

DISPOSICIÓN FARMACOCINÉTICA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL QUIMÉRICO P3 EN CONEJOS: CINÉTICA NO LINEAL

Geomar Acuña¹, Eduardo Fernández-Sánchez², Juan C. Polo³, Leyanis Rodríguez¹, María de los A. Becquer², Niurys de Castro¹.

¹ Departamento de Farmacología y Toxicología, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.

² Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.

³ Departamento de Química Básica, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.

A quién dirigir correspondencia:

Dr.C. Eduardo Fernández-Sánchez. Jefe del Laboratorio de Farmacocinética, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. email: efernandez@ifal.uh.cu

Resumen

El anticuerpo monoclonal quimérico P3, constituye objeto de investigación con el fin de definir su potencialidad terapéutica. Se realiza un estudio de caracterización farmacocinética a tres niveles de dosis: 2, 5 y 10 mg/Kg, administrándose mediante bolus i.v. en conejos Nueva Zelanda. Se reportan sus parámetros mediante el Análisis No Compartmental, correspondiendo a la regularidad farmacocinética esperada. Las variaciones respecto a las dosis administradas del área en cerrada bajo la curva, del aclaramiento y del volumen de distribución, sugieren un comportamiento de cinética dosis dependiente, comprobando ello mediante el enfoque estadístico combinado del ajuste de regresión lineal y el Análisis de Varianza (ANOVA). Se concluye que a partir de la dosis de 5 mg/Kg ocurre un punto de inflexión en la variación de los parámetros, indicando el cambio de linealidad de la farmacocinética del AcM quimérico P3.

Palabras Clave: Disposición farmacocinética, anticuerpo monoclonal quimérico P3 cinética no lineal, N-glicolylneur amino ácido, antidiotipo, N-glicolil asociado a gangliósidos

PHARMACOKINETIC DISPOSITION OF THE CHIMERIC MONOCLONAL ANTIBODY P3 IN RABBITS: NON LINEAR KINETICS

Abstract

Chimeric monoclonal antibody P3, focus an actual research about the definition of his therapeutical potentiality and clinical applications. A pharmacokinetic study in three different doses, was developed at 2, 5 and 10 mg/Kg, bolus i.v. administration, in rabbits. The parameters were characterized using a Non Compartmental Analysis. The variation of the area under the curve, clearance and volume of distribution, corresponding to different doses, points to non linear kinetics, and to probe this the

pharmacokinetics parameters were calculated, essentially using a combination of different statistical procedures: linear regression analysis and Analysis of Variance (ANOVA), it allows to conclude that at the dose of 5 mg/Kg it happens an inflexion point that shows the non linear kinetics of the MoAb.

Key words: pharmacokinetics disposition, chimeric monoclonal antibody P3. non linear kinetics, N-glycolylneuraminic acid, antiidiotypic, NeuGc-containing gangliosides. N-glycolyl-containing-gangliosides.

Introducción

El anticuerpo monoclonal murino P3 fue generado por inmunización de ratones BALB/c con NeuGcGM3 incluido en liposomas. Una inmuno histoquímica preliminar demostró que el AcM P3 fue capaz de reconocer el antígeno expresado en los tumores de mama humanos¹.

El anticuerpo monoclonal murino P3 se enlaza a varios NeuGc-contenidos en gangliósidos. También reacciona con los antígenos expresados en tumores de pecho humanos. La especificidad de enlace del P3 ha sido caracterizada en más detalle usando un panel de glicolípidos que incluyeron varios gangliósidos desialilados y varios derivados químicos de Neu-Gc-GM3. El grupo carboxilo y la función nitrogenada del ácido siálico demostraron desempeñar un rol importante en el enlace del anticuerpo. Análisis conformacional del GM3 reveló que, a pesar de la gran flexibilidad del enlace NeuGc α 8NeuGc, el epítipo enlazante del P3 sobre el ácido siálico externo presenta el epítipo en una forma apropiada para varias de sus conformaciones².

Los estudios sobre el AcM P3, indujeron a explorar la naturaleza del idiotipo definido por 1E10, para lo cual se utilizó una librería de péptidos que dispersamente despliegan los fagos. Particularmente, los datos presentados han revelado que la inmunodominancia del H-CDR3 de este anticuerpo 1E10 como un epítipo de celular T. Así, el H-CDR3 está simultáneamente involucrado en la interacción del AcM P3 con el anti-idiotipo B y las células T, comportándose como un idiotipo regulatorio³.

En modelos singénicos, el AcM murino P3 ha sido capaz de elucidar una fuerte respuesta de anticuerpo anti-idiotípico (Ab2), aún en la ausencia de adyuvantes o proteínas transportadoras. El anticuerpo 1E10 es un anticuerpo anti-idiotípico específico para el anticuerpo P3 que ha demostrado efecto antitumoral en animales singénicos y alogénicos. Se ha reportado la construcción molecular de los anticuerpos quiméricos tipo IgG1, P3 y 1E10, y la evaluación y mantenimiento de las principales propiedades de los anticuerpos murinos⁴. La respuesta anti-idiotípica inducida por ambos anticuerpos fue fuerte y en mucho de los ratones fue aun mas altamente significativa que la respuesta anti-isotípica, a pesar del hecho de que el 70% de la molécula es xenogénica con respecto al modelo animal^{5, 6, 7}.

Los estudios farmacocinéticos de moléculas biotecnológicas, en el último quinquenio, ya reportan una práctica común referida a anticuerpos y citokinas con diversos enfoques preclínicos y clínicos. En particular los anticuerpos asociados a gangliósidos, han sido poco estudiados en este sentido existiendo solamente el reporte de I. Bergman et al, en 1995, lo cual constituye una rareza en este campo disciplinario ⁸.

Desde sus inicios, la Farmacocinética observó el fenómeno de la no linealidad del comportamiento corporal de los fármacos de origen sintético debido fundamentalmente a los procesos de eliminación y de distribución ^{9, 10, 11}. Con la aparición de las moléculas biotecnológicas, similares a los endógenos, ello ha manifestado en su generalidad que las mismas presentan comportamiento no lineal ¹², lo cual debe ser atendido para garantizar el uso racional del medicamento en la clínica ^{13, 14}. En particular los anticuerpos monoclonales experimentan esta característica debido a los mecanismos de eliminación involucrados, como causa fundamental incorporándose a ellos los mecanismos de depuración mediada por los antígenos específicos y no específicos ¹⁵.

Dado que las investigaciones asociadas al anticuerpo quimérico P3, sus anti-idiotipos y quiméricos derivados, son centro de atención del Centro de Inmunología Molecular de Cuba, para así definir las correspondientes estrategias inmunoterapéuticas futuras, el presente trabajo se orienta hacia la caracterización farmacocinética del AcM quimérico P3 a diferentes niveles de dosis y establecer su cinética dosis dependiente asociada a un comportamiento semejante al reportado por Michaelis-Menten en la cinética enzimática, por la relevancia que ocupa en el decursar de novedosos tratamientos clínicos.

Materiales y Métodos

Producto ensayado:

El anticuerpo monoclonal quimérico (AcM quimérico) P3 fue obtenido en los laboratorios del Centro de Inmunología Molecular (CIM) de Ciudad de La Habana a través de técnicas de ingeniería de anticuerpos a partir del AcM P3 murino y mantuvo sus principales propiedades de reconocimiento, reaccionando específicamente con NeuGcGM3 y NeuGcGM2, pero no con sus variantes acetiladas.

El producto ensayado fue formulado como solución inyectable a una concentración de 10 mg/mL en solución salina tamponada (PBS), teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Producción establecidas en los Procedimientos Normalizados de trabajo de dicha institución.

Animales de experimentación:

Se utilizaron 15 conejos Nueva-Zelanda (NZ) machos, de 6 a 8 semanas de nacidos, cuyos pesos estuvieron en el rango de 1.9 a 2.1 kg. Estos animales fueron suministrados por el Centro Nacional Para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), y fueron alojados en el bioterio del

Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB) del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), en correspondencia con los Procesos Normalizados de Operación (PNO) establecidos, con un período de adaptación de 7 días. Durante el tiempo que duró el experimento se garantizaron las condiciones de temperatura (20-22°C), humedad (50%), foto-período (12x12), alimentación de pienso conejina (150g/día) y consumo de agua *ad libitum*, requeridas en estos casos para lograr el bienestar de los animales. Los animales fueron divididos en tres grupos de 5, los que fueron identificados con su correspondiente tarjeta de datos que incluyó; fecha de inicio, fecha de muestreos, observaciones, etc.

Ensayo farmacocinético:

Se caracterizaron tres niveles de dosis del AcM quimérico P3; 2 mg/Kg, 5 mg/Kg y 10 mg/Kg, todas administradas por bolus intravenoso. Cada nivel de dosis se estudió en un grupo de 5 conejos, escogidos aleatoriamente. En todos los casos se administró el bolo intravenoso correspondiente, en la vena marginal de la oreja. Posterior a la administración, se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos siguientes: 5, 15, 30 y 45 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 horas. Todas las muestras se extrajeron de la vena marginal de la oreja, asegurándose de que se extrajeran de la oreja que no se utilizó para la administración.

Todos los animales se sometieron a un régimen de ayuno desde la noche anterior al experimento hasta dos horas después de la administración del fármaco. Se les permitió la toma de agua *ad libitum* antes y durante todo el tiempo que duró el estudio. Todos los animales fueron manipulados bajo la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales, de acuerdo a las instrucciones del Internacional Animal Care Comité (ARCA No. 0112/2000) y en correspondencia con las European Guidelines for Animal Experimentation.. Todos los procesos invasivos se condujeron bajo ligera anestesia de fenobarbital sódico (40 mg/Kg)..

La sangre obtenida en cada muestreo fue transferida a tubos colectores, donde se mantuvo durante 1 hora aproximadamente a 37°C hasta que ocurriera la retracción espontánea del coágulo. Posteriormente se obtuvo el suero mediante desgarramiento del coágulo formado con un tubo capilar y centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero así obtenido, se refrigeró a -20°C hasta su posterior cuantificación.

Cuantificación de la concentración sérica de AcM quimérico P3:

La cuantificación de los niveles séricos del AcM quimérico P3 se realizó mediante el empleo de una técnica ELISA de tipo Sandwich, desarrollada y validada en el CIM. Esta técnica tiene una sensibilidad de 2 ng/mL y una exactitud del 10 %. Para su desarrollo se recubrieron placas de poli estireno de 96 pocillos (MaxiSorp, NUNC) con 50 µL/pozo de anti-IgG humana obtenida en carnero

(SIGMA I-3382) a una concentración de 3 µg/mL de tampón carbonato-bicarbonato. Posteriormente se incubaron durante 12 horas en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se lavó cada placa 3 veces con agitación usando solución de lavado (tween 20 en PBS 1x, al 0,05 %).

Se desarrolló una Curva de Calibración partiendo de una concentración de IgG humana (SIGMA I-2511) de 250 ng/mL y realizando diluciones sucesivas 1:2 sobre solución de ensayo (solución de BSA en PBS 1x al 0,1 %) para obtener las concentraciones: 125, 62.5, 31.25, 15.6 y 0 ng/mL.

Las diluciones de las muestras se realizaron utilizando solución de ensayo. Las diluciones de las muestras correspondientes a los tiempos de muestreo comprendidos entre 5 minutos y 8 horas fueron de 1/400 y 1/800, las diluciones de las muestras restantes fueron de 1/100 y 1/200.

Se aplicó la curva de calibración en los pocillos correspondientes y las diluciones por duplicado, ubicando todas las muestras de un conejo en una sola placa. Luego se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C, y posteriormente se lavaron 3 veces con solución de lavado. Se aplicó el conjugado anti-IgG humana fosfatasa alcalina a una dilución de 1/10000 en solución de ensayo y se incubó durante una hora a 37°C, en cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación, se lavó 3 veces con solución de lavado y se aplicó el sustrato, pNPP disuelto en tampón dietanolamina al 0,1 %. Se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y luego se detuvo la reacción enzimática con NaOH 3 M. Finalmente se leyeron las placas en un lector de placas de ELISA a 405 nm.

Procesamiento y análisis de los datos:

El análisis farmacocinético para caracterizar el patrón de disposición sistémica del anticuerpo se realizó mediante la utilización del enfoque alternativo de análisis no compartimental de cálculo de los parámetros. El procesamiento farmacocinético se realizó mediante la utilización del software WinNonlin profesional ver. 2.1, 1997, Pharsight Co., determinándose el perfil farmacocinético concentración vs tiempo para cada animal, así como los parámetros farmacocinéticos correspondientes.

Todos los parámetros farmacocinéticos fueron calculados según lo establecido en la literatura^{16, 17} determinando los parámetros: AUC, CL, V_{SS} , $t_{1/2}$.

Las variables parámetros farmacocinéticos fueron promediadas y se reporta su desviación estándar en cada caso, utilizando el software estadístico STATISTICA Vers. 6.1.

Cinética No-lineal:

Para determinar la no linealidad de los parámetros a diferentes niveles de dosis, se realizó el análisis de regresión lineal y ANOVA, para comprobar si la variación de los parámetros farmacocinéticos en función de la dosis es o no lineal. Se trabajó con la transformación logarítmica de la variable

farmacocinética (parámetro farmacocinético) para verificar si los valores cuantificados varían respecto a la dosis de acuerdo a una cinética de orden 1, según la expresión: $\ln \text{parámetro} = m \cdot \text{Dosis} + \ln C$. El software utilizado fue SPSS para Windows, versión 11.5.1

La dependencia PK vs. Dosis fue representada gráficamente para verificar entre cuales dosis se produce algún un cambio de los parámetros esenciales, que defina un comportamiento No lineal o Dosis dependiente. Las representaciones gráficas fueron generadas mediante EXCEL Microsoft Office XP, 2003.

Resultados

A partir de los datos primarios, en la figura 1 se ofrece el gráfico de los valores promedios de concentración versus tiempo para cada nivel de dosis ensayado, donde se denota la característica del perfil farmacocinético del AcM quimérico P3, el cual expone la regularidad farmacocinética establecida para la vía de administración empleada.

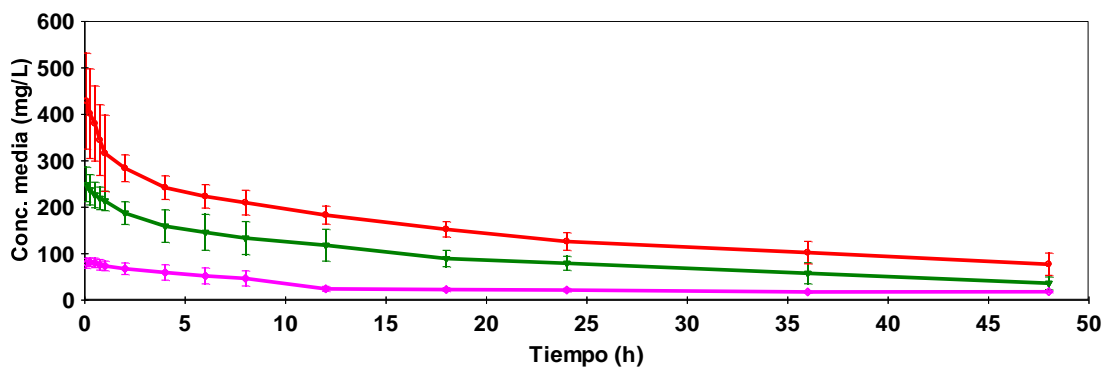


Figura 1. Perfiles farmacocinéticos de los datos primarios, tras la administración de una dosis única bolus intravenoso de 2 mg/kg ($\text{---}\diamond\text{---}$), 5 mg/kg ($\text{---}\diamond\text{---}$), o 10 mg/kg ($\text{---}\diamond\text{---}$) del AcM quimérico P3 a conejos Nueva Zelanda. Cada punto representa el valor medio (\pm DE) de 5 determinaciones.

En la tabla 1 se representan los valores de los parámetros obtenidos para cada dosis utilizada, expresándose los valores y sus desviaciones estándar, las cuales son semejantes a las obtenidas en cualquier estudio farmacocinético de este tipo.

Tabla 1. Valores de los parámetros pertinentes al análisis de la No Linealidad farmacocinética, del AcM P3, administrado por bolus i.v., a conejos Nueva Zelanda.

Parámetro	Dosis 2 mg/Kg	Dosis 5 mg/Kg	Dosis 10 mg/Kg
AUC, mcg·h/mL	5357.72	6102.74	10844.77
CL, mL/h	0.69	1.51	1.53
V _{SS} , mL	126.73	49.13	55.27
T _{1/2} , h	139.40	22.54	25.03

Leyenda: C_{máx}, concentración máxima; t_{1/2}, tiempo de vida media de eliminación; AUC_{0-∞}, área bajo la curva concentración sérica vs t extrapolada hasta el infinito; V_{SS}, volumen aparente de distribución en estado de equilibrio estacionario; CL, aclaramiento..

Los valores de los parámetros numéricamente ofrecen diferencias en concordancia a los incrementos de las dosis empleadas, lo cual de por si no posibilita el identificar si existe proporcionalidad o no.

El CL y V_{SS} parámetros de base fisiológica, se asocian a procesos de eliminación y de enlazamiento de las moléculas. El AUC, aunque un parámetro derivado de la dosis administrada y la correspondencia de los parámetros antes señalados, no obstante se utiliza pues posee un carácter relevante para definir la posible No Linealidad.

En dicha tabla se puede observar un aumentos notable del AUC para la tercera dosis ensayada, 10 mg/Kg, lo cual resta por identificar si es proporcional o no. En cuanto al CL, es evidente que prácticamente se duplica en la segunda dosis ensayada, 5 mg /Kg, y posteriormente alcanza un valor semejante lo cual presupone que existe una saturación del sistema de depuración sistémica. De forma inversa como es de esperar, el V_{SS} igualmente en la segunda dosis, alcanza una notable disminución que prácticamente se mantiene para la tercera. O sea que presenta una correspondencia inversa entre V_{SS} y CL, lo cual debe ser responsable integralmente del comportamiento manifiesto del AUC.

En las figuras 2a, 2b y 2c, se representan los gráficos de la variación entre los parámetros señalados y los niveles de dosis administrados en cada caso, donde se observa más objetivamente el comportamiento referido en la tabla 1. En la tabla 2, se representan los parámetros estadísticos obtenidos mediante los análisis correspondientes, donde se observan los cambios de linealidad.

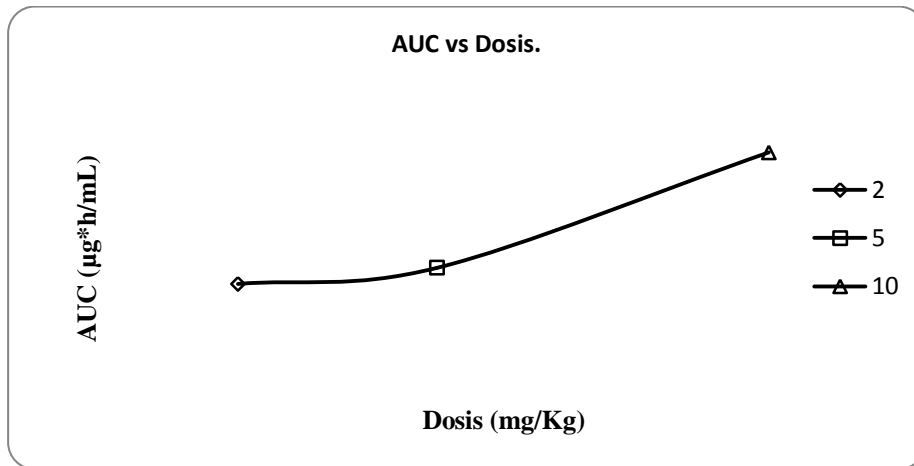


Figura 2a. Representación gráfica de la relación AUC vs Dosis. Administración intravenosa. Dosis 2 mg/kg, 5 mg/Kg, y 10 mg/Kg. Análisis no compartimental.

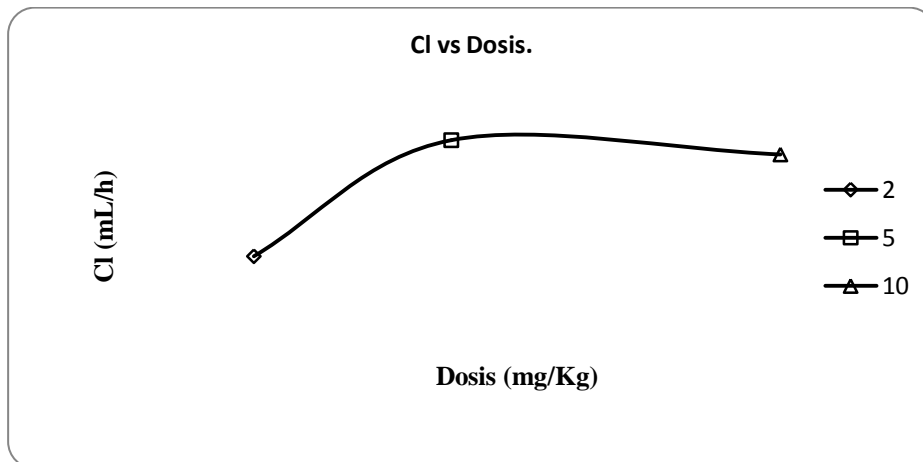


Figura 2b. Representación gráfica de la relación Cl vs Dosis. Administración intravenosa. Dosis 2 mg/kg, 5 mg/Kg, y 10 mg/Kg. Análisis no compartimental.

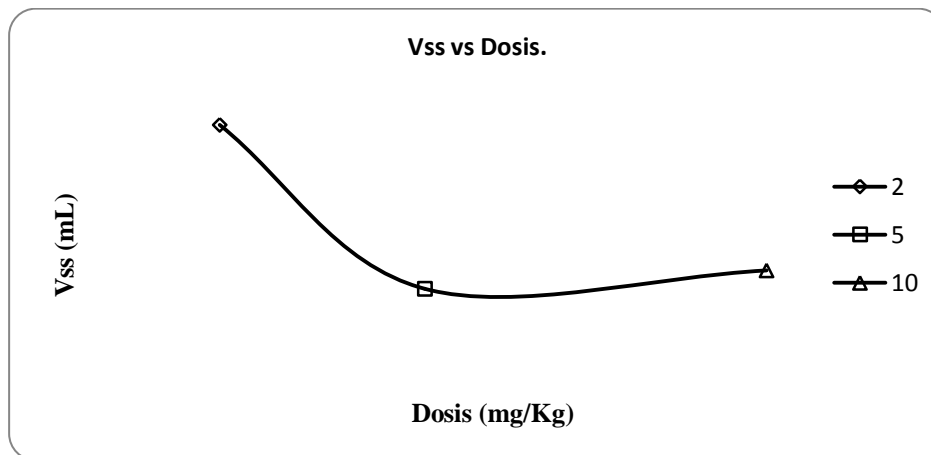


Figura 2c. Representación gráfica de la relación Vss vs Dosis. Administración intravenosa. Dosis 2 mg/kg, 5 mg/Kg, y 10 mg/Kg. Análisis no compartimental.

Tabla 2. Resumen del análisis de regresión lineal y ANOVA aplicado a las relaciones AUC vs Dosis, Cl vs Dosis y Vss vs Dosis, según el modelo lineal . Nivel de significación: $p < 0.05$

Parámetro	R	R ²	Error Estándar	ANOVA	Ajuste al modelo lineal
AUC	0.976	0.953	0.12459	No Significativo	No se ajusta
CL	0.751	0.564	0.40995	No Significativo	No se ajusta
Vss	0.676	0.457	0.52796	No Significativo	No se ajusta

Discusión

Aunque no se exponen los perfiles farmacocinéticos individuales para cada conejo, de la figura 1 y de la tablas se observa que el experimento posibilitó la cabal caracterización farmacocinética, derivándose parámetros correspondientes mediante la aplicación del Análisis No Compartimental, lo cual redundaba en explicar y predecir el comportamiento de la molécula de acuerdo a intereses posteriores, ya bien preclínicos o clínicos.

Como se observa a partir de las tablas de parámetros farmacocinéticos para cada dosis, existen dispersiones pertinentes, pero comunes a todo tipo de trabajo farmacocinético en animales vivos e íntegros, más aún cuando se emplea técnica de cuantificación ELISA, factible por su rapidez y presumible sencillez, y con cierta precisión, la cual ha sido usada en trabajos de Farmacocinética Clínica con otros anticuerpos^{18, 19}. No obstante esta técnica no posee los valores de sensibilidad que alcanzan las técnicas con marcadores isotópicos para la cuantificación de los bajos valores de concentraciones sistémicas, así como la total robustez de los métodos de Análisis por Radio Receptor en cuanto a precisión, especificidad y sensibilidad²⁰.

La variación del $t_{1/2}$, un parámetro derivado, es correspondiente a su relación con los parámetros de base fisiológica CL y V_{SS} , los cuales mecanísticamente si son directamente influenciados por los mecanismos de saturación tanto de biotransformación como de enlazamiento que se manifiestan diferentemente a cada nivel de dosis.

En s las dosis ensayadas, los valores de tiempo de vida media de eliminación disminuyen con el incremento de la dosis, pero siempre por encima de las 24 horas, lo que define un buen candidato

para las aplicaciones terapéuticas, en relación a la aparición de la respuesta farmacológica, fenómeno similar a otras moléculas quiméricas. No obstante es bueno recordar que la mayoría de las moléculas biotecnológicas, presentan un patrón transiente entre la respuesta farmacocinética manifiesta y la respuesta farmacológica, siendo esta última mas extendida, en relación a que se establecen mecanismos de efecto indirecto ^{21, 22, 23}. Esta potencialidad debe ser analizada para futuras aplicaciones terapéuticas mediante administraciones de dosis repetidas a modo de régimen de dosificación.

De acuerdo al análisis de regresión lineal, en los tres casos, los valores de los coeficientes de correlación y determinación R y R² son bajos. Estos coeficientes constituyen una medida del grado de ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión. El error estándar de la estimación, que es una medida del grado de dispersión de los puntos experimentales alrededor de la recta de regresión, es elevado. Finalmente el análisis de varianza (ANOVA) no resulta significativo en ninguno de los casos (significación > 0,05) lo que demuestra que el modelo lineal $\ln PK = m \cdot \text{Dosis} + \ln C$, no explica el comportamiento de los datos. La correspondencia de los tres resultados permite concluir que en ninguno de los casos el sistema es lineal (aunque la dependencia $\ln AUC - \text{Dosis}$, se aleja menos de este comportamiento).

Al analizar la dependencia gráfica Parámetro – Dosis, en los tres casos se observa, que alrededor del punto correspondiente al segundo nivel de dosis estudiado (5 mg/kg) se produce un punto de inflexión, lo cual significa que entre la 2da y la 3ra dosis se origina según lo esperado un cambio de los parámetros esenciales del modelo, lo que define un comportamiento No lineal o Dosis dependiente. Como podría suponerse de antemano, de acuerdo a los resultados del análisis de regresión lineal, este cambio es menos brusco y evidente para la dependencia $AUC - \text{Dosis}$.

Todo parece indicar que la responsabilidad mecanística de la no linealidad del AcM quimérico P3, es atribuible esencialmente a la capacidad limitada de los procesos de eliminación, ya que el aclaramiento, CL, alcanza como se observa en la tabla 2 y la figura 2a, un estado estacionario de sus valores manifiestos. De forma inversa pero igualmente manifiesta, los valores de V_{SS} presentan idéntico comportamiento, lo cual parece indicar que las variaciones de la distribución farmacocinética, están asociada a los sitios blancos que participan en los procesos de biotransformación.

Este anticuerpo, el quimérico P3, de tipo IgG, dado que se experimentó en animales sanos, presentará un mecanismo fundamental de aclaramiento a través de las células del sistema retículo endotelial el cual a su vez es regulado a través de la interacción con varios receptores Fc, expresados

en las células fagocíticas del sistema retículo endotelial, protegiendo así a la IgG de un rápido aclaramiento. Posiblemente la saturación de este mecanismo regulatorio, permite que el valor del aclaramiento se mantenga estacionario ²⁴.

Otra vía no descartada en el caso del P3 está dada por la transformación idiotípica al AcM 1E10 ⁴, ya que el aclaramiento de los anticuerpos pudiera ser impactada por los factores relacionados a los isotipos del anticuerpo, cuestión esta que en la presente investigación no puede ser aseverada por la no medición simultánea del AcM 1E10, por lo que sería de interés en futuras investigaciones medir ambos anticuerpos a la vez.

Literatura citada

- ¹ Vázquez AM, Alfonso M, Lanne B, Karlsson KA, Carr A, Barroso O., Fernández IE, Reginfo E, Llanio ME, Álvarez Zeuthen I, Pérez R. Generation of a Murine Monoclonal Antibody specific for N-Glycolylneuramínico acid-containing Gangliosides that also recognizes Sulphated Glycolipids. *Hybridoma* 1995;14(6):551-556.
- ² Moreno E, Lanne B, Vazquez AM, Kawashima I, Tai T, Fernández LE, Karlsson K-A, Angströ J, Pérez R. Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuroaminic acid-containing gangliósidos. *Glycobiology* 1998;8(7):695-705.
- ³ Pérez A, Mier ES, Santiago N, Vazquez AM, Pérez R. A monoclonal antibody against NeuGc-containing gangliosides contains a regualtory idiootype involved in the interaction with B and T cells. *Molecular Immunology* 2002;39:103-112.
- ⁴ López-Requena A, Mateo de Acosta C, Pérez A, Valle A, Lonbardo Sosa JK, Pérez R, Vazquez AM. Chimeric Anti-N-Glycolyl-Gangliosid and its Anti-Idiotypic MAbs: Immunodominance of their Variable Region. *Hybridoma and Hybridomics* 2003;(4):235-243.
- ⁵ López-Requena A, Mateo de Acosta C, Moreno E, González M, Puchades Y, Santiago N, Vázquez AM, Pérez R. Gangliosides, Ab 1 y Ab2 antibodies I. Towards a molecular dissection of an idiootype-anti-idiootype system. *Molecular Immunology* 2007;44:423-433.
- ⁶ López-Requena A, Rodríguez M, Mateo de Acosta C, Moreno E, Puchades Y, González M, Talavera A, Valle A, Hernández T, Vázquez AM, Pérez R. Gangliosides, Ab1 y Ab2 antibodies II. Light versus heavy Chain: An idiootype-anti-idiootype case study. *Molecular Immunology* 2007;44:1015-1028.
- ⁷ López-Requena A, Bestagno AM, Mateo de Acosta C, Cesco-Gaspere M, Vázquez AM, Pérez R, Burrote OR. Gangliosides, Ab1 y Ab2 antibodies III. The idiootype of anti-ganglioside MAb P3 is immunogenic in a T-cell-dependent manner. *Molecular Immunology* 2007;44:2915-2922.

-
- ⁸ Bergman i, Burckart CJ, Pohl CR, Venkataramanan R, Barmada MA, Griffith JA, Cheung NV. Pharmacokinetics of IgG and anti IgM Anti-ganglioside antibodies in Rats and Monkeys after intrathecal Administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995;284 (2):111-115.
- ⁹ Levy, G. y Nelson, E. "Theoretical relationship between drug, elimination rate and duration of pharmacology effect of drugs". *J. Pharm. Sci*1965;54:512-522.
- ¹⁰ Jusko W. J., Pharmacokinetics of capacity-limited systems, *J. Clin. Pharmacol* 1989;(29):488-493.
- ¹¹ Ludden T. M., Nonlinear pharmacokinetics; clinical implications, *Clin. Pharmacokinet* 1991;(20):429-446.
- ¹² Azuma, J., Kurimoto, T., Tsuji, S., Mochizuki, N., Fujinaga, S., Matsumoto, Y. y Masuho, Y. "Phase I studies on human MoAb against cytomegalovirus: PK and immunogenicity". *J. of Immunother* 1991;(10):278-285.
- ¹³ Moulder SL, Arteaga CL. A Phase I/II Trial of trastuzumab and gefitinib in patients with Metastatic Breast Cancer that overexpresses HER2/neu (ErbB-2). *Clin Breast Cancer* 2003;4(2):142-5.
- ¹⁴ Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N. 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.
- ¹⁵ M.A. Tabrizi, Chih-Ming L- Tseng y L. K. Roskos. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discovery Today* 2005;11(½):81-88.
- ¹⁶ Gibaldi M, Perrier D. Noncomparmental Analysis based on Statistical Momentm Unforma Healthcare. En: *Pharmacokinetics*, 2nd edition, New York, 2007:409-418.
- ¹⁷ Kwon Y. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metaabolism for Industrial Scientists. En: *Pharmacokinetic Study Design and Data Interpretation.*, Kluwe Academic Publishers, New York, 2002:18-27.
- ¹⁸ Rodríguez-Vera L, Ramos-Suzarte M, Soriano JL, Batista N, Lima N, Rodríguez R, Gonzalez J, Garcia R, Suárez N, Viada CE, Crombet-Ramos T and Fernández-Sánchez E. Pharmacokinetics evaluation of humanized monoclonal antibody anti-epidermal growth factor reeceptor nimotuzumab in combination with doxorubicin and ciclophosphamide in patients wirh advanced breast cancer..*Journal of Life Sciences* 2013;7(11):1123-1133.
- ¹⁹ Strumberg D, Schultheis B., Scheulen M.E., Hilger R.A., Krauss J., Marschener N., Lordick F., Bach F., Reuter D., Edler L. Aand Mross K. "Safety, efficacy and pharmacokinetics of nimotuzmab, a humanizad monoclonal anti-epidermal growrh factor receptor (EGFR) anitboy in patients with locally

advanced or metastatic pancreatic cancer “International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 2010;48:473;485.

²⁰ Fernández-Sánchez E, Ducongé, Castillo R, García I, Beausoleil I, Macías A. “Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (ior EGF/r3 antibody pharmacokinetic studies on nude mice. I: a radio-receptor analysis applied to drug serum quantification Journal of Pharmacy and Pharmacology 2002;54:59-64.

²¹ Holford, N.H.G. y Sheiner, L.B. “Understanding the Dose-effect relationship: clinical application of PK-PD models”. Clinical Pharmacokinetics 1981;6:429-453.

²² L.B. Sheiner y J.L. Steimer. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Drug Development. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol 2000;40: 67-95.

²³ Ducongé J, Castillo R, Crombet T , Álvarez D, Matheu J, Vecino G, Alonso K, Beausoleil I, Valenzuela C, Becquer MA, Fernández-Sánchez E. Integrated pharmacokinetic/pharmacodynamics modeling and allometric scaling for optimizing the dosage regimen of the monoclonal ior EGF/r3 antibody” European Journal of Pharmaceutical Sciences, Elsevier B.V. 2004;21:261-270.

²⁴ Ghetie V, Ward ES. Transytosis and catabolism of antibody. Immunology Research 2002;25:97-113.