

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 80 25918**

(54)

Réactifs étalonnés pour la détermination de l'hémoglobine glucosylée.

(51)

Classification internationale (int. Cl.<sup>3</sup>). G 01 N 31/22, 33/48.

(22)

Date de dépôt..... 5 décembre 1980.

(33)

(32)

(31)

Priorité revendiquée : *EUA, 7 décembre 1979, n° 101,341.*

(41)

Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 25 du 19-6-1981.

(71)

Déposant : Société dite : ABBOTT LABORATORIES, résidant aux EUA.

(72)

Invention de : Edwin Granville Moore.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,  
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

La présente invention concerne des réactifs normalisés intéressants dans la détermination de l'hémoglobine glucosylée dans le sang. Un mélange d'hémoglobine ou de méthémoglobine et de 1 à 25% du dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine dans lequel le dérivé 2,4-dinitro bloque la position de fixation allostérique de l'hémoglobine est un réactif convenable. Donc, les réactifs de l'invention reproduisent des mélanges d'hémoglobine glucosylée et non glucosylée quant aux propriétés spectrales associées avec les états de transformation R et T de l'hémoglobine, c'est-à-dire des étalons synthétiques d'hémoglobine glucosylée. Les réactifs contenant de manière caractéristique 3%, 11% et 20% du dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine dans lequel la position de fixation allostérique de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine est bloquée par un groupe 2,4-dinitrophényle sont incorporés dans des nécessaires d'essai.

L'hémoglobine existe sous deux formes allostériques : la forme tendue T et la forme relâchée R. Ces formes ont des propriétés chimiques et physiques différentes et les quantités relatives d'hémoglobine R et T peuvent être déterminées par des techniques classiques admises telles que spectroscopie dans l'ultraviolet, l'infrarouge ou le visible, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et spectroscopie de résonance de spin électronique. Par exemple, Perutz et col., *Biochemistry* 17, n° 17, page 3641 (1978) décrivent les spectres d'absorption des dérivés d'hémoglobine, c'est-à-dire la transition  $R \rightarrow T$ , en fonction du ligand et de la liaison par l'hexaphosphate d'inositol. Le dichroïsme circulaire et la réactivité chimique sont d'autres techniques pour distinguer les états R et T de l'hémoglobine. La quantité relative des états R et T peut être déterminée à la fois par des techniques de point final et des techniques cinétiques.

On sait que des teneurs élevées en hémoglobine glucosylée sont associées avec le diabète sucré (diabetes mellitus). L'hémoglobine glucosylée est présente chez les non diabétiques à une teneur d'environ 5% de l'hémoglobine totale, tandis que les diabétiques en ont deux à quatre fois plus (*Science*, 200, 7 avril 1978). La teneur en hémoglobine glucosylée donne un indice de concentra-

tion sanguine moyenne de glucose d'un patient sur une longue période de temps. Cet indice n'est pas affecté par des fluctuations à court terme du sucre sanguin (heure par heure) et donne donc un reflet relativement précis de l'état de contrôle du glucose sanguin chez les diabétiques.

L'hémoglobine glucosylée est couramment dénommée HbA ou hémoglobine rapide, parce qu'elle migre plus rapidement sur une colonne chromatographique et, bien entendu, elle est généralement mesurée par chromatographie ou électrophorèse.

On a récemment découvert (demande de brevet des Etats-Unis d'Amérique Serial n° 973 368, au nom de la demanderesse) que le pourcentage d'hémoglobine glucosylée dans le sang peut être mesuré en contrôlant le déplacement des populations à l'équilibre des formes allostériques R et T d'hémoglobines lorsque l'on fait réagir l'hémoglobine non glucosylée avec une substance se fixant à la position allostérique. Cette réaction provoque un déplacement de la forme allostérique R à la forme T dans la fraction non glucosylée de l'hémoglobine. L'hémoglobine glucosylée de l'échantillon de sang ne contribue pas au déplacement de l'équilibre des formes allostériques puisque la glucosylation bloque la position de fixation allostérique. Donc, le déplacement entre les formes allostériques par réaction des hémoglobines avec une substance se fixant à la position allostérique est d'autant plus petit que le pourcentage d'hémoglobine dans l'échantillon de sang est plus grand. La découverte précédente tire avantage de la réactivité de la position de fixation allostérique qui est accessible dans l'hémoglobine non glucosylée et du déplacement résultant de l'équilibre des formes allostériques du mélange d'hémoglobines glucosylée et non glucosylée obtenu lorsque l'on fait réagir une substance se fixant à la position allostérique avec la fraction d'hémoglobine non glucosylée.

On connaît une grande variété de composés efficaces comme substances se fixant à la position allostérique, couramment désignée sous le nom de position de fixation des organophosphates de l'hémoglobine. Ces composés comprennent les organophosphates, les sulfates, les acides carboxyliques représentés par l'hexaphosphate d'inositol, J. Biol. Chem., 246, page 7168 (1971); le 2,3-diphospho-

glycérate, Nature, 234, page 174 (1971); l'adénosine triphosphate, Biochem. Biophys. Res. Comm., 26, page 162 (1967); le phosphate de pyridoxal, Fed. Proc. Fed. Amer. Soc., Expl. Biol., 28, page 604 (1969); le pentaphosphate d'inositol, Can. J. Chem., 47, page 63 (1969); le 8-hydroxy-1,3,6-pyrènetrisulfonate, J. Biol. Chem., 246, 5832 (1971); le O-iodosodium benzoate, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 203, page 72 (1977). L'homme de l'art familiarisé avec les hémoglobines admet une grande variété de substances se fixant à la position allostérique. L'hexaphosphate d'inositol est une substance préférée se fixant à la position allostérique.

Il est généralement souhaitable de lyser les globules rouges du sang pour libérer les hémoglobines. Les détergents cationiques (par exemple bromure de cétyltriméthylammonium), anioniques (par exemple dodécylsulfate de sodium et désoxycholate de sodium) et non ioniques (par exemple saponine et octylphénoxy-polyéthylèneoxy-éthanol) courants sont utiles pour lyser les globules rouges du sang. On préfère les détergents non ioniques dans la gamme de concentrations d'environ 0,025 à 0,5% en volume. L'écrasement mécanique, par exemple par les ultrasons, et la lyse hypotonique, sont également des moyens efficaces pour libérer l'hémoglobine des globules rouges.

La fixation sur le fer de l'hème de ligands se fixant à l'hème déplace généralement l'équilibre des isomères allostériques d'hémoglobines vers la forme relaxée (R). Donc, lorsque la fraction fixant l'hème des hémoglobines dans l'échantillon essayé est coordonnée avec un ligand se fixant à l'hème, on observe de plus forts déplacements des populations d'équilibre des formes allostériques de l'hémoglobine. Ce grossissement du déplacement de l'équilibre permet une détermination précise de l'hémoglobine glucosylée. Cette coordination du ligand se fixant à l'hème pour déplacer l'équilibre des isomères allostériques est applicable lorsque le fer est à l'état  $Fe^{+2}$  ou  $Fe^{+3}$  (méthémoglobine).

L'homme de l'art familiarisé avec les hémoglobines reconnaît une grande variété de ligands se fixant à l'hème qui se fixent sur le fer de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine.

Par exemple, les isocyanures tels que les isocyanures d'alkyle en  $C_1-C_6$  ou de phényle sont des ligands se fixant à l'hème

particulièrement souhaitables pour l'hémoglobine à l'état  $Fe^{+2}$ .  
D'autres ligands convenables sont  $O_2$  et NO.

On préfère généralement avoir un seul ligand fixé  
au fer puisque ceci entraîne des mesures plus simples du déplacement  
5 des formes allostériques. Par exemple, l'oxyhémoglobine (glucosylée  
et non glucosylée) est de préférence désoxygénée par réaction avec  
le dithionite de sodium ou d'autres réducteurs bien connus en  
désoxyhémoglobine. La désoxyhémoglobine est mise à réagir avec un  
isocyanure d'alkyle tel qu'isocyanure de n-butyle et, par suite, la  
10 réaction avec un ligand se fixant à la position allostérique donne  
un déplacement plus défini à l'équilibre des formes allostériques  
permettant la détermination de l'hémoglobine glucosylée.

L'hémoglobine est oxydée en méthémoglobine par des  
techniques connues, Antonini et Brunoni, Hemoglobin and Myoglobin  
15 in Their Reaction With Ligands, North Holland Publishing Co.,  
Amsterdam (1971). Ainsi donc, le ferricyanure de potassium, le  
nitrite de sodium, l'aniline et la phénylhydrazine sont des réactifs  
convenables pour oxyder l'hémoglobine en méthémoglobine. L'auto-  
oxydation en présence de colorants tels que le bleu de méthylène  
20 oxyde également l'hémoglobine en méthémoglobine.

La méthémoglobine non glucosylée est réactive avec  
des substances se fixant à la position allostérique décrites  
pour l'hémoglobine non glucosylée.

L'homme de l'art reconnaîtra une grande variété de  
25 ligands fixant l'hème qui se fixe avec la méthémoglobine. Ces  
ligands comprennent les cyanates, les thiocyanates, le N-hydroxy-  
acétamide, l'imidazole et ses dérivés, Perutz et col. Biochemistry  
17, pages 3640-3652 (1978).

D'autres ligands courants sont les fluorures, les  
30 azides, les nitrites, les cyanures, l'eau, l'hydroxyde, l'acétate  
et le formiate d'ammonium. L'imidazole environ 0,1M est un ligand  
se fixant à l'hème préféré à utiliser avec la méthémoglobine.

De manière caractéristique, on ajoute 1 ml d'un  
réactif contenant de l'imidazole 0,1M, du ferricyanure de potassium  
35  $K_3Fe(CN)_6$  0,2mM et 0,05% en volume de Triton X-100 (octylphénoxy-  
polyéthylèneoxyéthanol) comme détergent dans un tampon à pH 6,8,

à 10-20  $\mu$ l de sang complet et on incube le mélange pendant 10 min.

Le ferricyanure de potassium oxyde l'hémoglobine en méthémoglobine; le Triton X-100 est un détergent non ionique qui lyse les globules rouges en libérant les hémoglobines; et l'imidazole se coordine avec le fer en déplaçant l'équilibre des isomères allostériques vers la forme (R).

Le spectre d'absorption de ce mélange est enregistré à 560 et 635 nm. On ajoute ensuite 2  $\mu$ l d'une solution 0,1M d'hexaphosphate d'inositol à pH 6,8. Ce dernier réactif réagit avec la position de fixation allostérique de l'hémoglobine non glucosylée et déplace l'équilibre des isomères allostériques vers la forme tendue (T). On mesure à nouveau le spectre d'absorption à 560 et 635 nm. La concentration en hémoglobine glucosylée est traduite par une diminution de l'absorption à 560 nm et une augmentation de l'absorption à 635 nm.

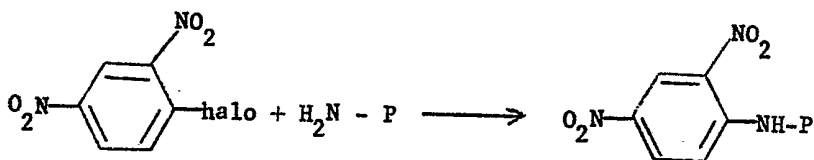
Réactif A : imidazole 0,1M,  $K_3Fe(CN)_6$  0,2mM, 0,05% en volume de Triton X-100 (détergent du type octylphénoxypolyéthylèneoxyéthanol) dans l'eau à pH 6,8

Réactif B : hexaphosphate d'inositol (IHP) 0,1M dans l'eau à pH 6,8.

A 1,0 ml de réactif A à 25°C, on ajoute 10-20  $\mu$ l de sang complet, on l'incube pendant 10 min pour permettre la lyse des globules rouges et l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine. On enregistre le spectre visible, de 450 à 700 nm, en contrôlant particulièrement l'absorption à 560 et 635 nm. On ajoute ensuite 2  $\mu$ l de réactif B au mélange de réaction. On enregistre à nouveau le spectre comme précédemment.

On utilise, pour déterminer l'hémoglobine glucosylée présente, des étalons préparés par les techniques de l'invention. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau ci-après.

On fait réagir l'hémoglobine ou la méthémoglobine avec un halogéno-2,4-dinitrobenzène, dans lequel l'halogène est le chlore, le fluor, le brome ou l'iode, pour former le dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine, selon l'équation suivante :



dans laquelle P est la protéine de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine.

5 On fait réagir l'hémoglobine dans les globules rouges ou en solution avec un excès d'halogéno-2,4-dinitrobenzène, de préférence le fluoro-2,4-dinitrobenzène. Dans le cas où l'on démarre le processus avec les globules rouges du sang, on fait réagir les globules rouges avec un excès de 2,4 dinitrobenzène, on les lyse  
10 et on oxyde l'hémoglobine en méthémoglobine. Dans ce procédé, plusieurs groupes 2,4-dinitrophényle sont fixés à l'hémoglobine et il est essentiel que l'un au moins des groupes 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation allostérique. Dans le cas où l'on démarre le procédé avec une solution d'hémoglobine, on traite  
15 la solution d'hémoglobine avec un excès, par exemple, le fluoro-2,4-dinitrobenzène et on isole le dérivé produit ou on l'oxyde en méthémoglobine. Il est généralement souhaitable d'utiliser le dérivé de méthémoglobine à cause de sa stabilité. Cependant, on notera que les globules rouges, dans lesquels l'hémoglobine a été transformée  
20 en dérivé 2,4-dinitrophénylé pour bloquer la position de fixation allostérique, peuvent être mis en suspension dans le sérum physiologique à 10-30% de glycérol et utilisés comme étalon sous cette forme.

25 Bien que la réaction du 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène avec l'hémoglobine humaine soit connue, Hemoglobin and Myoglobin In Their Reaction With Ligands, E. Antonini et M. Brunoni, North Holland Publishing Company, Amsterdam, Londres 1971, pages 295-296, on ne connaît pas de dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine dans lequel un groupe 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation  
30 allostérique de la méthémoglobine, ni de mélanges ou solutions étalons du dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine où un groupe 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation allostérique de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine.

Le dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine est un dérivé particulièrement apprécié à cause de sa stabilité. Les mélanges de méthémoglobine avec 1 à 25% du dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine, dans lequel un groupe 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation allostérique de la méthémoglobine, est un réactif normalisé particulièrement intéressant pour déterminer l'hémoglobine glucosylée.

Dans un mode de mise en oeuvre préféré pour l'utilisation dans des nécessaires d'essais, on utilise des mélanges de méthémoglobine avec 3%, 11% et 20% du dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine dans lequel le groupe 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation allostérique de la méthémoglobine, dans une solution 5-15 mM de protéine dans un tampon au phosphate à pH 6-8 ou en solution dans l'eau.

Le mélange peut également être utilisé sous forme de mélange étalon lyophilisé.

Les réactifs normalisés de l'invention sont utilisés à la place des mélanges d'hémoglobine et d'hémoglobine glucosylée. L'hémoglobine glucosylée doit être séparée du sang ou préparée par réaction enzymatique du glucose et de l'hémoglobine. Les réactifs et étalons de l'invention sont des dérivés synthétiques de l'hémoglobine ou de la méthémoglobine qui sont convenablement préparés et servent d'étalons stables pour la détermination de l'hémoglobine glucosylée.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

#### EXEMPLE 1

On agite 3 l de sang humain complet pendant 10-15 min et on divise en six échantillons de parties aliquotes que l'on place chacun dans un tube à centrifuger et on centrifuge à 1800-2000 g pendant 30 min à 25°C. On aspire la liqueur surnageante et on ajoute à chaque tube 300 ml de sérum physiologique normal et on remet les cellules en suspension en agitant doucement. On répète trois fois la centrifugation, l'aspiration et la remise en suspension. On met ensuite les cellules en suspension dans 250 ml de sérum physiologique tamponné au phosphate à pH 7,2. On réunit les suspensions

et on ajoute à cette suspension 15 ml de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène et on incube le mélange de réaction à environ 25°C pendant 2 h. On subdivise à nouveau en six fractions la suspension qui a réagi avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène et on centrifuge à 1800-2000 g pendant 5 15 min. On décante la liqueur surnageante et on la jette et on lyse les globules dans l'eau pendant environ 1 h à 25°C ou pendant une nuit à 4°C. On centrifuge les tubes à 15 000-17 000 g pendant 30 min et on conserve la liqueur surnageante que l'on stocke à 2-8°C. On oxyde le dérivé d'hémoglobine dans la liqueur surnageante en dérivé 10 de méthémoglobine par traitement avec 11,0 g de ferricyanure de potassium.

On isole le dérivé 2,4-dinitrophénylé de méthémoglobine sur un lit fixe de résine échangeuse d'ions et on ajoute 1/20 de volume de phosphate de potassium 1M à pH 6,2. On concentre 15 cette solution par dialyse sur un appareil Amicon de dialyse-concentration à fibre creuse.

On mélange le dérivé 2,4-dinitrophénylé de méthémoglobine avec la méthémoglobine pour donner des étalons variant entre 1 et 25% du dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine. On prépare 20 fère des réactifs étalons ayant une teneur en protéine de 5-15 mM, dans le tampon au phosphate à pH 6,8, où le dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine est à une concentration de 3%, 11% ou 20%.

#### EXEMPLE 2

25 On prépare le dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine selon le procédé de l'exemple 1, sauf que l'on supprime l'étape d'oxydation par le ferricyanure de potassium.

#### EXEMPLE 3

30 On produit les dérivés des exemples 1 et 2 en démarrant le procédé avec une solution d'hémoglobine au lieu de globules rouges du sang ou en lysant les globules rouges avant de produire le dérivé.

#### EXEMPLE 4

35 On suit le mode opératoire de l'exemple 1, dans lequel on produit le dérivé de l'hémoglobine dans les globules rouges par réaction avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène et les globules rouges ne sont pas lysés, mais combinés avec les globules rouges

n'ayant pas réagi, on lave et on stocke dans le glycérol à 10-30% dans le sérum physiologique pour donner un étalon stable. Ainsi donc, on prépare une suspension aqueuse de globules rouges du sang, dans laquelle 1 à 25% des globules rouges ont l'hémoglobine transformée en dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine où un groupe  
5 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation allostérique de l'hémoglobine. De manière caractéristique, on incorpore dans des nécessaires d'essai des suspensions de 3%, 11% et 20% en solution dans le sérum physiologique à 10-30% de glycérol.

## T A B L E A U

Courbe d'étalonnage.

Hb gluco- sylée, %	Sans IHP		+ IHP		Différence normalisée $\frac{\Delta \Delta}{\Delta^{-IHP}}$
	560 nm A	635 nm A	560 nm A	635 nm A	
0%	0,664	0,089	0,592	0,123	0,184
5%	0,654	0,086	0,588	0,120	0,176
10%	0,657	0,089	0,593	0,121	0,169
15%	0,658	0,090	0,596	0,118	0,158
20%	0,663	0,095	0,609	0,123	0,144
25%	0,651	0,091	0,600	0,117	0,138
50%	0,645	0,098	0,611	0,113	0,090
100%	0,717	0,123	0,715	0,128	0,012

Calculs :  $\Delta = A^{560 \text{ nm}} - A^{635 \text{ nm}}$

$$\text{Différence normalisée} = \frac{\Delta \Delta}{\Delta^{-IHP}} = \frac{\Delta^{-IHP} - \Delta^{+IHP}}{\Delta^{-IHP}}$$

RE V E N D I C A T I O N S

- 1 - Réactif étalonné pour déterminer l'hémoglobine glucosylée, caractérisé en ce qu'il contient un mélange d'hémoglobine avec 1 à 25% du dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine, dans lequel un groupe 2,4-dinitrophénylé bloque la position de fixation allostérique de l'hémoglobine.
- 2 - Réactif étalonné selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mélange est dans une gamme de concentrations de 5-15 mM en solution aqueuse.
- 3 - Réactif étalonné pour déterminer l'hémoglobine glucosylée, caractérisé en ce qu'il contient un mélange de méthémoglobine avec 1 à 25% de dérivé 2,4-dinitrophénylé de la méthémoglobine dans lequel un groupe 2,4-dinitrophénylé bloque la position de fixation allostérique de la méthémoglobine.
- 4 - Réactif étalonné selon la revendication 3, caractérisé en ce que le mélange est dans une gamme de concentrations de 5-15 mM en solution aqueuse.
- 5 - Réactif étalonné pour déterminer l'hémoglobine glucosylée, caractérisé en ce qu'il contient une suspension de globules rouges du sang dans laquelle 1 à 25% des globules rouges contiennent de l'hémoglobine transformée en dérivé 2,4-dinitrophénylé de l'hémoglobine dans lequel un groupe 2,4-dinitrophényle bloque la position de fixation allostérique de l'hémoglobine.
- 6 - Réactif étalonné selon la revendication 5, caractérisé en ce que la suspension est à 10-30% de glycérol dans le sérum physiologique.