

## COMUNICACION CORTA

# Farmacocinética y biodistribución del AcM $^{125}\text{I}$ -ior t1, marcado por el método de iodogen, en ratas y conejos

Alexander Montenegro, Francisco Zayas,\* Eduardo Fernández, Osmar E. Fernández, Daniel Alvarez, Jorge Ducongé, Julia Piedra\* y Orlando Peña.\*\*

Laboratorio de Farmacocinética, Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, San Lázaro y L, Código Postal 10400. \*Instituto de Nefrología, \*\*Centro de Inmunología Molecular, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de junio de 1997. Aceptado: 27 de abril de 1998.

Palabras clave: farmacocinética, biodistribución, anticuerpo monoclonal, iodogen.  
Key words: pharmacokinetics, biodistribution, monoclonal antibody, iodogen.

La iodación de un anticuerpo monoclonal (AcM) involucra la sustitución de uno o más átomos naturales de la molécula en estudio por uno de yodo, de una abundancia menos común. En los estudios de la farmacocinética y biodistribución de AcM, estas consideraciones no pueden ser olvidadas, pues el isótopo, el método de marcaje y los resultados particulares del radiomarcaje aplicado son fundamentales para la correcta comprensión y evaluación de los resultados del ensayo.<sup>1,2</sup>

Para estudiar la farmacocinética y biodistribución en ratas del AcM ior t1, se marcó previamente con  $^{125}\text{I}$ . Para validar el empleo de la entidad marcada se necesitaba comparar su farmacocinética con la de la molécula sin marcar. Esta validación fue realizada en conejos debido a la no posesión de un método específico para realizar la determinación del ior t1 no marcado en ratas. Se comenzó por marcar con cloramina T al AcM ior t1, siguiendo un protocolo establecido, lo que acarrió una drástica disminución de la inmunoreactividad. Lo anterior condujo al empleo de una metodología de marcaje menos agresiva, como la del monoclóruo. Este último método tampoco resultó satisfactorio por baja estabilidad del marcaje.

El objetivo de este trabajo fue determinar por el método del iodogen, la posible influencia de la radioiodación en la farmacocinética del ior t1 en conejos y definir la farma-

cocinética, así como la biodistribución de ese anticuerpo monoclonal en ratas.

## Radioiodación del ior t1

El ior t1, una  $\text{IgG}_{2a}$  anti-CD6, (Centro de Inmunología Molecular, Ciudad de La Habana) fue marcado con  $^{125}\text{I}$  por una variante del método del iodogen (IG) en que se adicionaron 100  $\mu\text{g}$  de ior t1, disueltos en PBS, pH 7,4, a un vial de reacción que contenía 12  $\mu\text{g}$  de iodogen (Pierce, London). Se empleó  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (Amersham) para el marcaje. La proteína marcada se separó del isótopo libre y de las impurezas de bajo peso molecular mediante una columna Sephadex [G 50 fine (40x1) cm], usando como estabilizador de corrida la glicina al 0,2 mol/L; pH 8,8. La radioactividad asociada a la proteína de interés y la radiólisis del producto marcado se determinaron por cromatografía de papel ascendente, empleando como disolvente el TCA 10 %.

## Determinación de la inmunoreactividad

Se determinó la inmunoreactividad a partir de muestras de las fracciones radiomarcadas de interés las que se incubaron a temperatura ambiente con linfocitos T humanos. Se determinó la radioactividad total y la del precipitado, después de centrifugar la muestra y a partir de ellas, se calculó el porcentaje de inmunoreactividad. Las uniones no específicas se estudiaron frente a eritrocitos humanos, según el procedimiento descrito anteriormente.

## Estudio de la farmacocinética y biodistribución del $^{125}\text{I}$ -ior t1 en ratas

Se emplearon ratas Wistar machos (Centro Nacional de Producción de Animales para Laboratorio (CENPALAB), Ciudad de La Habana). Se administró una dosis de 600 mg del AcM por la vena de la cola y la sangre se extrajo por la cava abdominal. El perfil farmacocinético en suero se ajustó por programas de regresión utilizando la programateca pKcalc.<sup>3</sup> Para la selección de la ecuación multiexponencial que describe mejor el curso temporal de las concentraciones séricas del fármaco, se aplicaron los criterios de Akaike y Schwartz.<sup>4</sup>

A partir del modelo seleccionado, se calcularon los parámetros farmacocinéticos característicos respecto a su modelo dependencia.<sup>5</sup> Los órganos para el estudio de biodistribución se extrajeron y perfundieron con disolución salina en los instantes posteriores a la administración intravenosa: 1, 4, 12, 24 y 48 h.

## Ensayo farmacocinético en conejos

Se utilizaron conejos machos de la estirpe F1 (CENPALAB). Se administraron 2 mg del AcM por la vena lateral de la oreja y la sangre se extrajo por incisión de esa misma vena, pero de la oreja contraria. Se compararon los parámetros farmacocinéticos obtenidos por el ELISA con respecto al método radioquímico mediante la prueba t de Student, con un nivel de significación del 95 % ( $p < 0,05$ ).

Se comprobó la ocurrencia de un aumento de las áreas bajo la curva (AUC), así como de los tiempos de residencia media (MRT) y de vida media de eliminación beta, al compararse con los resultados reportados previamente para la farmacocinética después de marcado por cloramina T (Tabla 1).

Por otro lado, se observó una disminución del aclaramiento total, que concuerda con la idea de una eliminación más lenta de la radioactividad cuando se emplea el marcaje con iodogen. Los volúmenes de distribución del estado estacionario (Vss) y área (Vz) indicaron un posible aumento de la distribución con respecto al marcaje con cloramina T. Sin embargo, la biodistribución del <sup>125</sup>I-ior t1 (Tabla 2) no resultó mayor que la medida al emplear la cloramina T, lo que hizo suponer la no ocurrencia de un aumento en el paso del AcM a tejidos. Unido a esto, el mejor ajuste del perfil farmacocinético a una ecuación monoexponencial, es indicativo de que el ior t1 marcado por iodogen permanece fundamentalmente en circulación sistémica.

La caracterización del perfil farmacocinético medido en conejos resultó similar al medido en ratas. Los resultados se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental según los criterios de Akaike y Schwartz. El marcaje con iodogen mostró diferencias significativas con respecto a la farmacocinética en conejos del AcM sin marcar, dada fundamentalmente por una disminución de la eliminación, según el análisis por la prueba t de Student aplicado (Tabla 3). Este resultado corrobora que la iodación afecta el metabolismo propio de la molécula en estudio.

El lento descenso de las concentraciones séricas en el <sup>125</sup>I-ior t1 marcado con iodogen y su menor eliminación puede deberse a alguna unión inespecífica a componentes del torrente circulatorio, lo que está acorde también con el elevado valor del área bajo la curva, una biodistribución que no justifica el aumento del volumen de distribución y la notable disminución de la radioactividad detectada en el hígado. Motiva también la hipótesis anterior el mejor ajuste a un modelo monocompartimental en el marcaje por iodogen y el que hemos comprobado la unión inespecífica del <sup>125</sup>I-ior t1 a los glóbulos rojos humanos en ensayos *in vitro*.

Las diferencias con respecto al método de cloramina T, pudieran estar relacionadas con la agresividad del procedimiento antes mencionada

**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos en ratas Wistar del <sup>125</sup>I-ior t1 marcado por iodogen, en una dosis por bolo intravenoso de 0,6 mg.

Parámetros	Cloramina t	Iodogen
t <sub>1/2β</sub> (h)	25,56	77,4
t <sub>1/2α</sub> (h)	0,47	—
β (h <sup>-1</sup> )	0,025 2	8,95 · 10 <sup>-3</sup>
α (h <sup>-1</sup> )	1,46	—
MRT (h)	35,98	110,25
AUC [(μg · h)/mL]	3 120,40	5 685
AUMC [(μg · h <sup>2</sup> )/mL]	11 2 275,80	6,28 · 10 <sup>5</sup>
V <sub>ss</sub> (mL)	6,92	—
V <sub>z</sub> (mL)	7,09	11,79
Cl (mL/h)	0,19	2,93 · 10 <sup>5</sup>

**Tabla 2.** Cantidad de <sup>125</sup>I-ior t1, marcado por el método de cloramina T y de iodogen, expresada como área bajo la curva desde t = 0 hasta t = 48 h, en los órganos muestreados en ratas Wistar después de administrarles 600 mg por administración rápida endovenosa.

Organos	AUC (mg h/mL)	
	Cloramina T	Iodogen
Intestino delgado	3 054	1 876,50
Hígado	5 853	999,88
Pulmones	716	392,61
Riñón	668	551,40
Estómago	427	893,30
Páncreas	236	290,90
Corazón	210	214,68
Cerebro	110	181,00
Tiemo	161	164,60
Bazo	211	251,41

**Tabla 3.** Análisis estadístico por t student (p > 0,05) de los valores medios de los parámetros farmacocinéticos después de la administración de ior t1 (ELISA) y de <sup>125</sup>I-ior t1 marcado por iodogen, en dosis de 2 mg por bolo endovenoso en conejos FI.

Parámetros	Elisa	Iodogen	p
	(2 mg)		
t <sub>1/2β</sub> (h)	21,84 ± 1,6	35,66 ± 6,94	0,000*
MRT (h)	26,9 ± 2,4	39,25 ± 5,25	0,000*
Cl (mL/(h · kg))	3,98 ± 0,62	2,31 ± 0,34	0,000*
V <sub>z</sub> (mL/kg)	125,3 ± 20,1	116,4 ± 12,6	0,709

\* Valores significativos (p > 0,05).

do, lo que debió dar lugar a la formación de una mayor cantidad y diversidad de metabolitos radiomarcados.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Bolton A.E, Radioiodination techniques, *Amersham international plc*, 38, 1985.
2. Eary J.F, Krhon. K.A., Kishore, R., and Nelp. W.B., Radiochemistry of halogenated antibodies. *Antibodies in*

*radiodiagnosis and therapy* (M.R. Zalutsky, ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 83-102, 1989.

3. Shumaker H. pKcalc Analyst, Cincinnati, Ohio, USA, 1988.
4. Imbimbo B.P *et al.*, Efficiency of different criteria for selecting pharmacokinetic multiexponential equations, *Biopharm. And Drug Disposition*, 12, 139, 1991.
5. Gibaldi M. and Perrier D., *Pharmacokinetics.*, 2nd Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 199-219, 1982.