

## **Anticuerpo monoclonal humanizado h-R3: un nuevo concepto terapéutico para el tratamiento del cáncer avanzado**

Tania Crombet Ramos,<sup>1</sup> Rolando Pérez Rodríguez,<sup>1</sup> Agustín Lage Dávila,<sup>1</sup>  
Marta Osorio Rodríguez,<sup>2</sup> Teresa Cruz Rivero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Inmunología Molecular. Ave 16 y 216, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana 11600.  
AP 16040, Cuba. Telf.: (53-7) 271 4335; Fax: (53-7) 335049; E-mail: taniac@ict.cim.sld.cu

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), Ciudad de La Habana, Cuba.

### **RESUMEN**

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte en Cuba y en el resto del mundo. El receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) es una glicoproteína de membrana, que se sobre-expresa en tumores epiteliales y que se asocia al proceso de transformación maligna. El h-R3 es un anticuerpo monoclonal (AcM) humanizado obtenido en el Centro Inmunología Molecular (CIM), mediante técnicas de Ingeniería Genética que reconoce al EGFR con alta afinidad. Para caracterizar la actividad farmacológica del AcM se llevaron a cabo experimentos *in vitro* e *in vivo* en la línea de carcinoma A431. Se demostró que el h-R3 posee una potente actividad antitumoral, antiangiogénica y proapoptótica. Se evaluó la aparición de resistencia al tratamiento prolongado con el h-R3, y se demostró que se induce resistencia *in vivo*, en relación con la selección de subpoblaciones con elevado potencial angiogénico. Se realizaron 2 ensayos clínicos para evaluar la seguridad, biodistribución, farmacocinética así como la eficacia preliminar del AcM h-R3 en el tratamiento de pacientes con cáncer avanzado de cabeza y cuello. En el ensayo Fase I se demostró que el AcM es seguro, poco inmunogénico y exhibe un comportamiento farmacocinético no lineal. En pacientes portadores de tumores avanzados de cabeza y cuello, se produjo un incremento significativo de la respuesta antitumoral cuando el h-R3 se combinó con la Radioterapia. En el año 2002 se obtuvo el registro condicionado en Cuba del h-R3 como tratamiento del cáncer avanzado de cabeza y cuello.

El método de humanización del AcM h-R3 recibió el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 1998.

### **Introducción**

A pesar de los avances en la terapia antitumoral, los tumores de origen epitelial siguen siendo una de las primeras causas de muerte a nivel mundial [1].

En particular, el cáncer avanzado de cabeza y cuello representa en la actualidad un problema de salud. La incidencia mundial de tumores de cabeza y cuello es creciente y se estima que se diagnostican cada año alrededor de 500 000 nuevos casos en todo el mundo [1]. En Cuba se produjeron 487 defunciones en el año 2000 por tumores de labio, cavidad bucal y de la faringe, para una tasa de 4,4 por cada 100 000 habitantes [2]. El crecimiento en la incidencia se asocia al elevado consumo de tabaco y alcohol. Casi el 95% de los tumores de cabeza y cuello se clasifican como carcinomas escamosos o epiteliales. En el 90% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello se sobre-expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [3, 4].

A pesar de los avances en la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, muy poco se ha avanzado en el tratamiento del cáncer avanzado de cabeza y cuello [5]. Para los tumores que se diagnostican en etapa III y IV y que no son tributarios de tratamiento quirúrgico, el tratamiento convencional incluye la irradiación seguida de cirugía en los casos en que sea posible. La respuesta objetiva antitumoral (remisiones completas o parciales) después de la terapia radiante es baja, ya que solamente entre 30 y el 40% de los pacientes tratados experimentan alguna mejoría [6]. El porcentaje de respuestas completas tras la radioterapia no supera el 25% y varía de acuerdo a la localización anatómica de la lesión primaria. El tratamiento

de las recidivas corregionales sigue constituyendo un importante desafío. Adicionalmente, la duración de la respuesta obtenida tras la radioterapia es limitada y la mayoría de estos pacientes con recidivas locorregionales desarrollan una enfermedad progresiva que va acompañada de intenso sufrimiento. Es por eso que otros tratamientos con posibilidades potenciales de resultar efectivos son objeto de intensa investigación en la actualidad [6].

### **Sistema EGF/EGFR**

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es una molécula polipeptídica de 53 aminoácidos, de peso molecular 6,045 Kd, aislada por primera vez de glándula submaxilar de ratón. Posteriormente se obtuvo una molécula similar aislada de orina humana [7].

El EGFR es una glicoproteína de membrana de 170 Kd. Su dominio intracelular está asociado a actividad proteína quinasa tirosina específica, que presenta homología estructural con el producto del oncogen *v-erb-B*, evidencia que sugiere su relación con el proceso de transformación maligna [8, 9].

La sobre-expresión de EGFR confiere ventajas de crecimiento, alto índice de metastización, resistencia a la quimioterapia y a la hormonoterapia y constituye en general un signo de mal pronóstico. Las respuestas biológicas integradas al EGFR son pleiotrópicas [10].

El gen del receptor de EGF se encuentra amplificado y/o sobre-expresado en los carcinomas epidermoides humanos [11-15], lo que confiere ventajas de crecimiento a estas células.

Estudios bioquímicos e histológicos de biopsias de tumores humanos han demostrado la sobre-expresión del EGFR en diferentes neoplasias humanas, incluyendo cáncer de mama, vejiga, riñón, ovario, pulmón, cerebro, páncreas, entre otros [11-15]. También se ha demostrado que el EGF y el TGF alfa provocan estimulación del crecimiento de líneas celulares de tumores con expresión de EGFR [16].

La inmunoterapia pasiva para las enfermedades malignas asociadas al sistema EGF/EGFR, utilizando anticuerpos monoclonales contra el EGFR, ha sido objeto de múltiples investigaciones, en las cuales se ha demostrado que el reconocimiento específico del receptor por el anticuerpo bloquea la unión del ligando, constatándose efecto inhibitorio de la estimulación mitogénica de las células malignas. Sin embargo, el origen murino de estos anticuerpos monoclonales provoca en los pacientes tratados la generación de anticuerpos contra esta proteína heteróloga (HAMA, Human Antimouse Antibodies).

### AcM ior egf/r3

En el Centro de Inmunología Molecular se generó un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal murino, tras la inmunización con una fracción purificada de placenta humana, que reconoce al receptor del EGF con alta afinidad y que es capaz de inhibir la unión del EGF a su receptor en un ensayo de competencia. Este anticuerpo fue denominado ior egf/r3 [17, 18].

El AcM ior egf/r3 inhibió la proliferación de líneas tumorales con alta expresión de EGFR en cultivo y en ratones xenotrasplantados, constatándose evidencias de actividad antitumoral [17].

### Ensayos Clínicos con el AcM ior egf/r3

El AcM murino ior egf/r3 murino fue utilizado en 6 Ensayos Clínicos precedentes. En 2 de estos ensayos se empleó en el diagnóstico inmunogammagráfico de tumores de origen epitelial, administrándose 3 mg del anticuerpo marcado con Tecnecio 99 (<sup>99m</sup>Tc) [19].

Con el anticuerpo murino se realizaron 4 ensayos clínicos terapéuticos, en los Hospitales Hermanos Ameijeiras, CIMEQ, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), Instituto de Neurología y Neurocirugía (INN) y Hospital Manuel Fajardo, en Ciudad de la Habana.

En total se incluyeron 58 pacientes con enfermedad neoplásica en las siguientes localizaciones: pulmón, cerebro, mama y sistema digestivo [20, 21].

En el ensayo clínico terapéutico Fase I se trataron 18 pacientes y se escalaron 6 niveles de dosis desde 200 mg hasta 2,0 g, no presentándose ninguna reacción adversa severa ni muy severa según los criterios de la Organización Mundial de la Salud. (OMS) [20].

En el 83,3% de los pacientes se detectó respuesta HAMA (Human antimouse antibodies). En este ensayo se obtuvieron los siguientes datos de farmacocinética:  $t_{1/2} = 38,49$  h,  $Cl = 1,2$  mL/hkg y  $Vd = 0,05$  L/Kg [20].

En este ensayo, se constató remisión parcial del tumor en 1 paciente. La sobrevida global de este ensayo fue pobre, pero se encontró aumento de sobrevida en 2 pacientes (por más de 2 años), asociado a la administración de ciclos repetidos del ior egf/r3 [20].

En otro ensayo Fase I en pacientes portadores de tumores astrocíticos avanzados se constató una reacción alérgica muy severa asociada con la sensibilización previa del paciente al AcM y a la aparición de respuesta HAMA. Aunque no aparecieron evidencias de respuesta objetiva antitumoral, 6 pacientes se mantuvieron en enfermedad estable durante 6 meses y 2 pacientes permanecieron vivos, 4 años después de terminada la terapia [21].

En los Ensayos Clínicos Fase IIa, que implicaban varios ciclos de tratamiento con el AcM en pacientes con tumores localizados en pulmón o mama sí se reportaron reacciones adversas severas y muy severas, además de la aparición de respuesta HAMA. Las reacciones adversas severas fueron vómitos, bronco-espasmo, fiebre y disnea al reposo. Las reacciones adversas muy severas consistieron en anafilaxia (4 pacientes), fiebre con hipotensión y relajación de esfínteres (1 paciente). En todos los casos las reacciones aparecidas se controlaron tras la interrupción de la administración del anticuerpo y con tratamiento médico.

### Humanización del AcM

Con el objetivo de incrementar la eficacia terapéutica y disminuir la toxicidad se procedió a la humanización del anticuerpo murino ior egf/r3 [22].

La humanización de anticuerpos permite combinar las regiones hipervariables de anticuerpo murino con el marco de soporte de una inmunoglobulina humana y de esta forma fusionar las regiones de origen murino que reconocen con alta especificidad al antígeno con las cadenas pesadas de un anticuerpo humano necesarias para su efectividad biológica.

El anticuerpo R3 humanizado (h-R3) se obtuvo mediante clonaje a partir de la región variable del ADN obtenido del hibridoma murino ior egf/r3. Este anticuerpo h-R3 contiene las regiones hipervariables (CDR) de origen murino (ior egf/r3) y los marcos (Frs) de las regiones variables y de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de origen humano (REI y NEWN respectivamente). El anticuerpo humanizado reconoce al receptor del EGF con similar afinidad que su predecesor murino ( $10^{-9}$  M) [22].

Para caracterizar la actividad biológica del anticuerpo humanizado se realizaron experimentos preclínicos *in vitro* e *in vivo*, sobre una línea tumoral con sobre-expresión del EGFR: la línea de carcinoma vulvar A431.

Para caracterizar la toxicidad, el comportamiento farmacológico y la eficacia preliminar del AcM h-R3 en el tratamiento de pacientes portadores de tumores avanzados se realizaron 2 ensayos clínicos.

La caracterización químico-farmacéutica del AcM h-R3, de conjunto con la información preclínica, productiva, y a la eficacia demostrada en los ensayos clínicos permitió la concesión del registro provisional del h-R3 por la Agencia Regulatoria Cubana, el Centro Estatal para el Control de los Medicamentos, como tratamiento del cáncer avanzado de cabeza y cuello.

El AcM h-R3 constituye el primer anticuerpo registrado en el mundo contra el EGFR, al igual que el primer anticuerpo monoclonal aprobado a escala mundial para el tratamiento del cáncer avanzado de cabeza y cuello.

El anticuerpo monoclonal h-R3 constituye además el primer AcM registrado por el Centro de Inmunología Molecular para la terapia de las enfermedades malignas.

## Objetivos

1. Evaluar la actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal (AcM) h-R3 en la línea de carcinoma vulvar A431 *in vitro* e *in vivo*.
2. Evaluar el efecto anti-proliferativo, anti-angiogénico y pro-apotótico del AcM h-R3 en la línea de carcinoma vulvar A431.
3. Evaluar la aparición de resistencia tras el tratamiento prolongado con AcM anti-EGFR.
4. Evaluar los posibles mecanismos de aparición de resistencia a los anticuerpos anti-EGFR.
5. Evaluar la seguridad, biodistribución, farmacocinética e inmunogenicidad del AcM h-R3 administrado en dosis simple a pacientes portadores de tumores epiteliales avanzados.
6. Evaluar la seguridad y eficacia preliminar del AcM h-R3 administrado en dosis múltiples a pacientes portadores de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello en etapas avanzadas.

## Material y métodos

### Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea tumoral de carcinoma vulvar A431 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivo Celular (ATCC, Rockville, MD). Las líneas fueron cultivadas en condiciones de cultivo (unidimensional) monocapa o tridimensional (esferoides) en medio modificado de Dulbecco (DMEM, Life technologies, Inc), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco-BRL, Grand Island, NY), en condiciones convencionales de cultivo (37 °C en atmósfera húmeda, 5% CO<sub>2</sub>). El cultivo en esferoides (multicelular) se preparó utilizando la tecnología de recubrimiento líquido. Brevemente, las placas de cultivo de 96 pocillos (Nalge Nunc Inc., Naperville, IL), fueron recubiertas con Agarosa al 1% (BMA, Rockland, ME). Las placas fueron colocadas en un agitador orbital, a una velocidad de 250 rpm durante 5 minutos, para permitir que las células cultivadas estuvieran en estrecho contacto entre sí.

### Ensayo de inhibición de la proliferación

La proliferación celular se midió a través de un ensayo de incorporación de timidina tritiada. Brevemente, 10<sup>4</sup> células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en esferoides o en monocapa, durante 24 h y luego se expusieron a diferentes concentraciones del AcM h-R3, durante 48 h en el medio de cultivo anteriormente descrito (1% FBS/DMEM). Las células fueron incubadas en presencia de la timidina tritiada (Amersham), durante 6 h y la radiactividad incorporada en el ADN se contó en un contador de centelleo b (Pharmacia).

### Análisis de ciclo celular

Se realizó el cultivo en monocapa de la línea A431, en presencia del AcM h-R3 a una concentración de 100 mg/mL. Luego de 48 h de incubación, las células fueron tripsinizadas, lavadas, fijadas en para-formaldehído 1% y permeabilizadas con etanol frío al 70%. Posteriormente, se procedió al lavado,

resuspensión e incubación de las células durante 1 h en una solución que contenía 50 mg/mL de yoduro de propidio y 400 mg/mL de ARNasa A. El análisis del perfil del ADN y el análisis de ciclo celular se realizó empleando la citometría de flujo (Becton Dickinson, San José, CA). Los datos fueron analizados empleando el software CellQuest (Becton Dickinson).

### Medición de los niveles de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

Se utilizó un sistema inmunoenzimático comercial (R&D System, Minneapolis, MN, USA) para cuantificar los niveles proteicos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el medio condicionado de las células tumorales cultivadas en presencia del AcM h-R3. Las células de la línea A431 fueron sembradas a una densidad de 10<sup>5</sup> células por pocillo en el medio de cultivo convencional. Tras 48 h de incubación, el medio fue reemplazado por medio DMEM/FCS al 1%, que contenía diferentes concentraciones del AcM h-R3. El medio condicionado fue colectado tras 24 h. de incubación y conservado a -70 °C hasta la cuantificación de VEGF. El número de células fue determinado utilizando un contador de células (Coulter Electronics, Luton, UK) y este dato se empleó para la normalización.

### Análisis de VEGF al nivel de ARN

El análisis de VEGF se realizó utilizando células en cultivo o células tumorales conservadas en nitrógeno líquido obtenidas tras exéresis a los ratones xenotransplantados y tratados con el AcM h-R3. En resumen, el ARN total fue extraído utilizando el reactivo TRIzol (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron disueltas en gel de formaldehído-agarosa al 1% y se verificó que se había añadido la misma cantidad de muestra realizando una tinción con bromuro de etidio. Luego, el ARN fue transferido a una membrana Hybond N + (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) y la hibridación se realizó utilizando una sonda de ADN marcada con Fósforo 32 (<sup>32</sup>P), que reconocía todas las isoformas del VEGF. Las membranas fueron autoradiografiadas y la intensidad de las bandas de 3,7 a 4,5 kb fue evaluada.

### Experimentos *in vivo*

Dieciséis ratones portadores de una inmunodepresión severa combinada (SCID), fueron inyectados subcutáneamente con la línea celular A431 cells (5 x 10<sup>6</sup> cells/mouse). Cuando las células alcanzaron un volumen mayor de 200 mm<sup>3</sup> los animales fueron separados aleatoriamente en los siguientes grupos de tratamiento: grupo control (PBS), grupo de tratamiento h-R3 o grupo de tratamiento con el AcM ior egf/r3. Cada grupo de tratamiento recibió 4 inyecciones intraperitoneales de PBS o de los AcM antes mencionados (1 mg/dosis) cada 48 horas. Los tumores fueron resecados, transcurridos 8 días del experimento para estudios de inmunohistoquímica o para la realización de los estudios de biología molecular antes referidos (cuantificación de ARNm).

En un experimento independiente, 25 ratones (5 ratones en 5 grupos de tratamiento) fueron inoculados por la vía subcutánea con la línea celular A431 ( $7,7 \times 10^6$  células) en 0,2 mL de PBS. El tratamiento de los ratones portadores de tumores bien establecidos (volumen: 200-300 mm<sup>3</sup>) consistió en inyecciones intraperitoneales de 1 mg (grupo de alta dosis) o de 0,25 mg (grupo de baja dosis) de los AcM h-R3 o ior egf/r3 cada 48 h durante 2 semanas. El tratamiento se mantuvo hasta que se alcanzó la remisión tumoral completa de todos los ratones que recibieron tratamiento con los 2 AcM: h-R3 e ior egf/r3. Los tumores se midieron cada 48 h y los volúmenes fueron calculados empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{2} \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$$

### Inmunohistoquímica

Los tumores resecados fueron fijados en formalina o en la solución de Carnoy. Las muestras fueron embebidas en parafina y cortadas en secciones de 4 mm de grosor. Las tinciones fueron reveladas utilizando el kit Vecstatin ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA), o el kit HistoStain-SP (Zimed Laboratories, San Francisco, CA). La actividad antiproliferativa se evaluó a través de la tinción del antígeno nuclear Ki67, con el anticuerpo policlonal NCLki67p (Novocastra Laboratories, New Castle, UK) diluido 1:1000, luego de exponer el antígeno con altas temperaturas. La actividad apoptótica se evaluó a través del método TUNEL empleando un kit comercial de detección de muerte celular *in situ* (Roche Diagnostics GmbH, Germany), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las muestras en las cuales la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal no se añadió sirvió como control negativo. Las secciones fueron evaluadas en un microscopio óptico a una magnificación 40 x. El índice apoptótico se definió como el porcentaje de células positivas en 100 núcleos, contados en 10 campos seleccionados al azar. La tinción de vasos sanguíneos se llevó a cabo en las secciones fijadas en la solución de Carnoy, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo contra el Factor VIII (Factor de von Willebrand) humano y de ratón (A0082, DAKO, Carpinteria, CA), diluido 1:500. Las células positivas endoteliales fueron cuantificadas en 10 campos seleccionados al azar en todas las muestras, empleando una magnificación de 40x. Adicionalmente se preparó una lámina control para cada muestra que fue teñida con hematoxilina y eosina para examinar la morfología tisular.

### Estadística

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software GraphPAD InStat, versión 1,14 (GraphPAD Inc., San Diego, CA). Los experimentos *in vivo* fueron analizados empleando el test de ANOVA acoplado al test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

### Evaluación de la aparición de resistencia

La línea celular A431 proveniente de un carcinoma de vulva se obtuvo a partir de la Colección Americana de Cultivo (ATCC; Rockville, Maryland). Las variantes independientes de la línea A431 resistentes a los AcM ior egf/r3 y h-R3 se obtuvieron especialmente para este ensayo. En todos los casos, las líneas parentales

y las variantes resistentes fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bobino, al 5% (FBS) (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Todos los cultivos fueron mantenidos en atmósfera húmeda, a 37 °C en incubadora de CO<sub>2</sub>.

### Evaluación de la proliferación *in vitro*

La proliferación de las células parentales y las variantes resistentes se evaluó a través de la incorporación de timidina tritiada en células cultivadas en monocapa. Brevemente, las células tripsinizadas fueron resuspendidas a una densidad de  $3 \times 10^3$  en 100 µl de DMEM (Life Technologies, Inc.), conteniendo 1 % de suero fetal bovino y plantadas en placas de 96 pocillos (Nalge Nunc Inc., Naperville, IL). Las placas fueron incubadas bajo condiciones convencionales durante 24 h y luego se añadieron 100 µl de los siguientes productos: AcM C225, h-R3 o TGF en medio DMEM/FBS al 1 %. Las células fueron incubadas durante 48 h adicionales y se añadió la timidina tritiada 2 µCi/pocillo durante las 4-6 h de incubación.

### Evaluación de la actividad antitumoral *in vivo* de los 3 AcM

Las células A431 ( $5 \times 10^6/200$  µl of PBS) fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco derecho de ratones portadores de inmunodeficiencia severa combinada de 6 a 8 semanas de edad (peso promedio: 23 g). Luego de 10 días (volumen tumoral promedio= 300 mm<sup>3</sup>), los animales fueron separados al azar en 7 grupos. Los grupos de "alta dosis" recibieron 1 mg de los AcM C225, hR3 y mR3 administrados por la vía intraperitoneal (IP) cada 48 h. Los grupos de "baja dosis" fueron tratados con la dosis de 0,25 mg de cada AcM siguiendo el mismo esquema terapéutico. El grupo control recibió PBS (solución de buffer fosfato). El tratamiento se detuvo tras la administración de 8 inyecciones.

### Obtención de las variantes celulares de la línea A431 resistentes a los AcM

Tras 2 semanas de tratamiento continuo en los grupos de alta y baja dosis de cada AcM C225, m-R3 y h-R3, la mayoría de los ratones alcanzaron la remisión tumoral completa. En este momento el tratamiento cesó y los ratones fueron monitoreados para apreciar la aparición de recurrencias tumorales. Las recurrencias tumorales aparecieron en mayor proporción en el grupo tratado con la dosis bajas, 2 meses después del inicio del tratamiento. Cuando los tumores alcanzaron un volumen similar al que tenían al momento del inicio del tratamiento, se comenzó una segunda ronda de tratamiento utilizando el mismo AcM, dosis y esquema. Aquellos tumores que no respondieron durante la primera semana de tratamiento con la dosis de 0,25 mg fueron tratados con la dosis de 1 mg, siguiendo el mismo esquema, durante las 2 semanas siguientes. Los ratones que recibieron la dosis de 1 mg inicialmente, fueron tratados con el mismo esquema terapéutico. Los tumores que no respondieron durante la segunda etapa del tratamiento fueron considerados resistentes. Estos ratones fueron sacrificados, y las células tumorales fueron recuperadas *in vitro*, por tratamiento enzimático, bajo condiciones asépticas y crecidas en medio de cultivo. Las células fueron

pasadas en cultivo al menos 3 veces antes de cualquier medición.

#### Análisis del ADN

El ADN genómico (10 µg) fue digerido con *Hinf*I (New England Biolabs Inc., Mississauga, Ontario, Canada), disueltas en gel de agarosa al 0,6% y transferido a una membrana de nylon. El patrón de bandas fue evaluado tras hibridación con una sonda multilocus 33,15 marcada con NICE (Cellmark Diagnostic, United Kingdom), usado en combinación con un sustrato quimioluminiscente (Tropic Inc., Bedford, MA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### Western blot

Para detectar la expresión de EGFR y de Her 2, se obtuvieron lisados celulares de acuerdo al protocolo previamente descrito. Las proteínas fueron disueltas en SDS-PAGE y luego transferidas a una membrana Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA). Luego del bloqueo con caseína 1%/TBST, la membrana se incubó con un AcM anti-EGFR Ab SC-003 o con el AcM anti-Her 2 Ab SC-284 (Santa Cruz Biotechnologies, San Francisco, CA) a una concentración de 0,2 µg/mL. Posteriormente, la membrana, se lavó y se incubó con un anticuerpo de carnero anti-conejo conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA). La fosforilación del EGFR se determinó en los lisados de las células estimuladas con TGF alfa, usando el anticuerpo murino anti-pEGFR no. 324864 (Calbiochem) a una concentración 0,1 µg/mL. Se utilizó un anticuerpo anti-ratón W402B conjugado a peroxidasa (Promega) a la concentración 0,2 µg/mL, como anticuerpo secundario para detectar el anticuerpo murino primario. Las manchas fueron visualizadas usando el kit ECL de luminiscencia (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).

#### Medición del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Se utilizó un kit comercial para medir los niveles de VEGF murino o humano (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) en el medio de cultivo procedente de la línea celular de carcinoma vulvar A431, de las variantes resistentes a los anticuerpos y de los clones transfectados con el VEGF murino. Brevemente, las células fueron sembradas a una densidad de  $10^5$  cells/0,5 mL/pozo en una placa de 24 pozos y cuando se alcanzó una confluencia del 80%, el medio fue reemplazado por DMEM, que contenía 1% de suero fetal bovino con o sin C225. El medio se recuperó después de 24 h y las células fueron colectadas como se describió previamente.

#### Análisis de ARN

Se utilizaron  $10^7$  células para realizar la extracción del ARN total utilizando el reactivo de Trizol (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se corroboró la eficiencia de la transferencia realizando una tinción con bromuro de etidio del gel y de la membrana.

#### Obtención de variantes que sobre-expresan VEGF

Se utilizó un plásmido que codificaba mVEGF164 (981 pb), regulado por un promotor de citomegalo-

virus (CMV), para transfectar a células A431 usando el reactivo SuperFect (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los clones controles resultaron producto de la transfección de un vector vacío. Los controles positivos fueron seleccionados con concentraciones crecientes (500–800 µg/mL) de Geneticin (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) y fueron mantenidos en presencia de 800 µg/mL de la droga. Tres de los clones (mVEGF.S1, mVEGF.S2, y mVEGF.S3) fueron seleccionados por una prueba de resistencia al anticuerpo *in vivo*, que fue seleccionado después del tratamiento a bajas dosis.

#### Ensayo Clínico Fase I

El ensayo clínico fase I se realizó en 12 pacientes reclutados en los Servicios de Oncología del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ) y del Hospital Hermanos Ameijeiras (HHA). Todos los sujetos del ensayo habían concluido el tratamiento oncoespecífico al menos cuatro semanas antes de la inclusión.

El anticuerpo monoclonal h-R3 fue administrado a todos los pacientes en el Centro de Investigaciones Clínicas.

#### Selección de sujetos

Se seleccionaron pacientes con diagnóstico citológico o histológico de cáncer de origen epitelial, en estadios III ó IV, que cumplieran los siguientes criterios de selección:

#### Criterios de inclusión

- Pacientes que hayan concluido el tratamiento oncoespecífico al menos 4 semanas antes de la inclusión en el ensayo y que no sean susceptibles de recibir otra terapia con intención curativa.
- Pacientes que hayan concluido el tratamiento oncoespecífico al menos 4 semanas antes de la inclusión en el ensayo y que no sean susceptibles de recibir otra terapia con intención curativa.
- Expresa voluntariedad escrita del paciente.
- Edad desde 18 hasta 75 años, de ambos sexos.
- Estado General según la OMS menor o igual que 3.
- Lesiones medibles en los diámetros perpendiculares mayores, por Tomografía Axial Computarizada (TAC), Rayos X(Rx) ó Ultrasonido (US).
- Parámetros de laboratorio clínico:
  - ✓ Hb >10 g/L; leucocitos totales más de  $4 \times 10^9$  células/L; plaquetas  $100 \times 10^9$  /L.
  - ✓ Funcionamiento hepático dentro de límites normales y/o sin antecedentes de alguna afección hepática demostrada por TGP, TGO o Fosfatasa alcalina.
  - ✓ Función renal: creatinina sérica  $\leq 132$  mmol/L.

#### Criterios de exclusión

- No cumplir algún criterio de inclusión.
- Embarazo o lactancia.
- Presentar una enfermedad crónica asociada en fase de descompensación, por ejemplo: cardiopatía, diabetes, hipertensión arterial.
- Antecedentes de hipersensibilidad a éste u otro producto semejante.

- Estados febriles.
- Procesos sépticos severos.
- Compromiso mediastinal.
- Estados alérgicos agudos o de gravedad.
- Tratamiento previo con otros AcM anti EGFR (murino o humanizado).

#### **Crterios de salida**

- A solicitud del paciente.
- Reacciones adversas muy severas según la tabla de la Organización Mundial de la Salud, OMS.
- Progresión de la enfermedad antes de concluir la evaluación prevista.
- Pérdida de seguimiento del paciente y desconocimiento de la evolución.

La ejecución de este Ensayo Clínico fue aprobada y seguida hasta el final, por el Comité de Ética para la investigación clínica del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, del Hospital Hermanos Ameijeiras y del Centro de Investigaciones Clínicas. Todos los pacientes firmaron el acta de consentimiento informado, antes de su inclusión en el protocolo.

#### **Esquema de tratamiento**

Se realizó un escalado algebraico de dosis, empleando un esquema de Fibonacci modificado, hasta completar cuatro grupos de tratamiento. Se incluyeron 3 pacientes por cada nivel de dosis.

Las dosis administradas del anticuerpo monoclonal h-R3 fueron las siguientes:

- Primer Nivel: 50 mg
- Segundo Nivel: 100 mg
- Tercer Nivel: 200 mg
- Cuarto Nivel: 400 mg

En cada inyección se administraron 3 mg del AcM h-R3, conjugado a un isótopo radiactivo, Tc99m, para facilitar los estudios de biodistribución. Esta fracción del AcM marcado (fracción caliente) constituyó parte de la dosis total a administrar, para todos los niveles de dosis estudiados.

La administración del producto (co-inyección del AcM h-R3 marcado y no marcado) se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Clínicas y posteriormente los pacientes permanecieron ingresados en el hospital de procedencia.

El h-R3 fue administrado por vía endovenosa (vena antecubital), en 250 mL de solución salina en infusión rápida (30 minutos).

#### **Evaluación de la toxicidad**

Se realizó un examen físico exhaustivo a cada paciente antes de la administración del producto y luego cada 6 horas durante las primeras 24 horas post-tratamiento. A continuación, se practicó el examen diariamente durante el periodo de hospitalización de los pacientes, que fue de al menos 72 h. después de la administración del anticuerpo monoclonal.

Adicionalmente se realizaron exámenes complementarios de hematología y bioquímica sanguínea en los siguientes tiempos: pre-inclusión en el protocolo, una semana después y luego cada mes durante el tiempo de seguimiento de los pacientes.

Los exámenes realizados fueron los siguientes: Hemoglobina, Conteo de leucocitos, Plaquetas, Proteí-

nas totales, Glucosa, Albúmina, TGP, TGO, Fosfatasa Alcalina, Bilirrubina, Creatinina y Urea.

#### **Estudio de farmacocinética**

Se colectaron muestras de sangre del brazo contralateral al de la inyección. Las extracciones se realizaron a los 5, 10, 20, 30 min and 1, 3, 5, 8, 18, 24, 36, 48, 72, 168 and 720 horas post-tratamiento. Las muestras fueron dispensadas en viales secos, para obtener suero.

Se realizó la determinación de la concentración sérica del h-R3 utilizando un sistema inmunoenzimático, que contenía células A-431 pegadas a la fase sólida. Estas células procedentes de un carcinoma vulvar, poseen una alta expresión del receptor de EGF.

#### **Evaluación de la inmunogenicidad**

La respuesta inmune contra el AcM h-R3 fue medida a través de un sistema ELISA cualitativo

#### **Ensayo Clínico Fase I/II**

El ensayo clínico Fase I/II, fue abierto, no controlado, no aleatorizado y unicéntrico. En el estudio se incluyeron 14 pacientes (12 evaluables) atendidos en el servicio de cabeza y cuello del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR).

Se definieron 4 grupos de tratamiento de 3 pacientes cada uno, con dosis de 50, 100, 200 y 400 mg de AcM h-R3. Cada paciente recibió 6 veces la dosis correspondiente del AcM. La inclusión de los pacientes fue lineal, de acuerdo al nivel de dosis. Adicionalmente, los sujetos del ensayo siguieron la radioterapia convencional, de acuerdo al tipo y localización del tumor. La cobaltoterapia se realizó en 30 sesiones, durante 5 días (lunes-viernes) de 6 semanas. Se calculó la dosis total y la dosis diaria de radiaciones para cada uno de los pacientes.

#### **Selección de sujetos**

Universo

Pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, confirmado por técnicas histopatológicas, tributarios de tratamiento radiante.

#### **Crterios de inclusión del ensayo**

- Pacientes con tumores epiteliales de cavidad bucal y mesofaringe, no susceptibles de tratamiento quirúrgico o en recaída, que al momento de la inclusión sean tributarios de tratamiento con radiaciones.
- Confirmación de la expresión de EGFR por Inmunohistoquímica (I.H.Q).
- Expresa voluntad escrita del paciente.
- Edad de 18 hasta 80 años, de ambos sexos.
- Estado general según la OMS menor o igual que 2.
- Expectativa de vida de 6 meses.
- Parámetros de laboratorio clínico. Hb > 10 g/L, leucocitos totales más de  $4 \times 10^9$  células/L, plaquetas > de  $10^9$ /L.
- Funcionamiento hepático dentro de límites normales y/o sin antecedentes de alguna afección hepática demostrada por TGP, TGO o Fosfatasa alcalina.
- Función renal: creatinina sérica  $< 0 = 132$  mmol/L.

#### **Crterios de exclusión del ensayo**

- No cumplir algún criterio de inclusión.

- Pacientes tratados con el AcM ior rgf/r3.
- Embarazo o lactancia.
- Presentar una enfermedad crónica asociada en fase de descompensación, por ejemplo: cardiopatía, diabetes, hipertensión arterial.
- Antecedentes de hipersensibilidad a éste u otro producto semejante.
- Estados febriles.
- Procesos sépticos severos.
- Estados alérgicos agudos o de gravedad.

#### Criterios de interrupción del ensayo

- A solicitud del paciente.
- Pérdida de seguimiento del paciente ( durante 6 semanas que debe recibir la radioterapia) y desconocimiento de la evolución.
- Estados alérgicos agudos o de gravedad.

#### Tratamiento

Se realizó un escalado algebraico de dosis, empleando un esquema de Fibonacci modificado, hasta completar 4 grupos de tratamiento.

#### Administración del AcM

El h-R3 fue administrado por vía endovenosa (vena antecubital), en 250 mL de solución salina en infusión rápida (30 min).

#### Intervalos

El AcM h-R3 se administró una vez, durante 6 semanas.

#### Conservación

El AcM h-R3 se entregó en forma de solución acuosa y se mantuvo en las condiciones recomendadas por el productor (4-8 °C).

#### Evaluación de eficacia y toxicidad

Para la evaluación de toxicidad se recogieron todas las evidencias de reacciones adversas ocurridas en el Ensayo, a través del Examen Físico de los pacientes y de los exámenes de laboratorio que se realizaron previo al tratamiento y cada 15 días hasta concluir las 6 semanas del tratamiento. A continuación los exámenes de laboratorio se realizaron mensualmente, hasta concluir 1 año después del tratamiento.

**Laboratorio clínico.** Se realizaron los siguientes exámenes de Laboratorio, para evaluar la aparición de toxicidad:

Hemoglobina	Proteínas totales	Fosfatasa alcalina	Proteinuria
Leucocitos totales	Glicemia	Bilirrubina	Hematuria
Conteo diferencial	TGP	Creatinina	Hematocrito
Conteo de plaquetas	TGO	Urea	Parcial de orina

La clasificación de la intensidad de la reacción adversa fue de acuerdo a la escala de toxicidad de la OMS.

#### Evaluación de la respuesta antitumoral

Se clasificó la respuesta clínica según los criterios de la OMS.

Se evaluó la respuesta objetiva al tratamiento o remisión del tumor, por la diferencia de productos de las mediciones de los diámetros perpendiculares mayores de las lesiones medibles. En caso de lesiones dudosas, se tomó biopsia para corroborar la respuesta antitumoral.

#### Evaluación de la respuesta anti-idiotípica

Se obtuvieron muestras para el estudio de la respuesta anti-idiotípica quincenalmente durante las primeras 6 semanas del tratamiento, haciendo coincidir las extracciones con las correspondientes al laboratorio clínico y luego 1 vez al mes hasta concluir el tiempo de seguimiento previsto (1 año).

Para la determinación de la respuesta HAMA se empleó un sistema ELISA indirecto.

Se estudió cada muestra por duplicado. Se obtuvo el promedio de densidad óptica por cada muestra. Se calculó la relación (razón) entre la muestra de cada tiempo y el valor de densidad óptica pre-tratamiento. Se consideró respuesta HAMA positiva, cuando el valor de esta razón fue mayor que 2.

#### Determinación del carácter anti-angiogénico y anti-proliferativo del AcM h-R3.

Antes y después de finalizado el tratamiento se tomaron muestras de tejidos para el estudio del carácter anti-angiogénico y anti-proliferativo del AcM h-R3. Adicionalmente se evaluó la expresión del EGFR antes y después de la terapia. Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunohistoquímica del CIM.

#### Estadística

Para evaluar las reacciones adversas del monoclonal en diferentes dosis y la radioterapia se comparó la distribución de frecuencia de eventos adversos según la severidad de los mismos mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La aparición de los eventos adversos se comparó mediante el análisis de varianza de efecto fijo.

Se estimó el intervalo de confianza para un 95% de la proporción de respuesta antitumoral para cada uno de los grupos de dosis.

La respuesta antitumoral lograda por cada uno de los grupos de dosis se comparó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba exacta generalizada de Fisher.

Se evaluó la actividad proliferativa, la angiogénesis y la expresión EGFR en 11 pacientes. Para el análisis de estos indicadores se utilizó la estadística descriptiva, dado que no había balance en cuanto a la cantidad de pacientes entre los grupos de dosis.

Todas las pruebas estadísticas se evaluaron con un 95% de confianza.

#### Extensión del ensayo clínico

Para definir la dosis a utilizar en el ensayo clínico Fase II, se solicitó a la Agencia Regulatoria Cubana, una extensión del ensayo recién-descrito. En el ensayo de extensión se incluyeron 10 pacientes en las 2 dosis donde se encontraron las mayores evidencias de eficacia terapéutica en el ensayo clínico Fase I/II. Se trataron 5 pacientes con la dosis de 200 mg y 5 pacientes con la dosis de 400 mg.

Los criterios de selección y evaluación de los pacientes fueron los mismos (ya descritos).

## Resultados y Discusión

### Experimentos pre-clínicos

Se realizaron experimentos para evaluar la actividad antitumoral del AcM humanizado h-R3.

Se evaluó la actividad anti-proliferativa *in vitro* del AcM h-R3 en monocapa (cultivo bidimensional) y en condiciones de cultivo tridimensional (esferoides), en una línea de carcinoma vulvar que presenta una alta expresión de EGFR. Se escogió el modelo de cultivo tridimensional, pues este refleja mejor la organización y las interacciones célula-célula en un tumor en crecimiento.

El AcM h-R3 exhibió un máximo de inhibición de la proliferación de la línea tumoral A431 equivalente a 40%. Este efecto fue semejante en las 2 condiciones de cultivo: en monocapa y en esferoides, aunque el máximo de inhibición se alcanzó a dosis más bajas, en condiciones de cultivo tridimensional (Figura 1).

El análisis del ADN por citometría de flujo evidenció arresto del ciclo celular en la fase G1, acompañado de una disminución en la fase S, en las células tratadas con el h-R3 en comparación con los controles, no tratados (Figura 2). No se observó ninguna acumulación en la zona sub-G1, indicativa de actividad apoptótica. La ausencia de apoptosis en condiciones de cultivo *in vitro* indican que la actividad del h-R3 en estas condiciones experimentales es fundamentalmente citostática y no citotóxica.

También se evaluó la actividad antiangiogénica *in vitro* del AcM h-R3 a través de su capacidad de inhibir la síntesis de V-EGF, uno de los principales factores proangiogénicos, en la línea celular de carcinoma vulvar A431:

Se demostró que el AcM h-R3 inhibe la producción de VEGF a nivel proteico. Este efecto fue dosis dependiente y significativo, a la concentración más alta utilizada (100 mg/mL). En paralelo se demostró inhibición dosis-dependiente del VEGF a nivel de ARNm (Figura 3).

### Actividad anti-tumoral *in vivo*.

#### Experimentos *in vivo*

Se realizaron experimentos en ratones atímicos xenotrasplantados con la línea celular de carcinoma

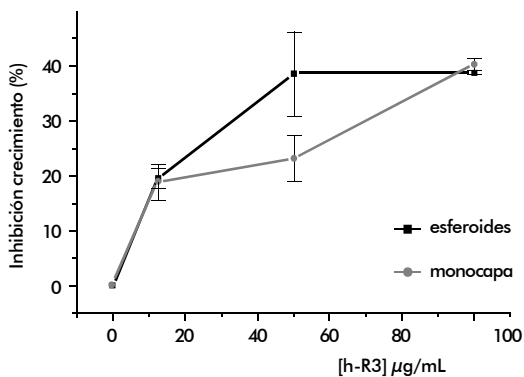


Figura 1. Actividad anti-proliferativa del AcM h-R3 sobre la línea A431 en 2 condiciones de cultivo: monocapa (cultivo bidimensional) y en esferoides (cultivo tridimensional).

vulvar A 431 para evaluar la actividad antitumoral, pro-apoptótica y anti-angiogénica de los AcM ior egf/r3 (murino) y h-R3 (humanizado).

Se realizaron 2 experimentos:

- Experimento 1: (curso corto) 4 inyecciones de cada AcM
- Experimento 2: (curso largo) 8 inyecciones de cada AcM

En ambos experimentos *in vivo* se constató una marcada actividad antitumoral de los 2 AcM anti-EGFR. No se constataron diferencias desde el punto de vista estadístico en la actividad anti-proliferativa de los anticuerpos ior egf/r3 y h-R3. La actividad anti-proliferativa se constató tras 4 administraciones del AcM, a la dosis de 1 mg/tratamiento.

La extensión de la acción antitumoral se estudió nuevamente a 2 dosis de ambos AcM, en el experimento de curso largo. Tras 8 inyecciones de cada anticuerpo, se demostró que la mayoría de los tumores exhibían respuesta completa. En contraste, los tumores xenotrasplantados en los ratones del grupo control crecieron rápidamente, alcanzando un volumen de 1000 mm<sup>3</sup>, a los 14 días de iniciado el experimento, lo cual representa un incremento en 5 veces. No se encontraron diferencias entre los ratones tratados con las dosis alta o baja de ambos anticuerpos (Figura 4).

Al finalizar el experimento 1 se realizó exéresis de los tumores residuales de los 3 grupos de tratamiento (control, ior egf/r3 y h-R3) con el objetivo de conocer los mecanismos efectores antitumorales a través de estudios de inmunohistoquímica y de biología molecular.

El análisis de ARNm tumoral procedentes de los ratones tratados con ambos anticuerpos reveló un decrecimiento significativo en los niveles de VEGF, resultado que se correspondió con los hallazgos previos *in vitro* (Figura 5).

En los estudios de Inmuhistoquímica, se constató un alto índice de apoptosis en las muestras de los tumores procedentes de los grupos tratados con los AcM ior egf/r3 y h-R3. El índice apoptótico resultó 5 veces mayor en los grupos que recibieron tratamiento con los anticuerpos en comparación con el grupo control (Figure 6).

Al igual se encontraron diferencias cualitativas en el grado de proliferación tras la tinción con un AcM anti-Ki 67. Se encontró un alto grado de proliferación en la periferia de los tumores pertenecientes al grupo control, mientras que la tinción fue prácticamente negativa en las muestras de los animales inyectados con los 3 AcM (Figure 6).

Adicionalmente, se evaluó la vascularización de los tumores residuales en los 4 grupos. Los tumores provenientes del grupo control mostraron gran densidad de vasos sanguíneos, mientras que las muestras de los ratones tratados se caracterizaron por una marcada disminución en la angiogénesis (Figure 6).

El conteo de vasos sanguíneos fue 3 veces menor en los animales tratados con los AcM anti-EGFR en comparación con el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este resultado sugiere un efecto anti-angiogénico marcado *in vivo*.

Para evaluar la aparición de resistencia adquirida tras la administración prolongada de anticuerpos anti-EGFR, se diseñó un experimento de curso largo, don-



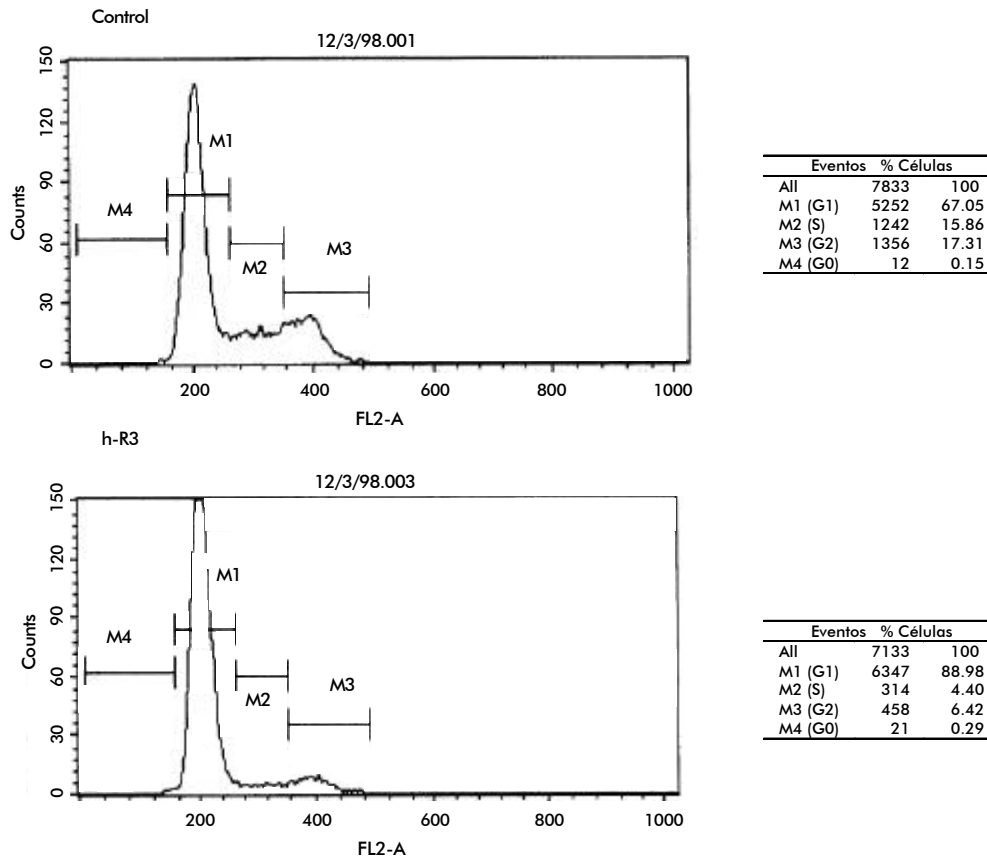


Figura 2. El análisis del ADN por citometría de flujo evidenció arresto del ciclo celular en la fase G1, acompañado de una disminución en la fase S, en las células tratadas con el h-R3 en comparación con los controles, no tratados.

de los ratones que habían alcanzado remisión tumoral completa, se mantuvieron en observación para detectar la recurrencia tumoral. La recidiva tumoral ocurrió en todos los grupos de tratamiento. La frecuencia de recurrencia tumoral para los AcM C225, h-R3 y ior egf/r3 fue de 20, 40 y 80% para los ratones tratados con la dosis más baja (0,25 mg) de cada anticuerpo y de 25%, 25% y 80%, para el grupo de ratones que recibió la dosis alta de tratamiento.

Los ratones con recurrencias tumorales fueron tratados con la misma dosis y el mismo anticuerpo que habían recibido previamente. En general se observó que los tumores no respondieron en la misma medida que lo hicieron inicialmente y se establecieron 6 variantes resistentes derivadas de la línea parental A431 (R1-R6).

Para corroborar el origen común de las variantes resistentes y la línea A431 se realizó un análisis del ADN, demostrándose un patrón de bandas idéntico, lo que evidenció que las cepas resistentes no contenían células contaminantes murinas o humanas. Se seleccionaron 2 de las variantes resistentes, R1 y R5, para continuar el resto de los experimentos.

Las 2 líneas resistentes y la línea de carcinoma vulvar A431 ( $10^6$  células) fueron xenotransplantadas en ratones SCID, para evaluar la resistencia *in vivo* al tratamiento. El experimento comenzó cuando los tumores tenían un volumen de 200-300 mm<sup>3</sup>. Ambas cepas

resistentes mostraron un acelerado crecimiento *in vivo* y más aún, evidenciaron sensibilidad reducida al tratamiento con el AcM C225. En el día 45, todos los ratones xenotransplantados con la línea A431 y tratados con el AcM C225, habían alcanzado la remisión tumoral, mientras que los ratones transplantados con las cepas resistentes no respondieron a esta nueva ronda de tratamiento.

Para caracterizar las variantes resistentes se realizó la evaluación de la expresión de EGFR y HER 2 en las líneas resistentes en comparación con la parental. Para demostrar la funcionalidad del EGFR en estas líneas, se realizó la estimulación de las cepas resistentes y la parental con TGF alfa, que es uno de los principales ligandos del EGFR. Estos experimentos se realizaron utilizando técnicas de Western-Blot. La no-expresión de EGFR y HER2 o la no-funcionalidad del receptor, podrían explicar la aparición de resistencia a nuevas rondas de terapia. En estos ensayos, se demostró que no había una pérdida de la expresión de EGFR en las cepas resistentes y que mantenían intacta su capacidad de activación. El patrón de expresión similar del EGFR y su activación tras el estímulo con el ligando demostraron que los cambios en el estado del EGFR no eran los responsables del fenotipo resistente. Este resultado se reforzó tras el hallazgo de que las líneas resistentes mantuvieron la misma sensibilidad que la parental al tratamiento con C225 o con TGF alfa, en

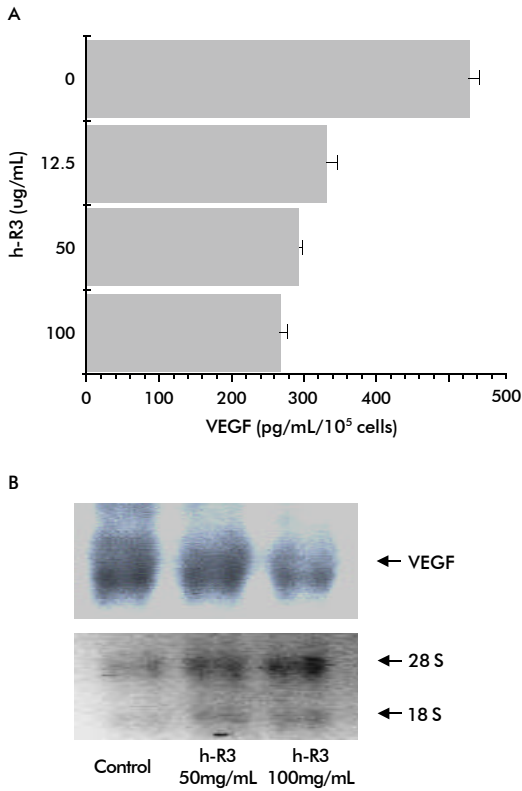


Figura 3. Inhibición dosis-dependiente de la producción de VEGF a nivel proteico (A) y a nivel de ARNm (B).

concentraciones no fisiológicas, inhibitorias, en condiciones de cultivo *in vitro*.

Al constatarse, resultados contradictorios *in vitro* e *in vivo*, en cuanto a la sensibilidad al tratamiento con 1 AcM anti EGFR, se evaluó la capacidad angiogénica de las variantes resistentes en comparación con la línea original. Una capacidad angiogénica alta de las cepas resistentes, podría explicar las discrepancias encontradas en cuanto a la sensibilidad *in vitro* e *in vivo*.

Para evaluar un aumento de la capacidad angiogénica, se midieron los niveles de VEGF, a nivel de ARN y a nivel proteico en las líneas resistentes en comparación con la línea A431. En este ensayo se demostró que las variantes resistentes expresaban al menos 2 veces más VEGF al nivel de ARNm y a nivel proteico. Las líneas resistentes mostraron una disminución de la síntesis de VEGF tras el tratamiento con un AcM anti-EGFR, pero aún así producían de 2 a 4 veces más VEGF que las parentales.

Luego de la demostración de la sobre-expresión de VEGF en las variantes resistentes, se decidió realizar una transfección del gen del VEGF en la línea A431 no modificada, para evaluar si efectivamente la sobre-expresión de VEGF podía explicar la elevada tumorigenicidad y resistencia a los AcM anti-EGFR. Se utilizó un vector de expresión que codificaba para la forma murina del VEGF<sub>164</sub>, equivalente a la isoforma humana del VEGF 165. Se transfectaron 3 clones, que producían entre 800 y 1200 pg/mL de VEGF. Estos clones mantuvieron la misma sensibili-

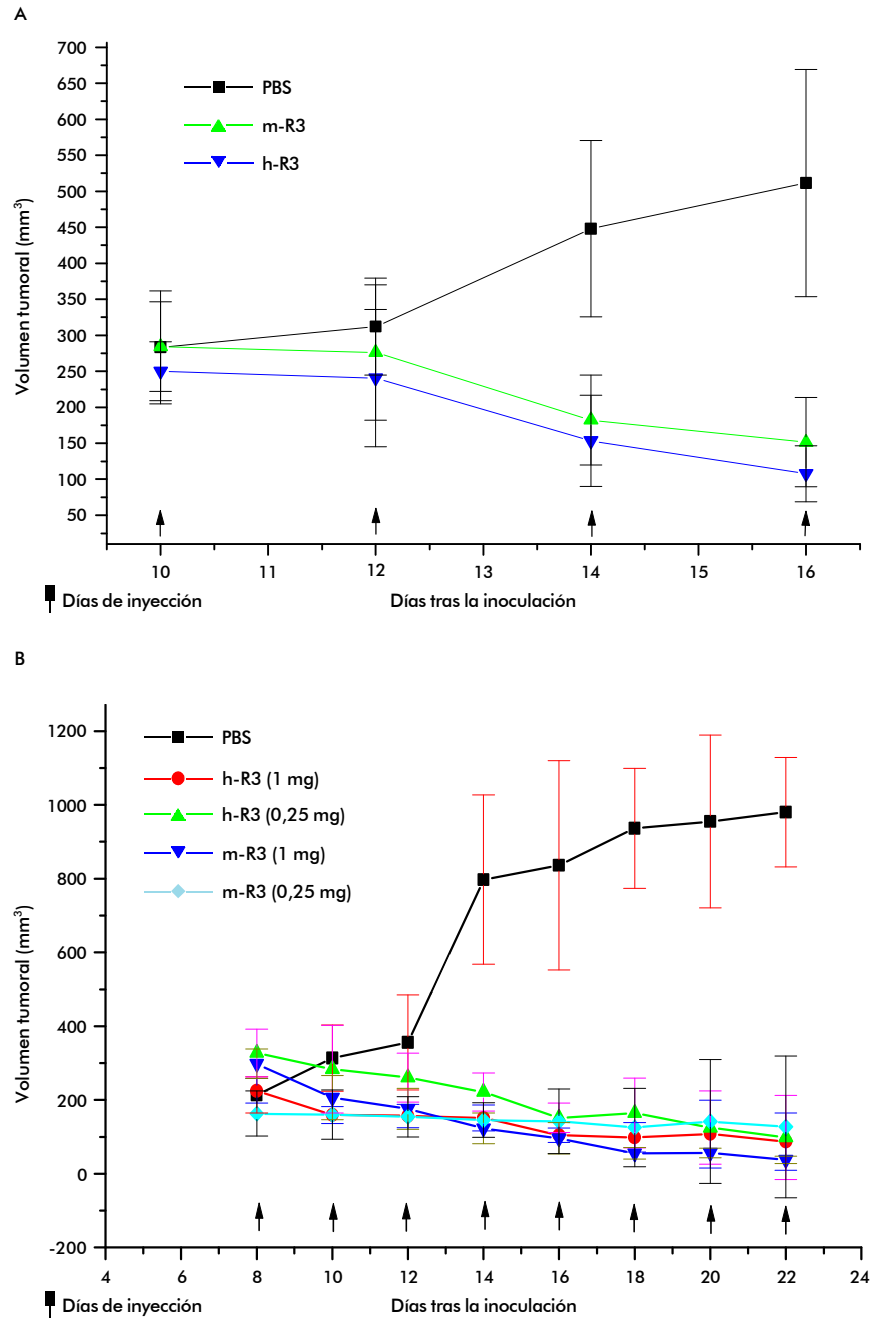


Figura 4. Actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales ior egf/r3 y h-R3 en ratones xenotransplantados con la línea A431. A. Experimento de corto curso. B. Experimento de largo curso.

dad *in vitro* a la inhibición por el AcM C225, pero *in vivo*, mostraron un crecimiento acelerado y una disminución de la respuesta al C225. Los clones transfectados mostraron una resistencia significativa al tratamiento. El clon transfectado con menor secreción de VEGF, secretaba una cantidad similar a los clones resistentes.

Uno de los hallazgos más importantes de estos experimentos, consiste en la no-detección de alguna alteración en la expresión y activación del EGFR en las variantes resistentes, que se estableció por

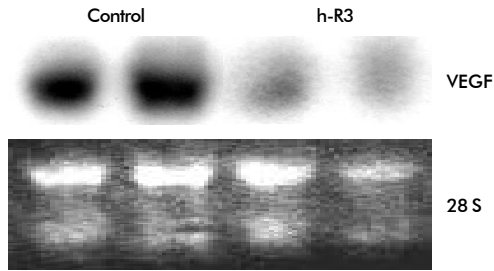


Figura 5. Inhibición dosis-dependiente de la producción de VEGF a nivel de ARNm en muestras de ratones tratados con el h-R3.

Western Blot y en la evaluación de la inhibición del crecimiento de las variantes resistentes tras el tratamiento con AcM anti EGFR. Se demostró que *in vitro* la línea parental y las resistentes tenían comportamiento idéntico en cuanto a la inhibición del crecimiento, y por tanto el fenotipo resistente se evidenció sólo *in vivo*.

Debido a la discrepancia *in vitro/in vivo* se evaluó la capacidad angiogénica de las variantes resistentes. Como marcador subrogado se evaluó la producción de VEGF a nivel proteico y a nivel de ARN. Se

encontró que las variantes resistentes expresaban un nivel significativamente mayor de VEGF. Para explicar los mecanismos que conducen a la elevación del VEGF, se postulan varias hipótesis: en primer lugar se sabe que algunos oncogenes, al activarse, regulan positivamente la producción de VEGF. Entre estos se encuentran: ras, src, y el erb2/neu. También se ha descrito que cuando se produce la inactivación o la mutación de algunos genes supresores tumorales tales como *p53*, *VHL*, o *PTEN*, se regula positivamente la producción de VEGF. Las cepas resistentes pueden sobre-expresar el VEGF como resultado de la selección de aquellas variantes que posean uno o más de estos cambios genéticos tras la terapia con anticuerpos anti-EGFR. Alternativamente, puede existir alguna aberración en la señalización de la cascada del EGFR relacionada con el VEGF. Los cambios pueden estar en la vía del fosfatidil-inositol 3'-kinase, o en la kinasa src o en la vía del ras. Cualquiera que sea el mecanismo, la magnitud del incremento en la producción de VEGF, puede incrementar significativamente la angiogénesis de las cepas resistentes.

Nuestros resultados demuestran que en principio, puede aparecer resistencia adquirida tras el uso de agentes anti-EGFR. Sin embargo, la extensión y la

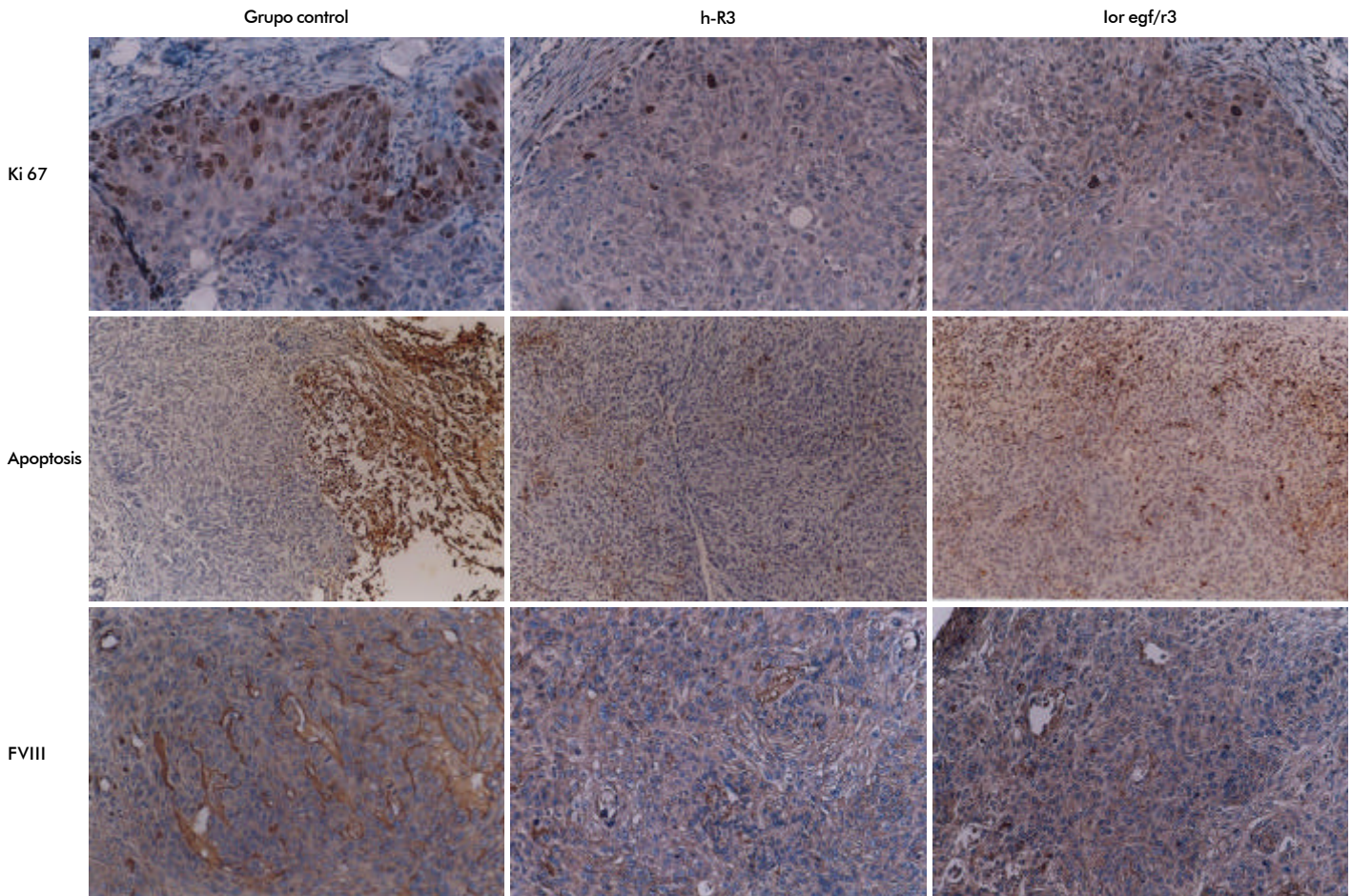


Figura 6. Actividad antiproliferativa, pro-apoptótica y anti-angiogénica de los AcM h-R3 e ior egf/r3 en tumores de ratones tratados en comparación con el grupo control.

frecuencia en que aparece la resistencia, muestran resultados alentadores para la clínica, principalmente porque estos agentes se usan mayormente como quimio o radiosensibilizadores, más que como drogas simples, no combinadas. Las bases de la resistencia parecen tener algún vínculo con la angiogénesis tumoral, y esta observación refuerza el posible vínculo entre la función de los oncogenes y la formación de vasos sanguíneos. Los mecanismos de resistencia de los tumores son pleiotrópicos para las clásicas drogas citotóxicas, y el comportamiento debe ser semejante para los inhibidores del EGFR. Será interesante testar otras líneas con sobre-expresión del EGFR para evaluar la posibilidad de la existencia de otros mecanismos de resistencia adquirida y evaluar la aparición de resistencia tras el uso de otros antagonistas del EGFR.

## 1. Resultados clínicos

### 1.1 Ensayo Clínico Fase I

El ensayo Fase I se realizó en los hospitales CIMEQ, "Hermanos Ameijeiras" y el Centro de Investigaciones Clínicas.

Se evaluó la toxicidad, farmacocinética, biodistribución e inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal anti-receptor de EGF, h-R3, en pacientes portadores de tumores de origen epitelial en estadios avanzados.

Se incluyeron 12 pacientes portadores de tumores avanzados, distribuidos en 4 grupos de tratamiento: 50, 100, 200 y 400 mg del AcM. Se seleccionaron pacientes que al momento de inclusión no tuvieran otra alternativa de terapia oncoespecífica

En cada inyección se administraron 3 mg del AcM h-R3, conjugado a un isótopo radiactivo, Tc99m, para facilitar los estudios de farmacocinética y biodistribución. Esta fracción del AcM marcado (fracción caliente) constituyó parte de la dosis total a administrar, para todos los niveles de dosis estudiados.

La administración del producto (mezcla del AcM h-R3 frío y caliente) se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Clínicas y posteriormente los pacientes permanecieron ingresados. El h-R3 fue administrado por vía endovenosa (vena antecubital), en 250 mL de solución salina en infusión rápida.

En el ensayo se incluyeron 12 pacientes con tumores epiteliales en estadios avanzados (11 mujeres y 1 hombre), en el Hospital Hermanos Ameijeiras y en el Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ). La edad promedio fue de 59,33 años [35-74]. Los tumores primarios correspondieron a las siguientes localizaciones: ovario (4 casos), mama (4 casos), pulmón (2 casos), estómago (1 caso) y riñón (1 caso).

Todos los sujetos del ensayo habían concluido el tratamiento oncoespecífico al menos 4 semanas antes de la inclusión.

Todos los pacientes cumplían los criterios de inclusión y no eran susceptibles de otra terapia oncoespecífica: 2 pacientes habían sido operados previamente, 2 habían recibido radioterapia, 1 paciente recibió solamente quimioterapia, 2 recibieron radioterapia combinada con quimioterapia, 2 pacientes recibieron cirugía combinada con quimioterapia, 1 paciente recibió cirugía más radioterapia, y en los 2

casos restantes se empleó la cirugía combinada con radio y quimioterapia (Tabla 1).

### Toxicidad

Siete de los 12 pacientes presentaron reacciones adversas. En todos los casos las reacciones adversas fueron leves o moderadas de acuerdo a la clasificación de la OMS. No se constataron reacciones adversas severas o muy severas. Todas las reacciones fueron reversibles (Tabla 1).

### Estudio de farmacocinética

Los valores de concentración del h-R3 en suero se relacionaron con los tiempos correspondientes para describir los perfiles farmacocinéticos, concentración versus tiempo. Dichos perfiles se ajustaron a un transcurso biexponencial, utilizando la aplicación Winnonlin, 1997 para estudios de farmacocinética. Tras el procesamiento de los datos se encontró que el AcM h-R3 tenía un tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) equivalente a 62,91 h, 82,60 h, 302,95 h y 304,51 h para las dosis de 50, 100, 200 y 400 mg, respectivamente. El área bajo la curva de concentración fue de 45 458, 145 931, 573 612 and 635 275 ng/mL/min y la máxima concentración alcanzada fue de 27 790, 36 612, 52 713, 57 117 ng/mL para los niveles de dosis de 50, 100, 200 y 400 mg, respectivamente. El volumen aparente del compartimento central fue de 2321,96, 2823,67, 4279,71 and 7173,99 mL y el aclaramiento fue de 1,08, 0,67, 0,34 and 0,76 mL/h/kg para los 4 niveles de dosis. No se encontraron diferencias significativas en los valores de aclaramiento para los 4 niveles de dosis ( $P=0,095$ , Prueba de Kruskal-Wallis).

El tiempo de vida media obtenido para las dosis de 200 y 400 mg (10-14 días), resultó significativamente mayor que el obtenido para el anticuerpo murino. Este prolongado tiempo de vida media facilita el uso en la clínica de este medicamento.

Los datos preliminares inducen a pensar que el h-R3 presenta un comportamiento farmacocinético no lineal. A valores crecientes del producto se obtiene un incremento del tiempo de vida medio de distribución, de eliminación y del volumen de distribución del estado estacionario. Así mismo concentraciones crecientes del h-R3 conducen a valores decrecientes del aclaramiento plasmático, hasta el nivel de dosis de 200 mg.

### Estudio de biodistribución

Para estimar la biodistribución del h-R3, los datos gammagráficos fueron colectados en una SOPHY CAMERA DS7 (400 mm FOV) de la firma SOPHA MEDICAL. Se realizaron previamente los controles de calidad necesarios para garantizar la exactitud de las mediciones. Se adquirieron imágenes a los 5 min, 1, 3, 5 y 24 horas después de la inyección empleando un colimador de agujeros paralelos-divergente para ampliar el campo de visión del detector. El tiempo promedio de duración de cada estudio fue de 20 min, en dependencia de la estatura del paciente, con una velocidad de traslación del soporte del detector de 20 cm/seg. Se empleó una ventana energética centrada en 140 keV con un ancho de 20%. Cada adquisición consistió en dos matrices de formato 2048 x 512 correspon-

dientes a las vistas anterior y posterior de cuerpo entero y se realizaron empleando la técnica de definición de contornos de este sistema.

Empleando una estación de procesamiento de SOPHY 20P y el software biodose se determinaron, a través del análisis visual de las imágenes, los órganos fuentes de ese radiofármaco y los porcentajes de acúmulo del  $^{99m}\text{Tc}$  h-R3 en los mismos.

El análisis cualitativo de las imágenes de cuerpo entero evidenció la existencia de cinco órganos fuente para el anticuerpo monoclonal h-R3 en las dosis estudiadas: corazón, hígado, riñones, bazo y vejiga urinaria (Figura 7).

Los datos de la biodistribución del h-R3- $^{99m}\text{Tc}$  se reportan en forma de porcentaje de la dosis inyectada para cada nivel de dosis en los órganos fuente, en 2 de los tiempos estudiados (Tabla 2).

Para todos los niveles de dosis, el órgano que mostró la mayor captación del h-R3 fue el hígado. Este elevado acúmulo del AcM gía y Radiobiología (I.N.O.R). La edad promedio fue de 62,21 años [47-78] (Tabla 3).

#### Reacciones adversas

Ocho de los 14 pacientes (57,1%) presentaron reacciones adversas que fueron clasificadas, según la tabla de la OMS de leves a moderados (grado 1 y grado 2) a excepción del paciente 12, donde se reportó una reacción adversa severa (grado 3). No hubo evidencias de reacciones adversas muy severas (grado 4). Las reacciones adversas más frecuentes fueron: fiebre (7 pacientes), seguida por temblores (5 pacientes), hipotensión arterial (4 pacientes) y cefalea (4

pacientes). Hubo otras reacciones adversas menos frecuentes como: somnolencia (2 pacientes), desorientación en tiempo, espacio y persona (2 pacientes), mialgias (2 pacientes), disfasia motora (1 paciente) y por último, lenguaje incoherente (1 paciente) (Tabla 4).

En general, todos los eventos adversos aparecieron entre 1 y 24 horas después de administrado el monoclonal, y su duración se mantuvo entre 15 minutos y 72 horas. Todas las reacciones adversas fueron totalmente reversibles, algunas de forma espontánea y otras bajo la administración de anti-histamínicos y antipiréticos.

#### Evaluación de la respuesta

Se evaluó la respuesta antitumoral, una vez concluido el tratamiento, y luego mensualmente, en 12 de los 14 pacientes incluidos. La respuesta fue clasificada en remisión completa, remisión parcial, estabilización, o progresión de acuerdo a la escala de respuesta de la OMS. La evaluación de la respuesta se mantiene aún, para definir el intervalo libre de enfermedad y el tiempo a la progresión.

Al finalizar el tratamiento se obtuvo respuesta objetiva en 8 pacientes (6 remisiones completas y 2 remisiones parciales), las remisiones completas aparecieron en los 4 niveles de dosis: 50 mg (1 paciente), 100 mg (1 paciente), 200 mg (2 pacientes) y 400 mg (2 pacientes). Los pacientes con remisión parcial pertenecieron a los niveles de 50 y 100 mg. La respuesta se evaluó como enfermedad estable en 3 pacientes, correspondientes a los niveles de dosis de 50 mg, 200 mg y 400 mg. En 1 paciente del segundo

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes incluidos en el ensayo Fase I y eventos adversos tras la administración del AcM h-R3.

Número	Dosis	Sexo	Edad	Diagnóstico de entrada	Etapas	Tratamiento previo	Eventos Adversos	Severidad de la reacción
01	50 mg	F	35	Carcinoma de ovario	IV	Quimioterapia	Náuseas y vómitos.	Grado I
02	50 mg	F	50	Carcinoma de ovario	IV	Cirugía Quimioterapia	Febrícula (37,5 °C). Temblores. Sequedad bucal.	Grado I
03	50 mg	M	53	Carcinoma epidermoide de pulmón	III	Radioterapia Quimioterapia	Febrícula (37 °C). Enrojecimiento facial	Grado I
04	100 mg	F	68	Adenocarcinoma estómago	IV	Cirugía	Temblores	Grado II
05	100 mg	F	58	Carcinoma ductal infiltrante de la mama	IV	Radioterapia Quimioterapia	Temblores, Debilidad en los miembros inferiores Dolor torácico	Grado I
06	100 mg	F	66	Carcinoma ductal infiltrante de la mama	IV	Cirugía	No	No
07	200 mg	F	65	Carcinoma de ovario	IV	Cirugía Radioterapia Quimioterapia	No	No
08	200 mg	F	68	Carcinoma ductal infiltrante de la mama	IV	Radioterapia	No	No
09	200 mg	F	55	Carcinoma epidermoide de pulmón	IV	Radioterapia	No	No
10	400 mg	F	74	Carcinoma de ovario	III	Cirugía Radioterapia	Temblores Cianosis peribucal	Grado II
11	400 mg	F	58	Carcinoma renal	IV	Cirugía Quimioterapia	Temblores, hipertensión	Grado II
12	400 mg	F	62	Carcinoma ductal infiltrante de la mama	IV	Cirugía Quimioterapia Radioterapia	No	No

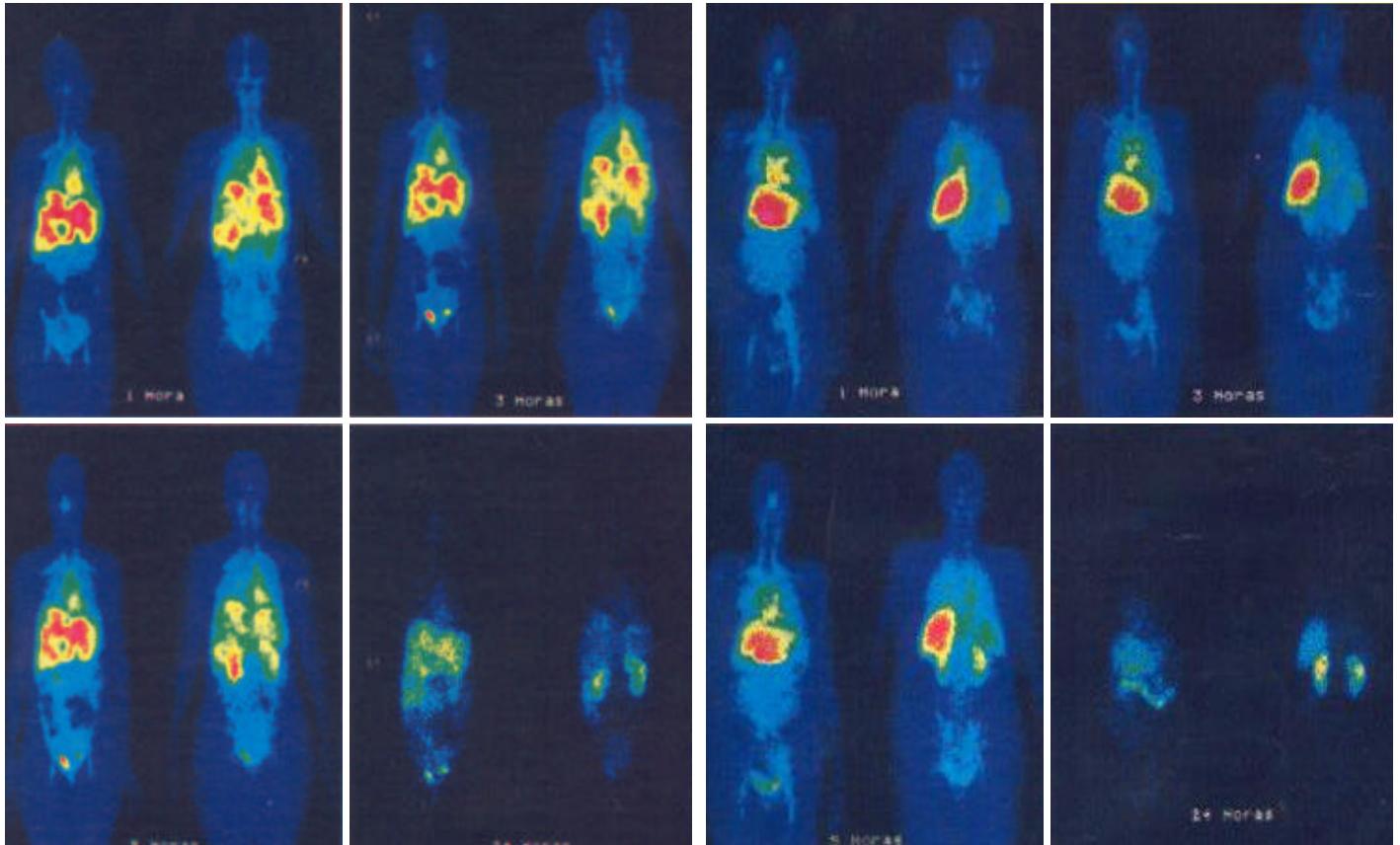


Figura 7. Estudio de Biodistribución en 2 pacientes. Se observan acumulación del AcM h-R3 en 5 órganos fuentes (corazón, hígado, bazo, vejiga y riñones). Se observa captación positiva del AcM en lesiones tumorales.

nivel de dosis se constató progresión. En uno de los pacientes que alcanzó enfermedad estable, se realizó la resección quirúrgica del tumor residual, alcanzando finalmente la remisión tumoral completa (Paciente 8, 200 mg) (Tabla 5).

Al finalizar el ensayo se alcanzó regresión tumoral completa en 7 pacientes de los 12 pacientes evaluables (58,8%). El índice histórico de respuesta completa a la terapia radiante convencional es de 25-30%, por lo que el uso del AcM h-R3, duplicó el porcentaje de respuesta antitumoral que se alcanza con la terapia convencional (Tabla 5).

La mejor respuesta terapéutica se obtuvo en los mayores niveles de dosis (200 y 400 mg), obteniéndose

66,6% de respuesta completa a diferencia de los niveles más bajos donde solo se obtuvo 33,3% de respuesta.

#### Resultados respuesta anti-idiotípica

La respuesta anti-idiotípica fue evaluada en los 14 pacientes tratados. En 1 paciente se constató respuesta inmunológica contra el AcM h-R3. Este paciente correspondía al último nivel de dosis (paciente 11).

#### Resultados de inmunohistoquímica

Se realizaron estudios de Inmunohistoquímica en 11 de los 12 pacientes evaluables con el objetivo de determinar los mecanismos por los cuales el AcM ejerce su efecto antitumoral.

Antes de ser administrado el AcM, en todos los pacientes se constató una sobre-expresión del EGFR, siendo este uno de los criterios de inclusión en el estudio.

En los estudios de las biopsias pareadas de los pacientes antes y después del tratamiento, por técnicas de Inmunohistoquímica, se constató disminución de la angiogénesis, de la actividad proliferativa, así como inducción de apoptosis en los tumores de los pacientes post-tratamiento (Figura 8).

#### 1.3 Ensayo clínico de extensión

En este ensayo nos propusimos comparar la eficacia terapéutica de la combinación del h-R3 más radiote-

Tabla 2. Datos de Biodistribución (Porcentaje de la dosis inyectada) 1 h y 24 h después de la administración del AcM h-R3.

Órgano fuente	Tiempo	% de la dosis inyectada			
		50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
Corazón	1 hr	4.76	5.84	3.61	4.07
	24 hr	1.12	1.98	1.71	1.94
Hígado	1 hr	24.76	11.79	9.88	10.58
	24 hr	12.78	10.35	5.57	5.98
Bazo	1 hr	0.96	1.74	1.58	1.33
	24 hr	0.27	1.03	0.80	0.69
Riñones	1 hr	2.66	2.46	2.49	3.04
	24 hr	11.02	5.94	8.82	8.62
Vejiga	1 hr	1.37	25.21	4.21	3.29
	24 hr	0.92	4.34	2.16	3.04

Tabla 3. Características demográficas de los pacientes incluidos en el ensayo Fase I/II

Identificación del paciente	Edad	Sexo	Etapa	Localización de tumor primario	Tipo Histológico
01	57	M	IV	Espacio retromolar	C.E.M.D
02	64	M	IV	Base de lengua	C.E.M.D
03	58	M	III	Base de lengua	C.E.M.D
04	78	F	IV	Base de lengua	C.E.M.D
05	59	M	IV	Encía inferior	C.E.B.D
06	63	M	IV	Carrillo derecho	C.E.B.D
07	57	M	IV	Base de lengua	C.E.B.D
08	62	M	IV	Espacio retromolar	C.E.B.D
09	47	F	IV	Amígdala izquierda	C.E.M.D
10	69	M	IV	Espacio retromolar	C.E.B.D
11	57	M	IV	Amígdala derecha	C.E.M.D
12	72	M	IV	Espacio retromolar	C.E.P.D
13	69	M	III	Suelo de boca	C.E.M.D
14	59	F	IV	Amígdala izquierda	C.E.M.D

Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado: CEMD

Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado: CEPD

Carcinoma epidermoide bien diferenciado:CEBD

Tabla 4: Eventos adversos tras la administración del AcM h-R3 en dosis múltiples en el ensayo Fase I/II.

Identificación del paciente	Nivel de dosis	Eventos Adversos	Severidad según OMS	Tratamiento	No. Ciclo AcM
01	50	No	No	No	No
02	50	No	No	No	No
03	50	No	No	No	No
04	100	Fiebre	1	No	1
		Hipotensión Arterial	1	No	1
05	100	Fiebre	1	No	1
06	100	No	No	No	No
07	200	Fiebre	2	Paracetamol	4
		Temblor	2	Dipirona y benadrilina	4
		Mialgia	1	No	6
08	200	Hipotensión Arterial	1	No	3
		Fiebre	2	Benadrilina IM	5
		Temblor	1	No	5
		Mialgia	2	No	5
		Cefalea	2	No	5
		Somnolencia	1	Benadrilina IM	5
		Desorientación	2	Benadrilina IM	5
		Disfasia motora	2	Benadrilina IM	5
09	200	No	No	No	No
10	400	Fiebre	2	Paracetamol	2
			2	Dipirona y benadrilina	3
		Temblor	2	Paracetamol	2
			2	Dipirona y benadrilina	3
		Cefalea	2	No	2
			2	Dipirona y benadrilina	3
		Mialgia	2	No	4
11	400	Fiebre	2	Dipirona y benadrilina	1
		Temblor	2	Dipirona y benadrilina	1
		Cefalea	2	No	1
		Hipotensión Arterial	2	No	1
12	400	Fiebre	2	Dipirona y benadrilina	1
		Temblor	2	Dipirona y benadrilina	1
		Somnolencia	3	No	1
		Mialgias	2	No	1
		Cefalea	2	Dipirona y benadrilina	1
		Desorientación	2	No	1
		Hipotensión Arterial	2	No	1
		Lenguaje incoherente	2	No	1
13	400	No	No	No	No
14	100	Hipotensión	2	No	1

Tabla 5. Evaluación de la respuesta en pacientes tratados con el AcM h-R3 y RTP en el ensayo clínico Fase I/II.

Pcte	Nivel de dosis	Localización del tumor primario	Mejor respuesta terapéutica	Sobrevida (meses)
1	50 mg	Espacio retromolar	RC	8.6
2	50 mg	Base de lengua	EE	4
3	50 mg	Base de lengua	RP	8.86
5	100 mg	Encía inferior	P	7.23
6	100 mg	Mucosa oral	RP	11.56
7	200 mg	Base de lengua	RC	30.6*
8	200 mg	Espacio retromolar	EE/RC	10.13
9	200 mg	Amígdala	RC	30.43*
10	400 mg	Amígdala	RC	29.63*
11	400 mg	Amígdala	RC	29.36*
13	400 mg	Base de lengua	EE	4.8
14	100 mg	Base de lengua y amígdala	RC	24.6*

RC- Remisión Completa

EE: Enfermedad Estable

NE: No evaluable

RP- Remisión Parcial

P: Progresión Tumora

rapia, en las 2 dosis donde se encontraron las mayores evidencias de eficacia terapéutica en el ensayo clínico previo.

Se incluyeron 10 pacientes, todos del sexo masculino que eran portadores de tumores de origen epitelial en estadios avanzados. La edad promedio fue de 52 años [45-68]. Todos los pacientes cumplían los crite-

rios de inclusión y eran susceptibles de recibir tratamiento radiante al momento del diagnóstico.

Tres pacientes se encontraban en etapa III y 7 en estadio IV al momento de la inclusión en el ensayo (Tabla 6).

#### Reacciones adversas

Nueve de los 10 pacientes (90%) presentaron reacciones adversas de atribución definitiva, probable o posible al AcM que fueron clasificadas de acuerdo a la tabla de Criterios Comunes de Toxicidad como leves a moderados. No hubo evidencias de reacciones adversas muy severas.

Las reacciones adversas fueron: temblores (5 pacientes), cefalea (1 paciente), fiebre (1 paciente), hematuria (2 pacientes), escalofríos (1 paciente), vómitos (1 paciente), anemia (3 pacientes), aumento de creatinina (1 paciente), hipotensión (1 paciente), leucopenia (1 paciente), hematuria (1 paciente) (Tabla 7).

Todas las reacciones adversas fueron totalmente reversibles, de forma espontánea o con la administración de anti-histamínicos y antipiréticos.

#### Evaluación de la respuesta

Se evaluó la respuesta antitumoral, una vez concluido el tratamiento. La respuesta fue clasificada en remisión completa, remisión parcial, estabilización, o progresión de acuerdo a los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST).

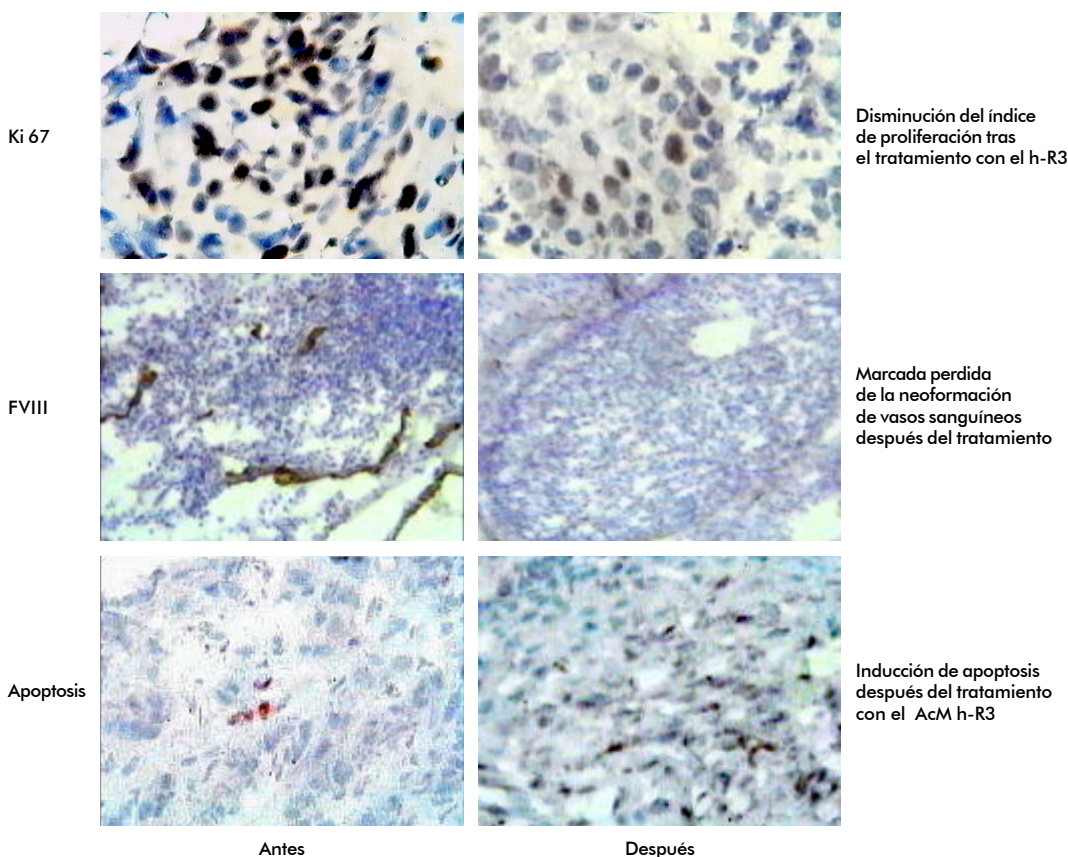


Figura 8. Estudios de Inmunohistoquímica en biopsias de pacientes tratados.



Tabla 6. Características demográficas de los pacientes incluidos en el ensayo de extensión.

Identificación del paciente		Edad	Sexo	Etapa	Localización de tumor primario	Tipo Histológico
JFD	01	45	M	III	Amígdala Izquierda	CEMD
PRM	02	68	M	IV	Espacio Retromolar Izquierdo	CEMD
ECG	03	67	M	III	Mesofaringe	CEMD
RRG	04	68	M	IV	Mesofaringe Izquierda	CEBD
UCC	05	67	M	IV	Amígdala Derecha	CEBD
LDC	06	45	M	IV	Amígdala Izquierda, Pilares, Base Lengua	CEPD
FRF	07	54	M	IV	Fosa Amigdalina Derecha	CI
PFI	08	56	M	III	Hemibase de lengua Izquierda	CEMD
JBL	09	64	M	IV	Mesofaringe, Paladar blando y úvula	CEMD
NBM	10	52	M	IV	Mesofaringe derecha., amígdala, pilares, hemipaladar blando	CEPD

Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado: CEMD

Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado: CEPD

Carcinoma epidermoide bien diferenciado:CEBD

Carcinoma indiferenciado

Tabla 7. Eventos adversos tras la administración del AcM h-R3 en dosis múltiples en el ensayo de extensión

Paciente	No	Nivel de dosis /mg	Eventos Adversos	Fecha de aparición	Severidad según CTC	Tratamiento	No de administración AcM
JFD	01	200 mg	No				
PRM	02	200 mg	Temblores	08/12/00	1	Dipirona 600mg, Benadriлина 20mg	1
			Temblores	02/02/01	1		5
			Cefalea	02/02/01	1	Dipirona 600mg, Benadriлина 20mg	5
ECG	03	200 mg	Temblores	14/12/00	1	Dipirona 600mg, Benadriлина 20mg	1
RRG	04	200 mg	Temblores	15/02/01	1	Dipirona 600mg Benadriлина 20mg	5
UCC	05	200 mg	Fiebre	15/02/01	1	Benadriлина 20mg	5
			Hematuria	26/02/01	1	No	3
LDC	06	400 mg	Escalofríos	15/02/01	1	No	1
			Elevación TGP	26/02/01	1	No	3
			Escalofríos	01/03/01	1	Dipirona 600mg, Benadriлина 20mg	3
FRF	07	400 mg	Vómitos	01/03/01	1	No	3
			Temblores	02/03/01	1	Dipirona 600mg y benadriлина 20mg	2
			Anemia	27/03/01	1	No	4
			Temblores	30/03/01	1	Dipirona 600mg y Benadriлина 20mg	4
			Anemia	10/04/01	2	No	5
			Aumento creatinina	10/04/01	1	No	5
			Hematuria	10/04/01	1	No	5
PFI	08	400 mg	Anemia	19/03/01	1	Vit B12-B6	3
			Disminución proteínas totales	19/03/01	0	Vit B12-B6	3
			Leucocitosis	05/04/01	0	No	3
JBL	09	400 mg	Hipotensión	17/03/01	1	No	3
			Hipotensión	30/03/01	1	No	5
NBM	10	400 mg	Anemia	13/04/01	2	No	3
			Leucopenia	27/04/01	0	No	4

Al finalizar el tratamiento se obtuvo respuesta objetiva en 9 pacientes: 6 remisiones completas y 3 remisiones parciales. En 1 paciente del primer nivel de dosis se constató progresión. El porcentaje de respuestas completas fue del 60% (Tabla 8).

Si consideramos los 2 ensayos juntos, en 18 de los 22 pacientes evaluables (81,8%) se obtuvo respuesta

objetiva antitumoral (remisión parcial más remisión completa). En 13 pacientes, la respuesta fue completa (59%). La adición del AcM h-R3 a la radioterapia convencional, incrementó de forma significativa el porcentaje de respuesta antitumoral.

La respuesta constatada es de larga duración, pues 10 de los 13 pacientes que alcanzaron la remisión

Tabla 8. Evaluación de la respuesta en pacientes tratados con el AcM h-R3 y RTP en el ensayo clínico Fase I/II.

Paciente	Nivel de dosis	Localización del tumor primario	Best Response	Survival (mo)
1	200 mg	Amígdala	RC	17.9*
2	200 mg	Espacio retromolar	P	5.86
3	200 mg	Pared faríngea posterior	RC	17.13*
4	200 mg	Pared faríngea	RC	15.9*
5	200 mg	Amígdala	RP	6.66
6	400 mg	Amígdala y base de lengua	RC	15.13*
7	400 mg	Amígdala	RC	5.33
8	400 mg	Base de lengua	RP	6.33
9	400 mg	Paladar blando	RC	15*
10	400 mg	Amígdala y paladar blando	RP	5.73

RC- Remisión Completa

EE: Enfermedad Estable

NE: No evaluable

RP- Remisión Parcial

P: Progresión Tumoral

tumoral completa se mantienen libres de enfermedad tras un tiempo de seguimiento entre 15 y 30 meses.

En Cuba, el cáncer es la segunda causa de muerte para todos los grupos de edad desde el año 1958. Anualmente, se diagnostican entre 20 000 y 25 000 casos nuevos de cáncer y fallecen entre 13 000 y 14 000 personas por esta causa.

El anticuerpo h-R3 le aporta a Cuba y al mundo, una molécula capaz de mejorar los tratamientos actuales de pacientes con tumores de origen epitelial que tienen una alta expresión de receptor de EGF, entre los que se encuentran las principales localizaciones tumorales como el cáncer de pulmón, el cáncer de colon, el cáncer de próstata, el cáncer cérvico-uterino, los tumores de cabeza y cuello, el cáncer de mama, así como otras localizaciones tumorales como los gliomas y los carcinomas renal, pancreático y de vejiga, entre otros.

Según cálculos conservadores, más de 1000 pacientes se beneficiarían anualmente con la disponibilidad del uso de este medicamento, lo que permitiría reducir en gran escala la mortalidad por cáncer en Cuba e incorporar a la vida social de nuestro país, a un gran grupo de pacientes que de otra forma no tendrían esa posibilidad.

En pacientes portadores de tumores avanzados de cabeza y cuello, este nuevo medicamento duplica la respuesta objetiva antitumoral a la Radioterapia, que constituye la terapia estándar para este estadio de la enfermedad, incrementándose el índice de respuestas completas de 30 a 60%.

El anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 muestra un alto perfil de seguridad en el tratamiento de los pacientes, siendo muy bien tolerado en comparación con otras terapias oncoespecíficas y en comparación con las otras drogas que tienen como blanco al EGFR.

Esta propiedad del producto de ser no tóxico por los pacientes, unido a su alta efectividad en el logro de respuesta antitumoral objetiva (respuestas completas y parciales) que no pueden ser logrados con otro tipo de tratamiento, hacen que el uso del anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 tenga un gran impacto en el

tratamiento de los pacientes que sufren de estas enfermedades malignas en Cuba y el mundo.

Actualmente, en Cuba se encuentra en curso el ensayo Fase II en pacientes con neoplasias de cabeza y cuello, donde se evalúa la eficacia terapéutica del h-R3 en combinación con Radioterapia, en comparación con un control concurrente consistente en la terapia radiante sola.

Adicionalmente, se ejecuta un ensayo Fase I/II, donde se evalúa la eficacia del AcM h-R3 como tratamiento a pacientes portadores de tumores astrocíticos grado III y IV.

En otros países han comenzado ensayos clínicos con el nuevo medicamento cubano.

El R3 humanizado como nueva droga anti-tumoral debe mejorar la calidad y esperanza de vida de pacientes con tumores de origen epitelial.

Sólo existe 1 anticuerpo neutralizante del EGFR que se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos. El C225, desarrollado por Imclone Systems Inc., NY, es un anticuerpo quimérico con afinidad similar al h-R3, sin embargo resulta más tóxico y más inmunogénico que el hR3, ya que contiene un 30% de secuencias de ratón, mientras que el h-R3 sólo contiene menos del 10%. El AcM C225 ha mostrado una severa toxicidad en piel en los ensayos clínicos realizados, lo que no ha ocurrido con el hR3, ni en Cuba ni en Canadá, lo que confiere ventajas farmacológicas a nuestro producto.

## Conclusiones

1. El AcM humanizado anti-EGFR h-R3 es una nueva molécula que tiene actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* en la línea de carcinoma vulvar A431. El efecto antitumoral puede atribuirse a la inhibición de la proliferación, de la formación de vasos sanguíneos y a la inducción de apoptosis.

2. Se induce resistencia *in vivo* al uso de anticuerpos bloqueadores del EGFR. La resistencia puede estar relacionada con la selección de subpoblaciones con elevado potencial angiogénico.

3. El AcM h-R3 fue bien tolerado cuando se administró en simple o múltiples dosis en combinación con

Radioterapia. No se constató respuesta inmune contra el AcM humanizado.

4. Se detectaron 5 órganos fuente en los estudios de Biodistribución. El hígado constituyó el órgano de mayor captación del AcM h-R3.

5. El análisis de Farmacocinética evidenció un comportamiento no lineal del AcM h-R3. El tiempo de vida media a las dosis terapéuticas (200–400 mg) se encuentra entre 10-14 días.

6. El porcentaje de respuesta histórico a la Radioterapia se incrementó de forma significativa con el uso del AcM h-R3. Se constató respuesta objetiva antitumoral en 18 de 22 pacientes evaluables (83%). En 13 pacientes (59%) se constató remisión tumoral completa.

7. La respuesta antitumoral observada en pacientes puede atribuirse al efecto antiproliferativo, antiangiogénico y pro-apoptótico del AcM.

## Colaboradores

Leonel Torres Aroche, Elia Neninger Vinageras, Mauricio Catalá Fernández, María E Solano, Alejandro Perera Pintado, Normando Iznaga Escobar, Olga Torres Gemeil, Carlos Roca Machali, Ramón del Castillo, Cristina Mateo de Acosta del Río, Adolfo Castillo Vitloch, Mayra Ramos Suzarte, Angel Casacó Parada, Gryssell Maria Rodriguez Martinez, Olga M. Morejón Zayas, Suhamy Atencio Acosta, Teresita Rodríguez Obaya, Niubis M. Pérez Pérez, Sergio Catá Murguido.

- Schantz SP; Yu GP Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002 Mar; 128(3):268-74
- Mortalidad por algunos tumores malignos. Anuario estadístico en Cuba, 2000.
- Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD et al. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology* 1991; 23(3):189-94.
- Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T et al. Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1992; 14(1):8-13.
- Shin DM, Donato NJ, Perez-Soler R et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy with C225 and cisplatin in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(5):1204-12
- Robert F; Ezekiel MP; Spencer SA; Meredith RF; Bonner JA; Khazaeli MB; Saleh MN; Carey D; Lo Buglio AF; Wheeler RH; Cooper MR; Waksal HW. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001 Jul 1; 19(13):3234-43
- Parries G; Chen K; Misono KS; Cohen S. The human urinary epidermal growth factor (EGF) precursor. Isolation of a biologically active 160-kilodalton heparin-binding pro-EGF with a truncated carboxyl terminus. *J Biol Chem* 1995; 270(46):27954-60
- Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19(56):6550-65.
- Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7(10):2958-70.
- Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol* 2001; 13(6):506-13.
- Brabender J, Danenberg KD, Metzger R et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res* 2001; 7(7):1850-5.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4:9-15.
- Feldkamp MM, Lau N, Guha A. Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44: 157-164.
- Libermann TA, Razon N, Bartal AD et al. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 1984; 44:753-60.
- Alper O, Bergmann-Leitner ES, Bennett TA et al. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *J Natl Cancer Ins* 2001; 93(18):1375-84.
- Narita T; Taga T; Sugita K; Nakazawa S; Ohta S The autocrine loop of epidermal growth factor receptor-epidermal growth factor / transforming growth factor-alpha in malignant rhabdoid tumor cell lines: heterogeneity of autocrine mechanism in TTC549. *Jpn J Cancer Res* 2001; 2(3):269-78.
- Fernández A, Pérez R, Macías A et al. Generation and characterization of anti-EGFR antibodies. *Interferon y Biotecnología* 1998; 6: 289-298.
- Fernández A, Spitzer E, Pérez R et al. A new monoclonal antibody for detection of the EGFR in Western Blot and paraffin embedded tissue sections. *J of Cell Biochem* 1992; 49:157-165.
- Ramos-Suzarte M, Rodríguez N, Oliva JP et al. 99mTc-labeled antihuman epidermal growth factor receptor antibody in patients with tumors of epithelial origin: Part III. Clinical trials safety and diagnostic efficacy. *J Nucl Med* 1999; 40(5):768-75.
- Crombet T, Torres O, Neninger E et al. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16(1):93-102.
- Crombet T, Torres O, Rodríguez V et al. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor in advanced brain tumor patients: preliminary study. *Hybridoma* 2001; 20(2):131-6.
- 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(1):71-81.
- Stone MJ Monoclonal antibodies in the prehybridoma era: a brief historical perspective and personal reminiscence. *Clin Lymphoma* 2001; 2(3):148-54.