

[Handwritten signature]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99 752

REQUERENTE: AKZO N.V., holandesa, com sede em Velperweg
76, 6824 BM Arnhem, Holanda

EPÍGRAFE: "Processo de marcação de oligonucleótido modifi-
cado e de preparação de um conjugado e de com-
posições farmacêuticas"

INVENTORES: Wilhelmus Henricus Arnoldus Kuijpers, Fran-
ciscus Michael Kaspersen e Constant Adriaan
Anton van Boeckel

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Holanda em 10 de Dezembro de 1990 sob o nº 90.02714

73440

0/4184-651

PATENTE N° 99 752

"Processo de marcação de oligonucleótido modificado e de preparação de um conjugado e de composições farmacêuticas"

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de marcação de oligonucleótido modificado, que é complementar de um fragmento de ácido nucleico associado a uma célula "alvo" ou na sua vizinhança próxima, que compreende a marcação do referido oligonucleótido modificado com uma entidade terapêutica ou com um isótopo terapêutico.

O invento refere-se igualmente a um processo de preparação de um conjugado de uma porção alvejante possuindo especificidade para uma célula alvo e de um oligonucleótido modificado, no qual se conjuga, com a referida porção alvejante, o referido oligonucleótido modificado, que é complementar de um oligonucleótido modificado, marcado, bem como de composições farmacêuticas.

MEMÓRIA DESCRITIVA

O invento refere-se a oligonucleótidos modificados que estão marcados radioativamente.

Os oligonucleótidos marcados radioativamente são conhecidos, por exemplo como sondas usadas em ensaios de hibridação.

O uso de tais oligonucleótidos in vivo não será de um modo geral possível porque o ADN e o ARN são rapidamente metabolizados in vivo. As finalidades in vivo dos oligonucleótidos modificados estão descritas por E. Uhlmann e A. Peyman: Chemical Reviews, 90, 543 (1990).

Na terapia chamada de "oligonucleótidos anti-sentido", os fragmentos de ADN e de ARN sintéticos, que podem ou não estar conjugados com enzimas ou citostáticos, são dirigidos para fragmentos de ácido nucleico complementar (ADN ou ARN) que estão presentes em células "alvo", por exemplo de tumores ou células infectadas por um vírus. A modificação do oligonucleótido anti-sentido é necessária para se obter a desejada estabilidade na circulação (devem, inter alia, ser capazes de resistir às enzimas endógenas) e, em adição, porque em resultado da modificação a penetração das células e dos tecidos pode ser melhorada. O oligonucleótido anti-sentido é complementar de um ácido nucleico na célula alvo e pode inibir a transcrição de ADN, a tradução de ARNm ou a replicação de ácido nucleico (viral).

Até agora os "oligonucleótidos anti-sentido" não foram conjugados com grupos químicos que estão marcados com isótopos radioactivos que podem ser usados em radio-imunoterapia.

O presente invento refere-se a "oligonucleótidos anti-sentido" modificados que são marcados com isótopos que podem ser usados terapeuticamente (nucleótido anti-sentido radioactivo: RAN), e ao uso de RAN na terapia anti-cancerosa e anti-viral.



Além disto, os RAN podem ser marcados de tal modo que a localização do ácido nucleico complementar (fragmento) é tida em conta. Se o RAN tem de ter uma acção intracelular, preferem-se os isótopos que emitem electrões Auger (tais como ^{77}Br , ^{80}Br , ^{125}I e ^{123}I) ao passo que no caso de localização extracelular se preferem isótopos alfa ou beta-emissores (tais como os isótopos ^{90}Y , ^{131}I , ^{186}Re , ^{211}At e Bi). A última categoria de isótopos é também preferida se o RAN tem de atingir o seu "alvo" tanto dentro como fora da célula.

Os RAN podem ser preparados de acordo com qualquer técnica conhecida para a síntese de oligonucleótidos, como descrito por exemplo por E. Uhlmann e A. Peyman: Chemical Reviews, 90, 543 (1990). Podem ser escolhidos os esqueletos de açúcares naturais (ribose e desoxirribose) e os seus enantiómeros, possivelmente modificados, por exemplo 2'-O-metilribose, mas também será possível usar estereoisómeros (enantiómeros α em vez de nucleósidos β) para escolher outros esqueletos tais como desoxiglucose, desde que se consiga torná-los mais resistentes às enzimas endógenas e desde que possam proporcionar o emparelhamento das bases dos oligonucleótidos, com uma Tf (temperatura de fusão) suficiente.

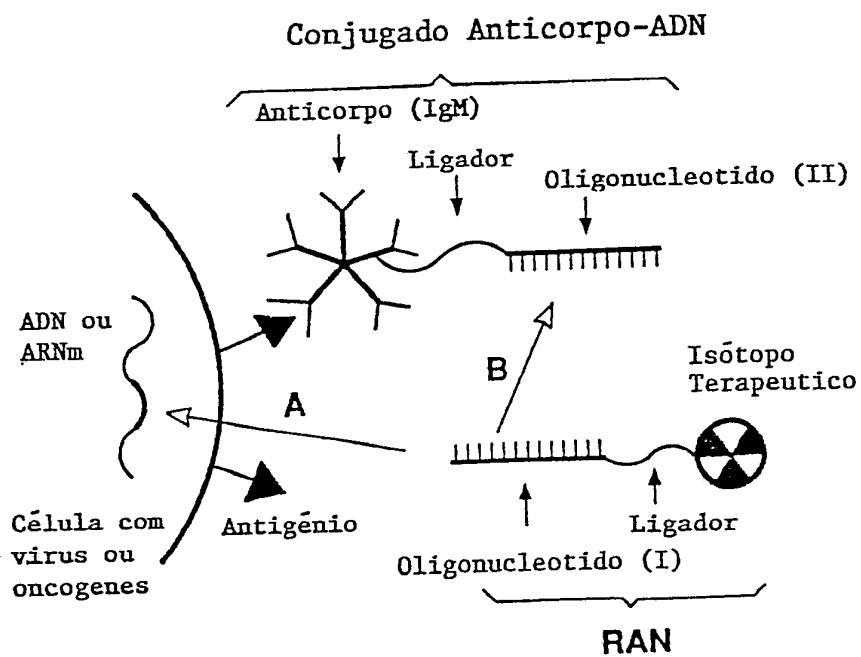
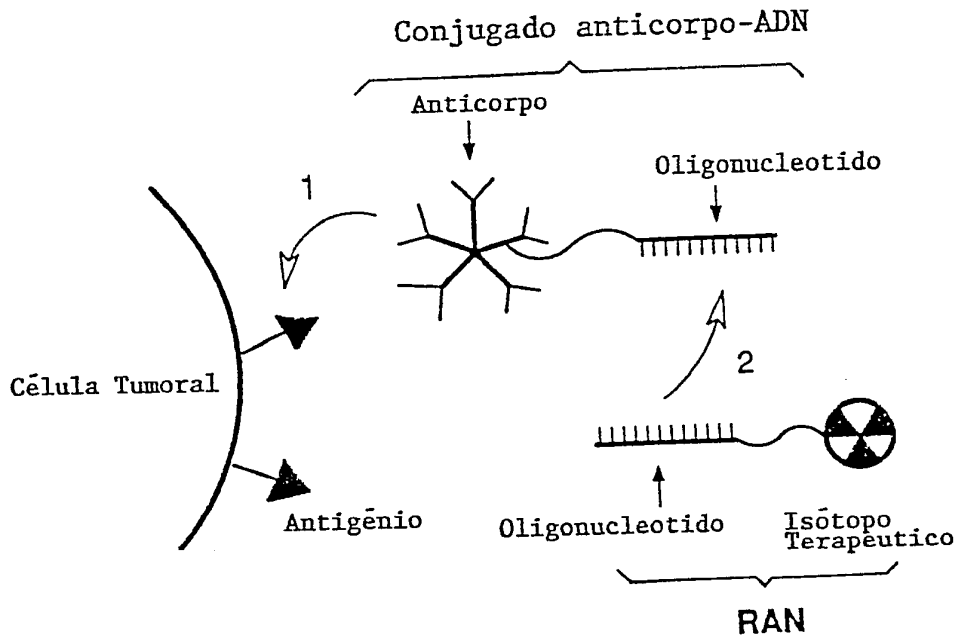
A ligação fosfato entre os açúcares também pode ser substituída por uma ligação mais estável (in vivo), tal como $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ ou $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$.

As bases podem ser bases naturais (A, U, C, G, T), mas também podem ser bases raras tais como a xantina, hipoxantina e bases como as descritas em Benner e col., J. Am. Soc. Chem. Vol. 111, pág 21, 1989.

Os RAN podem ser quer oligonucleótidos lineares quer oligonucleótidos circulares.

Os RAN preferidos são oligonucleótidos modificados, marcados radioactivamente do tipo I.

Esquema 1 A e B: Aplicações terapêuticas de nucleótidos anti-sentido radiomarcados (RANs).



na qual:

n = 5-20

B = base nucleosídica,

X = O⁻, S⁻, N-dialquilo, O-alquilo, alquilo e/ou suas combinações

Y = O e/ou S

Q, Q' = um fragmento químico que é adequado para conjugação com um porção alvejante. Este fragmento contém um aldeído reactivo, um grupo NH₂ ou SH e/ou Q, Q' é H, alquilo, acilo ou nucleósido.

Estes grupos (Q,Q') e as técnicas de conjugação que são necessárias para acoplar Q ou Q' a uma porção alvejante estão descritos no artigo de revista de J. Goodchild: Bioconjugate Chemistry 1, páginas 165 a 187 inclusivé (1990).

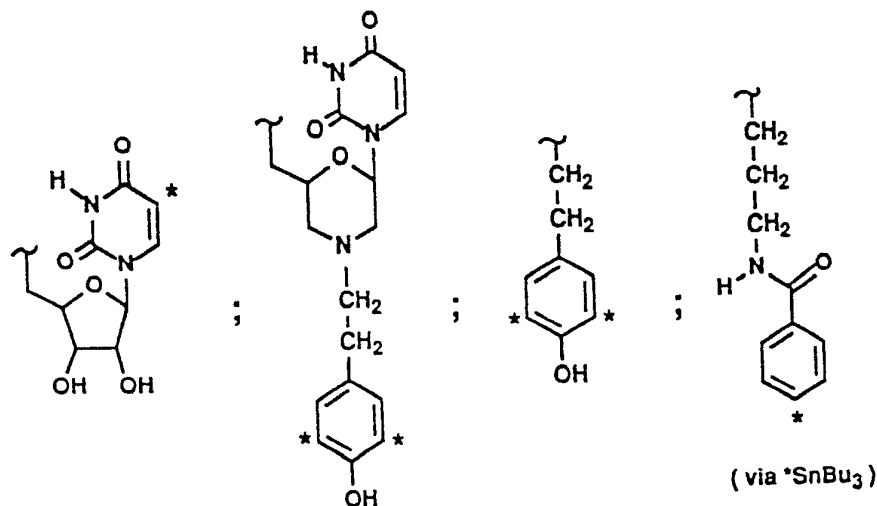
Opcionalmente, o nucleótido do tipo II pode ser marcado com um isótopo para imagologia.

Prefere-se acoplar vários oligonucleótidos (tipo II) à porção alvejante, de modo a aumentar o número de locais de ligação para o oligonucleótido do tipo I. Consegue-se a maior eficácia se a sequência do oligonucleótido corresponder a uma sequência que é única para o oncogene ou gene viral intracelulares.

Os RAN são preparados marcando quimicamente oligonucleótidos modificados, sintetizados, (tipo I), com o isótopo radioactivo desejado. A síntese dos nucleótidos modificados que são adequados tanto para o RAN (tipo I) como para o tipo II é feita de acordo com processos conhecidos tais como os descritos em Chemical Reviews 90, páginas 543 a 584 inclusivé (1990), sendo preferidas as modificações tais como os metilfosfonatos, amidatos de fósforo, tioatos de fósforo e alquilfosfotriésteres, os quais - preferivelmente - são incorporados em combinação com ligações fosfodiéster de ocorrência natural.

Em virtude dos oligonucleótidos mencionados em último lugar serem usualmente preparados com a ajuda da síntese chamada de

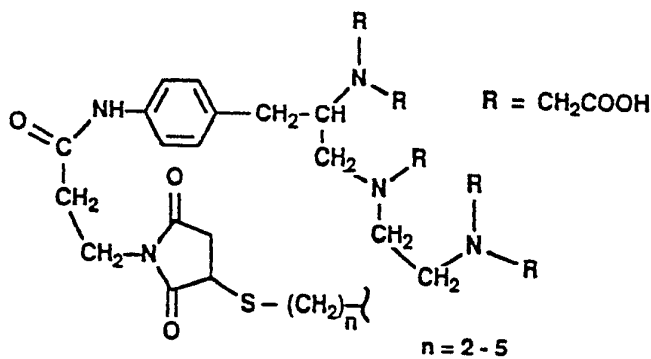
"fase sólida", os grupos a serem marcados estão posicionados preferivelmente na extremidade 5'. São exemplos destes grupos no caso de marcação com halogêneos radioactivos:



onde * é um halogéneo radioactivo.

Uma alternativa é a halogenação directa das bases do ácido nucleico.

Se se usam metais radioactivos, Z/Z' é um complexo de um metal radioactivo e um quelante tal como agentes quelantes macrocíclicos DTPA, agentes quelantes N_xS_x e substâncias similares, tais como:



EXPERIÊNCIA

Na terapia anti-sentido, foram introduzidas várias modificações no ADN, principalmente para melhorar a estabilidade do oligonucleótido contra as nucleases e para melhorar a incorporação celular. Usam-se mais comumente análogos de ADN com esqueleto modificado, tais como oligonucleótidos de fósforotioato, metilfosfonato e fosfotriéster de alquilo (inter alia ADN metilado com fosfato). Em todos estes casos, contudo, a introdução de grupos fosfato modificados não deve conduzir a uma solubilidade mais pobre do oligonucleótido em água ou a uma diminuição da estabilidade do complexo com a sequência alvo.

Como mencionado, ambos os fragmentos de ADN, o RAN e o fragmento conjugado com a porção alvejante, têm de ser modificados para os proteger de degradação pelas nucleases. A principal actividade da nuclease no sangue provém das 3'-exonucleases. Em consequência, a modificação do fosfodiéster(es) na extremidade 3' do oligonucleótido mostrou-se importante. Como o oligonucleótido ligado à porção alvejante deve ser estável durante um período bastante longo (2-3 dias), este fragmento deve ser mais profundamente modificado do que o RAN, mas não ao ponto do material se tornar imunogénico. Para os nossos objectivos, escolhemos a modificação do metilfosfonato. As ligações metilfosfonato podem ser facilmente introduzidas em fragmentos de ADN usando a química de ADN standard (fosforamideto).

Além disto, esta modificação é estável nas condições químicas necessárias para a conjugação e radiomarcagem e a introdução de ligações internucleósidos neutras diminui a ligação não específica dos oligonucleótidos, altamente carregados, às proteínas do sangue carregadas positivamente.

Em princípio, fragmentos de ADN parcialmente metilados com fosfato também conseguem os nossos objectivos. Fomos bem sucedidos no desenvolvimento de uma estratégia sintética para a preparação de ADN parcialmente metilado com fosfato, bem

definido. A labilidade do fosfotriéster de metilo nesta modificação requer condições suaves durante a conjugação e radiomarcção. Caso contrário pode ocorrer a desmetilação do fosfotriéster ou outras reacções secundárias.

Exemplo 1

Usando um sintetizador de ADN da Applied Biosystems (modelo 381A) sintetizaram-se os seguintes fragmentos de ADN I e II complementares, contendo, respectivamente, 2 e 5 ligações metilfosfonato (obtidos após desprotecção usando amoníaco em metanol durante 3 dias e purificação com o auxílio de cromatografia de permeação em gel).

I: U5'-5'Gp(Me)CCGCGCAAGCGp(Me)C 3'

II: U5'-5'Gp(Me)CGCTp(Me)TGCGp(Me)CCGp(Me)Gp(Me)C 3'

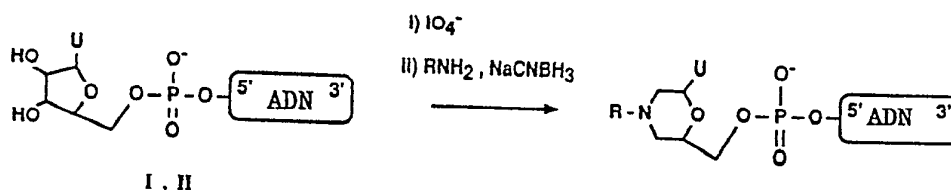
p(Me) significa um metilfosfonato que foi introduzido usando metilfosfonamidos adequadamente protegidos.

Estabilidade do duplex.

A estabilidade de um duplex entre duas cadeias de ADN complementares é expressa como temperatura de fusão Tf. Esta temperatura, à qual metade da estrutura helicoidal se perde, pode ser monitorizada pela medição da absorvância a 260 nm em função da temperatura. Verificou-se que o valor de Tf do duplex de ADN entre I e II em NaCl 0,1 M, Tris.HCl 0,01 M (pH = 7,0) era de 57 °C. Sob condições fisiológicas in vivo (37 °C) dar-se-á uma hibridação eficaz.

Na extremidade 5' dos fragmentos de ADN modificados (I, II) introduziu-se um nucleótido uridina ligado em 5'-5'. Esta porção uridina oferece, após oxidação do diol em cis, a possibilidade de incorporar vários ligadores contendo amino via aminação redutora (Esquema 2).

Obviamente, usou-se o fragmento II de ADN modificado maior para conjugação com o anticorpo.



Esquema 2: Incorporação de ligadores contendo amino via uridina ligada em 5'-5'.

Exemplo 2

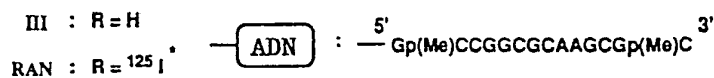
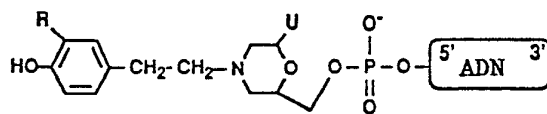
Preparação de oligonucleótidos radiomarcados (RAN)

Obteve-se um RAN por marcação radioactiva de um nucleótido sintético (I).



Fazendo reagir o oligonucleótido com periodato de sódio (0,05 M; 30 eq.) em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH=4,75) durante uma hora a 0 °c no escuro, converteu-se a ribose (de U) num dialdeído. Após remoção do periodato em excesso numa coluna Sephadex G-10, o dialdeído foi aminado numa solução de tiramina 0,05 M em tampão fosfato 0,1 M (pH = 6,9)/metanol (2:1 v/v).

Após 30 minutos à temperatura ambiente adicionou-se cianoboro-hidreto de sódio (0,1 M; 30 eq.) em metanol. Deixou-se a redução prosseguir durante a noite à temperatura ambiente, após o que se adicionou uma quantidade adicional (30 eq.) de cianoboro-hidreto de sódio (1 hora, temperatura ambiente). A mistura reaccional foi concentrada e aplicada a uma coluna Sephadex G-25 usando TEAB 0,05 M como eluente. As fracções contendo ADN foram recolhidas e liofilizadas produzindo o oligonucleótido derivado III.



Esquema 3

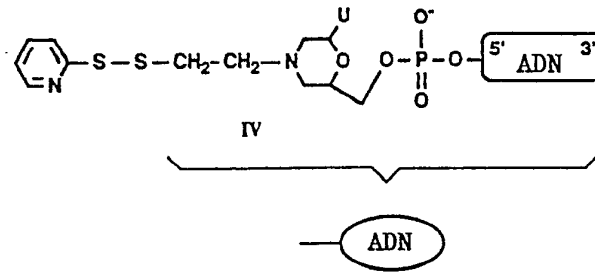
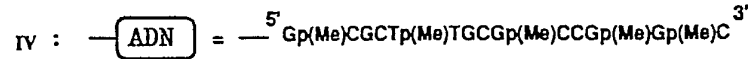
A porção p-hidroxifeniletilo do oligonucleótido III pode ser facilmente marcada com Na^{125}I na presença de iodogen R .

Resumidamente, revestiu-se um tubo de reacção Eppendorf com iodogen R (50 μg) secando uma solução de iodogen R em cloreto de metileno por meio de azoto. Adicionou-se ao tubo de reacção 10 μg de uma solução de Na^{125}I (≈ 2 mCi). Deixou-se prosseguir a iodacção durante 15 minutos à temperatura ambiente com agitação ocasional. O RAN foi purificado em Sephadex PD10 usando tampão PBS ou 2 x tampão SSC (para os estudos de hibridação). A actividade específica do RAN assim obtida era de 35 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Exemplo 3

Preparação de conjugados anticorpo-oligonucleótidos

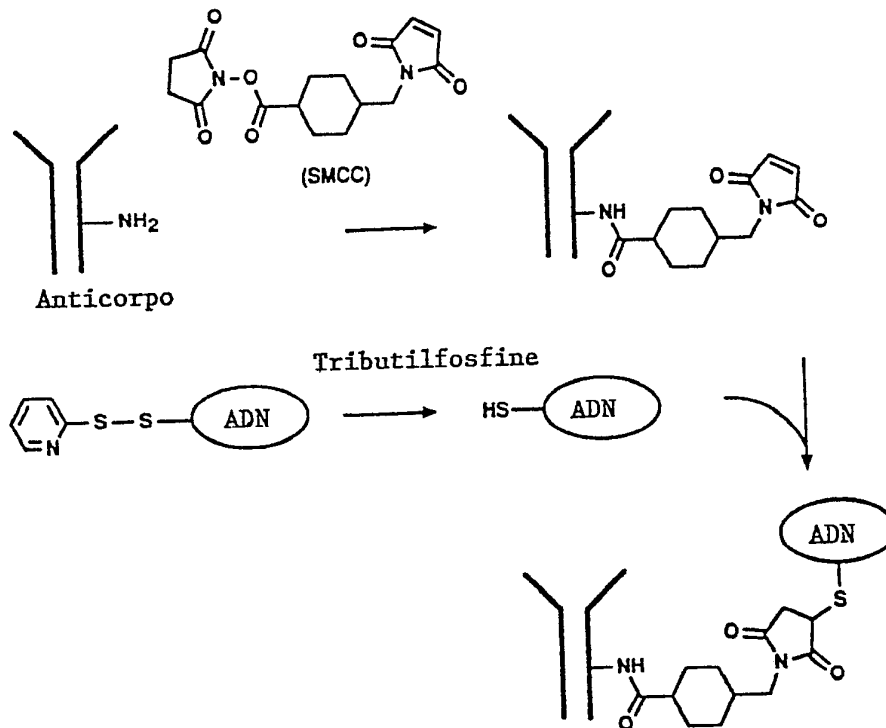
Primeiro, derivou-se o oligonucleótido II com um ligador de tiol activado de modo análogo ao descrito para a derivação do oligonucleótido. Resumidamente, o oligonucleótido II foi oxidado com periodato de sódio 0,05 M (12,5 eq.) em tampão acetato de sódio 0,12 M (pH = 4,75) durante 1 hora a 0 °C no escuro. Subsequentemente à remoção do periodato em excesso (Sephadex G-10) o dialdeído foi aminado com S-piridilcisteamina 0,04 M. Adicionou-se HCl (30 eq.) em tampão fosfato 0,1 M (pH = 8,0)/metanol (2:1 v/v), seguido por redução com cianoboro-hidreto de sódio (5 eq.) em metanol durante 16 horas à temperatura ambiente. Adicionou-se uma quantidade adicional de cianoboro-hidreto de sódio (5 eq.) antes de purificação do oligonucleótido numa coluna Sephadex G-25 usando como eluente TEAB 0,05 M. A liofilização das fracções contendo ADN deu o oligonucleótido IV contendo um ligador de tiol activado como um 2-piridildissulfureto. De acordo com a absorvância UV da piridina-tiona libertada após a redução do dissulfureto, aproximadamente 45% do oligonucleótido continha ligador de tiol activado.



Esquema 4

Como os conjugados de ADN-proteína ligados por dissulfureto podem ser insuficientemente estáveis em sistemas in vivo, centrámo-nos numa estratégia de acoplamento da maleimida. Geralmente, nesta abordagem o anticorpo é derivado com grupos maleimida por tratamento da proteína com succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC).

Subsequentemente, forma-se um conjugado com o oligonucleótido contendo tiol, via uma ligação tioéter estável (Esquema 5).



Esquema 5. Preparação de conjugados anticorpo-oligonucleótido

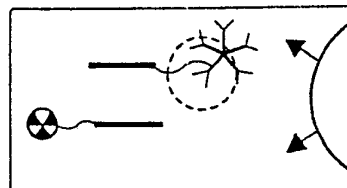


Exemplo 4

Experiências in vitro com anticorpo anti-HCG 130A.

Inicialmente, usou-se o anticorpo anti-HCG 130A para investigar as condições adequadas para conjugação do oligonucleótido.

Preparação do conjugado. (I)



Primeiro, fez-se reagir a IgG 130A em tampão fosfato 0,05 M (pH = 7,5) com SMCC (0,01 em DMF) durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro. Introduziu-se uma média de 10 grupos maleimida por anticorpo após tratamento com 60 eq. de SMCC. O anticorpo foi purificado numa coluna PD-10 usando fosfato 0.5 M/NaCl 0,1 M/EDTA 5 mM (pH = 6,0) como eluente. Depois da redução do oligonucleótido activado com 2-piridildissulfureto em tampão fosfato 0,1 M (pH = 8,0)/metanol (2:1 v/v) por tratamento com tributílfosfina (1 eq., 5 min., t.a.), o fragmento de ADN contendo tiol (50 eq. em relação ao anticorpo) foi feito reagir imediatamente com anticorpo derivado com maleimida (Esquema 5). Deixou-se prosseguir a conjugação durante a noite a 4 °C, seguida por bloqueamento dos grupos maleimida não reagidos, com cisteamina.

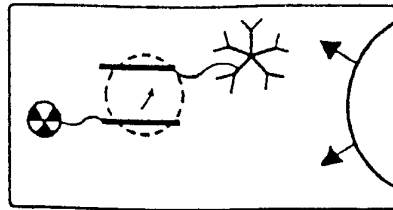
A presença de oligonucleótidos ligados covalentemente na preparação de conjugado pode ser demonstrada por focalização isoelétrica (IEF) e SDS-PAGE. Por IEF observou-se um desvio do ponto isoelétrico em direcção a um pH mais baixo e o SDS-PAGE mostrou um aumento do tamanho molecular em comparação com a IgG 130A não conjugada.

O conjugado anticorpo-oligonucleótido pode ser facilmente separado do excesso de oligonucleótido não reagido por filtração

em gel numa coluna Sephacryl S-100. Processamento da coluna HR a 4 °C com PBS como eluente. As fracções contendo conjugado-anticorpo foram armazenadas a 4 °C.

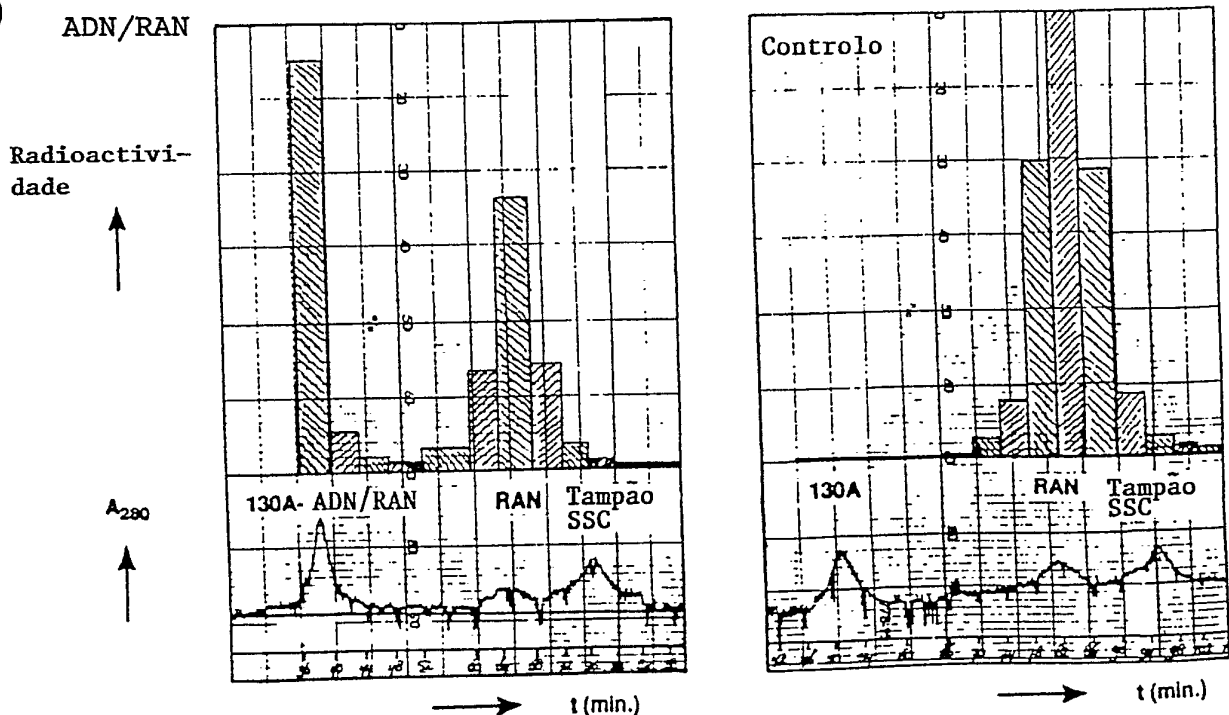
Com base na taxa de absorvância a 260 nm/280 nm do conjugado purificado determinou-se uma composição molar de 3:1 de oligonucleótido e de anticorpo.

Estudos de hibridação. (II)



Permitiu-se que o RAN hibridasse com os oligonucleótidos do conjugado de anticorpo (10 µg/ml) em 2 x tampão SSC. Usou-se um ligeiro excesso de RAN (aprox. 1,2 eq.), em comparação com a quantidade total de fragmentos de ADN conjugados. Após 1 hora de hibridação à temperatura ambiente, aplicou-se a mistura a uma coluna Sephacryl S-100 e eluiu-se com tampão PBS a 4 °C de modo a separar o RAN não hibridado do complexo conjugado/RAN. Mediram-se a absorvância a 280 nm e a radioactividade das fracções eluídas (Esquema 6).

Esquema 6: Filtração em gel da mistura de hibridação IgG 130A-ADN/RAN

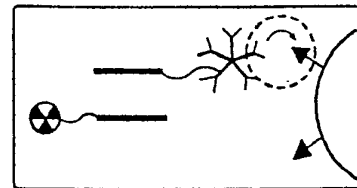


O perfil de eluição mostrou radioactividade em ambos os picos do conjugado e do RAN.

Aproximadamente 45% da radioactividade eluída estava presente no pico contendo o anticorpo-conjugado. Com a finalidade de excluir ligação não específica do RAN ao anticorpo, realizou-se uma experiência de controlo na qual se incubou IgG 130A não derivada com o RAN, no tampão de hibridação. A filtração em gel da mistura revelou que menos de 0,1% da radioactividade registada estava presente na fracção de anticorpo.

Estas experiências demonstram que o RAN é mesmo capaz de reconhecer a sequência complementar no anticorpo, via um mecanismo de hibridação específico.

Estudos de ligação ao antigénio. (III)



A questão seguinte a ser respondida era se o conjugado anticorpo-oligonucleótido tinha mantido as suas propriedades de ligação ao antigénio. Para elucidar esta questão, parte da mistura de hibridação (ver acima) foi incubada em esferas de Sepharose revestidas com HCG.

Após 90 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante removido. As esferas foram lavadas várias vezes com tampão de hibridação antes de se determinar a radioactividade remanescente nas esferas. Mediu-se uma radioactividade 150 vezes superior em relação à da experiência de controlo, em que as esferas de Sepharose-HCG foram incubadas com uma mistura de RAN e de IgG 130A e tratadas como anteriormente. Isto mostra que não ocorre ligação específica entre o RAN e o anticorpo (ou esferas).

Em conclusão, estes estudos de ligação ao antigénio indicam claramente que o anticorpo, após conjugação com o oligonucleótido, manteve a sua capacidade de se ligar especificamente a antigénios, in vitro.

Exemplo 5

Experiências in vitro com anticorpo anti-tumor humano 1688.

Encorajados pelos resultados promissores com a IgG 130A, centrámos os nossos esforços na IgM 1688, a qual, no momento, é avaliada em radio-imunoterapia de vários tumores.

A IgM 1688 foi activada com grupos maleimida por tratamento com SMCC, como descrito para o anticorpo 130A. Dado que uma IgM oferece mais locais reactivos do que uma IgG, usou-se um ligeiro excesso de SMCC em comparação com a derivação da IgG 130A.

A reacção com 17 eq. de SMCC deu uma derivação média de 8,5 grupos maleimida, como determinado espectrofotometricamente. O anticorpo activado foi reagido imediatamente com oligonucleótido IV recentemente reduzido (tributilfosfina) (40 eq. em relação ao anticorpo). Após conjugação durante a noite (4 °C) e subsequente bloqueamento dos grupos maleimida não reagidos com cisteamina, o conjugado anticorpo-oligonucleótido foi separado do oligonucleótido em excesso e dos outros reagentes numa coluna Sephacryl S-100 HR com tampão PBS como eluente a 4 °C. Embora se observasse um desvio na taxa de absorvância a 260 nm/280 nm em relação ao conjugado purificado (0,63), em relação à IgM 1688 (0,57), não foi possível fazer uma quantificação precisa do número de oligonucleótidos conjugados, devido à absorvância UV, dominante, da proteína. Com base na nossa experiência com o anticorpo 130A, estimámos, contudo, que estão ligados ao anticorpo 2-3 oligonucleótidos.

Por analogia com as experiências com a IgG 130A, o conjugado IgM 1688-ADN foi incubado com RAN (aprox 2 eq. em relação ao conjugado) em 2 x tampão SSC para permitir a

hibridação dos fragmentos de ADN complementares. Após um período de hibridação de 1 h à temperatura ambiente, usou-se uma coluna S-100 (tampão PBS, 4 °C) para separar a fracção contendo anticorpo do RAN não hibridado. A determinação da radioactividade em ambas as fracções revelou que 16% das contagens eluídas estavam presentes na fracção de anticorpo-conjugado. Tal como com a IgG 130A, a experiência de controlo, na qual o RAN e a IgM 1688 foram incubados e subsequentemente separados, mostrou que tinha ocorrido uma ligação não específica negligenciável do RAN à IgM 1688: 0,2% da radioactividade eluída estava presente no pico do anticorpo.

Estes resultados foram confirmados por uma série de experiências de hibridação dot-blot. Neste ensaio, imobilizou-se uma série de diluições do conjugado IgM 1688-ADN sobre um filtro de nitrocelulose. Após bloqueamento do filtro com BLOTTO para suprimir a ligação não específica, incubou-se com RAN durante 2 h à temperatura ambiente em 2 x tampão SSC. Em seguida, o filtro foi lavado e visualizado por auto-radiografia, mostrando um bom padrão de diluição.

Numa experiência paralela, tratou-se uma série de diluições do conjugado IgM 1688-ADN, semelhante, com igual quantidade de RAN diluído 100 vezes com oligonucleótido III não-marcado. Nesta experiência a radioactividade detectada nesta série coincidiu perfeitamente com o padrão para a diluição de 100 vezes na primeira experiência. Na experiência de controlo, em que se incubou com RAN um filtro de nitrocelulose imobilizado com IgM 1688, apenas se detectou radioactividade de fundo.

Resumindo, estes resultados provam que apesar das enormes dimensões do anticorpo IgM, o RAN é ainda capaz de interagir especificamente com os oligonucleótidos conjugados.

Estudos de ligação ao antigénio.

A capacidade de ligação ao antigénio do conjugado IgM 1688-

-ADN foi, tal como com o conjugado de IgG 130A, examinado por incubação de esferas de Sepharose revestidas com CTA-1, o antigénio cognato da IgM 1688, com uma mistura de hibridação de conjugado e RAN. Mediu-se uma radioactividade nas esferas revestidas com CTA da mistura de IgM 1688/RAN de 17,5 vezes em relação ao controlo.

Além de experiência acima, em que o RAN foi hibridado com o conjugado antes deste último se ter ligado ao antigénio, realizou-se um teste adicional mimetizando a "sequência de ligação" pré-alvejante. Assim, em primeiro lugar, incubaram-se as esferas revestidas com CTA com conjugado IgM 1688-ADN, durante a noite a 4 °C (passo 1). Após remoção do conjugado em excesso e de várias lavagens, as esferas foram incubadas com RAN durante 2 ½ h à temperatura ambiente em 2 x tampão SSC (passo 2). De modo semelhante, realizou-se uma experiência de competição incluindo hibridação com a mesma quantidade de RAN, diluído 100 vezes com oligonucleótido III não marcado. Depois da remoção do sobrenadante e de várias lavagens, determinou-se a radioactividade remanescente nas esferas. Os resultados destas experiências estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1

passo 1	passo 2	radioactividade relativa
IgM 1688-ADN	RAN	10,6
IgM 1688 (controlo)	RAN	1,8
IgM 1688-ADN	RAN/ADN (III)(1:100)	1,4
IgM 1688 (controlo)	RAN/ADN (III)(1:100)	1

Tal como esperado, a radioactividade mais elevada verifica-se na experiência de pré-alvejamento com RAN não diluído. Além disto, os resultados demonstram claramente o comportamento competitivo dos oligonucleótidos não marcados.

73440

0/4184-651

-20-

As experiências acima (com esferas revestidas com CTA actuando como modelo de células de tumor expressando antigénio) mostram que o oligonucleótido radiomarcado é capaz de reconhecer a sua sequência complementar num conjugado-anticorpo, mesmo quando este último está ligado ao seu antigénio. Deste modo, o pré-alveamento com base na hibridação com ADN, apresentou-se bem sucedido in vitro.

O anticorpo anti-tumor humano 1688 e o seu antigénio são revelados na EP(A) 0328578.

73440

0/4184-651

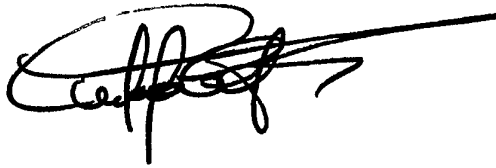
-23-

preparado de acordo com uma das reivindicações 5-7, num meio adequado para administração e se embalar com um oligonucleótido modificado, marcado, de acordo com uma das reivindicações 1-4 incorporado num meio adequado para administração.

Lisboa, 10. Dez. 1991

Por AKZO N.V.

=O AGENTE OFICIAL=

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.