

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 467 841

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 21924

(54) Fragment de glucagon et son application à la préparation d'un anticorps spécifique.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 07 C 103/52 // G 01 N 33/54.

(22) Date de dépôt..... 14 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Japon, 16 octobre 1979, n° 54-134061.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 18 du 30-4-1981.

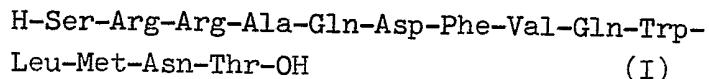
(71) Déposant : TOYO JOZO KK, résidant au Japon.

(72) Invention de : Nobuaki Nakagawa, Kikuo Kotani, Kunio Ohya, Kaoru Morita, Shigeo Katsuragi et Toshiharu Noda.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

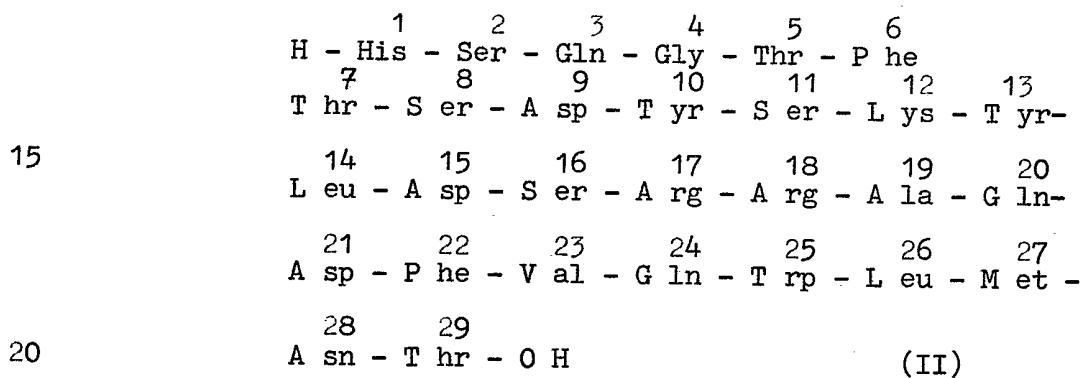
(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf,
26, av. Kléber, 75116 Paris.

La présente invention concerne un fragment de glucagon de la formule



5 une forme conjuguée de ce fragment de glucagon et d'une protéine et un procédé pour la préparation d'un anticorps spécifique en utilisant cette forme conjuguée.

10 Le glucagon est une hormone qui agit sur le métabolisme des hydrates de carbone et on sait que c'est un peptide 1-29 du pancréas de la formule



que l'on appelle ci-après glucagon (1-29) et la détermination de son taux sanguin a été très importante comme détermination clinique.

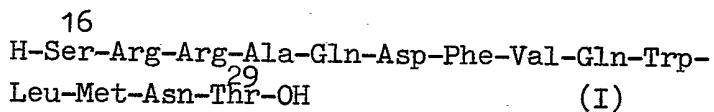
25 La détermination radio-immunologique, la détermination par immunofluorescence, la détermination immuno-logique enzymatique et des procédés de détermination du même genre basés sur la réaction immunitaire ont été utilisés comme principaux procédés de détermination des quantités de glucagon de l'ordre de traces et donc son anticorps spécifique a été essentiellement nécessaire.

Toutefois, l'anticorps spécifique pour le glucagon ne peut être obtenu qu'accessoirement en utilisant une combinaison de glucagon(1-29) comme haptène et d'albumine de sérum bovin (BAS); de plus, on ne peut pas 35 s'attendre à sa reproductibilité.

En outre, on a rapporté peu d'exemples de la production de l'anticorps en utilisant une combinaison d'un haptène tel qu'un fragment du glucagon (1-29), par exemple un fragment de glucagon constitué du peptide (18-29) présent dans la glucagon, un fragment de glucagon constitué du peptide (19-29) présent dans le glucagon /appelé ci-après glucagon(19-29), Publication non-examinée de brevet japonais N° 53-993207 ou un fragment de glucagon constitué du peptide(15-29) présent dans le glucagon (Publication non-examinée de brevet japonais N° 54-24868) et de BSA.

La demanderesse a étudié un procédé pour obtenir un anticorps efficace dans une détermination basée sur la réaction immunitaire du glucagon(1-29) et a trouvé que la combinaison d'une protéine et du nouveau fragment de glucagon constitué du peptide(16-29) présent dans le glucagon produit son anticorps d'une manière efficace et que cet anticorps réagit avantageusement avec le glucagon(1-29) marqué et divers fragments de glucagon marqués dans la réaction immunitaire.

Un but de la présente invention est de fournir des fragments de glucagon constitués du peptide de la formule



Un autre but de la présente invention est de fournir une combinaison de glucagon(16-29) et de protéine.

Un autre but encore de la présente invention est de fournir un procédé pour produire un anticorps spécifique en utilisant la combinaison de glucagon(16-29) et d'une protéine.

La synthèse du glucagon(16-29) selon la présente invention peut être effectuée comme suit : on fait réagir un amino-acide et/ou un peptide inférieur par

condensation dans l'ordre de succession des amino-acides de la formule (I) et le groupe protecteur du groupe réactif est libéré au stade final de la réaction. La réaction de condensation peut être conduite selon
5 la synthèse classique des peptides en répétant la fixation et l'élimination du groupe protecteur et la condensation. Les groupes protecteurs pour la synthèse des matières de départ ou des produits intermédiaires sont des groupes protecteurs classiques pour
10 la synthèse des peptides et sont facilement éliminables par hydrolyse, décomposition par un acide, réduction, aminolyse ou hydrazinolyse.

Par exemple, le groupe alpha-amino peut être protégé de manière classique par un groupe benzyloxycarbonyle tel que les groupes benzyloxycarbonyle, p-nitrobenzyloxycarbonyle ou p-méthoxybenzyloxycarbonyle ou un groupe oxycarbonyle aliphatique tel que les groupes t-amyoxyxycarbonyle ou t-butylxycarbonyle.
15

Le groupe carboxyle peut être protégé par estérification. Le groupe ester est substitué par un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol ou un aralcanol tel que l'alcool benzylique, l'alcool p-nitrobenzylique, l'alcool p-méthoxybenzylique ou l'alcool dichlorobenzylique.
20

Le groupe hydroxy dans la sérine et la thréonine peut éventuellement être protégé par estérification ou éthérification. Un groupe protégé par estérification est le groupe benzyloxycarbonyle. Un groupe protégé par éthérification est le groupe benzyle.
25

Le groupe amino dans le groupe guanidino de l'arginine est protégé par un groupe tosyle ou benzyloxycarbonyle. Toutefois, il n'est pas toujours nécessaire de protéger le groupe guanidino.
30

Après la fin de l'étape finale des condensations, ces groupes protecteurs sont de préférence éli-
35

minés par décomposition par un acide comme par l'acide fluorhydrique dans une seule étape d'élimination. En conséquence, le groupe réactif dans la chaîne latérale de la sérine, l'arginine, l'acide aspartique ou la
5 thréonine est protégé par un groupe protecteur facilement éliminé par l'acide fluorhydrique. Par exemple, le groupe hydroxyle dans la sérine et la thréonine est protégé par un groupe benzyle; le groupe amino dans le groupe guanidino de l'arginine est protégé par un
10 groupe tosyle; et le groupe carboxyle en chaîne latérale dans l'acide aspartique est protégé par un groupe ester de benzyle.

D'autres groupes alpha-amino et carboxyle sont protégés par un groupe protecteur qui peut être éliminé dans des conditions n'éliminant pas le groupe protecteur en chaîne latérale. Par exemple, le
15 groupe alpha-amino est de préférence protégé par un groupe t-butoxycarbonyle ou t-amyloxycarbonyle qui peut être éliminé par l'acide trifluoro-acétique, ou protégé par un groupe benzyloxycarbonyle qui peut être
20 éliminé par réduction catalytique. Le groupe carboxyle est protégé par un groupe ester de méthyle ou d'éthyle qui peut être éliminé par une solution aqueuse diluée d'hydroxyde de sodium, et le groupe carboxyle à l'extrémité C-terminale est protégé par un groupe ester de benzyle qui peut être éliminé par l'acide
25 fluorhydrique anhydre.

La condensation d'amino-acides et/ou de peptides est effectuée comme suit. Par exemple, un amino-acide ou peptide ayant un groupe alpha-amino protégé et un groupe carboxyle terminal activé est mis à réagir avec un amino-acide ou peptide ayant un groupe alpha-amino libre et un groupe carboxyle terminal protégé. Au contraire, un amino-acide ou peptide ayant un groupe
30 alpha-amino activé et un groupe carboxyle terminal protégé est mis à réagir avec un amino-acide ou peptide a-
35

yant un groupe carboxyle terminal libre et un groupe alpha-amino protégé.

Le groupe carboxyle peut être activé, par exemple, par transformation en azide d'acide, en anhydride d'acide, en imidazolide d'acide, en izoxazolide ou en ester actif ou par réaction avec le carbodiimide ou le N,N'-carbonyl-diimidazole.

Des réactions de condensation préférées sont celles utilisant le carbodiimide, l'azide ou l'ester actif. Dans la réaction de condensation, la racémisation doit être soigneusement évitée et des procédés préférables sont ceux utilisant un azide ou un ester actif comme l'ester de succinimide ou l'ester de p-nitrophényle, méthode Wünsch /Z. Naturforsch., 216, 426 (1966)_ ou méthode Geiger modifiée utilisant le N-éthyl, N'-3-diméthylaminopropyl-carbodiimide comme agent de condensation.

On obtient ainsi le peptide (I) protégé. Ces groupes protecteurs sont éliminés de préférence par décomposition par un acide comme l'élimination en une seule étape par l'acide fluorhydrique et finalement on peut obtenir le produit (I).

La purification du peptide (I) peut être effectuée par chromatographie sur colonne connue en utilisant un support.

Le glucagon(16-29) selon la présente invention est lié à une protéine afin de produire une forme conjuguée pour la production d'anticorps. Des exemples de la protéine qu'on utilise de manière classique sont BSA ou sa modification obtenue en coupant le groupe disulfure à l'intérieur de la molécule par traitement alcalin ou au moyen de laurylsulfate de sodium et de mercaptoéthanol.

Des exemples de réactifs de conjugaison pour le glucagon et la protéine sont des réactifs de conju-

gaison polyfonctionnels comme le glutaraldéhyde ou l'ester de succinimide de 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)-propionate (se reporter à la demande de brevet japonais N° 53-85900). Ces réactifs de conjugaison polyfonctionnels sont choisis de manière à donner des groupes fonctionnels qui participent à la fixation de la protéine.

Le rapport du glucagon(16-29) à la protéine telle que BSA est de une mole ou plus de glucagon(16-29) par mole de BSA, de préférence dix moles de glucagon(16-29) par mole de BSA. Dans la réaction d'enchaînement, par exemple la quantité nécessaire de glucagon(16-29) est ajoutée dans un milieu aqueux de pH 7-8 et on y ajoute un réactif de conjugaison polyfonctionnel. La réaction se produit tandis qu'on refroidit ou à la température ambiante pendant 1 à 4 heures. Après purification par filtration à travers un gel, on ajoute BSA et on fait réagir à la température ambiante pendant 1 à 4 heures. Le produit conjugué de glucagon(16-29) et de BSA est obtenu après purification comme par filtration à travers un gel et dialyse et si nécessaire conservé après lyophilisation.

La forme conjuguée ainsi obtenue de glucagon(16-29) et de protéine est administrée à des mammifères tels que des lapins, des rats, des cobayes ou des souris pour les sensibiliser. Par exemple, la substance conjuguée est mise en suspension dans l'adjuvant complet de Freund et la suspension est injectée par voie sous-cutanée à des cobayes à raison de 30 - 70 γ de glucagon(16-29) 4 à 7 fois à des intervalles de 2 semaines. On obtient de l'antisérum à partir du sang des animaux sensibilisés par une technique classique telle que par recueil du sang et centrifugation. Cet antisérum contient une plus forte proportion de l'anticorps spécifique et peut être conservé dans un congélateur et peut être utilisé et peut être conservé dans

un congélateur et peut être utilisé par dilution aliquote. Cet anticorps spécifique se lie immunologiquement non seulement au glucagon(1-29) marqué, mais aussi à divers fragments marqués de glucagon tels que le fragment(16-29) de glucagon, le fragment (17-29) de glucagon et le fragment (19-29) de glucagon.

Comme expliqué ci-dessus, le fragment(16-29) de glucagon selon la présente invention est utile pour la production d'anticorps sous la forme d'un produit de conjugaison de glucagon (16-29) et de protéine. L'anticorps ainsi obtenu présente un excellent enchaînement spécifique dans la réaction immunitaire et cette réaction immunitaire est utilisée avantageusement pour détermination radio-immunologique, détermination par immunofluorescence et détermination immunologique enzymatique du glucagon(1-29) in vivo.

Il a été rapporté (Publication non-examinée de brevet japonais N° 55-39702) que le fragment(15-29) de glucagon a une activité pour conjugaison avec les protéines. Toutefois, aucun exemple de glucagon(16-29) n'est mentionné dans le brevet ci-dessus. De plus, le glucagon(16-29) de la présente invention est plus réactif et spécifique que le fragment(15-29) en raison de l'amino-acide sérine à l'extrémité N-terminale du glucagon(16-29).

Les abréviations utilisées sont les suivantes :

Ser; L-sérine	Val; L-valine
Arg; L-arginine	Trp; L-tryptophane
30 Ala; L-alanine	Leu; L-leucine
Gln; L-glutamine	Met; L-méthionine
Asp; acide L-aspartique	Asn; L-asparagine
Phe; L-phénylalanine	Thr; L-thréonine
BOC; t-butoxycarbonyle	OBzl; ester de benzyle
35 AOC; t-amyloxycarbonyle	OSU: ester de N-hydroxy-succinimide

Z; benzyloxycarbonyle	ONP; ester de p-nitrophényle
Bzl; benzyle	TFA; acide trifluoroacétique
Tos; tosylo	NMM; N-méthylmorphorine
OMe; ester de méthyle	Et ₂ O; oxyde diéthyle
5 THF; tétrahydrofurane	DMF; diméthylformamide
HOBT; 1-hydroxybenzotriazole	
WSC; N-éthyl, N'-3-diméthylaminopropylcarbodiimide	

10 Les exemples suivants illustrent la présente invention. Dans les exemples, on utilise le support et le solvant de développement suivants pour la chromatographie en couche mince.

- 15 Support : cellulose de Merck Art 5716
Solvant de développement :
1 : butanol-pyridine-acide acétique-eau
(15:10:3:11)
2 : couche supérieure de
butanol-pyridine-acide acétique-eau (10:3:
0,1:11)
3: couche supérieure de
butanol-pyridine-acide acétique-eau (5:3:
0,1:11)
- 20 Support : gel de silice de Merck Art 5721
Solvant de développement :
4 : chloroforme-méthanol-acide acétique
(95:5:3)
5 : chloroforme-méthanol-acide acétique
(80:25:2)
6 : chloroforme-éthanol-acétate d'éthyle
(5:2:5)
30 7 : chloroforme-méthanol-acide acétique
(85:15:5)

Exemple 1

Production

35 H-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-
Thr-OH /glucagon(16-29)J :

On ajoute de l'anisol (6 cm³), de l'éthanediol (0,94 cm³, 10 mM) et du skatol (131 mg, 1mM) à 2,5 g (1 mM) de

5 BOC-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(Bzl)-OBzl).

On ajoute le mélange dans de l'acide fluorhydrique anhydre (HF, 20 cm³), on agite à 0°C pendant une heure et on élimine HF rapidement par distillation sous vide. On ajoute Et₂O (100 cm³) au résidu pour séparer le précipité. On dissout le précipité dans de l'acide acétique à 50-80% (100 cm³) et on centrifuge. On sèche par congélation le liquide surnageant pour obtenir une poudre (1,22 g). On dissout la poudre dans une solution aqueuse 8 M d'urée (150 cm³) et on règle 10 le pH à 9 par addition d'une solution aqueuse d'ammoniac. On charge la solution sur une colonne de carboxyméthylcellulose (4 x 20 cm) mise en équilibre avec une solution aqueuse 8 M d'urée. Après 30 minutes, on lave complètement la colonne avec de l'eau de manière à éliminer l'urée et on l'élue par la technique du gradient continu de concentration en utilisant de l'eau (1 litre) réglée au pH 4,5 au moyen d'acide acétique et jusqu'à 15 une solution aqueuse 0,2 M d'acétate d'ammonium (pH 4,5, 1 litre). Ensuite, on élue la colonne avec une solution aqueuse 0,5 M d'acétate d'ammonium (pH 4,5, 500 cm³) et on l'élue finalement avec une solution aqueuse 0,5 M d'acétate d'ammonium (pH 4,5) contenant de l'urée (8 M) de manière à fractionner les fractions actives II (tubes N° 80 à 110), III (tubes N° 120 à 20 170), IV (tubes N° 171 à 230) et V (tubes N° 231 à 290) en fractions de 7 cm³ chacune et on sèche par congélation ces fractions actives.

30 La poudre séchée préparée à partir de la fraction active V est dissoute dans de l'acide acétique à 50% (50 cm³). On ajoute de l'acide thioglycolique (2,5 cm³) à la solution qui est abandonnée à 45°C pen-

dant 21 heures. On dissout de l'urée (24 g) dans cette solution. La matière insoluble est éliminée par filtration. On charge le filtrat sur une colonne (4,2 x 104 cm) de Sephadex LH-20 (nom commercial) et on l'élue avec de l'acide acétique à 50%. Les fractions des tubes N° 62 à 79, chaque fraction 7 cm³, sont recueillies et séchées par congélation pour donner la poudre (150 mg). Chromatographie sur couche mince : Rf₁ = 0,50, Rf₂ = 0,34).

La poudre lyophilisée obtenue à partir de la fraction active IV est dissoute dans de l'acide acétique à 50% (20 cm³), on ajoute de l'acide thioglycolique (1 cm³) et on abandonne le mélange à 45°C pendant 21 heures. On dissout de l'urée (9,6 g) dans cette solution et la matière insoluble est éliminée par filtration. On charge le filtrat sur une colonne (3,3 x 120 cm) de Sephadex LH-20 (nom commercial) et on l'élue avec de l'acide acétique à 50%. Les fractions des tubes N° 32 à 37, chaque fraction 7 cm³, sont recueillies et séchées par congélation pour donner la poudre (110 mg).

Chromatographie sur couche mince : Rf₁ = 0,50

Analyse des amino-acides :

Asp 2.03 (2), Thr 0.96 (1), Ser 0.87 (1),
 Glu 2.07 (2), Ala 1.02 (1), Val 0.91 (1),
 Met 0.95 (1), Leu 1, Phe 0.95 (1),
 Arg 2.19 (2), Trp 1.04 (1).

Les lyophilisats obtenus dans les fractions actives III et II sont traités et soumis à une chromatographie sur colonne en opérant comme sur les fractions actives IV ci-dessus pour l'obtention de la poudre (130 mg) (chromatographie sur couche mince : Rf₁ = 0,50) provenant des fractions des tubes 31 à 36 dans la fraction active III et de la poudre (50 mg) (chromatographie sur couche mince Rf₁ = 0,50) à partir des fractions des tubes N° 39 à 44 dans la fraction active II.

Exemple 2

Forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA ou BSA modifié :

1) Forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA

On dissout du glucagon(16-29) (15 mg) dans une solution 0,0001 N d'hydroxyde de sodium et on règle la solution au pH 8,0 pour préparer une solution (20 cm³). On ajoute à cette solution une solution aqueuse à 25% de glutaraldéhyde (25 cm³) et on fait réagir la solution à la température ambiante pendant 2 heures. On fait passer le mélange de réaction à travers une colonne (5 x 50 cm) de Sephadex G-15 et on recueille la fraction passée (une solution contenant environ 11 mg de dérivé dans lequel le glutaraldéhyde a réagi avec l'extrémité N-terminale du glucagon(16-29)).

On y ajoute du BSA (42 mg, produit de Sigma Co.) et on fait réagir à la température ambiante pendant 2 heures. On dialyse le mélange de réaction dans de l'eau distillée et on lyophilise le dialysat pour obtenir une forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA (rapport molaire d'enchaînement de BSA:glucagon(16-29) = environ 1:10). Production : 48 mg.

2) Forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA modifié.

On dissout du glucagon(16-29) (15 mg) dans une solution 0,0001 N d'hydroxyde de sodium et on règle le pH à 8,0 pour préparer la solution (20 cm³). On ajoute à cette solution une solution à 0,1% dans le diméthylformamide d'ester de succinimide de 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionate (1,575 cm³) et on fait réagir le mélange à 5°C pendant une heure. On fait passer le mélange de réaction à travers une colonne (5 x 50 cm) de Sephadex G-15 remplie de tampon acétate (pH 5) contenant du diméthylformamide pour recueillir la fraction passée (une solution contenant un dérivé (11,5 mg) dans lequel un groupe 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionyle a été

introduit dans l'extrémité N-terminale du glucagon (16-29). On règle la solution au pH 7,0, on y ajoute du BSA modifié (45 mg), préalablement traité au moyen de laurylsulfate de sodium et de mercaptoéthanol à la température ambiante pendant toute une nuit, et on fait réagir le mélange à la température ambiante pendant une heure. On dialyse le mélange de réaction dans de l'eau distillée et on le lyophilise pour obtenir une forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA modifié (rapport d'enchaînement BSA modifié : glucagon (16-29) = environ 1 : 10). Production : 52 mg.

On remplace le glucagon(16-29) ci-dessus par du glucagon (17-29), du glucagon(19-29) et du glucagon (1-29) (produit de Sigma Co.) et on effectue le traitement de la même manière pour obtenir une forme conjuguée de BSA ou de BSA modifié et de glucagon(17-29), glucagon (19-29) ou glucagon(1-29).

Exemple 3

I. Production d'anticorps en utilisant une forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA :

1) Une forme conjuguée de glucagon(16-29) et de BSA (1 mg) 248 de glucagon(15-29) est dissoute dans 1,0 cm³ de tampon phosphate 10 mM (pH 7,2) (contenant 0,15 M NaCl). On y ajoute de l'adjuvant complet de Freund (1 0 cm³) et on mélange soigneusement de manière à obtenir une émulsion.

On injecte l'éмульSION (0,5 cm³) dans la peau d'un doigt de pied et diverses parties sous-cutanées du dos d'un cobaye. La même quantité d'émuльSION est injectée par voie sous-cutanée six fois à des intervalles de 2 semaines. Dix jours après l'injection finale, on recueille le sang entier et on l'abandonne pendant 60 minutes pour coagulation. On obtient du sérum anti-glucagon(16-29) par centrifugation à 3 000 tpm pendant 10 minutes.

2) La forme conjuguée de glucagon(17-29) et de BSA (1 mg), la forme conjuguée de glucagon(19-29) et de BSA (1 mg) et la forme conjuguée de glucagon (1-29) et de BSA (2,5 mg) obtenues dans l'exemple 2 sont utilisées et traitées selon les mêmes modes opératoires que dans l'exemple 3 (1). On obtient du sérum anti-glucagon (17-29), du sérum anti-glucagon (19-29) et du sérum anti-glucagon(1-29).

II. Réactivité immunitaire de l'antisérum

1) Méthode de détermination de la réactivité immunitaire :

On dilue les antisérum ci-dessus à 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800, 25600 et 51200 fois avec du tampon phosphate 10 mM (pH 7,4) (contenant 25% de BSA, 1 mM MgCl₂, 0,1% de NaN₃, 3 mM de EDTA et 0,15 M NaCl).

Une portion de 100 µl de chacune de ces dilutions est mise à réagir avec 100 µl de solution au tampon phosphate (la même composition que ci-dessus) de glucagon (1-29) marqué ou de fragment de glucagon marqué /tracéur : bêta-galactosidase, fragment de glucagon : glucagon(16-29), glucagon(17-29), glucagon(19-29) à 5°C pendant 16 heures. On y ajoute de l'IgG de cobaye (4γ) et du sérum de lapin anti-IgG de cobaye et on fait incuber pendant une heure à la température ambiante.

Le précipité est recueilli par centrifugation à 3 000 tpm pendant 10 minutes et ajouté à 200 µl de tampon phosphate pH 6,7 10 mM (contenant 0,1% BSA, 1 mM MgCl₂, 0,1% NaN₃ et 0,15 M NaCl) contenant 5 mg/cm³ d'O-nitrophénol-bêta-D-galactopyranoside et on fait incuber à 37°C pendant 45 minutes pour déterminer l'activité de bêta-galactosidase à 420 nm par colorimétrie. On détermine le rapport combiné au glucagon marqué et au fragment de glucagon marqué dans chaque concentration de dilution des antisérum par réaction immunitaire.

(a) Glucagon(1-29) marqué

On utilise du glucagon(1-29) marqué à la bêta-galactosidase /~40 pg de glucagon(1-29) obtenu par le procédé tel que mentionné ci-dessus.

(b) Fragments de glucagon marqués

5 Du glucagon(16-29) marqué à la bêta-galactosidase, du glucagon(17-29) marqué à la bêta-galactosidase et du glucagon(19-29) marqué à la bêta-galactosidase préparés par la méthode ci-après sont utilisés à raison d'environ 20 pg de chaque fragment de glucagon.

10 (2) Résultats et discussion concernant la réactivité immunitaire.

15 Les rapports de combinaison en réactivité immunitaire, comme calculé par les quantités de précipités pour chaque antisérum sont indiqués dans le tableau pour le cas des dilutions aux coefficients 800, 6400 et 51200. Les rapports de combinaison dans les autres cas de dilution sont comparables à ces résultats.

Dans le tableau: +++ : rapport de combinaison
20 75%

++ : rapport de combinaison
50-75%

+ : rapport de combinaison
25-50%

- : rapport de combinaison
0-25%

25 Comme montré dans le tableau, le glucagon (16-29) de la présente invention ressemble au glucagon (17-29) et au glucagon(19-29) dans sa structure, toutefois on trouve de grandes différences de réactivité immunitaire des anticorps dans les antisérum obtenus par injection de chaque fragment.

30 L'anticorps produit par le glucagon(16-29) de la présente invention fait montre d'une réactivité immunitaire sensible et avantageuse non seulement contre le glucagon(16-29), mais aussi contre le glucagon (17-29) et le glucagon(1-29).

Ces résultats montrent que l'anticorps spécifique C-terminal (titre de l'anticorps) peut être déterminé quantitativement en utilisant le fragment de glucagon de la présente invention.

Tableau

La pré-sénette thyroïde	Témoin			Glucagon (1-29) marqué à la bêta-galac- tosidase
	Glucagon(16-29) marqué à la bêta-galactosidase	Glucagon(17-29) marqué à la bêta-galactosidase	Glucagon(17-29) marqué à la bêta-galactosidase	
Glucagon et frag- ments de glucagon pour 1m- minuté	Dilution des antisérum			
glucagon (16-29)	x800 x6400 x51200	++ ++ +	++ ++ +	+++ +++ +
glucagon (17-29)	x800 x6400 x51200	- - -	- + -	+ + -
glucagon (19-29)	x800 x6400 x51200	- - -	- - -	- - -
glucagon (1-29)	x800 x6400 x51200	- - -	- - -	++ ++ +

III. Préparation de glucagon(1-29) marqué et de fragments de glucagon marqués

1) Glucagon(1-29) marqué

Une solution aqueuse 100 mM de EDTA (10 μ l) et 0,1% de 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionate succinimide dans du diméthylformamide (264,4 μ l) sont ajoutés dans du glucagon(1-29) dissous dans un tampon phosphate 50 mM (pH 8,0) (0,4 cm³) et on fait réagir le mélange à 5°C pendant une heure. On fait passer le mélange de réaction à travers une colonne (1,5 x 40 cm) de Sephadex G-15 (1,5 x 40 cm) pour filtration à travers le gel et on recueille la fraction passée pour obtenir la solution contenant un dérivé dans lequel un groupe 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionyle a été introduit dans le groupe amino du glucagon(1-29).

On ajoute de la bêta-galactosidase (produit de Boehringer Mannheim GmbH) (2,78 mg) dans du tampon phosphate 50 mM (pH 8,0) (2 cm³) contenant le dérivé (25 μ g) de 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionyl glucagon(1-29) et on fait réagir à la température ambiante pendant une heure.

On fait passer le mélange de réaction à travers une colonne (1,5 x 90 cm) de Sephadex G-150 pour filtration à travers le gel et on recueille la fraction passée pour obtenir du glucagon(1-29) marqué à la bêta-galactosidase dans lequel il y a combinaison de l'extrémité N-terminale du glucagon(1-29) et du groupe thiol de la bêta-galactosidase.

2) Fragments de glucagon marqués

Une solution aqueuse 100 mM de EDTA (10 μ l) et 0,1% de 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionate succinimide dans du diméthylformamide (625 μ l) sont ajoutés dans du glucagon(16-29) (0,5 mg) dissous dans du tampon phosphate 50 mM (pH 8,0) (0,4 cm³) et on fait réagir à 5°C pendant une heure. On fait passer le mé-

lange de réaction à travers une colonne (1,5 x 40 cm) de Sephadex G-15 pour filtration à travers le gel et on recueille la fraction passée pour obtenir la solution contenant un dérivé dans lequel un groupe 3-(2'-benzothiazolyl-dithio)propionyle a été introduit dans l'extrémité N-terminale du glucagon(16-29).

On ajoute de la bêta-galactosidase (6,19 mg) dans du tampon phosphate 50 mM (pH 8,0) (2 cm³) contenant le dérivé (25 µg) de 3-(2'-benzothiazolyl-dithio) propionyl glucagon(16-29) et on fait réagir à la température ambiante pendant une heure. On fait passer le mélange de réaction à travers une colonne (1.5 x 90 cm) de Sephadex G-150 pour filtration à travers le gel et on recueille la fraction passée pour obtenir du glucagon(16-29) marqué à la bêta-galactosidase dans lequel il y a combinaison de l'extrémité N-terminale du glucagon(16-29) et du groupe thiol de la bêta-galactosidase.

On remplace le glucagon(16-29) ci-dessus par du glucagon(17-29) et on le traite selon le même mode opératoire que ci-dessus pour obtenir du glucagon(17-29) marqué à la bêta-galactosidase et du glucagon(19-29) marqué à la bêta-galactosidase.

REVENDICATIONS

1) Le peptide de la formule

H-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH

5 2) Une forme conjuguée du peptide de la formule

H-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Lys-Asn-Thr-OH

et d'une protéine.

3) Une forme conjuguée selon la revendication 2,

10 caractérisée en ce que la protéine est de l'albumine ou sa forme modifiée.

4) Un procédé pour la préparation d'un anticorps spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend une sensibilisation par administration à des mammifères d'une

15 forme conjuguée du peptide de la formule

H-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-

Met-Asn-Thr-OH

et d'une protéine.