

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 159163 B

(21) Patentansøgning nr.: 2220/81

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 15/06

(22) Indleveringsdag: 20 maj 1981

(41) Alm. tilgængelig: 22 nov 1981

(44) Fremlagt: 10 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 maj 1980 JP 68040/80

(71) Ansøger: *Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.; No. 9, Kandatsukasa-cho 2-chome; Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Noboru *Yanaiara; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

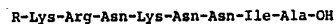
(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et tarm-glucagon-antistof

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

2220-81

Fremstilling af et tarm-glucagon-antigen bestående af et peptid-bærer-kompleks foregår ved, at man som haptent anvender et peptid med den almene formel



hvor R betegner hydrogen, en aminosyregruppe eller en peptidgruppe indeholdende 2-20 aminosyregrupper, og om-sætter det med en bærer i nærværelse af et bindemiddel til binding af haptentet og bæreren til hinanden.

Fremstilling af et tarm-glucagon-antistof foregår ved, at man administrerer det ovennævnte antigen til pattedyr og opsamlers det således dannede antistof.

Det opnåede antistof har fortrinlig specificitet med hensyn til tarm-glucagon og er dermed velegnet til anvendelse ved bestemmelse af tarm-glucagon.

Bindemidlet kan f.eks. være dialdehyder eller andre forbindelser der kan danne tværbinding mellem peptid og bærer.

DK 159163 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et tarm-glucagon-antistof.

I den foreliggende beskrivelse er forkortelser for aminosyrer, peptider, beskyttelsesgrupper, aktive grupper osv. angivet i overensstemmelse med de af IUPAC eller IUB angivne regler eller ved anvendelse af konventionelle symboler, hvorpå der er anført eksempler nedenfor. Hvor aminosyrer kan omfatte optiske isomere, skal de betegne L-enantiomere, medmindre andet er anført.

10	Arg:	arginin
	Trp:	tryptophan
	Asn:	asparagin
	Asp:	asparaginsyre
	Thr:	threonin
15	Ser:	serin
	Glu:	glutaminsyre
	Gln:	glutamin
	Ala:	alanin
	Val:	valin
20	Met:	methionin
	Leu:	leucin
	Phe:	phenylalanin
	Lys:	lysin
	Tyr:	tyrosin
25	Ile:	isoleucin
	Cys:	cystein
	Cys	
		cystin
	Cys	
	Gly:	glycin
30	His:	histidin
	Pro:	prolin
	Z:	carbobenzoxygruppe
	Su:	succinimidogruppe
	Tos:	p-toluensulfonylgruppe
35	Boc:	tert-butoxycarbonylgruppe.

Tarm-glucagon er et hormon, der spiller en vigtig rolle ved sukkerabsorptionmetabolisme. Bestemmelse af tarm-glucagon gør det muligt at diagnosticere forskelli-

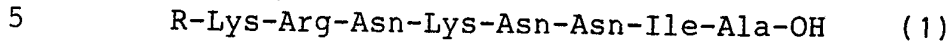
ge patologiske tilstande, som tarm-glucagon tager del i, såsom diabetes mellitus eller tarmcancer, samt diagnosticere sygdomme, såsom tarmsygdomme (f.eks. diarré, forstoppelse osv.), duodenalulcera, carcinoid, tarm-glucagon-noma osv. Bestemmelse af tarm-glucagon noteres således i stigende grad inden for området diagnose, patologi, fysiologi osv. Tarm-glucagon bestemmes ved en metode, såsom radioimmunoassay-metoden (RIA-metoden) under anvendelse af et antistof (antiserum), der reagerer med tarm-glucagon. Som et antistof, der er i stand til at reagere med tarm-glucagon, har man indtil nu kendt antistof R-64 fremstillet af Ravazzola et al. [se Endocrinology, vol. 105, nr. 2, pp. 499-508 (1979)]. Dette antistof udviser imidlertid ikke specificitet over for tarm-glucagon.

Med den ovenfor beskrevne forhåndenværende situation i erindring har opfinderne foretaget dybtgående undersøgelser til udvikling af en fremgangsmåde til opnåelse af et antistof, der har specificitet med hensyn til tarm-glucagon og er yderst effektivt til bestemmelse af tarm-glucagon efter RIA-metoden eller lignende, og i løbet af undersøgelserne har opfinderne opdaget, at den peptidsekvens, der består af den 93. til 100. aminosyre fra N-enden af svine-glicentin [se Horm. Metab. Res., 8, 366-371 (1976)], dvs.

H-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH er et antigen, der er bestemmende for et antistof med specificitet over for tarm-glucagon. Som resultat af yderligere undersøgelser baseret på de ovenfor beskrevne nye undersøgelsesresultater har opfinderne med held syntetiseret et antigen, der som haptent indeholder et peptid, som indeholder den ovenfor beskrevne specifikke peptidsekvens og har den nedenfor anførte almene formel (1), og har ud fra dette antigen fremstillet et ønsket fortrinligt antistof med høj specificitet over for tarm-glucagon og er dermed nået til den foreliggende opfindelse.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen

er ejendommelig ved, at man til pattedyr administrerer et tarm-glucagon-antigen, der består af et peptid-bærer-kompleks og er fremstillet ved, at man som haptent anvender et peptid med den almene formel



hvor R betegner et hydrogenatom, en aminosyregruppe eller en peptidgruppe indeholdende 2-20 aminosyregrupper, og omsætter det med en bærer i nærværelse af et bindemiddel til binding af haptentet og bæreren til
10 hinanden,

hvorefter man opsamler det således dannede antistof.

Opfindelsen belyses under henvisning til tegningen, hvorpå

15 fig. 1-4 er grafiske afbildninger, der viser specificiteten af antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse.

Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er det uomgængeligt nødvendigt at anvende et tarm-glucagon-antigen, der er fremstillet ved som haptent at
20 anvende et peptid med den ovenfor beskrevne almene formel (1). Som eksempler på den med R i den almene formel (1) betegnede aminosyregruppe kan der nævnes: H-Arg-, H-Trp-, H-Asn-, H-Ala-, H-Val-, H-Met-, H-Leu-, H-Phe-, H-Lys-, H-Tyr-, H-Ile-, H-Cys-, $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{H-Cys} \end{matrix}$, H-Gly-, H-His-, H-Pro-.

25 Som eksempler på peptidgruppen, der indeholder 2 til 20 aminosyregrupper, kan der nævnes H-Gly-Lys-, H-Asn-Tyr-, H-Met-Thr-, H-Met-Asn-, H-Leu-Thr-, H-Trp-Thr-, H-Phe-Val-, H-Gln-Ala-, H-Asp-Arg-,
30 H-Leu-Tyr-, H-Ser-Lys-, H-Met-Asn-Tyr-, H-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-,
35 H-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-

Asn-Thr-, H-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-
 Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-
 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-, H-Lys-Tyr-Leu-Asp-
 Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-,
 5 H-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Glu-Asp-Phe-Val-
 Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-.

Af disse foretrækkes peptider, hvori R betegner en pep-
 tidgruppe eller aminosyregruppe dannet ved successiv
 fjernelse af 1 til 19 aminosyregrupper fra N-enden af
 10 73-92 N-endesekvensen af svine-glicentin.

Som bæreren, der skal bindes til haptenet, kan
 der anvendes flere forskellige højmolekylære naturlige
 eller syntetiske proteiner, der konventionelt anvendes
 til fremstilling af antigener. Som eksempler kan der
 15 nævnes dyreserumalbuminer (f.eks. hesteserumalbumin, ok-
 seserumalbumin, kaninserumalbumin, humant serumalbumin,
 fåreserumalbumin osv.), dyreserumglobuliner (f.eks. he-
 steserumglobulin, okseserumglobulin, kaninserumglobulin,
 humant serumglobulin, fåreserumglobulin osv.), thyroglo-
 20 buliner fra dyr (f.eks. hestethyroglobulin, oksethyro-
 globulin, kaninthyroglobulin, humant thyroglobulin, få-
 rethyroglobulin osv.), hæmoglobiner fra dyr (f.eks. he-
 stehæmoglobin, oksehæmoglobin, kaninhæmoglobin, humant
 hæmoglobin, fårehæmoglobin osv.), hæmocyaminer fra dyr,
 25 proteinekstrakt fra ascaris (ascaris-ekstrakt; se be-
 skrivelsen til japansk patentansøgning (OPI) nr.
 16414/81), polylysin, polyglutaminsyre, lysin-glutamin-
 syre-copolymer, lysin- eller ornithinholdig copolymer
 osv.

30 Ascaris-ekstrakten beskrives i detaljer nedenfor.
 Ascaris-ekstrakten opnås ved ekstraktion af Ascaris suum
 i formalet form ved en sædvanlig proteinekstraktionspro-
 ces. Som ekstraktionsopløsningsmiddel kan der anvendes
 forskellige kendte proteinekstraherende opløsningsmidler,
 35 såsom vand, en fysiologisk saltopløsning, en 50%'s vandig
 methanol-eller ethanoloopløsning, en omtrent neutral puf-
 feropløsning osv., idet fysiologisk saltopløsning fore-
 trækkes. Nærmere angivet opnås den ovenfor beskrevne

ekstrakt f.eks. som følger. Indvoldfri *Ascaris suum* vaskes med en fysiologisk saltopløsning og skæres fortrinsvis i fine stykker til lettelse af ekstraktionen. Derpå sættes de fine stykker til et proteinekstraherende opløsningsmiddel, såsom en fysiologisk saltopløsning, hvorefter man ekstraherer under homogenisering af blandingen. Denne ekstraktion udføres sædvanligvis ved lave temperaturer, fortrinsvis ved ca. 2 til 10°C. Den således opnåede ekstraktionsopløsning centrifugeres derpå, og den overliggende væske opsamles. Efter dialyse af den overliggende væske lyofiliseres dialysatet. Alternativt centrifugeres dialysatet igen, og den overliggende væske opsamles og lyofiliseres efter fjernelse af suspenderet stof. På denne måde fremstilles den ønskede ascaris-ekstrakt. Denne kan anvendes til fremstilling af tarm-glucagon-antigenet, om nødvendigt efter yderligere rensning ved sædvanlige proteinrensningsmetoder, såsom en dialysemetode, gelfiltreringsmetode, adsorptionsmetode, chromatografi osv. De ascaris-ekstrakter, der er beskrevet i f.eks. *J. Immun.*, 111, 260-268 (1973), *J. Immun.*, 122, 302-308 (1979), *J. Immun.*, 98, 893-900 (1967) og *Am. J. Physiol.*, 199, 575-578 (1960), eller de, der er fremstillet ved yderligere rensning af disse ekstrakter, kan også anvendes til fremstilling af tarm-glucagon-antigenet.

Som bindemidlet til binding af haptenet og bæreren til hinanden kan der i vid udstrækning anvendes sådanne, der almindeligvis anvendes til fremstilling af antigener. Som specielle eksempler kan der nævnes alifatiske dialdehyder, der er i stand til at tværbinde aminogru-
pper til hinanden, såsom glyoxal, malondialdehyd, glutaraldehyd, succinaldehyd, adipoaldehyd osv.; dimaleimider, der er i stand til at tværbinde thiolgrupper til hinanden, såsom *N,N'*-*o*-phenylendimaleimid, *N,N'*-*m*-phenylendimaleimid osv.; maleimidocarboxyl-*N*-hydroxysuccinimidesterforbindelser, der er i stand til at tværbinde en aminogruppe til en thiolgruppe, såsom *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimidester, 4-(maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxyl-*N'*-hydroxysuccinimidester osv.; re-

agenser til anvendelse ved den sædvanlige peptidbindingsdannende reaktion, og som er i stand til at binde en aminogruppe til en carboxylgruppe gennem en amidobinding, såsom dehydratations-kondensationsmidler af carbodiimider (f.eks. N,N-dicyclohexylcarbodiimid, N-ethyl-N'-dimethylaminocarbodiimid, 1-ethyl-3-diisopropylaminocarbodiimid, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl)carbodiimid osv.), og lignende. Endvidere kan der også anvendes en kombination af en diazoniumpyridylcarboxylsyre (f.eks. p-diazoniumpyridyleddikesyre) og et sædvanligt peptidbindingsdannende reagens (f.eks. det ovenfor beskrevne dehydratations-kondensationsmiddel).

Antigenet til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse fremstilles ved omsætning af det ovenfor beskrevne haptent med bæreren i nærværelse af bindemidlet til binding af haptentet og bæreren til hinanden. Denne omsætning udføres i vandig opløsning eller en sædvanlig pufferopløsning med en pH-værdi på 7 til 10, fortrinsvis 8 til 9, ved 0 til 40°C, fortrinsvis ved ca. stuetemperatur. Denne omsætning er fuldstændt på ca. 1 til 24 timer. Som typiske eksempler på den puffer, der skal anvendes ved denne omsætning, kan der nævnes følgende:

- 0,2 M natriumhydroxid-0,2 M borsyre-0,2 M kaliumchlorid-puffer;
- 0,2 M natriumcarbonat-0,2 M borsyre-0,2 M kaliumchlorid-puffer;
- 0,05 M natriumtetrahydroborat-0,2 M borsyre-0,05 M natriumchlorid-puffer; og
- 0,1 M natriumdihydrogenphosphat-0,05 M natriumtetrahydroborat-puffer.

Ved den ovenfor beskrevne reaktion kan mængdeforholdet mellem haptent, bindemiddel og bærer bestemmes på rette måde. Sædvanligvis er et foretrukket vægtmængdeforhold mellem bærer og haptent imidlertid 2:1 til 6:1, og mere foretrukket 3:1 til 5:1, og et foretrukket molært mængdeforhold mellem bindemiddel og haptent er 5:1 til 10:1. Den ovenfor beskrevne reaktion giver et tarmglucagon-antigen be-

stående af peptid-bærer-komplekset, hvori bæreren og haptenet er bundet til hinanden via bindemidlet til binding af haptenet og bæreren til hinanden. Det ved reaktionen dannede antigen kan let isoleres og renses på 5 konventionel måde, f.eks. ved en dialysemetode, en gelfiltreringsmetode, en fraktioneret udfældningsmetode eller lignende. Det opnåede antigen kan oplagres efter lyofilisering på konventionel måde. I de således opnåede antigener er i gennemsnit sædvan-

10 ligvis 5 til 20 mol af peptidet bundet til 1 mol af proteinet. Hvert sådant antigen gør det muligt at fremstille et antistof med høj specificitet til tarm-glucagon med god reproducerbarhed. Navnlig har antigener med et molært bindingsforhold mellem peptid og protein på 1:8 15 til 1:15 højere specificitet og gør det muligt at fremstille et antistof med høj aktivitet og høj sensitivitet og foretrakkes således.

Peptidet med den almene formel (1), der skal anvendes til fremstilling af antigenet, indbefatter 20 kendte og hidtil ukendte forbindelser, som kan fremstilles ved de nedenfor beskrevne fremgangsmåder.

Peptidet med den almene formel (1) kan fremstilles ved en konventionel fremgangsmåde til syntetisering af peptider. En vilkårlig blandt fast-fase-fremgangsmåder og flydende-fase-fremgangsmåder kan benyttes, idet 25 de sidstnævnte er fordelagtige i mange tilfælde. Sådanne fremgangsmåder til syntetisering af peptider er beskrevet i f.eks. "The Peptides", vol. 1 (1966) skrevet af Schröder og Luhke (Academic Press, New York, USA) eller 30 "Peptide Synthesis" skrevet af Izumiya, et al. [Maruzen Co., Ltd. (1975)], og der er belyst f.eks. en azid-proces, en chlorid-proces, en syreanhydrid-proces, en blandet-syreanhydrid-proces, en DCC-proces, en aktiv-ester-proces, en proces, ved hvilken der anvendes Woodward- 35 reagens K, en carbodiimidazol-proces, en oxidations-reduktions-proces, en DCC/additiv- (f.eks. HONB, HOBt, HOSu osv.)-proces og lignende.

Peptidet med den almene formel (1) kan let synte-

tiseres efter en fremgangsmåde til syntetisering af polypeptider i almindelighed, f.eks. en såkaldt trinvis fremgangsmåde med kondensering af aminosyrer én efter én til den endestillede aminosyre eller en fremgangsmåde med kobling af flere fragmenter. Nærmere angivet kan det ovenfor beskrevne peptid fremstilles ved at kondensere et reaktivt carboxylgruppelholdigt udgangsmateriale svarende til det ene af de to fragmenter, som dannes ved at dele peptidet på et vilkårligt bindingssted, med et andet reaktivt aminogruppeholdigt udgangsmateriale svarende til det andet fragment på en til syntese af peptider konventionelt anvendt måde og, når det opnåede kondensat indeholder en beskyttelsesgruppe eller -grupper, fjernelse af beskyttelsesgruppen eller -grupperne på konventionel måde.

Ved reaktionstrinnene til fremstilling af peptidet med den almene formel (1) beskyttes asparaginsyren hensigtsmæssigt i mange tilfælde, og i sluttrinnet fjernes alle beskyttelsesgrupper fra det beskyttede peptid, som indeholder mindst én beskyttet aminosyrerest, til fremstilling af det ønskede peptid.

Beskyttelsen af funktionelle grupper, der ikke skal deltage i reaktionen, beskyttelsesgrupper, fjernelsen af beskyttelsesgrupperne og aktiveringen af funktionelle grupper, der deltager i reaktionen, kan passende udføres på en konventionel måde eller ved en fremgangsmåde valgt blandt kendte fremgangsmåder.

Som eksempler på beskyttelsesgruppen for aminogruppen i et udgangsmateriale kan der nævnes carbobenzoxy, tert-butoxycarbonyl, tert-amylloxycarbonyl, isobornylloxycarbonyl, p-methoxybenzyloxycarbonyl, 2-chlorbenzyloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl, trifluoracetyl, phthalyl, formyl, o-nitrophenylsulphenyl, diphenylphosphinothioyl osv. Som eksempler på beskyttelsesgruppen for carboxylgruppen kan der nævnes en alkylestergruppe (f.eks. en methylester-, ethylester-, propylester-, butylester- eller tert-butylestergruppe osv.), en benzylester-, p-nitrobenzylester-, p-methoxybenzylester-, p-

chlorbenzylester-, benzhydrylester-, carbobenzoxyhydrazido-, tert-butyloxycarbonylhydrazido- eller tritylhydrazidogruppe osv.

Som eksempler på beskyttelsesgruppen for guanidinogruppen i arginin kan der nævnes en nitrogruppe, en to-
5 sylgruppe, en p-methoxybenzensulfonylgruppe, en carbobenzoxygruppe, en isobornyloxycarbonylgruppe, en adamantyloxycarbonylgruppe osv. Guanidinogruppen kan også beskyttes i form af et salt med en syre (f.eks. benzen-
10 sulfonsyre, toluensulfonsyre, saltsyre, svovlsyre osv.).

Hydroxygruppen i threonin kan beskyttes ved esterifikation eller etherifikation. Som eksempler på til esterifikation egnede grupper kan der nævnes lavere alkanoylgrupper (f.eks. en acetylgruppe osv.), aroylgrupper
15 (f.eks. en benzoylgruppe osv.), af kulsyre afledede grupper (f.eks. en benzoyloxycarbonylgruppe, ethyloxycarbonylgruppe osv.) og lignende, og som eksempler på en til etherifikation egnet gruppe kan der nævnes en benzylgruppe, en tetrahydropyranylgruppe, en tert-butylgruppe
20 osv. Hydroxygruppen i threonin beskyttes dog ikke nødvendigvis. Methionin kan beskyttes i form af sulfoxid.

Som eksempler på udgangsmaterialer med aktiveret carboxylgruppe kan der nævnes syreanhydrider, azider, aktive estere (estere med pentachlorphenol, p-nitrophenol,
25 N-hydroxysuccinimid, N-hydroxybenzotriazol, N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid osv.) og lignende.

Den peptidbindingsdannende reaktion udføres i nogle tilfælde i nærværelse af et dehydratiserende middel, såsom et carbodiimidreagens (f.eks. dicyclohexylcarbodiimid eller carbodiimidazol).
30

Den peptidbindingsdannende reaktion kan udføres i nærværelse af et opløsningsmiddel. Som et sådant opløsningsmiddel kan et passende udvælges blandt dem, der vides at være anvendelige til peptidkondensationsreaktioner.
35 Som eksempler herpå kan der nævnes vandfrit el-

ler vandigt dimethylformamid, dimethylsulfoxid, pyridin, chloroform, dioxan, dichlormethan, tetrahydrofuran, ethylacetat, N-methylpyrrolidon og blandinger heraf.

Reaktionstemperaturen vælges passende i det område, der vides at være anvendeligt til peptidbindingsdannende reaktioner, sædvanligvis fra ca. -40 til ca. 60°C, fortrinsvis fra ca. -20°C til ca. 0°C.

Efter afslutning af den ovenfor beskrevne kondensationsreaktion kan eventuelle beskyttelsesgrupper i produktet fjernes ved en konventionel fremgangsmåde. Som eksempler på en sådan konventionel fremgangsmåde kan der nævnes en reduktionsproces (f.eks. hydrogenering under anvendelse af en katalysator som palladiumsort, reduktion under anvendelse af natriummetal i flydende ammoniak osv.), acidolyse (f.eks. acidolyse med en stærk syre, såsom trifluoreddikesyre, hydrogenfluorid eller methansulfonsyre).

Peptidet med den almene formel (1) som beskrevet ovenfor isoleres fra reaktionsblandingen og renses ved en peptidfraskillellesmetode, såsom ekstraktion, fordeling, kolonnechromatografi osv.

Til fremstilling af antistoffet under anvendelse af det opnåede antigen administreres antigenet til et pattedyr på konventionel måde, og det in vivo dannede antistof opsamles. Det pattedyr, der skal anvendes til fremstilling af antistoffet, er ikke underkastet særlige begrænsninger. Dog er kaniner og marsvin sædvanligvis hensigtsmæssige. Ved fremstilling af antistoffet fortyndes en forudbestemt mængde af det som ovenfor beskrevet opnåede antigen med en fysiologisk saltopløsning til en forudbestemt koncentration. Denne opløsning blandes derefter med Freund's fuldstændige adjuvans til fremstilling af en dispersion, som derefter administreres til pattedyret. F.eks. administreres den ovenfor beskrevne

dispersion intradermalt til en kanin i en dosis på 0,5 til 5 mg af antigenet på én gang. Derefter gentages administreringen i en dosis på 0,5 til 5 mg én gang hveranden uge i 2 til 10 måneder, fortrinsvis 4 til 6 måneder til immunisering af kaninen.

Opsamlingen af antistoffet kan udføres ved åreladning af den immuniserede kanin, når der er dannet en stor mængde af antistoffet efter den sidste administrering af den antigenet indeholdende dispersion, almindeligvis 1 til 2 uger efter den sidste administrering, og centrifugering af det således opnåede blod til fraskillelse af antiserum.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse har den fordel, at der med god reproducerbarhed kan opnås et i høj grad aktivt og i høj grad sensitivt antistof i stabil form, som har en yderst fortrinlig specificitet med hensyn til humant og animalsk tarm-glucagon baseret på den enestående beskaffenhed af det anvendte antigen.

Det således opnåede antistof har en særlig fortræffelig specificitet med hensyn til tarm-glucagon som beskrevet ovenfor og gør det muligt at bestemme humant tarm-glucagon med stor nøjagtighed efter RIA-metoden. Dette antistof kan også anvendes til en enzym-immunoassaymetode (EIA-metode), en fluorescens-immunoassaymetode (FIA-metode) osv. ved mærkning med et enzym eller et fluorescerende materiale. Endvidere kan dette antistof omsættes med et kendt uopløseliggørende materiale til fremstilling af et uopløseligt antistof.

Den foreliggende opfindelse beskrives nærmere ved hjælp af de efterfølgende ikke-begrænsende referenceeksempler og eksempler.

R_f -værdierne i referenceeksemplerne er målt ved tyndtlagschromatografi på silicagel under anvendelse af følgende opløsningsmiddelblandinger:

- 5 R_f^I 1-butanol-eddikesyre-vand (4:1:5)
 R_f^{II} 1-butanol-pyridin-eddikesyre-vand
 (31:20:6:24)

[Fremstilling af peptidet med den almene formel (1)].

Referenceeksempel 1

10 (1) Fremstilling af Z-Ile-Ala-OH:

10,87 g Z-Ile-OSu opløst i 50 ml tetrahydrofuran
 sattes til 30 ml af en vandig opløsning indeholdende
 2,67 g H-Ala-OH og 4,20 ml triethylamin under iskøling.
 Reaktionsopløsningen omrørtes ved stuetemperatur i 20 ti-
 15 mer efterfulgt af afdestillation af opløsningsmidlet. Der-
 på opløstes remanensen i 100 ml af en 2%'s vandig tri-
 ethylaminopløsning og vaskedes 3 gange med ethylacetat.
 Efter syring af den vandige opløsning med 3 N citronsy-
 re dannedes der en olieagtig udskillelse, som derefter
 20 ekstraheredes med ethylacetat. Ekstrakten vaskedes derpå
 med 1 N citronsyre og mættet vandig natriumchloridopløs-
 ning efterfulgt af afdestillation af opløsningsmidlet.
 Remanensen blev bragt i fast form fra en methanol-ether-
 blanding til opnåelse af 6,5 g af slutproduktet, smp.
 25 156-161°C, $[\alpha]_D^{20}$: -29,4° (C = 1,0, methanol).

(2) Fremstilling af Z-Asn-Ile-Ala-OH:

3,36 g Z-Ile-Ala-OH reduceredes katalytisk i en op-
 løsningsmiddelblanding bestående af 20 ml methanol og 15
 ml vand i nærværelse af palladiumsort. Det opnåede di-
 30 peptid opløstes i 20 ml vand indeholdende 1,4 ml tri-
 ethylamin og 16 ml tetrahydrofuran og afkøledes til -10°C.

Til denne opløsning sattes et blandet syreanhydrid opnået ud fra 3,46 g Z-Asn-OH, 1,67 ml isobutylchlorformiat og 1,42 ml N-methylmorpholin ved -10°C i en blandet opløsning af 15 ml dimethylformamid og 20 ml tetrahydrofuran. Reaktionsblandingen omrørtes ved 0°C i 5 minutter og derefter ved 15°C i 30 minutter, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Til remanensen sattes 1 N citronsyre, og et således dannet bundfald vaskedes med vand, tørredes og rensedes ved genudfældning fra methanol-ethylacetat. På denne måde opnåedes der 3,60 g af slutproduktet, smp. $240-244^{\circ}\text{C}$ (d.), $[\alpha]_{\text{D}}^{19}$: $-13,8^{\circ}$ (C: 1,0, dimethylformamid).

(3) Fremstilling af Z-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

4,74 g Z-Asn-Ile-Ala-OH opløstes i 20 ml iseddike. Derpå tilsattes der 25 ml 25%'s hydrogenbromid i eddikesyre, og man lod blandingen henstå ved stuetemperatur i 60 minutter. Et ved tilsætning af vandfri ether dannet bundfald opsamledes ved filtrering, vaskedes med ether og tørredes over kaliumhydroxid. Det således opnåede decarbobenzoxylerede produkt opløstes i 50 ml dimethylformamid indeholdende 3,08 ml triethylamin og afkøledes til -10°C . Til denne opløsning sattes et blandet syreanhydrid af Z-Asn fremstillet ud fra 4,18 g Z-Asn-OH, 1,60 ml N-methylmorpholin og isobutylchlorformiat. De efterfølgende processer udførtes på samme måde som beskrevet ovenfor under (2) til opnåelse af 3,60 g af slutproduktet, smp. 235°C (d.), $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: $-10,1^{\circ}$ (C: 0,5, 80% eddikesyre).

(4) Fremstilling af Z-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

3,41 g Z-Asn-Asn-Ile-Ala-OH opløstes i 15 ml iseddike, og der tilsattes 25 ml 25%'s hydrogenbromid i eddikesyre til fjernelse af carbobenzoxygruppen som be-

skrevet ovenfor under (3). Det opnåede decarbobenzoxyle-
 rede produkt opløstes i 30 ml dimethylformamid indehol-
 dende 1,70 ml triethylamin. Til denne opløsning sattes
 et blandet syreanhydrid opnået ud fra 3,13 g Z-Lys(Tos)-
 5 OH, 0,73 ml N-methylmorpholin og 0,95 g isobutylchloro-
 formiat. Efter de under (2) beskrevne procedurer opnåe-
 des der 4,01 g af slutproduktet, smp. 229-230°C (d.),
 $[\alpha]_D^{23}$: -19,4° (C: 1,0, dimethylformamid).

(5) Fremstilling af Z-Arg-(NO₂)-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-
 10 Ile-Ala-OH:

2,03 g Z-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH opløstes i
 20 ml iseddike. Derefter tilsattes der 20 ml 25%'s hy-
 drogenbromid i eddikesyre til fjernelse af carbobenzoxy-
 gruppen som beskrevet ovenfor under (2).

15 På den anden side henstilledes 4,19 g Z-Arg(NO₂)-
 Asn-N₂H₂-Boc i trifluoreddikesyre i 30 minutter ved
 stuetemperatur til fjernelse af Boc og opløstes derefter
 i 20 ml dimethylformamid. Til denne opløsning sattes der
 efter hinanden 3,61 ml 6 N saltsyre-dioxan og 0,96 ml
 20 isoamylnitrit ved -15°C, og den opnåede blanding omrør-
 tes ved -10°C i 5 sekunder efterfulgt af indstilling af
 pH-værdien til 7,5. Denne opløsning sattes ved -10°C til
 30 ml af den det ovenfor beskrevne decarbobenzoxyle-
 rede produkt indeholdende dimethylformamidopløsning og 0,64
 25 ml triethylamin, og reaktionsblandingen omrørtes ved 4°C
 i 20 timer efterfulgt af fjernelse af opløsningsmidlet.
 Til remanensen sattes 10% eddikesyre, og det således på
 fast form bragte materiale opsamledes ved filtrering,
 vaskedes med vand, tørredes og genudfældedes af metha-
 30 nol-ethylacetat til opnåelse af 2,19 g af slutproduktet,
 smp. 232-234°C, $[\alpha]_D^{21}$: -14,3° (C: 1,0, 80% eddikesyre).

(6) Fremstilling af Z-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-
 Ile-Ala-OH:

2,14 g Z-Arg(NO₂)-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH
 35 reduceredes katalytisk i 50 ml 50% eddikesyre i nærværel-
 se af palladiumsort til fjernelse af carbobenzoxygruppen.
 Det opnåede decarbobenzoxyle- rede produkt opløstes i 20 ml

dimethylformamid indeholdende 2,52 ml triethylamin. Til denne opløsning sættes Z-Lys(Tos)-OSu fremstillet ved omsætning af 2,40 g Z-Lys(Tos)-OH med 0,64 g N-hydroxysuccinimid i nærværelse af 1,14 g dicyclohexylcarbodiimid uden rensning. Reaktionsblandingen omrørtes ved stuetemperatur i 20 timer, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Til remanensen sættes 10% eddikesyre for at bringe den på fast form. På denne måde opnåedes der 1,42 g af slutproduktet, $smp. 200-204^{\circ}C$ $[\alpha]_D^{23}: -30,5^{\circ}$ (C: 1,0, 80% eddikesyre).

(7) Fremstilling af Boc-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

1,38 g Z-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH opløstes i 5 ml iseddike, og der tilsattes 7 ml 25% hydrogenbromid-eddikesyre til fjernelse af carbobenzyoxygruppen som beskrevet ovenfor under (3).

1,75 g Boc-Leu-Met-Asn-Thr N_2H_3 opløstes i 15 ml dimethylformamid og behandlede med 1,43 ml 6 N saltsyre-dioxan og 0,38 ml isoamylnitrit på samme måde som under (5) og sættes derefter til 15 ml dimethylformamid indeholdende det ovenfor beskrevne decarbobenzoxylerede produkt og 0,28 ml triethylamin. Reaktionsblandingen omrørtes ved $4^{\circ}C$ i 20 timer, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Remanensen underkastedes en modstrømsfordelingsmetode i et 1-butanol-2% eddikesyre-system, og 1-butanollaget opsamledes efterfulgt af afdestillation af opløsningsmidlet. Til remanensen sættes ethylacetat, og det på fast form bragte produkt vaskedes med methanol til opnåelse af 1,10 g af slutproduktet. R_f^I -værdi: 0,28.

(8) Fremstilling af Boc-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

1,05 g Boc-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH henstilledes i 6 ml trifluor-eddikesyre ved stuetemperatur i 30 minutter, og der tilsattes tør ether. Det således dannede bundfald opsamledes ved filtrering, vaskedes med ether og tørredes over natriumhydroxid under formindsket tryk til opnåelse af

det Boc-fri produkt.

Boc-Trp-OSu (fremstillet ved omsætning af 700 mg Boc-Trp-OH med 265 mg N-hydroxysuccinimid under indvirkning af 475 mg dicyclohexylcarbodiimid) opløstes i 20 ml 5 dioxan, og denne opløsning sattes til 15 ml af en dimethylformamidopløsning indeholdende det ovenfor beskrevne Boc-fri produkt og 0,16 ml triethylamin. Denne reaktionsblanding omrørtes ved stuetemperatur i 24 timer, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Til remanensen sat-
10 tes ethylacetat, og det således på fast form bragte produkt vaskedes med ethanol til opnåelse af 798 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,44.

(9) Fremstilling af Boc-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

15 777 mg Boc-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH behandlede i 4 ml trifluoreddikesyre til fjernelse af Boc som under (8).

En opløsning af 513 mg Boc-Val-Gln-OSu i 10 ml dimethylformamid sattes til en opløsning af det ovenfor
20 beskrevne Boc-fri produkt og 0,02 ml triethylamin i 5 ml dimethylformamid. Denne reaktionsblanding omrørtes ved stuetemperatur i 24 timer, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Derpå sattes der 10% eddikesyre til remanensen, og det således på fast form bragte produkt vaske-
25 des med vand og ethanol til opnåelse af 662 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,26.

(10) Fremstilling af H-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

30 645 mg Boc-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH henstilledes ved stuetemperatur i 40 minutter i nærværelse af 4 ml trifluoreddikesyre, 0,4 ml ethandithiol og 0,2 ml anisol til fjernelse af Boc som beskrevet ovenfor under (8).

35 783 mg Boc-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-N₂H₃ (smp. 158-163°C (d.)), $[\alpha]_D^{22}$: -1,0° (C: 1,0, dimethylsulfoxid)) opløstes i 10 ml dimethylformamid, og efter tilsætning

af 0,35 ml 6 N saltsyre-dioxan ved -15°C tilsattes der yderligere 0,09 ml isoamylnitrit. Efter omrøring af opløsningen ved -10°C i 5 minutter indstilledes opløsningens pH-værdi på 7,5 med triethylamin. Den opnåede opløsning 5 sættes til en opløsning af det ovenfor beskrevne Boc-fri produkt og 0,12 ml triethylamin i 10 ml dimethylformamid ved -10°C . Denne reaktionsblanding omrørtes ved 4°C i 20 timer, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Remanensen bragtes derefter på fast form ved til- 10 sætning af ethylacetat, opsamledes ved filtrering og tørredes.

Dette reaktionsprodukt underkastedes, uden yderligere rensning, trinnet til fjernelse af Boc med 5 ml trifluoreddikesyre i nærværelse af 0,5 ml ethandithiol. 15 Det opnåede Boc-fri produkt opløstes i 20 ml af en blandet opløsning af 1-butanol-methanol-vand (1:1:1), og opløsningen hældtes på en kolonne med "Amberlite[®] IRA-410" (2 x 4 cm) til omdannelse af produktet til et acetat. Det således opnåede acetat lyofiliseredes, opløstes i 20 1 M eddikesyre, fyldtes på en "Sephadex[®] G25"-kolonne (3 x 190 cm) og underkastedes gelfiltrering under anvendelse af 1 M eddikesyre som eluent. Fraktioner indeholdende slutproduktet (nr. 64 til 80) opsamledes, og opløsningsmidlet afdestilleredes efterfulgt af lyofilisering 25 ring af remanensen. Denne opløstes derpå i 5 ml af et nedre lag af et opløsningsmiddelsystem (1-butanol: eddikesyre:vand = 4:1:5) og rensedes ved en væskedråbe-modstrømsfordelingsmetode under anvendelse af et øvre lag af det samme opløsningsmiddelsystem. Fraktioner in- 30 deholdende slutproduktet opsamledes, og opløsningsmidlet afdestilleredes, hvorefter der udførtes lyofilisering til opnåelse af 260 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,20, R_f^{II} : 0,65.

Aminosyreanalyse af syredekompeneret produkt:

35 Lys (2) 2,11, Arg (3) 2,60, Asp (5) 4,74,
 Thr (1) 0,87, Glu (2) 2,08, Ala (2) 2,17,
 Val (1) 1,18, Met (1) 1,03, Ile (1) 0,95,
 Leu (1) 1,02, Phe (1) 1,06.

(11) Fremstilling af H-Ser-Lys(Tos)-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

485 mg Boc-Ser-Lys(Tos)-Tyr-Leu-Asp-Ser-N₂H₃
 5 (smp. 174-175°C (d.), $[\alpha]_D^{22}$: -21,8° (C: 1,0, dimethylformamid) kondenseredes med H-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH efter en azid-metode under anvendelse af 0,15 ml 6 N saltsyre-dioxan og 0,31 ml 20%
 10 isoamylnitrit-dimethylformamid-opløsning på samme måde som under (10). Efter endt reaktion afdestilleredes opløsningsmidlet. Efter tilsætning af ethylacetat størkne-
 de produktet. Dette råprodukt opløstes i 5 ml af et nedrelag af et opløsningsmiddelsystem (1-butanol:eddikesyre: vand = 4:1:5) og underkastedes en væskedråbe-mod-
 15 strømsfordelingsmetode til udførelse af rensning. Fraktioner indeholdende slutproduktet opsamledes, og opløsningsmidlet afdestilleredes. Remanensen opløstes i 7 ml af en blanding af 1-butanol-methanol-vand (1:1:1) og
 20 hældtes på en kolonne med "Sephadex[®] LH 20" (3 x 108 cm) til udførelse af gelfiltrering under anvendelse af 1-butanol-methanol-vand (1:1:1) som eluent. Fraktioner indeholdende slutproduktet opsamledes, og opløsningsmidlet afdestilleredes. Til remanensen sættes derpå ethylacetat
 25 til fremkaldelse af størkning. Det således størknede produkt behandlede i nærværelse af 3 ml trifluoreddikesyre og 0,2 ml ethandithiol til fjernelse af Boc. Det tørrede Boc-fri produkt opløstes i 5 ml 1 M eddikesyre og hældtes på en kolonne med "Sephadex[®] G50" (3 x 145
 30 cm) til udførelse af gelfiltrering under anvendelse af 1 M eddikesyre som eluent. Fraktioner indeholdende slutproduktet (nr. 43-57) opsamledes, hvorefter opløsningsmidlet afdestilleredes. Remanensen lyofiliseredes derpå til opnåelse af 93 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,25, R_f^{II} :
 35 0,54.

Aminosyreanalyse af syredekomponeret produkt
 (6 N HCl, 110°C, 24 timer)

Lys (3) 2,80, Arg (3) 2,89, Asp (6) 6,10,
 Thr (1) 0,97, Ser (2) 1,79, Glu (2) 2,06,
 Ala (2) 2,03, Val (1) 0,99, Met (1) 0,87,
 Ile (1) 1,00, Leu (2) 1,98, Thr (1) 1,00,
 5 Phe (1) 1,00.

(12) Fremstilling af H-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

25 mg Z-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH opløstes i 30 ml flydende ammoniak, og der tilsattes
 10 metallisk natrium i små stykker. Når reaktionsopløsningen blev blå, sættes der 0,5 g tørt ammoniumchlorid til den, hvorefter ammoniakken afdestilleredes. Remanensen opløstes i 1 M eddikesyre og underkastedes gelfiltrering under anvendelse af "Sephadex G10" (4 x 43 cm), idet der
 15 anvendtes 1 M eddikesyre som eluent. Fraktioner indeholdende slutproduktet opsamledes, og opløsningsmidlet afdestilleredes efterfulgt af lyofilisering af remanensen til opnåelse af 10 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,01, R_f^{II} : 0,27.

20 Aminosyreanalyse af syredekomponeret produkt.

Lys (2) 1,84, Arg (1) 0,94, Asp (3) 3,08,
 Ala (1) 1,08, Ile (1) 1,05.

(13) Fremstilling af H-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

25 10 mg Boc-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys(Tos)-Arg-Asn-Lys(Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH behandledes i nærværelse af 1 ml trifluoreddikesyre og 0,1 ml ethandithiol til fjernelse af Boc og behandledes derefter med metallisk natrium i flydende ammoniak på samme måde som under
 30 (12) til fjernelse af beskyttelsesgrupperne. Ved rensning ved gelfiltrering opnåedes 5 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,20, R_f^{II} : 0,49, $[\alpha]_D^{23}$: -50,0 (C: 0,07, 1 M eddikesyre).

(14) Fremstilling af H-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

100 mg H-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-

Met-Asn-Thr-Lys (Tos)-Arg-Asn-Lys (Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH behandledes på samme måde som under (12) til fjernelse af alle beskyttelsesgrupper. Ved rensning ved gelfiltrering opnåedes 40 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,20, R_f^{II} : 0,51, $[\alpha]_D^{23}$: $-46,3^\circ$ (C: 0,2, 1 M eddikesyre).

(15) Fremstilling af H-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH:

10 mg H-Ser-Lys (Tos)-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys (Tos)-Arg-Asn-Lys (Tos)-Asn-Asn-Ile-Ala-OH behandledes på samme måde som under (12) til fjernelse af alle beskyttelsesgrupper og underkastedes derpå gelfiltrering på "Sephadex[®] G-50" (2,5 x 135 cm) under anvendelse af 1 M eddikesyre som eluent. Fraktioner indeholdende slutproduktet opsamledes og lyofiliseredes til opnåelse af 4 mg af slutproduktet. R_f^I : 0,20, R_f^{II} : 0,49, $[\alpha]_D^{23}$: $60,9^\circ$ (C: 0,1, 1 M eddikesyre).

[Fremstilling af antistof].

20

Eksempel 1

10 mg af det i referenceeksempel 1 (14) opnåede peptid (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelt hen som "peptid A") og 5 mg okseserumalbumin (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelthen som "BSA") opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0), og der tilsattes 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derpå i 48 timer ved 4°C under anvendelse af 1 liter vand, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplekset lyofiliseredes derpå til opnåelse af 14 mg af tarm-glucagon-antigenet (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelthen som "antigen I").

35

Det således opnåede antigen I underkastedes endvidere gelfiltrering under anvendelse af "Sephadex[®] G-50" (eluent: fysiologisk saltopløsning, påvisning: OD 280 mm,

elueringshastighed: 3 ml/time, udleveret mængde: 1 ml portion). Fraktion [I] indeholdende peptid A bundet til BSA adskiltes fra fraktion [II] indeholdende andet produkt (dimer af peptid A), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% vandig natriumchloridopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til opnåelse af 7 mg hvidt, pulverformigt peptid A-BSA-komplex (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelthen som "antigen I"). Dette kompleks var et kompleks bestående af 1 mol BSA med i gennemsnit 13 mol peptid A koblet dertil. Det skal tilføjes, at dette bindingsforhold opnåedes som følger:

Først udarbejdedes der en standardkurve for koncentrationen af peptid-A-dimeren baseret på, at der viste sig ikke at være uomsat BSA og peptid A tilbage, og mængden af peptid-A-dimeren i den ovennævnte fraktion beregnedes ud fra standardkurven. Derefter udleddes mængden fra mængden af i starten tilsat peptid A. Den fremkomne mængde peptid A antoges at svare til mængden af til BSA koblet peptid A.

Eksempel 2

5 mg af peptidet H-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH, opnået på samme måde som i referenceeksempel 1 (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelthen som "peptid B") og 5 mg BSA opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH 7,0). 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning sættes til denne opløsning, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes til opnåelse af 9 mg af et tarm-glucagon-antigen (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelthen som "antigen II").

Dette antigen II underkastedes yderligere gel-filtrering under anvendelse af "Sephadex® G-50" til ad-

skillelse af fraktion [I] indeholdende peptid B koblet til BSA fra fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid-B-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes 5 til opnåelse af 6 mg hvidt, pulverformigt peptid B-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med i gennemsnit 10 mol peptid B koblet dertil.

Eksempel 3

4 mg af det i referenceeksempel 1 (12) opnåede 10 peptid (i det følgende for kortheds skyld betegnet simpelthen som "peptid C") og 5 mg BSA opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0). Til denne opløsning sættes 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter 15 mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes til opnåelse af 7,5 mg af et tarm-glucagon-antigen (i det følgende for 20 kortheds skyld betegnet simpelthen som "antigen III").

Dette antigen III underkastedes yderligere gel-filtrering under anvendelse af "Sephadex[®] G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid C koblet til BSA fra fraktion [II] indeholdende andet 25 produkt (peptid-C-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til opnåelse af 5,5 mg hvidt, pulverformigt peptid C-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med i gennemsnit 8 mol peptid C koblet dertil.

30

Eksempel 4

4 mg af peptidet H-Lys-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH, opnået som i referenceeksempel 1 (i det følgende forkortet til "peptid D") og 5 mg BSA opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, 35 pH 7,0). Til denne opløsning sættes 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes

ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes til opnåelse af 8 mg af et tarm-gluca-
5 gon-antigen (i det følgende forkortet til "antigen IV").

Dette antigen IV underkastedes yderligere gelfiltrering under anvendelse af "Sephadex® G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid D bundet til
10 BSA og fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid-D-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til opnåelse af 6 mg hvidt, pulverformigt peptid D-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med
15 i gennemsnit 9 mol peptid D koblet dertil.

Eksempel 5

4 mg af peptidet H-Tyr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH, opnået som i referenceeksempel 1 (i det følgende forkortet til "peptid E") og 5 mg BSA opløstes
20 i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0). Til denne opløsning sættes 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48
25 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes til opnåelse af 7 mg af et tarm-glucagon-antigen (i det følgende forkortet til "antigen V").

Dette antigen V underkastedes yderligere gelfiltrering under anvendelse af "Sephadex® G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid E bundet til
30 BSA og fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid-E-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til
35 opnåelse af 5 mg af hvidt, pulverformigt peptid E-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med i gennemsnit 6 mol peptid E koblet dertil.

Eksempel 6

5 mg af peptidet H-Gly-Lys-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH, opnået som i referenceeksempel 1 (i det følgende forkortet til "peptid F") og 5 mg BSA opløstes
5 i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0). Til denne opløsning sættes 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer,
10 hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes til opnåelse af 9 mg af et tarm-glucagon-antigen (i det følgende forkortet til "antigen VI").

Dette antigen VI underkastedes yderligere gel-
15 filtrering under anvendelse af "Sephadex® G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid F bundet til BSA og fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid F-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes
20 til opnåelse af 6 mg hvidt, pulverformigt peptid F-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med i gennemsnit 14 mol peptid F koblet dertil.

Eksempel 7

4 mg af peptidet H-Ala-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-
25 Ile-Ala-OH opnået som i referenceeksempel 1 (i det følgende forkortet til "peptid G") og 5 mg BSA opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0). Til denne opløsning sættes 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes
30 ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes til opnåelse af 7,5 mg af et tarm-
35 glucagon-antigen (i det følgende forkortet til "antigen VII").

Dette antigen VII underkastedes yderligere gel-

25

filtrering under anvendelse af "Sephadex[®] G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid G bundet til BSA og fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid-G-dimer), og fraktion [I] dialyseredes 5 mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til opnåelse af 5,5 mg hvidt, pulverformigt peptid G-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med i gennemsnit 9 mol peptid G koblet dertil.

Eksempel 8

10 4 mg af peptidet H-Gly-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH, opnået som i referenceeksempel 1 (i det følgende forkortet til "peptid H") og 5 mg BSA opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0). Til denne opløsning sattes 0,11 ml af en 0,1 M 15 glutaraldehydopløsning, hvorefter der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingen dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-komplex lyofiliseredes 20 til opnåelse af 7,5 mg af et tarm-glucagon-antigen (i det følgende forkortet til "antigen VIII").

Dette antigen VIII underkastedes yderligere gel-filtrering under anvendelse af "Sephadex[®] G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid H bundet 25 til BSA og fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid-H-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til opnåelse af 6 mg hvidt, pulverformigt peptid H-BSA-komplex. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA 30 med i gennemsnit 10 mol peptid H koblet dertil.

Eksempel 9

12 mg af det i referenceeksempel 1 (15) opnåede peptid (i det følgende forkortet til "peptid I") og 5 mg BSA opløstes i 2 ml af en ammoniumacetatpufferopløsning (0,1 M, pH 7,0). Til denne opløsning sattes 35 0,11 ml af en 0,1 M glutaraldehydopløsning, hvorefter

der omrørtes ved stuetemperatur i 5 timer. Reaktionsblandingens dialyseredes derefter mod 1 liter vand ved 4°C i 48 timer, hvorunder vandet udskiftedes 5 gange. Den opnåede opløsning indeholdende peptid-protein-kompleks lyofiliseredes til opnåelse af 15 mg af et tarm-glucagon-antigen (i det følgende forkortet til "antigen IX").

Dette antigen IX underkastedes yderligere gel-filtrering under anvendelse af "Sephadex® G-50" til adskillelse af fraktion [I] indeholdende peptid I bundet til BSA og fraktion [II] indeholdende andet produkt (peptid I-dimer), og fraktion [I] dialyseredes mod 0,6% saltopløsning ved 4°C i 24 timer og lyofiliseredes til opnåelse af 7,5 mg af hvidt, pulverformigt peptid K-BSA-kompleks. Dette kompleks var et kompleks af 1 mol BSA med i gennemsnit 10 mol peptid I koblet dertil.

[Fremstilling af antistof].

Eksempel 10

3 mg af det i eksempel 1 opnåede antigen I opløstes i 1,5 ml fysiologisk saltopløsning, og der tilsattes 1,5 ml af Freund's fuldstændige adjuvans til dannelsen af en dispersion. Den således opnåede dispersion administreredes intradermalt til 3 kaniner (af en vægt på 2,5 til 3,0 kg). Administrering i den samme dosis blev derefter gentaget 5 gange én gang hver anden uge. Yderligere blev administrering i en dosis på det halve af initialdosen gentaget 5 gange én gang hver måned. 10 Dage efter den sidste administrering blev de immuniserede dyr åreladet, og det således opnåede blod centrifugeredes til fraskillelse af antiserum. På denne måde opnåedes der et tarm-glucagon-antistof ifølge den foreliggende opfindelse (i det følgende forkortet til "antistof I").

Eksempel 11

35 3 mg af det i eksempel 1 opnåede antigen I opløstes i 1,5 ml af en fysiologisk saltopløsning, og

der tilsattes 1,5 ml af Freund's fuldstændige adjuvans til dannelse af en dispersion. Den således opnåede dispersion administreredes intradermalt til 3 kaniner (af en vægt på 2,5 til 3,0 kg). Administrering i den samme dosis blev derefter gentaget 5 gange én gang hver anden uge. Yderligere blev administrering i en dosis på det halve af initialdosen gentaget 5 gange én gang hver måned. 10 dage efter den sidste administrering blev de immuniserede dyr åreladet, og det således opnåede blod centrifugeredes til adskillelse af antiserum. På denne måde opnåedes der et tarm-glucagon-antistof ifølge den foreliggende opfindelse (i det følgende forkortet til "antistof II").

Eksempel 12

3 mg af det i eksempel 9 opnåede antigen IX opløstes i 1,5 ml af en fysiologisk saltopløsning, og der tilsattes 1,5 ml af Freund's fuldstændige adjuvans til dannelse af en dispersion. Den således opnåede dispersion administreredes intradermalt til 3 kaniner (af en vægt på 2,5 til 3,0 kg). Administrering i den samme dosis blev derefter gentaget 5 gange én gang hver anden uge. Yderligere blev administrering i en dosis på det halve af initialdosen gentaget 5 gange én gang hver måned. 10 dage efter den sidste administrering blev de immuniserede dyr åreladet, og det således opnåede blod centrifugeredes til fraskillelse af antiserum. På denne måde opnåedes der et tarm-glucagon-antistof ifølge den foreliggende opfindelse (i det følgende forkortet til "antistof III").

Eksempel 13

3 mg af det i eksempel 2 opnåede antigen II opløstes i 1,5 ml af en fysiologisk saltopløsning, og der tilsattes 1,5 ml af Freund's fuldstændige adjuvans til dannelse af en dispersion. Den således opnåede dispersion administreredes intradermalt til 3 kaniner (af en vægt på 2,5 til 3,0 kg). Administrering i den

samme dosis blev derefter gentaget 5 gange én gang hver anden uge. Yderligere blev administrering i en dosis på det halve af initialdosen gentaget 5 gange én gang hver måned. 10 dage efter den sidste administrering
5 blev de immuniserede dyr åreladet, og det således opnåede blod centrifugeredes til fraskillelse af antiserum. På denne måde opnåedes det et tarm-glucagon-antistof ifølge den foreliggende opfindelse (i det følgende forkortet til "antistof IV").

10

Eksempel 14

3 mg af det i eksempel 3 opnåede antigen III opløstes i 1,5 ml af en fysiologisk saltopløsning, og der tilsattes 1,5 ml af Freund's fuldstændige adjuvans til dannelsen af en dispersion. Den således opnåede disper-
15 sion administreredes intradermalt til 3 kaniner (af en vægt på 2,5 til 3,0 kg). Administrering i den samme dosis blev derefter gentaget 5 gange én gang hver anden uge. Yderligere blev administrering i en dosis på det halve af initialdosen gentaget 5 gange én gang hver
20 måned. 10 dage efter den sidste administrering blev de immuniserede dyr åreladet, og det således opnåede blod centrifugeredes til fraskillelse af antiserum. På denne måde opnåedes der et tarm-glucagon-antistof ifølge den foreliggende opfindelse (i det følgende
25 forkortet til "antistof V").

Eksempel 15

Når de i eksemplerne 4 til 8 opnåede antigener anvendtes og behandlede på samme måde som i eksempel
10, opnåedes der antistoffer med høj aktivitet og
30 høj specificitet med hensyn til tarm-glucoagon.

Referenceeksempel 2

Fremstilling af mærket peptid:

H-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-
Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-
35 Ala-OH mærkedes ved den fremgangsmåde, ved hvilken der

anvendes chloramin T. Det vil sige, 10 μ l af en vandig opløsning indeholdende 5 mg af det ovenfor beskrevne peptid og 10 μ l af en vandig opløsning indeholdende 1 mc [125 I]Na(MEN) og 20 μ g chloramin T sættes lidt

5 efter lidt til 20 μ l af en 1,0 M fosfatpufferopløsning (pH 7,4). Efter 30 sekunders forløb blev reaktionen afbrudt ved tilsætning af 50 μ l vandig opløsning indeholdende 100 μ g natriummetadisulfat. Reaktionsblandingen hældtes derefter på en kolonne med "Sephadex[®] G-10"

10 (1,0 x 30 cm) under anvendelse af 0,1 M eddikesyre som eluent. Eluanten opsamledes i 1 ml portioner, og fraktionerne nr. 8 til 11 hældtes sammen til opnåelse af en opløsning indeholdende H-Ser-Lys-[I 125 -monoiodo-Tyr]-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-

15 Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-OH.

Bestemmelse af antistofaktivitet.

Aktiviteten af hvert af de således opnåede antistoffer bestemtes som følger. Hvert af antistofferne fortyndedes først med en fysiologisk saltopløsning til

20 koncentrationer på 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ,

Til 100 μ l af hver fortyndet opløsning sættes 100 μ l af 125 I-mærket peptid (fremstillet ved fortynding af den ovenfor beskrevne opløsning til en fortyndingsgrad på ca. 10.000 cpm) og 400 μ l af en 0,05 M fosfatpuffer

25 (pH = 7,5) [indeholdende 0,25% BSA, 0,01 M EDTA og trasylol (500 KIV/ml)], og blandingen inkuberedes ved 4°C i 66 timer. Det opnåede kompleks af antistoffet og det 125 I-mærkede antigen skiltes fra uomsat eller frit 125 I-mærket peptid under anvendelse af dextranovertruk-

30 ket aktivtkul og centrifugeredes ved 4°C ved en hastighed på 3000 o/m i 15 minutter. Radioaktiviteten af det således opnåede kompleks taltes til bestemmelse af bindingsforholdet (%) for 125 I-mærket peptid og antistof ved hver koncentration. Bindingsforholdet ved hver

35 koncentration afsattes grafisk med bindingsforholdet som ordinat og begyndelsesfortyndingen for antistof som abscisse. Den fortyndingsgrad for antistof, ved hvilken

bindingsforholdet (%) er 50%, var som følger:

	<u>Antistof</u>	<u>Aktivitet</u>
	Antistof I	20000
	Antistof II	25000
5	Antistof III	25000
	Antistof IV	10000
	Antistof V	5000

Bestemmelse af tarm-glucagon-specificitet.

10 Pancreatisk glucagon, 80-100 peptidsekvensen i svin-
neglicentin og tarm-glucagon (Peak I beskrevet i Kenny J.,
J. Clin. Endocr., 15, 865 (1955)) anvendtes i forskel-
lige koncentrationer som testprøver. Som standardfor-
tyndingsmiddel anvendtes der en 0,05 M phosphat-fysiolo-
15 gisk saltopløsning (pH 7,5) indeholdende 0,25% BSA,
0,01 M EDTA, trasylo1 (500 KIV/ml) og 0,01% NaN₃.

400 µl af standardfortyndingsmidlet, 100 µl
af hver testprøve, 100 ml af det i eksempel 10 opnåede
antistof I (aktivitet: 20000) og 100 µl ¹²⁵I-mærket
20 peptid (fremstillet ved fortynding af det ovenfor
opnåede mærkede peptid til en fortyndingsgrad på ca.
10000 cpm) anbragtes i et rørglas og inkuberedes ved
4°C i 66 timer. Til blandingen sattes 1 ml af en dis-
persion af 0,25% aktivt kul overtrukket med 0,025%
25 dextran, hvorefter der inkuberedes ved 4°C i 30 minut-
ter. Den således behandlede blanding adskiltes i anti-
stof-bundet ¹²⁵I-mærket standardpeptid og uomsat (eller
frit) mærket standardpeptid ved centrifugering ved en
hastighed på 3000 o/m ved 4°C. Radioaktiviteten af
30 hvert peptid målt. Bindingsforholdet (%) for ¹²⁵I-
mærket peptid og hver prøve ved hver koncentration
og fortynding bestemtes, idet bindingsforholdet (B₀)
svarende til aktiviteten af anvendt antistof blev
taget som 100%. De således opnåede resultater er vist
35 i fig. 1. I fig. 1 repræsenterer ordinaten bindings-
forholdet (%) (B/B₀ x 100), og abscissen repræsenterer
koncentrationen af testprøven (pancreatisk glucagon og
80-100 peptidsekvensen i svineneglicentin) og fortyndings-

graden for tarm-glucagon (Peak I). I fig. 1 betegner bogstavet (a) pancreatisk glucagon, bogstavet (b) betegner 80-100 peptidsekvensen i svineglicentin, og bogstavet (c) betegner tarm-glucagon. Af fig. 1 kan det ses, at antistof I viser en kurve repræsenterende reaktiviteten med pancreatisk glucagon, som er tydelig skelnelig fra kurven, der repræsenterer reaktiviteten med tarm-glucagon. Heraf følger det, at antistoffet ifølge den foreliggende opfindelse ikke krydsreagerer med pancreatisk glucagon og har fortrinlig specificitet.

Med antistofferne III, IV og V bestemtes tarm-glucagon-specificiteten på samme måde som beskrevet ovenfor, og de således opnåede resultater er vist i fig. 2, 3 og 4.

Fig. 2 er en grafisk afbildning, der viser specificiteten af antistof III, og hvori ordinaten repræsenterer bindingsforholdet (%) ($B/B_0 \times 100$), og abscissen repræsenterer koncentrationen af testprøven (pancreatisk glucagon og 74-100 peptidsekvensen i svineglicentin) og fortyndingsgraden for tarm-glucagon (Peak I). I fig. 2 betegner bogstavet (a) pancreatisk glucagon, bogstavet (c) betegner tarm-glucagon, og bogstavet (d) betegner 74-100 peptidsekvensen i svineglicentin.

Fig. 3 er en grafisk afbildning, der viser specificiteten af antigen IV, og hvori ordinaten repræsenterer bindingsforholdet (%) ($B/B_0 \times 100$), og abscissen repræsenterer koncentrationen af testprøven (pancreatisk glucagon og 89-100 peptidsekvensen i svineglicentin) og fortyndingsgraden for tarm-glucagon (Peak I). I fig. 3 betegner bogstavet (a) pancreatisk glucagon, bogstavet (c) betegner tarm-glucagon, og bogstavet (e) betegner 89-100 peptidsekvensen i svineglicentin.

Fig. 4 er en grafisk afbildning, der viser specificiteten af antistof V, og hvori ordinaten repræsenterer bindingsforholdet (%) ($B/B_0 \times 100$), og abscissen repræsenterer koncentrationen af testprøven (pancreatisk

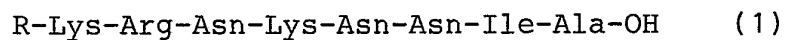
glucagon og 93-100 peptidsekvensen i svineglicentin) og fortyndingsgraden for tarm-glucagon (Peak I). I fig. 4 betegner bogstavet (a) pancreatisk glucagon, bogstavet (c) betegner tarm-glucagon, og bogstavet (f) betegner 5 93-100 peptidsekvensen i svineglicentin.

Af fig. 2 til 4 kan det ses, at alle antistofferne III, IV og V viser kurver repræsenterende reaktiviteten med pancreatisk glucagon, som er tydeligt skelnelige fra kurverne, der repræsenterer reaktiviteten med 10 tarm-glucagon. Heraf følger det, at antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse ikke krydsreagerer med pancreatisk glucagon og har fortrinlig specificitet med hensyn til tarm-glucagon.

15

P A T E N T K R A V

Fremgangsmåde til fremstilling af et tarm-glucagon-antistof, k e n d e t e g n e t ved, at man til pattedyr administrerer et tarm-glucagon-antigen, der 20 består af et peptid-bærer-kompleks og er fremstillet ved, at man som haptent anvender et peptid med den almene formel



hvor R betegner et hydrogenatom, en aminosyregruppe 25 eller en peptidgruppe indeholdende 2-20 aminosyregrupper, og omsætter det med en bærer i nærværelse af et bindemiddel til binding af haptentet og bæreren til hinanden, hvorefter man opsamler det således dannede antistof.

FIG. 1

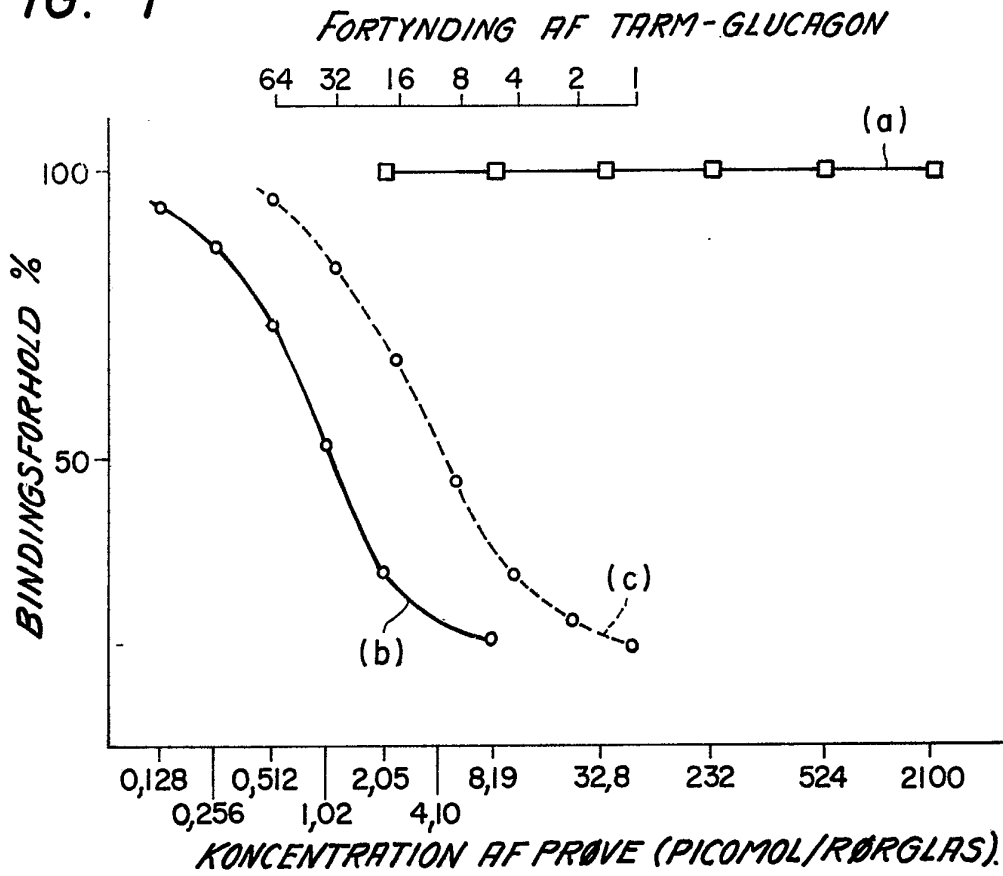


FIG. 2

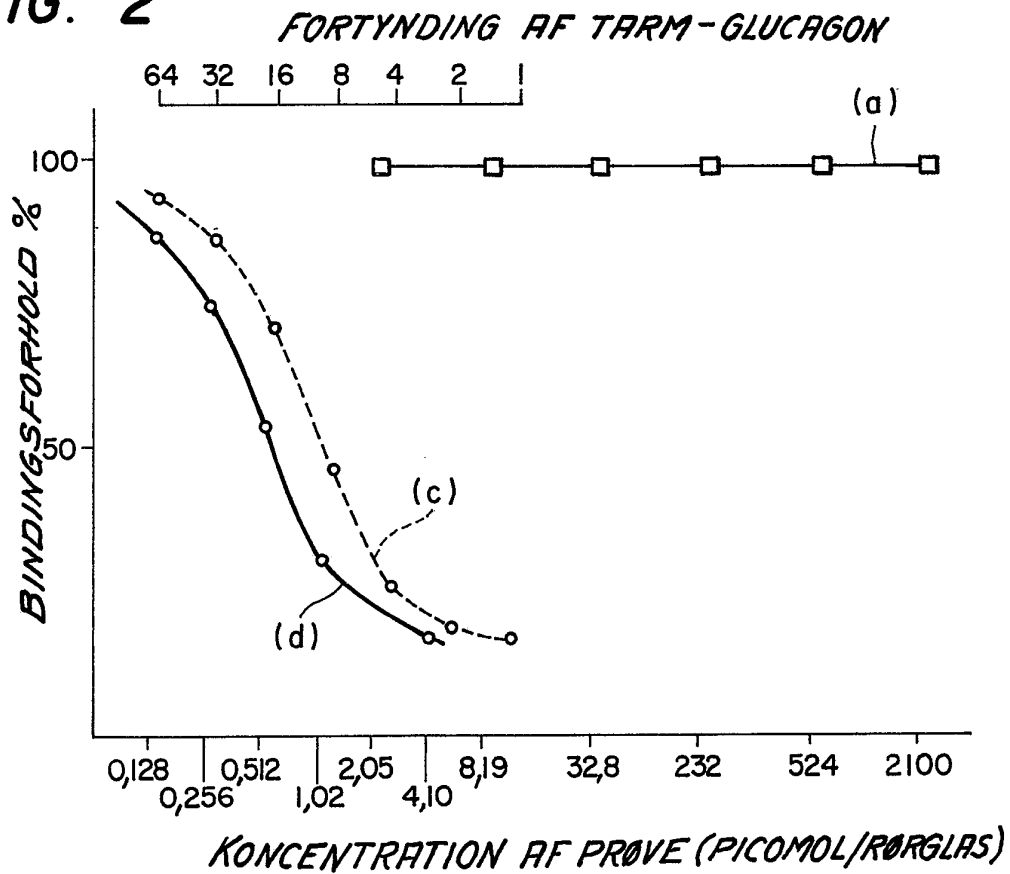


FIG. 3

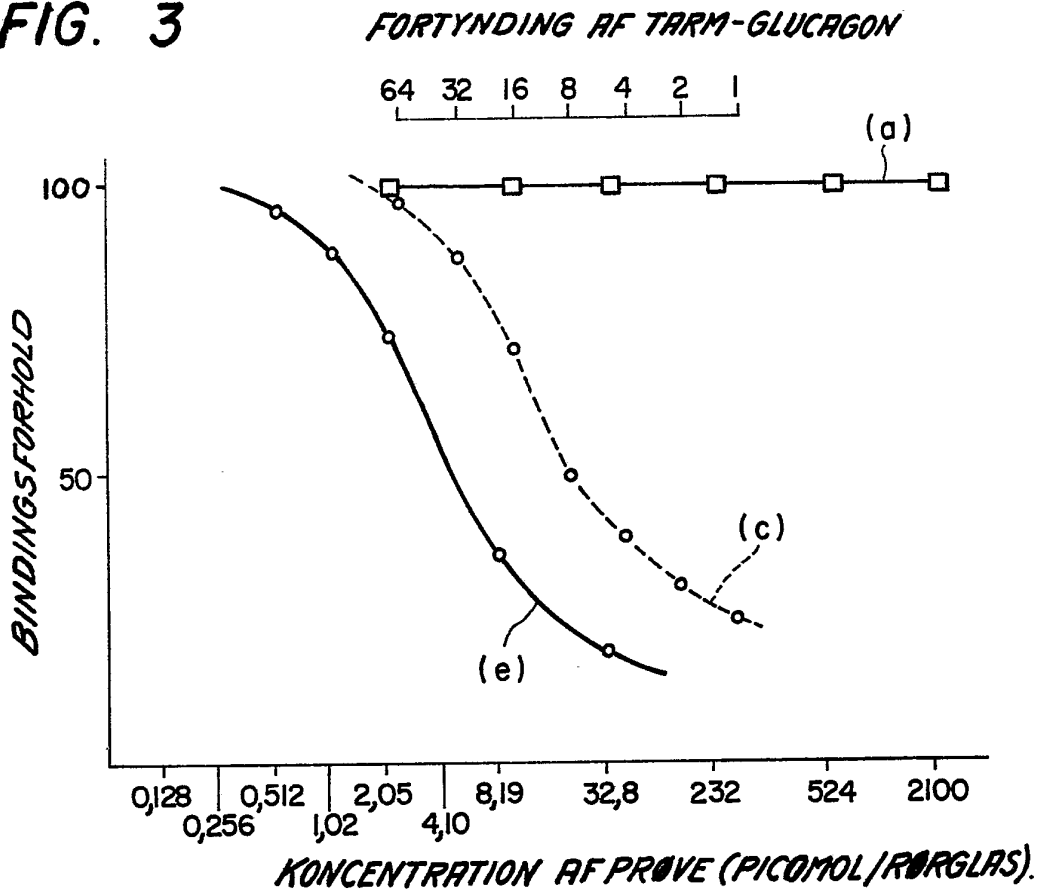


FIG. 4

