígado y piel aumentan con el tiempo desde un valor inicial igual a cero hasta que alcanzan el valor máximo de saturación como se muestra en la Figura 12.

Las simulaciones fueron realizadas por un período de 720 horas seguido de la infusión, que cubrieron un lapso de tiempo típico al que se utiliza en los protocolos de ensayos clínicos con los anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados y totalmente humanos (5, 7,13).

Tabla 7. Resumen de los parámetros utilizados en las simulaciones.

Parámetro	Símbolo	Valor utilizado
Constante de disociación	K_D (M)	$4.53 \pm 1.05 \times 10^{-9}$
Concentración inicial en plasma	C_{po} (nM)	100.0
No. de moléculas de EGF-R por célula		
Tumor	B_{OTU}	106
Hígado	B_{OHI}	10^4
Piel	B_{OPI}	10^4
Velocidades de aclaramiento		
Plasma	D (h^{-1})	2.89×10^{-3}
Tumor	DTU (h^{-1})	2.44×10^{-3}
Hígado	DHI (h^{-1})	7.33×10^{-2}
Piel	DPI (h^{-1})	1.95×10^{-2}
Volumen		
Plasma	V_P (L)	5.0
Tumor	V_{TU} (L)	0.005
Hígado	V_{HI} (L)	1.5
Piel	V_{PI} (L)	4.0

Para aplicaciones terapéuticas con anticuerpos monoclonales las dosis que se utilizan normalmente se encuentran en los rangos que se acercan a la saturación de los sitios de unión del anticuerpo a los receptores presentes en el tumor.

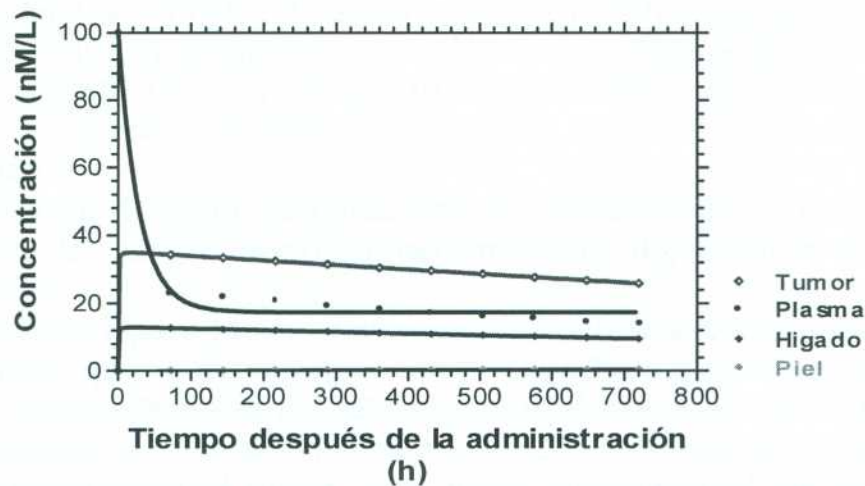


Figura 12. Simulación del modelo farmacocinético que muestra la curva de aclaramiento plasmático C_p y la cinética de acumulación expresada a través de la concentración de unión CB en el tumor, el hígado y la piel del anticuerpo monoclonal humanizado h-R3. La concentración en plasma C_p decae bi-exponencialmente, mientras que las concentraciones de unión CB crecen hasta que se alcanza la saturación de los sitios de unión al EGF-R.

Integrando en el tiempo las curvas de concentración en el tiempo para el aclaramiento en plasma y la acumulación en el hígado, la piel y el tumor representadas en la Figura 12, se obtiene el área bajo la curva (AUC) para el plasma, el hígado, la piel y el tumor. El AUC se puede asumir como un subrogado del efecto farmacocinético del anticuerpo en ese tejido.

Una vez obtenido el AUC para el plasma, el hígado, la piel y el tumor para valores fijos de la constante de disociación del anticuerpo y del número de moléculas de EGF-R por célula en cada tejido, se obtuvo utilizando el modelo la dependencia del efecto farmacocinético AUC de los valores de la constante de disociación K_D como se muestra en la Figura 13.

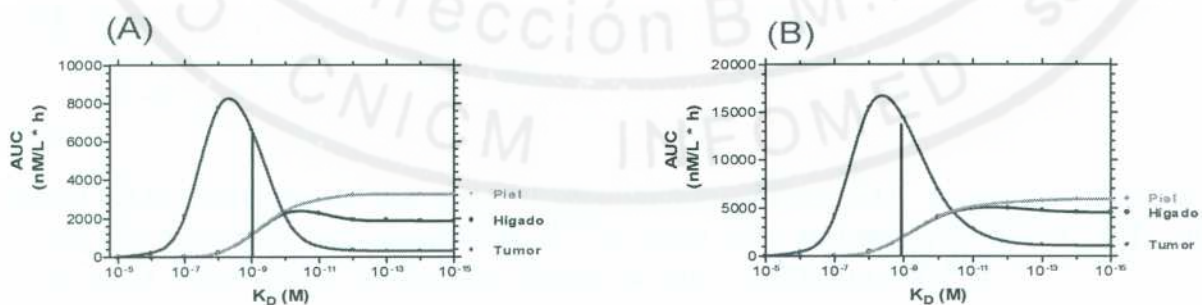


Figura 13. Dependencia del efecto farmacocinético AUC o farmacológico en el tumor y los tejidos normales cuando varía la constante de disociación K_D de anticuerpos anti-EGF-R para las dosis de 100 mg (A) y 200 mg (B).

El modelo predice que existe una dependencia entre el efecto farmacocinético, la farmacodinamia del anticuerpo en el tumor y los tejidos normales, donde para afinidades con valores intermedios (10^{-8} y 10^{-9} M) ocurrirá el máximo efecto (una alta acumulación en el tumor).

y muy baja en los tejidos normales el hígado y la piel), mientras que para los anticuerpos con afinidades bajas $K_D < 10^{-7}$ M, tendrán una acumulación muy baja en el tumor y los anticuerpos con una afinidad muy alta (K_D mayores que 10^{-10} M) inducirán una acumulación rápida en los tejidos normales (el hígado y la piel) reduciendo de nuevo el índice terapéutico como se muestra en la Figura 13.

Otro tipo de análisis que deriva de las aplicaciones del modelo radica en que el modelo predice el comportamiento del AUC o efecto farmacocinético en dependencia de la dosis que se administra Figura 14. Como se muestra en la Figura 14 con el aumento de la dosis se obtiene una dependencia no lineal en el AUC dado que a concentraciones mayores de 200 mg se obtiene la saturación de la mayoría de las moléculas de EGF-R por célula en los tejidos normales como la piel y el hígado y queda mayor cantidad de anticuerpo libre, que aunque los mecanismos de degradación del organismo operan sobre éste, el tumor tiene mayor disponibilidad del anticuerpo libre no unido a los tejidos normales en los diferentes compartimientos.

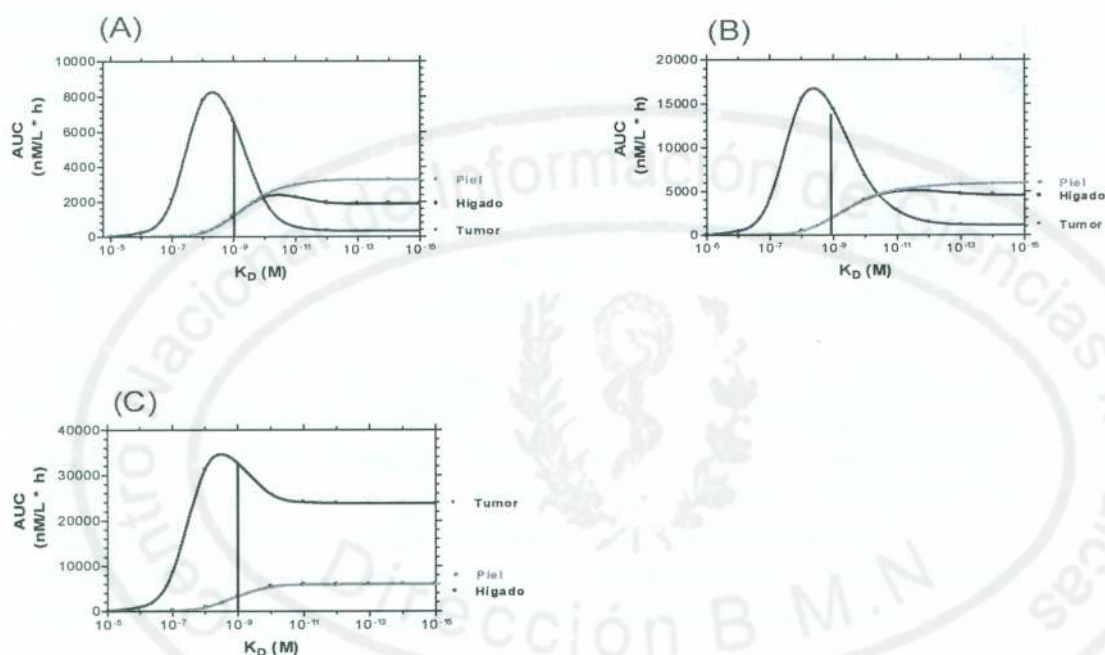


Figura 14. Dependencia no lineal del efecto farmacocinético AUC o farmacológico en el tumor y los tejidos normales con el aumento de las dosis para 100 mg (A), 200 mg (B) y 400 mg (C) cuando varía la constante de disociación K_D de anticuerpos anti-EGF-R.

Para el caso del anticuerpo TheraCIM h-R3 se estima una razón terapéutica mucho mayor que 1 sin llegar a la saturación de los tejidos normales, para el ERBITUX aproximadamente de 1 y para el ABX-EGF menor que 1, estos dos últimos con saturación de tejidos normales.

IV.DISCUSION GENERAL.

Durante los últimos años a través de estudios clínicos se ha podido demostrar que anticuerpos monoclonales 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. Uno de estos antígenos es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), cadena polipeptídica simple formada por 1186 amino ácidos (76-82). Aunque las células normales de los epitelios también expresan el EGF-R, el elevado número de receptores en las células tumorales confiere un grado de especificidad como blanco para la terapia. Por ende las células tumorales pueden, proporcionalmente, unir mayor cantidad de moléculas de anticuerpo. Varios anticuerpos monoclonales anti-EGF-R que reconocen diferentes epitopes del EGF-R han sido desarrollados utilizando dos aproximaciones fundamentales. Una aproximación ha sido la de obtener anticuerpos dirigidos contra la variante salvaje de receptor (1, 5, 6, 50, 51, 74) y la otra contra el nuevo epítopo que es creado por un desdoblamiento alternativo en la variante mutada del EGF-RvIII (83).

Aunque se ha trabajado intensamente en esta área, no existen todavía herramientas de evaluación cuantitativa que permitan la caracterización del EGF-R como blanco para la terapia específica del cáncer.

Dentro de las limitantes más comunes para lograr una terapia exitosa de las enfermedades malignas utilizando anticuerpos monoclonales se incluyen, la dosis de anticuerpo que se utiliza y el esquema de administración, la vida media en sangre de los anticuerpos y su rápido aclaramiento plasmático, demostrado en muchos estudios clínicos (5, 7, 13, 74, 84, 85). La presencia de antígenos circulante, la pobre penetrabilidad en los tumores de moléculas de alta peso molecular, dentro de las que se encuentran los anticuerpos y la forma en que estas moléculas son metabolizadas y catabolizadas por los órganos del sistema del retículo endotelial (86).

Para resolver estas limitantes y lograr mayor acumulación, penetración en los tumores, mejor aclaramiento plasmático y una mayor retención en los tumores, se requiere generar anticuerpos monoclonales con características físicas, bioquímicas e inmunológicas adecuadas para el desarrollo de una buena terapia. Es necesario también desarrollar nuevas estrategias para aumentar la eficacia de los tratamientos inmunoterapéuticos (86).

Esta tesis tuvo dentro de sus propósitos fundamentales la evaluación farmacodinámica del receptor de EGF como blanco para la terapia específica del cáncer.

4.1 Marcación del anticuerpo h-R3 con ^{188}Re y $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

La utilidad clínica del diagnóstico por medio de imágenes y la terapia del cáncer fue bien establecida al realizar la marcación de los anticuerpos monoclonales con isótopos radiactivos como el ^{125}I , el ^{111}In y el ^{123}I (87-89).

Aunque en un inicio fueron muy utilizados los isótopos antes mencionados se han hecho grandes esfuerzos en la búsqueda métodos eficientes para el marcaje de anticuerpos y sus fragmentos con ^{188}Re y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (62, 90-92).

En el presente trabajo se han obtenido sondas radiactivas del anticuerpo monoclonal h-R3 marcado con ^{188}Re y $^{99\text{m}}\text{Tc}$, 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, es una sonda radiactiva estable a temperatura ambiente en solución salina fisiológica después de realizada la marcación.

En estudios de estabilidad *in vitro* en los cuales la sonda radiactiva fue sometida a retos con 100 mM de DTPA y cisteína, a concentraciones en varios órdenes de magnitud más altas que los niveles fisiológicos, no ocurre disociación o pérdida del renio o el tecnecio acoplado al anticuerpo. Estos estudios mostraron que el h-R3 marcado con ^{188}Re y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es estable en DTPA, y que más del 92 % de la radiactividad permanece asociada al anticuerpo durante 1 h de reto a 37 °C. Sin embargo cuando el reto se realiza frente a 100 mM de cisteína bajo las mismas condiciones, ocurre una transquelación del 85 % de la radiactividad del anticuerpo hacia la cisteína después de 1 h a 37 °C (62). Estas concentraciones de cisteína utilizadas en los experimentos de reto fueron 1,000 veces más altas que las concentraciones normales de cisteína en el suero y los tejidos (64).

Aparentemente en el suero humano parece que existen sustancias antioxidantes que retardan o protegen la formación u oxidación del ^{188}Re a perrenato. El aumento de la estabilidad de los anticuerpos monoclonales marcados con ^{188}Re en el suero ha sido reportado previamente por Griffiths y cols. (90).

Experimentos de reconocimiento inmunológico en células H-125 medido a través de la técnica de Citometría de Flujo demostraron que más del 85 % de las células eran reconocidas por el h-R3 acoplado al ^{188}Re y ocurría la unión del anticuerpo marcado con el isótopo radiactivo a su antígeno expresado en la membrana. Estos valores son similares a otros reportados en la literatura (62, 90-92). En el caso de la sonda radiactiva del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -h-R3 el reconocimiento inmunológico se determinó utilizando el ensayo de los radiorreceptores (52, 53). El ajuste de las curvas de desplazamiento del ^{125}I -EGF por el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -h-R3 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 $\mu\text{g/mL}$ y 5.53 $\mu\text{g/mL}$ para el anticuerpo nativo y para el anticuerpo reducido, respectivamente (52, 53).

4.2 Estudios de biodistribución en modelos de animales experimentales

4.2.1 Biodistribución en ratones atímicos con xenoinjertos de líneas tumorales humanas

Determinación de la constante de disociación.

Desde la introducción de los procedimientos de ELISA para la medición de la constante de disociación de las reacciones de los complejos antígeno-anticuerpo se ha extendido el uso de estos (93, 94).

En el presente trabajo se empleó una fase sólida para la adhesión de las células H-125 adenocarcinoma de pulmón, A431 carcinoma epidermoide de vulva y MDA-MB-468 carcinoma de mama que fueron utilizadas en los ensayos de unión en equilibrio para la determinación de la constante de disociación por el EGF-R del anticuerpo humanizado h-R3.

La cinética en fase sólida de las reacciones antígeno-anticuerpo difiere significativamente de la cinética de los métodos clásicos en fase líquida utilizados inicialmente para estos propósitos (93). El método utilizado en el presente trabajo para medir la constante de disociación en fase sólida

estima directamente la afinidad del anticuerpo por su antígeno (EGF-R) presente en la membrana de las células fijadas previamente a esta fase. Este método para la medición de la afinidad utiliza una densidad de moléculas de EGF-R por célula constante, mientras que el anticuerpo se usa en diluciones doble seriadas (94).

Los valores de la constante de disociación obtenidos como resultado de este estudio corroboran las mediciones previas de la constante de disociación de los anticuerpos anti-EGF-R murino ior egf/r3 (50, 51) y el humanizado h-R3 (48) realizadas utilizando el radioinmunoensayo y el de ensayo de radiorreceptores (48, 50, 51).

Biodistribución en ratones con xenoinjertos de líneas de tumores humanos.

Desde el primer reporte del uso exitoso de los ratones atímicos para el crecimiento de tumores humanos xenoinjertados, la disponibilidad de estos sistemas animales representó una herramienta de gran valor en el estudio *in vivo* de muchos aspectos de los tumores humanos (95, 96). La mayoría de los tumores que crecen en los ratones atímicos mantienen sus características morfológicas y biológicas. La similitud entre el comportamiento de estos tumores en un hospedero natural y un ratón atímico, ha demostrado el valor potencial de este sistema animal para el estudio de los tumores humanos (97, 98).

Para los estudios de inmunolocalización en tumores del anticuerpo humanizado h-R3 marcado con ^{188}Re se seleccionó el modelo de ratones atímicos xenoinjertados con las líneas celulares de tumores humanos U-87 glioblastoma multiforme, H-125 adenocarcinoma de pulmón, A431 carcinoma epidermoide de vulva y MDA-MB-468 carcinoma de mama. En estos estudios no se observó acumulación estadísticamente significativa en los órganos normales.

La acumulación en el tumor provoca un mayor impacto en la biodistribución en órganos normales para el caso de la línea celular MDA-MB-468, línea con una mayor expresión de moléculas de EGF-R por célula, el anticuerpo se acumula en un mayor % DI/g de tejido en el tumor, lográndose un $(20.01 \pm 5.77) \% \text{ DI/g}$ a las 24 h después de la administración, pero al mismo tiempo los porcentos en los restantes órganos normales también fueron más altos si se comparan con los porcentos alcanzados cuando los tumores fueron de otras líneas celulares como se observó en la Tabla 3.

En experimentos con xenoinjertos de cuatro líneas diferentes de tumores humanos, que expresaban diferentes densidades de moléculas de EGF-R por célula, U-87 (5.0×10^4), H-125 (2.0×10^5), A431 (2.0×10^6) y MDA-MB-468 (3.6×10^6) se pudo constatar que una concentración más alta (% DI/g de tejido) estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparada con los otros tumores fue alcanzada en los tumores MDA-MB-468 que tenían, 72, 18 y 1.8 veces mayor número de moléculas de EGF-R por célula que los tumores U-87, H-125 y A431 respectivamente. Los datos de acumulación en el tumor para este anticuerpo anti-EGF-R h-R3 sugieren que existe un umbral en el número de moléculas de EGF-R por célula por encima del cual este anticuerpo con una constante de disociación en su unión al EGF-R de $4.53 \pm 1.05 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ se une a las células tumorales que expresan el EGF-R *in vivo* y se acumula en los tumores xenoinjertados. Esta acumulación preferencial en el tumor, que no era evidente que se produjera una vez que el anticuerpo fuera transformado a su versión humanizada, valida la utilidad práctica del anticuerpo para la radiolocalización de tumores que expresan el EGF-R.

Estudios de biodistribución (99) realizados con otros anticuerpos anti-EGF-R marcados con isótopos radiactivos en ratones atímicos con xenoinjertos de líneas de tumores humanos para el caso del anticuerpo C225 acoplado a DTPA y marcado con ^{111}In en tumores de A431, MDA-MB- 468 y de carcinomas mamarios MCF-7 han mostrado que la acumulación en el tumor A431 a las 72 h después de administrado el producto fue de $(28.0 \pm 2.4) \% \text{ DI/g}$ de tejido y el contenido de anticuerpo en el resto de los tejidos normales fue menor que la acumulación en los xenoinjertos, el hígado y la sangre mostraron $(4.7 \pm 0.7) \%$ y $(6.7 \pm 0.5) \% \text{ DI/g}$, respectivamente.

Otros estudios en ratones atímicos con xenoinjertos de tumores A431 realizados con los anticuerpos anti-EGF-R, el anticuerpo murino ior egf/r3 y el humanizado h-R3 marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (53) mostraron que a las 4 h después de la administración del compuesto la acumulación en el tumor fue de (6.14 ± 2.50) y $(5.06 \pm 2.61) \% \text{ DI/g}$ para el ior egf/r3 y el h-R3 respectivamente, el contenido de anticuerpo medido en los tejidos normales fue menor que la acumulación en el tumor, el hígado y la sangre mostraron (3.11 ± 0.1) y $(29.30 \pm 8.11) \% \text{ DI/g}$ a las 4 h y (1.95 ± 1.03) y $(15.27 \pm 1.46) \% \text{ DI/g}$ para el ior egf/r3 y h-R3, respectivamente. Sin embargo, a las 24 h después de la administración, el contenido de anticuerpo en el tumor se mantuvo más alto que en el resto de los tejidos normales ensayados.

4.2.2 Biodistribución en ratones normales Balb/c y primates no humanos

Biodistribución en ratones normales Balb/c

En estos estudios de biodistribución en la mayoría de los órganos y tejidos, con excepción de la sangre, el h-R3 mostró una acumulación mínima y un rápido aclaramiento en comparación con otros anticuerpos monoclonales ya sean quiméricos o humanizados (100).

El incremento de la acumulación del producto a las 24 h después de la administración en los riñones sugiere que el aclaramiento esta ocurriendo a través de las vías urinarias y la baja actividad o falta de acumulación en el hígado y el intestino delgado sugiere que el mayor porcentaje del aclaramiento del producto no ocurre a través de la ruta hepatoiliar-intestinos.

En estudios realizados con ratones Balb/c utilizando otros anticuerpos humanizados (101) se demostró que no existe unión específica en tejidos normales y si en los tumores. En estos experimentos los autores concluyen que la captación que se observa en algunos tejidos normales pertenecientes al sistema del retículo endotelial después de los 48 h de administrada la sonda radiactiva está dada por uniones no específicas de las regiones Fe del anticuerpo (101).

En ensayos de biodistribución en ratones de la misma cepa Balb/c realizados con el anticuerpo humanizado anti-Lewis Y (hu3S193) se demostró que aunque existe expresión del antígeno Lewis Y en las glándulas gástricas del estómago y en las glándulas basales del intestino delgado de estos ratones no se observó aumento de la captación específica en el intestino delgado de los ratones Balb/c (102). La presencia del antígeno Lewis Y en estas glándulas implica un patrón de distribución en tejidos humanos normales muy similar al reportado previamente a través de estudios de inmunohistoquímica con otros anticuerpos anti-Lewis Y (103).

Si en lugar de evaluar otros anticuerpos humanizados que son irrelevantes a la especie en estudio, empleamos la IgG humana, se observa que en un transcurso de tiempo similar al utilizado en el presente trabajo autores han reportado que la sonda radiactiva ^{125}I -IgG humana

hasta las 48 h después de la administración en ratones Balb/c no se acumula en los tejidos normales (104). En estudios cuando se utilizó el anticuerpo murino ior egf/r3 que sirvió de parental para la obtención de este anticuerpo h-R3 en ratones de la misma cepa se demostró que tampoco ocurría acumulación en los tejidos normales (105).

Biodistribución en primates no humanos.

El compuesto h-R3 acoplado al ^{188}Re , que por vez primera se utilizaba en primates no humanos para estudios de farmacocinética y biodistribución tuvo un aclaramiento plasmático con una cinética bi-exponencial con un tiempo de vida media para la fase inicial o fase alfa de 3.63 ± 2.93 h, que representa en parte la distribución entre los compartimientos vasculares y extravasculares del compuesto h-R3 acoplado al ^{188}Re , y un tiempo de vida media para la segunda fase o fase beta de 42.19 ± 7.54 h, que representa la eliminación, aclaramiento y catabolismo del h-R3 acoplado al ^{188}Re completamente equilibrado entre los dos compartimientos. Los tiempos de vida media obtenidos en el presente estudio fueron consistentes con estudios previos realizados con otros anticuerpos quiméricos y humanizados en otros modelos de animales experimentales (6,106-108). Estudios publicados recientemente han mostrado un tiempo de vida media para la fase terminal de 45 h para el anticuerpo monoclonal humanizado CTMOI (109).

La biodistribución del h-R3 acoplado al ^{188}Re en los monos babuinos fue comparable a la lograda en otros estudios con el anticuerpo humanizado 425 marcado con ^{125}I (107) y a la del anticuerpo quimérico B72.3 marcado con ^{125}I (110).

La expresión de EGF-R en varias especies de monos (Cynomolgus, Verdes, Rhesus y Babuinos) tiene el 90 % de homología con la expresión de este receptor en el hígado de los humanos. Los altos niveles de excreción del compuesto durante las primeras horas a través de los riñones pudiera estar relacionado con diferentes razones debido a: (i) alto metabolismo en los monos que pudo provocar que parte del ^{188}Re se transquelatara a especies de bajo peso molecular en el suero, (ii) origen y características de los monos, (iii) el patrón de glicosilación de la molécula que pudo conducir a diferencias en el catabolismo y (iv) ser una consecuencia del tipo de isótopo empleado.

4.3 Biodistribución en pacientes.

El presente trabajo incluyó dentro de sus objetivos realizar una caracterización preliminar sobre la disposición farmacocinética del anticuerpo humanizado anti-EGF-R h-R3.

El anticuerpo h-R3, una IgGi humanizada, en estos pacientes con tumores de origen epitelial en diferentes localizaciones, tuvo un aclaramiento de la circulación de los pacientes con una cinética bi-exponencial que consistió en una fase de distribución con tiempos de vida media de 2.99 ± 4.99 , 11.12 ± 1.44 , 22.56 ± 12.26 y 21.83 ± 8.49 h y una segunda fase de eliminación con tiempos de vida media de 62.91 ± 61.88 , 82.60 ± 7.90 , 302.95 ± 44.14 y 304.51 ± 41.23 h para las dosis de 50, 100, 200 y 400 mg respectivamente. Otros anticuerpos humanizados de la subclase IgGi como el Herceptin (111) también han mostrado similar disposición farmacocinética donde

los tiempos de vida media han sido de 36,103,155, 242 y 373 h para las dosis de 10, 50,100, 250 y 500 mg respectivamente.

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 farmacocinéticos obtenidos a través de los perfiles sugieren que el anticuerpo presenta una cinética no-lineal de eliminación (aumento de los valores del tiempo de vida media y la AUC y disminución de los valores del aclaramiento sistémico con el aumento de la dosis). El tiempo de vida media del anticuerpo y el AUC se incrementaron linealmente como se mostró en las Figuras 7 y 8, y el aclaramiento sistémico disminuyó con el aumento de la dosis como fue presentado en la Tabla 5. Este incremento lineal del tiempo de vida media y de los valores de AUC con relación al aumento de la dosis se observó solo hasta las dosis de 200 mg, en el intervalo de dosis entre 200 y 400 mg los valores del tiempo de vida media y del AUC alcanzaron valores de saturación para el caso del tiempo de vida media, mientras que el AUC experimentó una disminución de su valor.

Los valores de saturación obtenidos en el tiempo de vida media y el AUC para este intervalo de concentraciones pudieran estar relacionados con la saturación sistémica del número de moléculas de EGF-R presentes en los diferentes tejidos del organismo, donde a concentraciones menores 50 y 100 mg, que a su vez están relacionadas con la constante de disociación del anticuerpo, no se alcanza la saturación de todas las moléculas de EGF-R que están expuestas en los diferentes compartimientos de los tejidos, por lo que el tiempo de vida media y el AUC aumentan linealmente con el aumento de la concentración.

La ausencia de saturación de la mayor parte de las moléculas de EGF-R presentes en los tejidos normales y tumor lleva a que exista una menor cantidad de anticuerpo libre que pueda ser degradado por lo que el tiempo de vida media y el AUC aumentan linealmente con el aumento de la concentración. 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 los valores de meseta, y el AUC disminuye, similar cambio de fase se observa en el comportamiento del aclaramiento sistémico.

Este comportamiento cinético no lineal del anticuerpo h-R3 ha permitido justificar la selección del rango de dosis para maximizar la razón terapéutica para el h-R3. Donde se observa que existe una ventana de dosis alrededor de la cual a dosis por debajo de los 200 mg el tiempo de vida media no ha alcanzado sus valores máximos y por encima de los 200 mg como es el caso de la dosis de 400 mg, para la cual el tiempo de vida media no aumenta linealmente con el aumento de la dosis, este alcanza valores de meseta y ocurre una inversión de fase como se observó en la Figura 7.

La selección de la dosis óptima así como el esquema de tratamiento adecuado es una de las posibilidades que brinda este tipo de caracterización farmacocinética y disposición farmacológica del anticuerpo h-R3 estudiado en el presente trabajo.

Para los estudios de biodistribución se obtuvieron los datos de la cuantificación realizada en las imágenes adquiridas en la cámara gamma. La resolución de la imágenes fue tal, que las regiones de interés (RDI) pudieron trazarse sobre los órganos fuente sin necesidad de administrar un

radioisótopo adicional para definir las fronteras de los órganos (112) o realizar un mapeo del torrente sanguíneo para la substracción del fondo (113). Las curvas de tiempo-actividad para cada uno de los órganos fuente fueron ajustadas a un transcurso con funciones mono o bi- exponencial utilizando una regresión no-lineal por el método de los mínimos cuadrados. Posteriormente se realizó la integración para el cálculo de los tiempos de residencia en cada órgano o tejido.

El análisis cualitativo de las imágenes de cuerpo entero evidenció la existencia de 5 órganos fuente para el AcM h-R3 en las dosis estudiadas: corazón, hígado, riñones, bazo y vejiga urinaria como se mostró en las Figuras 9 y 10.

Para todos los niveles de dosis, el órgano que mostró la mayor captación del h-R3 fue el hígado. El AcM se acumuló en este órgano, inmediatamente después de la administración, alcanzando la absorción máxima en la primera hora.

La localización del producto en el hígado inmediatamente seguido de la administración de "mpc-acoplado al anticuerpo h-R3 como se muestra en la Figura 9 A, además de la presencia del EGF-R en las células de los hepatocitos, se debe a que el hígado es el centro de catabolismo de las proteínas, especialmente de las moléculas marcadas con isótopos radiactivos. El hígado, en este caso, actúa como el órgano con mayor número de sitios de excreción y/o catabolismo de los productos radiomarcados y de sus productos de degradación. El intestino grueso se visualizó en 5 pacientes luego de 24 h de la administración. En el caso del aumento del porciento de la dosis inyectada en los riñones a las 24 h comparado con los porcentos después de una hora de administrado el producto sugiere que parte de la excreción del producto se realiza a través de la vía urinaria. Los porcentajes de acumulación en los riñones y en la vejiga urinaria, se modificaron ampliamente en dependencia de la evacuación urinaria.

El perfil de distribución se correspondió con los reportes previos para el anticuerpo murino (2, 3). Las semejanzas en el patrón de biodistribución confirmaron que tras el proceso de humanización, el AcM h-R3 mantuvo *in vivo* el patrón original de reconocimiento en tejidos y órganos normales, así como en los tumores.

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

El tratamiento de tumores sólidos es una tarea extremadamente difícil que requiere una comprensión minuciosa de la oncología clínica, de la anatomía y la fisiología del tumor, de farmacología, inmunología y sus interacciones (114). Durante la década de los años ochenta Goldenberg y colaboradores (99) encontraron que los tumores que tenían más elevados los niveles de expresión de antígenos de membrana (el EGF-R) *in vitro* también acumulaban la mayor cantidad de anticuerpo cuando las mismas células tumorales crecían *in vivo*; sin embargo *in vivo* los niveles de expresión del antígeno no fueron medidos.

El modelo utilizado en el presente trabajo predice que para que exista una real acumulación en el tumor para un anticuerpo con afinidad de 10^{-9} M y que esta prevalezca a lo largo del tiempo en experimentos *in vivo*, el tumor debe tener una densidad de moléculas de EGF-R por célula (B_0) mayor o igual a 10^5 EGF-R/cél. 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 en la 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 con las líneas celulares humanas 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.

Las variables críticas que se espera sean importantes en la interpretación de los resultados de los experimentos de mediciones de la afinidad lo constituyen la dosis administrada del anticuerpo monoclonal en cuestión, las concentraciones resultantes en el plasma y las magnitudes de la constante de disociación K_D (115). Para la mayor parte de las dosis administradas en aplicaciones terapéuticas experimentales, las concentraciones resultantes en el plasma (entre 10- 200 nM) son mayores que $1/K_D$ y por ende se encuentran en la parte de la meseta, en la porción no dependiente de la concentración de la isoterma de unión de Langmuir del anticuerpo para un AcM con K_D mayor que 5×10^{-8} mol/L. Consecuentemente, no se esperaría un gran efecto en la acumulación en el tumor incrementando la afinidad del AcM, especialmente para anticuerpos con $K_D > 10^{-9}$ mol/L (114).

El modelo predice una vez obtenida la AUC para el plasma, el hígado, la piel y el tumor, con valores fijos de la constante de disociación del anticuerpo y del número de moléculas de EGF-R por célula en la piel, el hígado y el tumor, como se mostró en la Figura 13, que existe una dependencia entre el efecto farmacocinético, la farmacodinamia del anticuerpo, y la afinidad, donde para una afinidad con valores intermedios (10^{-8} y 10^{-9} 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 de nuevo el índice terapéutico como se mostró en la Figura 13.

Sin unión específica, sin embargo, la concentración del AcM en el tumor no sería mayor que la concentración en el plasma, es decir una afinidad muy baja se ve claramente que no sería útil. Otros autores han reportado que una alta afinidad del anticuerpo a una dosis dada tiende a disminuir la percolación del anticuerpo porque existen muy pocas moléculas de anticuerpo libres. Como resultado, se obtiene una distribución más heterogénea y la concentración promedio del anticuerpo en el tumor no aumenta linealmente con la afinidad (114,115).

El modelo explica una selección adecuada de la dosis que posibilitaría un mayor índice terapéutico y la optimización de la dosis y efecto sobre tejidos normales y el tumor como se observó en la Figura 14. Al analizar el concepto farmacodinámico de Antígeno Tumor Asociado, sobre todo de los antígenos relacionados con la familia de receptores de membrana, con el modelo se introduce un cambio de paradigma porque predice que existe una ventana de afinidad y una ventana de dosis para maximizar el índice terapéutico cuando son utilizados anticuerpos anti-EGF-R.

En el modelo desarrollado predice que un incremento de la afinidad no lleva a un aumento lineal de la acumulación en el tumor, válido para otros anticuerpos generados contra el receptor como, el ERBITUX (C225) (5, 85) y el ABX-EGF (84).

Finalmente, con el modelo se corrobora teóricamente porque el anticuerpo h-R3 con afinidad un orden más baja que la del ERBITUX y dos orden más baja que la del ABX-EGF tiene un alto efecto terapéutico en pacientes, una acumulación diferencial entre tejidos normales y tumores *in vivo* y no provoca reacciones alérgicas y toxicidad dermatológica en piel. Para el h-R3 se alcanza un índice o razón terapéutica > 1 sin tener que llegar a la saturación de las moléculas de EGF-R presentes en los tejidos normales como la piel y el hígado como se muestra en la Figura 14, sin embargo para los anticuerpos ERBITUX y ABX-EGF bajo las mismas condiciones la razón terapéutica es < 1 (Figura 14) y para que se alcance una razón terapéutica > 1 es necesario la administración de altas dosis de anticuerpo como se observa en la Figura 14. Tras el tratamiento con los AcMs ERBITUX (C225) ($K_D = 10^{-10}$ M) (9) y ABX-EGF ($K_D = 10^{-11}$ M) (116) o los pequeños inhibidores de la actividad quinasa asociada al EGF-R, tales como el IRESSA (117) y el Tarceva (8) se han detectado reacciones alérgicas tales como rash de tipo acné, foliculitis, diarrea, reacciones alérgicas y neumonitis intersticial, que pueden llegar a ser severas o muy severas. Más aún, para algunas drogas como el AcM ERBITUX (C225) y Tarceva (OSI 774), se ha reportado la existencia de correlación entre la respuesta antitumoral, la sobrevida y la presencia de reacciones en piel; en consecuencia se ha propuesto que la aparición de rash cutáneo es un marcador subrogado del bloqueo de EGF-R (118,119). A lo que estos autores no hacen mención en su presentación es a que aquellos pacientes que mayor sobrevida tuvieron, fueron los pacientes respondedores y como criterio de los protocolos, los pacientes que hacían respuesta al tratamiento con estas drogas continuaban recibiendo los beneficios del tratamiento y por consecuencias fueron los que mayor número de reacciones de rash cutáneo tuvieron y con mayor intensidad.

El modelo matemático farmacodinámico de la interacción cinética de anticuerpos específicos contra el EGF-R en tejidos normales y tumor, que es válido para aquellos anticuerpos que reconocen antígenos expresados en tejidos normales y tumorales y donde el efecto farmacodinámico depende de la expresión del blanco antigénico, de la afinidad del anticuerpo, de la dosis administrada y de su tiempo de vida medio confirma que existe una ventana de afinidad que puede explotarse terapéuticamente, donde los anticuerpos con afinidad intermedia (10^{-8} – 10^{-9} M) para el EGF-R muestran una acumulación preferencial en tejidos tumorales, con alta expresión de la proteína diana $> 10^5$ receptores por célula, con relación a órganos normales que también expresan el antígeno en menor proporción.

Otras diferencias relativas a la especificidad epitópica de los anticuerpos y los cambios resultantes en la señalización del receptor, no pueden desestimarse para explicar la ausencia de reacciones dermatológicas tras el uso del h-R3.

Este modelo farmacocinético que describe las interacciones y unión cinética de anticuerpos anti-EGF-R a su receptor en tejidos normales tales como la piel y el hígado y en el tumor es una simplificación matemática de muchos aspectos muy complejos que gobiernan las interacciones y la localización en los tejidos normales y el tumor de los anticuerpos con sus receptores una vez que son administrados en forma de inyección en bolo i.v o en infusión. Por ejemplo, el modelo no contiene ninguna información sobre la distribución espacial del anticuerpo dentro del tejido tumoral, si existen regiones del tumor que están distantes de los capilares, o tienen muy baja perfusión o es un tejido que ha hecho necrosis, entonces el volumen a que puede acceder el

anticuerpo es menor que el volumen intersticial total del tumor, que se considera en el modelo. Desarrollar un modelo que incluya la distribución espacial dentro del tumor, llevaría a la confusión y a tratar de incorporar información sobre capilaridad, presiones, gradientes, perfusión dentro del tumor, información que generalmente no está disponible o no esta bien caracterizada.

V. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvieron sondas radiactivas del anticuerpo h-R3 marcado con ^{188}Re y el $^{99\text{m}}\text{Tc}$, con buena actividad específica, estabilidad en el tiempo y capacidad de reconocimiento por el EGF-R que permitieron realizar la evaluación farmacológica del anticuerpo en los diferentes modelos experimentales y pacientes.
2. Para el anticuerpo h-R3 con una K_D en el orden de 10^9 M se necesita un mínimo de 10^5 moléculas de EGF-R / cél. para que exista una acumulación diferencial entre tejidos normales y tumor y se obtengan razones terapéuticas mayores que 1.
3. El anticuerpo h-R3 no se acumula en los órganos normales en los modelos experimentales estudiados. En aquellos órganos diana en los que hubo una acumulación inicial como el hígado, fue producto del catabolismo, y en el caso de los riñones producto de la excreción que ocurre en este órgano.
4. El anticuerpo h-R3 presenta una cinética no-lineal de eliminación y a partir de la dosis de 200 mg ocurre una inversión de fase, se logra la saturación de los receptores y los tiempos de vida media alcanzan valores de meseta.
5. El comportamiento cinético no lineal del anticuerpo h-R3 permitió justificar la selección del rango de dosis óptima de tratamiento entre 200 mg y 400 mg para maximizar la razón terapéutica en pacientes.
6. El modelo matemático farmacodinámico de la interacción cinética de anticuerpos específicos contra el EGF-R sugiere 2 predicciones contra-intuitivas: (i) existe una ventana de afinidad entre 10^{-8} y 10^{-9} M (estimada teóricamente) donde hay una acumulación diferencial y se maximiza la razón terapéutica entre tumores que sobre-expresan el EGF- R y tejidos normales; y (ii) anticuerpos con afinidades mayores que 10^9 M, paradójicamente, requieren dosis mayores para tener un efecto anti-tumoral, pero que coincide con la saturación total en los tejidos normales y un máximo de toxicidad.

VI. RECOMENDACIONES.

1. Realizar mediciones precisas de la constante de disociación K_D del anticuerpo h-R3 utilizando la técnica de Biacore que ya está disponible en el país.
2. Ampliar la evaluación farmacológica del anticuerpo h-R3 a través de estudios de farmacocinética y biodistribución en modelos de animales experimentales y en pacientes con tumores de origen epitelial a dosis repetida con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos dentro de los que se encuentran los tiempos de vida media, las concentraciones de estados estacionarios y el aclaramiento.

3. Realizar estudios de farmacodinamia en pacientes utilizando biopsias de tejido normal (piel) y del tumor para realizar mediciones de: (i) nivel de expresión del EGF-R entre tejido normal y tumoral, (ii) Inhibición de la cascada de señalización del EGF-R y (iii) determinación de la concentración de anticuerpo entre tejido normal y tumoral para comprobar experimentalmente que existe una acumulación diferencial.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Modjtahedi H, Hickish T, Nicolson M, Moore J, Styles J, et al. Phase I trial and tumor localization of the anti-EGF-R monoclonal antibody ICR62 in head and neck or lung cancer. *Brit J of Cancer* 1996; 73:228-235
2. Iznaga-Escobar N, Torres L, Morales A, Ramos M, Alvarez I, Pérez N, Fraxedas R, Rodríguez O, Rodríguez N, Pérez R, Lage A and Stabin M. ^{99m}Tc-labeled anti-EGF- Receptor Antibody in patients with tumor of epithelial origin: I. Biodistribution and Dosimetry for Radioimmunotherapy. *J Nucl Med* 1998 ; 39:15-23.
3. Iznaga-Escobar N, Torres L, Morales A, Ramos M, Rodríguez N, Pérez N, Alvarez I, Rodriguez O. ^{99m}Tc-labeled anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Antibody (ior egf/r3) in patients with tumor of epithelial origin: II. Pharmacokinetics and Clearances. *J Nucl Med* 1998; 39:1918-1927.
4. Ramos-Suzarte M, Rodríguez N, Oilva JP, Iznaga-Escobar N, Perera A, Morales A, González N, Cordero M, Torres L, Pimentel G, Borrón M, González J, Torres O, Rodríguez T, Pérez R. ^{99m}Tc-labeled anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Antibody (ior egf/r3) in patients with tumor of epithelial origin: III. Clinical Trials Safety and Diagnostic Efficacy. *J of Nucl Med* 1999; 40:768-775.
5. Baselga J., Pfister D., Cooper M.R., Cohen R., Burtness B. et al. Phase I Studies of Anti- Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 904-914.
6. Mendelsohn J, and Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19(56):6550-65.
7. Mendelsohn J., and Baselga J. Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 2787-2799.
8. Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J, et al. Phase I and pharmacologic study of OSI-774 (Tarceva), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol.* 2001;19:3267-3279
9. Shin D.M., Donato N.J., Perez-Soler R., Shin H.J.C., Wu J.Y, et al. Epidermal Growth Factor Receptor-targeted Therapy with C225 and Cisplatin in Patients with Head and Neck Cancer. *J. Clin. Oncol. Clin. Cancer Res.* 2001; 7:1204-1213.
10. Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 2002;20:3815-3825.
11. Rich J.N., Reardon D. A., Peery T., Dowell J.M., Quinn J.A. et al. Phase II Trial of Gefitinib (IRESSA) in Recurrent Glioblastoma. *J. of Clin. Oncol.* 2004; 22 :133-142.
12. Souliers D., Senzer N.N., Vokes E.E., Hidalgo M., Agarwala S.S., and Siu L.L. Multicenter Phase II Study of Erlotinib (Tarceva), an Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Cancer of Head and Neck. *J. of Clin. Oncol.* 2004; 22: 75-85.
13. Vanhoefer U., Tewes M., Rojo F., Dirsch O., Schleucher N., et al. Phase I Study of the Humanized Antiepidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody EMD72000 in

Patients With Advanced Solid Tumors That Express the Epidermal Growth Factor Receptor. *J of Clin. Oncol.* 2004; 22:175-184.

14. Seidman A.D., Forster M.N, Esteva F.J, Tan L., Kaptain S., et al. Weekly Trastuzumab and Paclitaxel Therapy for Metastatic Breast Cancer With Analysis of Efficacy by *HER2* Immunophenotype and Gene Amplification. *J. Clin. Oncol.* 2001;19: 2587-2595
15. Esteva F.J., Valero V., Booser D., Guerra L.T., Murray J.L., et al. Phase II Study of Weekly Docetaxel and Trastuzumab for Patients With *HER-2*-Over-expressing Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.*2002; 20:1800-1808.
16. Yano H., Shiozaki H., Kobayashi K., Yano T., Tahara H., Tamura S., Mori T. Immunohistologic detection of the epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1991; 67:91-98.
17. Saranath D., Panchal R.G., Nair R., Mehta A.R., Sanghavi V.D., Deo M.G. Amplification and over-expression of epidermal growth factor receptor gene in human oropharyngeal cancer. *Eur J cancer B Oral Oncol.* 1992; 28 :139-143.
18. Messa C., Russo F., Caruso M.G., Di Leo A. EGF, TGF- α , and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol.* 1998; 37: 285-289.
19. Libermann T.A., Razón N., Bartal A.D., Yarden Y., Schlessinger J., Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res.* 1984; 44: 753- 760.
20. Di Carlo A., Mariano A., Macchia P.E., Moroni M.C., Beguinot L., Macchia V. Epidermal growth factor receptor in human brain tumors. *J Endocrinol. Invest.* 1992; 15: 31-37.
21. Pérez R., Pascual M.R., Macias A., Lage A. Epidermal growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1984; 4:189-193.
22. Neskovic-Konstantinovic Z., Nikolic-Vukosavljevic D., Brankovic-Magic M., Kanjer K., Gavrilovic D., et al. Expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer, from early stages to advanced disease. *J Exp. Clin. Cancer Res.* 1999; 18:347-355.
23. Solbach C., Roller M., Budischewski K., Loibl S., Nicoletti M., Stegmüller M., Kaufmann M. EGF-R and Her2/neu over-expressing tumors: independent collectives for treatment of breast cancer by specific monoclonal antibody-therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2003; 129 :250-251.
24. Simpson B.J., Phillips H.A., Lessells A.M., Langdon S.P., Miller W.R. c-erbB growth factor receptor proteins in ovarian tumors. *Int. J. Cancer* 1995; 64:202-206.
25. Minguillon C., Schonborn I., Reles A., Bartel U., Lichtenegger W. EGF-R and PCNA expression in ovarian carcinomas-correlation with classic prognostic factors. *Gen. Diagn. Pathol.* 1996; 141:197-201.
26. Uegaki K., Nio Y., Inoue Y., Minari Y., Sato Y., Song M.M., Dong M., Tamura K. Clinico- pathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 1997; 17:3841-3847.
27. Maddy S.Q., Chisholm G.D., Busuttil A., Habib F.K. Epidermal growth factor receptors in human prostate cancer: correlation with histological differentiation of the tumor. *Br. J. Cancer* 1989; 60:41-44.
28. Morris G.L., Dodd J.G. Epidermal growth factor receptor mRNA levels in human prostatic tumors and cell lines. *J. Urol.* 1990; 143:1272-1274.

29. Piyathilake C.J., Frost A.R., Manne U., Weiss H., Bell W.C., Heimbürger D.C., Grizzle W.E. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8:734-744.
30. Meert A.P., Martin B., Delmotte P., Berghmans T., Lafitte J.J., et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir. J.* 2002; 20:975-981.
31. Uhlman D.L., Nguyen P., Manivel J.C., Zhang G., Hagen K., Fraley E., Aeppli D., Niehans G.A. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin. Cancer Res.* 1995; 8:913-920.
32. Busto-castanon L., Sanchez-Merino J.M., Gelabert-Mas A. Expression of epidermal growth factor receptor and p53 protein in superficial cancer of the urinary bladder. *Arch Esp. Urol.* 2001; 54:13-21.
33. Niikura H., Sasano H., Sato S., Yajima A. Expression of epidermal growth factor-related proteins and epidermal growth factor receptor in common epithelial ovarian tumors. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1997;16: 60-68.
34. Glynne-Jones E., Goddard I., Harper M.E. Comparative analysis of mRNA and protein expression for epidermal growth factor receptor and ligands relative to the proliferative index in human prostate tissue. *Hum. Pathol.* 1996; 27:688-694.
35. Xie H., Turner T., Wang M.H., Singh R.K., Siegal G.P., Wells A. In vitro invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells is modulated by EGF receptor-mediated signals. *Clin. Exp. Metastasis.* 1995; 13:407-419.
36. Damstrup L., Rude Voldborg B., Spang-Thomsen M., Brunner N., Skovgaard Poulsen H. In vitro invasion of small-cell lung cancer cell lines correlates with expression of epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer* 1998; 78:631-640.
37. Bartlett J.M., Langdon S.P., Simpson B.J., Stewart M., Katsaros D. The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 1996 73:301-306
38. Volm M., Rittgen W., Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br. J. Cancer* 1998; 77:663-669.
39. Veale D., Kerr N., Gibson G.J., Kelly P.J., Harris A.L. The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br. J. Cancer* 1993; 68:162-165
40. Fischer-Colbrie J., Witt A., Heinzl H., Speiser P., Czerwenka K, Sevela P., Zeillinger R. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res.* 1997;17(1B): 613-619.
41. Nicholson S., Sainsbury J.R., Halcrow P., Chambers P., Farndon J.R., Harris A.L. Expression of epidermal growth factor receptors associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer. *Lancet.* 1989; 28 (8631): 182-185.
42. Turner T., Chen P., Goodly L.J., y Wells A. EGF receptor signaling enhances in vivo invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 1996;14: 409-418.

43. Adelsman M.A., McCarthy J.B., Shimizu Y. Stimulation of betal-integrin function by epidermal growth factor and heregulin-beta has distinct requirements for erbB2 but a similar dependence on phosphoinositide 3-OH kinase. *Mol. Biol. Cell* 1999; 10:2861-2878.
44. Kerbel R.S., Vilorio-Petit A., Okada F. et al. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol. Med.* 1998; 4:286-295.
45. Gibson S., Tu S., Oyer R., Anderson S.M., Johnson G.L. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J. Biol. Chem.* 1999 274:17612-17618.
46. Giordano A., Rustum Y.M., Wenner C.E. Cell cycle: molecular targets for diagnosis and therapy: tumor suppressor genes and cell cycle progression in cancer. *J. Cell Biochem.* 1998; 70:1-7
47. Etessami A., Bourhis J. Cetuximab: Anti-EGF-R monoclonal antibody. *Drugs of the Future* 2000; 25:895-899.
48. Mateo C., Moreno E., Amour K. et al. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 1997; 3:71-81.
49. Yang X.D., Jia X.C.J., Corvalan J.R.F., Wang P., Davis C.G. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF-R monoclonal antibody, for cancer therapy. *Critical Reviews In Oncol, and Hemat.* 2001; 38:17-23.
50. Fernández A., Pérez R., Macías A., Velandia A., Alvarez I., Ramos M., y Velozo A. Generación y caracterización primaria de anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Interferon y Biotecnología* 1989; 6:289-299.
51. Fernández A., Spitzer E., Pérez R., Boehmer F.D., Eckert K., Zschiesche W., Grosse R. A New Monoclonal Antibody for Detection of EGF-receptors in Western Blots and Paraffin- Embedded Tissue Sections. *J of Cell Biochem* 1992; 49:157-165.
52. Morales A., Ducongé J., Caballero I., Núñez G., Fernández E., Iznaga-Escobar N. Biodistribution of ^{99m}Tc-labeled anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) Humanized Monoclonal Antibody h-R3 in a Xenograft Model of Human Lung Adenocarcinoma. *Nucl. Med. and Biol.* 1999; 26:275-279.
53. Morales A., Ducongé J., Alvarez-Ruiz D., Becquer-Viart M.A., Núñez-Gandolff G., Fernández E., Caballero-Torres I., Iznaga-Escobar N. Humanized versus Murine Antihuman Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for Immunoscintigraphic Studies. *Nucl. Med. Biol.* 2000; 27:199-206.
54. Vallis K.A., Reilly R.M., Chen P., Oza A., Hendler A., Cameron R., Hershkop M., Iznaga-Escobar N., Ramos-Suarez M., Keane P. A phase I study of ^{99m}Tc-h-R3 (DiaCIM), a humanized immunoconjugate directed towards the epidermal growth factor receptor. *Nucl Med Commun.* 2002; 23:1155-1164.
55. Vilorio-Petit A., Crombet T., Jothy S. et al. Acquired resistance to the anti-tumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61:5090-5101.
56. Crombet-Ramos T., Rak J., Perez R., Vilorio-Petit A. Anti-proliferative, anti-angiogenic and pro-apoptotic activity of h-R3: A Humanized anti-EGF-R antibody. *Int. J Cancer* 2002; 101:567-575.

57. Bier H., Hoffmann T., Haas I., van Lierop A. Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother.* 1998; 46:167-173.
58. Stragliotto G., Vega F., Stasiecki P., Gnopp P., Poisson M., Delattre J.Y. Multiple infusions of anti epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody (EMD 55900) in patients with recurrent malignant gliomas. *Eur. J. Cancer* 1996; 32: 636-640.
59. Crombet T., Torres O., Neningen E., Catala M., Rodriguez N., Ramos M., Fernandez E., Iznaga N., Perez R., Lage A. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16 :93-102.
60. Crombet T., Torres O., Rodríguez V., Menéndez A., Stevenson A., Ramos M., Torres F., Figueredo R., Veitia I., Iznaga-Escobar N., Pérez R., and Lage A. Phase I Clinical Evaluation of a Neutralizing Monoclonal Antibody against Epidermal Growth Factor Receptor in Advanced Brain Tumor Patients: Preliminary Study. *Hybridoma* 2001; 20:131-136.
61. Khazaeli, M.B., Contry, R.M., LoBuglio, A.F. (1994) Human immune response to monoclonal antibodies. *Journal of Immunotherapy* 1994; 15:42-52.
62. Winnard P.; Virzi F.; Fogarasi M.; Ruschowski M. Hnatowich D.J. Investigations of directly labeling antibodies with rhenium-188. *Q. J. Nucl. Med.* 1996, 40:151-160.
63. Throll J.H.; Freitas J.E.; Swanson D.; Rogers W.L. Clare J.M. Clinical comparison of cardiac blood pool visualization with ^{99m}Tc red blood cells *in vivo* and with ^{99m}Tc -Human Serum Albumin. *J. Nucl. Med.* 1976,19:796-803.
64. Hnatowich, D.J.; Virzi, F.; Fogarasi, M.; Ruschowski, M. Winnard, P.Jr. Can cysteine challenge assay predict the *in vivo* behavior of ^{99m}Tc -labeled antibodies?. *Nucl Med Biol* 1991,21:1035-1044.
65. Reilly R.M., Kiarash R., Sandhu J., Lee Y.W., Cameron R.G., Hendler A., Vallis K. Gariepy J. A comparison of EGF and MAb 528 labeled with ^{111}In for imaging human breast cancer. *J Nucl Med.* 2000; 41:903-911.
66. Akaike A. Posterior probabilities for choosing regression model. *Ann Inst Math Stat* 1978; 30:A9-A14.
67. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978; 6:165-175.
68. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokin Biopharmaceutics* 1978; 6:547-558.
69. Wagner IG. *Fundamental of Clinical Pharmacokinetics*. Hamilton, IL: Drug Intelligence; 1979:77-79.
70. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. In Gibaldi M, Perrier D, eds. *Pharmacokinetics*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker inc; 1982:319-355.
71. Sokal R., Rohlf J. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman and Co., New York, Fourth edition, 1995.
72. Baselga J, Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29:127-138.

73. Bender H., Takahashi H., Adachi K., Belser P., Liang S., Prewett M., Schrappe M., Sutter A., Rodeck U., Herlyn D. Immunotherapy of human glioma xenografts with unlabeled, ¹³¹I, or ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody 425 to Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res.* 1992; 52:121-126.
74. Bier H., Hoffmann T., Hauser U., Wink M., Ochler M., Kovar A., Muser M., Knecht R. Clinical trial with escalating doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72 000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001; 47:519- 524.
75. Lindmo T., Boven E., Cuttitta F., Fedorko J., Bunn P.A. Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods* 1984; 72:77-89.
76. Cohen S., Fava R.A., Sawyer S.T. Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:6237-6241.
77. Cohen S., Ushiro N., Stoscheck C., Chinkers M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1982; 257:1523-1531.
78. Schlessinger J. The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochem* 1988; 27:3119-3123.
79. Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309:418-425.
80. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:7709-7712.
81. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 1979; 48:193-216.
82. Okamoto S. y Oka T. Evidence for physiological function of epidermal growth factor: pregestational sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81:6059-6063.
83. Wikstrand C.J., Hale L.P., Batra S.K., Hill M.L., Humphrey P.A., et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 1995; 55: 3140-3148.
84. Roskos L., Lohner M., Osborn K., Pasumarthi R., Lu H., et al. Low pharmacokinetic variability facilitates optimal dosing of ABX-EGF in cancer patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2002; 21:91 [Abstract 362].
85. Fracasso P.M., Garrett C., Burris H.A., Arquette M.A., Sullivan D., et al. A study to assess the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of a single infusion of cetuximab (IMC-C225). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2003; 22:197 [Abstract 787],
86. Iznaga-Escobar N., Mishra A.K., Pérez R. Factors Affecting Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies: A Review Article. *Methods and Finding Exp. Clin. Pharmacol.* 2004; 26:123-127.
87. Beatty J.D., Duda R.B., Williams L.E. Sherbani K, Paxton R.J., Beatty B.G., Philben V.J., Werner J.L. Shively J.E. Preoperative imaging of colorectal carcinomawith ¹²⁵I-labeled anticarcioembryonic antigen monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1986; 46:6494-6502.

88. Divgi C.R., McDermott K., Johnson D.K., Schnobrich K.E., Finn R.D., Cohen A.M. Larson S.M. Detection of hepatic metastases from colorectal carcinoma using indium-111 (¹¹¹In) labeled monoclonal antibody (mAb): MSKCC experience with mAb ¹¹¹In-C110. *Int J Rad Appl Instrum [B]* 1991(b); 18:705-710.
89. Epenetos A.A., Carr D., Johnson P.M., Bodmer W.F. Lavender J.P. Antibody-guide radiolocalization of tumor in patient with testicular or ovarian cancer using two radioiodinated antibodies to placental alkaline phosphatase. *Br. J. Radiol.*1986; 59:117-125.
90. Griffiths, G.L.; Goldenberg, D.M.; Diril, H. Hansen, H.J. Technetium-99m, rhenium-186 and rhenium-188 direct labeled antibodies. *Cancer* 1994; 73:761-768.
91. Rhodes, B.A.; Lambert, C.R.; Marek, M.J.; Knapp, F.F. (Russ) Jr. Harvey E.B. Re-188 labeled antibodies. *Appl Radiat* 1st 1996, 47:7-14.
92. Juweid, M.; Sharkey, R.M.; Swayne, L.C.; Griffiths, G.L.; Dunn, R.; Goldenberg, D.M. Pharmacokinetics, dosimetry and toxicity of rhenium-188-labeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody, MN-14, in Gastrointestinal Cancer. *J Nucl Med* 1998, 39:34- 42.
93. Loomans E.E.M.G, Roelen A.J.M., Van Damme H.S., Bloemers P.J., Gribnau T.C.J., Schielen W.J.G. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol Meth.* 1995; 184:207-217.
94. Iznaga-Escobar N., Nunez G., Solozabal J., Morales A. Perdomo, Y. Affinity: a software package for calculation of antibody affinity by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Binary Computing in Microbiology* 1995; 47:144-147.
95. Giovanella B.C., Stehlin J.S. Jr., Williams L.J. Jr., Lee S., Shepard R.C. Heterotransplantation of human cancer into nude mice. *Cancer.* 1978; 42:2269-2281.
96. Povlsen C.O., Rygaard J. Growth of human tumors in the nude mice mouse. In: Bloom B.B., David J.R. (eds). *Vitro methods of cell-mediated and tumor immunity.* Academic. New York, 1976:701-711.
97. Speck R.R., Blank E.W. Couto J.R. Biodistribution of anti-breast micin HuBrE3-derived inverted Fabs (Ifabs) in nude mice carrying MX-1 xenografts. *Hybridoma* 1997; 16:243- 248.
98. Davies Q., Perkins A.C., Frier M., Watson S., Lalani E.N. Symons E.M. (1997) The effect of circulating antigen on the biodistribution of the engineered human antibody hCTMO1 in nude mice model *Eur. J. Nucl. Med.* 1997; 24:206-209.
99. Goldenberg A., Masui H., Divgi C., Kamrath H., Tentlow K., Mendelsohn J. Imaging of human tumor xenografts with Indian-ill-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81:1616-1625.
100. Wen X., Wu Q.P., Ke S., Ellis L., Charnsangavej C., et al. Conjugation with (III)In- DTPA-poly(ethylene glycol) improves imaging of anti-EGF receptor antibody C225. *J. Nucl. Med.* 2001; 42:1530-1537.
101. Hutchins J.T., Kuli F.C. Jr., Bynum J., Knick V., Thurmond L.M. Improved biodistribution, tumor targeting, and reduced immunogenicity in mice with a G4 variant of Campath-1H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:11980-11984.

102. Clarke K, Lee F.T., Brechbiel M.W., Smyth F.E., Old L.J., Scott A.M. *In Vivo* Biodistribution of a Humanized Anti-Lewis Y Monoclonal Antibody (hu3S193) in MCF-7 Xenografted Balb/c Nude Mice. *Cancer Res.* 2000; 60:4804-4811.
103. Hellstrom I., Garrigues H.J., Garrigues U., Hellstrom K.E. Highly tumor-reactive, internalizing, mouse monoclonal antibodies to Lewis Y related cell surface antigens. *Cancer Res.* 1990; 50:2183-2190.
104. Shahhosseini S., Babaei M.H., Najafi R. Tissue distribution of ¹²⁵I-human nonspecific polyclonal IgG in normal and induced inflammation mice. *Iranian J of Pharm. Res.* 2002; 1:55-59.
105. Morales A., Zayas F., Núñez G., Iznaga-Escobar N., Pérez N., Izquierdo, J.C. ^{99m}Tc direct radiolabeling of monoclonal antibody for egf/r3. *Nucl. Med. and Biol.* 1998;25:25- 30.
106. Dadparvar S, Krishna L, Miyamoto C, et al. Indium-111-labeled anti-EGFr-425 scintigraphy in the detection of malignant gliomas. *Cancer* 1994; 73 (suppl):884-889.
107. Haunschild J, Steiner K, Faro HP, and Senekowitsch R. Pharmacokinetics of Reshaped mAb 425 in three Animal Species. *Cell Biophysics* 1995; 26:167-182.
108. Khetarpal VK, Storbeck LS. Biological disposition of intravenously administered ¹³¹I-labeled anti-EGF-Receptor antibody (RG 83852) in rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 35:313-317.
109. Van Hof A, Molthoff C, den Hollander W, Kenemas P, Verheijen R, Vermorken J, et al. Biodistribution and blood kinetics of ¹¹¹Indium labeled CDR-grafted monoclonal antibody hCTMO1 in ovarian cancer patients. 11th Int. Hammersmith Conference, Lesbos 1994, 23-26.
110. Colcher D, Milenic D, Roselli M, Raubitschek A, Yarraton G, King D, et al. Characterization and biodistribution of recombinant and recombinant/chimeric constructs of monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res* 1989; 49:1738-1745.
111. Herceptin: Documento técnico presentado para la solicitud de registro a la FDA. FDA, EUA, 1997.
112. Hammond ND, Moldofsky PJ, Bearsley MR, et al. External imaging techniques for quantitation of distribution of ¹³¹I-labeled F(ab')₂ fragments of monoclonal antibody in humans. *Med Phys* 1984; 11:778-783.
113. Eary JF, Appelbaum FL, Durack L, et al. Preliminary Validation of the opposing view method for quantitative gamma camera imaging. *Med Phys* 1989; 16:382-387.
114. Shockley T.R.; Lin, K; Sung, C.; Nagy, J.A.; Tompkins R.G.; Dedrick, R.L.; Dvorak, H.F.; Yarmush, M.L A Quantitative analysis of tumor specific monoclonal antibody uptake by human melanoma xenografts: Effects of antibody immunological properties and tumor antigen expression levels. *Cancer Res.* 1992; 52:357-366.
115. Fujimori, K; Covell, D.G.; Fletcher, J.E.; and Weinstein, J.N. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂ and Fab in tumors. *Cancer Res.* 1989; 49:5656-5663.
116. Figlin R., Belldegrun A., Lohner M.E., Roskos L., Yang X.D., Schwab G., Weiner L. ABX-EGF: a fully human anti-EGF-R antibody in patients with advanced cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2001; 20:276a (Abstract 1102).

117. Meric JB, Faivre S, Monnerat C, Adi Vago N, Le Chevalier T, Armand JP, Raymond E. "Iressa" Bull Cancer 2000; 87:873-876.
118. Saltz L, Kies M, Abbruzzese J. The presence and intensity of the cetuximab- induced acne-like rash predicts increased survival in studies across multiple malignancies. Proc Am Soc Clin Oncol 22, 2003 (Abs 817).
119. Clark GM, Pérez-Soler R, Siu L. Rash severity is predictive of increased survival with erlotinib HC1. Proc Am Soc Clin Oncol 22, 2003 (Abs 786).

VIII. ANEXOS

8.1 Anexo 1: Publicaciones relacionada

La caracterización farmacológica a través de estudios de farmacocinética y biodistribución del h- R3 en modelos de animales experimentales y en pacientes ha dado lugar a 6 publicaciones y otras 5 relacionadas aparecidas en revistas de alto índice de impacto.

a) Publicaciones.

1. Iznaga-Escobar N. ¹⁸⁸Re-direct labeling of monoclonal antibodies for radioimmunotherapy of solid tumors: Biodistribution, Normal Organ Dosimetry and Toxicology. Nuclear Medicine and Biology 1998;25: 441-447.
2. Iznaga-Escobar N., and Pérez-Rodríguez R. Monoclonal Antibodies for Immunoscintigraphy: a Revision of the Tumor-Associated Antigen Concept. Biotechnology II. Universal Medical Press 1999; 2:131-138.
3. Iznaga-Escobar N. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with rhenium-188 for radioimmunotherapy of solid tumors- a review of radiolabeling characteristics, quality control and in vitro stability studies. Applied Radiation and Isotopes 2001; 54:399-406.
4. Crombet T, Torres L, Neninger E, Catala M, Solano ME, Perera A, Torres O, Iznaga- Escobar N, Torres F, Perez R and Lage A. Pharmacological Evaluation of Humanized Anti-Epidermal Growth Factor Receptor, Monoclonal Antibody h-R3, in Patients With Advanced Epithelial-Derived Cancer. J Immunother. 2003; 26:139-148.
5. Iznaga-Escobar N., Luis Ramírez I., Izquierdo J.C., Suarez L., Morales D., and Perez R. ¹⁸⁸Re-labeled anti-Epidermal Growth Factor Receptor Humanized Monoclonal Antibody h-R3: Labeling Conditions, In vitro and In Vivo Stability. Methods and Finding Exp. Clin. Pharmacol. 2003; 25:703-711.
6. Crombet-Ramos T., Casaco-Parada A., and Iznaga-Escobar N. h-R3 Treatment of head and neck cancer, treatment of epithelial tumors of anti-EGF-R monoclonal antibody. Drugs of the Future 2003; 28:847-853.

b) Otras publicaciones relacionadas con la tesis.

1. Morales A., Ducongé J., Caballero I., Núñez G., Fernández E., Iznaga-Escobar N. Biodistribution of ^{99m}Tc-labeled anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-

- R) Humanized Monoclonal Antibody h-R3 in a Xenograft Model of Human Lung Adenocarcinoma. *Nuclear Medicine and Biology* 1999; 26:275-279.
2. Morales A, Ducongé J, Alvarez Ruiz D, Becquer-Viart MA, Núñez Gandolff G., Fernández E, Caballero-Torres I, Iznaga-Escobar N. Humanized versus Murine Antihuman Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for Immunoscintigraphic Studies. *Nucl Med Biol* 2000; 27:199-206.
 3. González B., Casacó A., Alvarez P., León ME., Arteaga M., León A., Santana E., Bada A., Figueredo R., Hernández R., Iznaga-Escobar N., González F., and Pérez R. Radiotoxicity of h-R3 monoclonal antibody labeled with ^{188}Re administered intracerebrally in rats. *Human and Experimental Toxicology* 2001;19:684-692.
 4. Vallis KA, Reilly RM, Chen P, Oza A, Hendler A, Cameron R, Hershkop M, Iznaga-Escobar N, Ramos-Suzarte M, Keane P. A phase I study of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -h-R3 (DiaCIM), a humanized immunoconjugate directed towards the epidermal growth factor receptor. *Nucl Med Commun.* 2002; 23:1155-64.
 5. Mishra A, Iznaga-Escobar N, Figueredo R, Jain VK, Dwarakanath BS, Perez-Rodriguez R, Sharma RK and Mathew TL. Preparation and comparative evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled 2-iminothiolane modified antibodies and CITC-DTPA immunoconjugates of anti-EGF-receptor antibodies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002; 24:653-660.

c) Eventos.

Además los trabajos de caracterización farmacológica en modelos de animales experimentales y el modelo matemático se han presentado en los siguientes eventos:

- 7th World Congress on Nuclear Medicine and Biology. Berlin, Germany August 30- September 4, 1998.
- a) Conferencia: Radioimmunotherapy of ^{188}Re -Labeled Anti-Human EGF-R Antibody ior egf/r3 in H-125 Human Lung Adenocarcinoma Xenografted Nude Mice. Iznaga-Escobar N, Luis I., Amador JF., López A, Izquierdo JC., Pérez R. *European Journal of Nuclear Medicine* (Abstract OS-214) 25/8, p. 890.
 - b) Sesión de cartel: ^{188}Re -Labeled Anti-Human EGF-R Antibodies Murine ior egf/r3 and Humanized h-R3: Biodistribution and Pharmacokinetics in Monkeys. Iznaga-Escobar N., González J., Crombet T., Herrera T., Martínez J.R., López A., Morales D., and Pérez R. *European Journal of Nuclear Medicine* (Abstract PS- 602) 25/8, p. 1134.
 - c) Sesión de cartel: ^{188}Re -Direct Labeling of Anti-Human EGF-R Antibodies Murine ior egf/r3 and Humanized h-R3. Iznaga-Escobar N., Luis I., Izquierdo JC., Suárez L., Figueredo R., Morales D., Gómez JA, and Pérez R. *European Journal of Nuclear Medicine* (Abstract PS- 735) 25/8, p. 1167.

10th World Congress on Immunology. New Delhi, India November 1-6, 1998.

11th International Symposium on Radiopharmacology. St Louis, Missouri, USA June 24- 27, 1999

- a) **Conferencia:** Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Human Cancer Cell Lines using 2-Deoxy-D-Glucose and the humanized Monoclonal Antibody h-R3. **Iznaga-Escobar N**, Jain V, Figueredo R, Pérez. Proceeding of 11th International Symposium on Radiopharmacology (Abstract), p.16.

XXVII Annual Meeting of the Spanish Association of Nuclear Medicine. May 24-27, 2000. **Puerto La Cruz, Tenerife, Spain.**

XVI European Association of Cancer Research Meeting. **May 30 - June 3, 2000, Thesaloniki, Halkidiki, Greece.**

- a) **Sesión de cartel:** Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Human Cancer Cell Lines using 2-Deoxy-D-Glucose and the humanized Monoclonal Antibody h-R3. **Iznaga-Escobar N**, Jain V, Figueredo R, Pérez.
- b) **Sesión de cartel:** ¹⁸⁸Re-Labeled Anti-Human EGF-R Antibodies Murine for egf/r3 and Humanized h-R3: Biodistribution and Pharmacokinetics in Monkeys. **Iznaga-Escobar N**, González J., Crombet T., Herrera T., Martínez J.R., López A., Morales D., and Pérez R.

VII World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics. 4th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. **July 15-20, 2000. Florence, Italy.**

- a) **Sesión de cartel:** ¹⁸⁸Re-Labeled Anti-Human EGF-R Antibodies Murine for egf/r3 and Humanized h-R3: Biodistribution and Pharmacokinetics in Monkeys. **Iznaga-Escobar N**, González J., Crombet T., Herrera T., Martínez J.R., López A., Morales D., and Pérez R. British Journal of Clinical Pharmacology. CPT 2000 (Abstract No. 881), p. 226.
- b) **Sesión de cartel:** Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Human Cancer Cell Lines using 2-Deoxy-D-Glucose and the humanized Monoclonal Antibody h-R3. **Iznaga-Escobar N**, Jain V, Figueredo R, Pérez. British Journal of Clinical Pharmacology. CPT 2000 (Abstract No. 961), p. 247.

d) Premios.

En el año 2000, en Halkidiki, Grecia en el XVI Congreso de la Asociación Europea de Investigaciones del Cáncer (EACR) en la sesión de cartel la ponencia titulada: Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Human Cancer Cell Lines using 2-Deoxy-D- Glucose and the humanized Monoclonal Antibody h-R3. **Iznaga-Escobar N**, Jain V, Figueredo R, Pérez obtuvo el premio de Merck Sharp and Dohme que otorga esta organización.

En el año 1998, en Berlín, Alemania en el VII Congreso Mundial en Medicina Nuclear y Biología en la sesión de cartel la ponencia titulada ¹⁸⁸Re-Labeled Anti-Human EGF-R Antibodies Murine for egf/r3 and Humanized h-R3: Biodistribution and Pharmacokinetics in Monkeys. De los autores **Iznaga-Escobar N**, González J., Crombet T., Herrera T., Martínez J.R., López A., Morales D., and Pérez R. European Journal of Nuclear Medicine (Abstract PS-602) 25/8, p. 1134 obtuvo el premio al Mejor investigador Joven.

En la XIV Edición del Forum de Ciencia y Técnica, la ponencia denominada Anticuerpo Monoclonal h-R3: "Un nuevo medicamento para el tratamiento del cáncer avanzado" de los autores Pérez R, Mateo C, Crombet T, Iznaga-Escobar N. y colaboradores obtuvo premio relevante de la comisión de Biotecnología y Farmacia.

e) Avales de la novedad científica.

La novedad científica del h-R3 a escala mundial se encuentra además avalada por las patentes concedidas en 17 países, incluyendo EUA, Canadá, China y la Oficina Europea de Patentes. La patente de obtención del AcM h-R3, denominada "Obtención de un anticuerpo quimérico y humanizado contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico para uso diagnóstico y terapéutico" de los autores Mateo C, Moreno E y Pérez R, recibió en el año 2002 la medalla de oro que confiere la Organización Mundial de la Propiedad Industrial. Esta ponencia recibió además el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 1998.

