

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 397**

51 Int. Cl.:  
**G01N 27/416** (2006.01)  
**C12M 1/40** (2006.01)  
**C12Q 1/26** (2006.01)  
**C12Q 1/32** (2006.01)  
**G01N 27/327** (2006.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07850567 .4**  
96 Fecha de presentación: **13.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2096432**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol en sangre completa**

30 Prioridad:  
**14.12.2006 JP 2006336789**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

73 Titular/es:  
**NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA  
11-2, FUJIMI 1-CHOME CHIYODA-KU  
TOKYO 102-8172, JP**

72 Inventor/es:  
**UMEGAE, Yoshihiko;  
MACHIDA, Reiko;  
TAKAGI, Hisako;  
IRIE, Yayoi;  
YOKOYAMA, Takao y  
TANABE, Toshio**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 382 397 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol en sangre completa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol en sangre que está sujeto a interferencia por glucosa y/o un derivado de la misma, concretamente, un procedimiento para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol en sangre, caracterizado por que como muestra se utiliza sangre completa, y no es necesario separar las células sanguíneas, se describe adicionalmente una microplaca detectora utilizado para la medición, y un kit para medir 1,5-anhidroglucitol que incluye la microplaca detectora .

**Técnica anterior**

En los últimos años, el número de pacientes diabéticos ha ido en aumento a medida que la dieta se ha vuelto más rica. Para evitar complicaciones en los pacientes diabéticos, los niveles de azúcar en sangre deben mantenerse en niveles cercanos a los de los individuos sanos, y se utilizan ampliamente dispositivos para la automedición de los niveles de azúcar en sangre de manera que los propios pacientes puedan monitorizar los niveles de azúcar en sangre en sus hogares. Sin embargo, puesto que los niveles de azúcar en sangre varían dependiendo de la comida, y la medición tiene que hacerse con frecuencia, los pacientes sufren una pesada carga. También es difícil para los pacientes interpretar correctamente los valores medidos debido a la falta de conocimiento, y no resulta fácil controlar rigurosamente los niveles de azúcar en sangre.

Mientras, puesto que el 1,5-anhidroglucitol no se ve afectado por la comida y refleja el control de azúcar en sangre en pacientes diabéticos durante la última semana, los pacientes diabéticos pueden entender correctamente su control de azúcar en sangre mediante una medición "una vez por semana" solos en casa. Un kit de automedición de 1,5-anhidroglucitol proporcionaría una gran ventaja a los pacientes, pero los procedimientos convencionales para medir 1,5-anhidroglucitol utilizando suero o plasma como muestra requieren la separación de las células sanguíneas y no son adecuados para la automedición porque la medición requiere una gran cantidad de muestra. Por lo tanto, no se han creado kits de automedición de 1,5-anhidroglucitol, que incluyen aquellos que utilizan como muestra una cantidad traza de sangre completa tal cual.

Los procedimientos de medición de 1,5-anhidroglucitol descritos en los documentos de patente 1 a 9 utilizan suero o plasma como muestra, no sangre completa, y no implican la medición electroquímica.

Además, cuando se utiliza una muestra de sangre completa para el kit de 1,5AG para animales (Nippon Kayaku Co., Ltd.) distribuido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., la sangre se hemoliza añadiendo agua purificada o una solución acuosa de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM y se centrifuga adicionalmente, el sobrenadante se trata con una columna, y el 1,5-anhidroglucitol se mide mediante un procedimiento colorimétrico que utiliza un pigmento. En otras palabras, este procedimiento no es un procedimiento para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol utilizando como muestra sangre completa tal cual, sin separar las células sanguíneas.

La razón para utilizar convencionalmente suero o plasma como muestra, no sangre completa, es que la glucosa también está contenida en las células sanguíneas. Incluso cuando se añade un reactivo a la sangre completa para eliminar o convertir la glucosa, la glucosa permanece en las células sanguíneas sin ser eliminada o convertida. Puesto que la glucosa se libera a través de la membrana celular en la etapa de medición de 1,5-anhidroglucitol en sangre, no puede eliminarse completamente la interferencia producida por la glucosa. En una reacción para detectar 1,5-anhidroglucitol en sangre, se espera una interferencia producida por la hemoglobina en los eritrocitos con capacidad de oxidación-reducción. Hasta ahora, no se conoce un procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol en sangre que utilice sangre completa convirtiendo o eliminando enzimáticamente la glucosa con antelación, sin separar las células sanguíneas.

Además, los procedimientos para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol se describen en el DOCUMENTO NO PATENTE 1 y en los DOCUMENTOS DE PATENTE 10 y 11. Sin embargo, el DOCUMENTO NO PATENTE 1 describe un procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol en orina utilizando un detector enzimático compuesto de un electrodo de peróxido de hidrógeno y una membrana con enzimas inmovilizadas. Sin embargo, no se menciona la medición de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa, en la que coexisten glucosa y similares. En el DOCUMENTO DE PATENTE 10, el 1,5-anhidroglucitol se mide por amperometría utilizando una deshidrogenasa y metosulfato de fenacina como aceptor de electrones. Sin embargo, sólo se mencionan ejemplos para el estándar de referencia del 1,5-anhidroglucitol, y no existe ninguna descripción acerca de la medición en sangre completa. En el DOCUMENTO DE PATENTE 11, se deja actuar a una enzima con la capacidad de oxidar el 1,5-anhidroglucitol, y se mide electroquímicamente el peróxido de hidrógeno producido utilizando un electrodo de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, en esta medición también se utiliza suero, y este no es un procedimiento de medición que utilice sangre completa.

Mientras, el 1,5-anhidroglucitol es un compuesto que es una glucosa reducida en la posición de 1 y tiene una

estructura química muy similar a la de la glucosa. Por lo tanto, muchas de las enzimas utilizadas para medir 1,5-anhidroglucitol también reaccionan con la glucosa. La glucosa en sangre es 20 veces más abundante (o más) que el 1,5-anhidroglucitol. Por lo tanto, para medir 1,5-anhidroglucitol, la glucosa debe eliminarse o convertirse de alguna manera para que la glucosa no reaccione con las enzimas para medir 1,5-anhidroglucitol. Además, cuando los derivados de la glucosa producidos por esta conversión reaccionan con las enzimas para medir 1,5-anhidroglucitol, estos derivados también deben eliminarse o convertirse.

En el DOCUMENTO DE PATENTE 1, la glucosa se elimina o se convierte por oxidación de la glucosa con glucosa oxidasa o por fosforilación de la glucosa con hexoquinasa, en el DOCUMENTO DE PATENTE 2 por oxidación de la glucosa con glucosa oxidasa y gluconolactonasa o glucosa deshidrogenasa y gluconolactonasa, en los DOCUMENTOS DE PATENTE 3 y 4 por conversión de la glucosa en fructosa-1,6-difosfato con hexoquinasa, fosfohexosa isomerasa, y 6-fosfofructoquinasa o glucosa isomerasa, fructoquinasa, y 6-fosfofructoquinasa, en el DOCUMENTO DE PATENTE 5 por fosforilación de la glucosa con glucoquinasa o hexoquinasa, y en el DOCUMENTO DE PATENTE 6 por fosforilación de la glucosa con una enzima que fosforila la glucosa a glucosa-6-fosfato y, a continuación se mide el 1,5-anhidroglucitol. En estos documentos, la glucosa se convierte en glucono-1,5-lactona, glucosa-6-fosfato, ácido glucónico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato, o similares. Hasta ahora, sin embargo, no se conoce la medición eliminando o convirtiendo la glucosa en sangre completa con una enzima y a continuación cuantificando electroquímicamente el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa con una enzima.

DOCUMENTO DE PATENTE 1: Patente japonesa nº 2983015  
 DOCUMENTO DE PATENTE 2: JP-A-2001-78797  
 DOCUMENTO DE PATENTE 3: Patente japonesa nº 3170320  
 DOCUMENTO DE PATENTE 4: Patente Japonesa nº 3217180  
 DOCUMENTO DE PATENTE 5: JP-A-2001-116756  
 DOCUMENTO DE PATENTE 6: Patente japonesa nº 2872983  
 DOCUMENTO DE PATENTE 7: JP-A-63-185397  
 DOCUMENTO DE PATENTE 8: JP-A-10-191998  
 DOCUMENTO DE PATENTE 9: JP-A-8-70893  
 DOCUMENTO DE PATENTE 10: JP-A-7-67697  
 DOCUMENTO DE PATENTE 11: JP-A-62-79780  
 DOCUMENTO DE PATENTE 12: JP-A-5-304997  
 DOCUMENTO DE PATENTE 13: JP-A-63-22185  
 DOCUMENTO DE PATENTE 14: JP-A-2-268679  
 DOCUMENTO DE PATENTE 15: JP-A-2000-135079  
 DOCUMENTO DE PATENTE 16: JP-A-11-18760  
 DOCUMENTO DE PATENTE 17: JP-A-2000-175698  
 DOCUMENTO DE PATENTE 18: JP-A-10-179140  
 DOCUMENTO NO PATENTE 1: Biomed. Chromatogr., Vol.7, p.41 (1993)

#### Divulgación de la invención

Problemas a ser resueltos por la invención

Para las pruebas de laboratorio clínico, recientemente se han implementado de manera creciente la medición rápida de diversos objetos de ensayo a pie de cama o en un centro de atención al paciente denominado Point of Care Testing y la medición de los niveles de azúcar en sangre por los propios pacientes en el hogar. Puesto que en tales casos el uso de una centrífuga o similar para la obtención de suero o plasma resulta complicado y requiere tiempo, su uso en el entorno clínico real resulta difícil. En concreto, en la medición por los propios pacientes en casa, se utiliza como muestra una cantidad traza, tal como no más de varias decenas de µl de sangre recogida utilizando un dispositivo de lanceta y un dispositivo de recogida de muestras. Por lo tanto, para la obtención de suero no pueden emplearse procedimientos de medición que utilicen una centrífuga. De esta manera, se está a la espera de un procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol que utilice como muestra sangre completa tal cual.

Medios para la solución de los problemas

Los inventores de la presente invención llevaron a cabo diversas investigaciones con el fin de resolver los problemas anteriormente indicados. Como resultado, descubrieron un procedimiento para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol en sangre utilizando como muestra sangre completa tal cual, y lograron la presente invención.

Esto es, la presente invención se refiere a lo siguiente.

(1) Un procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol en sangre completa, que comprende la etapa de eliminación o conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma que interfiere con la medición y la etapa posterior de medición del 1,5-anhidroglucitol, en el que se utiliza sangre completa tal cual, sin separar las células sanguíneas, eliminando o convirtiendo la glucosa y/o un derivado de la misma, y además se deja actuar una enzima para medir

1,5-anhidroglucitol, sin separar las células sanguíneas, para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol.

(2) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (1) anteriormente indicado, en el que la enzima para medir 1,5-anhidroglucitol es una oxidorreductasa.

5 (3) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (2) anteriormente indicado, en el que la oxidorreductasa es piranosa oxidasa, L-sorbosa oxidasa, o 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa.

10 (4) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (3) anteriormente indicado, en el que la oxidorreductasa se deriva de los géneros *Pseudomonas* o *Agrobacterium*.

(5) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriormente indicados, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente en presencia de un mediador redox.

15 (6) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (5) anteriormente indicado, en el que el mediador redox es un complejo de osmio, un compuesto de quinona, un compuesto de ferroceno, un compuesto de fenotiocina, un compuesto de fenoxacina, un compuesto de fenacina, un compuesto de indofenol, un compuesto difenilamina, o un compuesto fenólico.

20 (7) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (6) anteriormente indicados, en el que la glucosa y/o un derivado de la misma se elimina o se convierte con una enzima a partir de sangre completa tal cual, sin separar las células sanguíneas.

25 (8) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (7) anteriormente indicados, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente en presencia de un estabilizador.

(9) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (8) anteriormente indicado, en el que el estabilizador es ácido 2-sulfobenzóico o ácido 3-sulfobenzóico.

30 (10) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (9) anteriormente indicados, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente mediante amperometría, coulometría, o voltametría cíclica.

35 (11) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (10) anteriormente indicados, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente utilizando un electrodo que tiene un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidorreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol y un contraelectrodo.

40 (12) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (11) anteriormente indicado, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente utilizando un electrodo diferencial.

45 (13) El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de acuerdo con el punto (12) anteriormente indicado, en el que el electrodo diferencial es un electrodo que tiene un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidorreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol y un mediador redox, un electrodo de trabajo para medir un blanco que contiene un mediador redox pero no contiene una oxidorreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol, y un contraelectrodo.

Efecto ventajoso de la invención

50 De acuerdo con la presente invención, puesto que el 1,5-anhidroglucitol puede medirse electroquímicamente utilizando como muestra sangre completa, y no es necesario separar las células sanguíneas, la medición se simplifica sin requerir el uso de una centrífuga o similar, permitiendo que los propios pacientes realicen las mediciones en el hogar.

55 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

En lo sucesivo, la presente invención se explicará en detalle. La presente invención es un procedimiento para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol en sangre que está sujeto a interferencia por glucosa, caracterizado por que en la medición de 1,5-anhidroglucitol en sangre se utiliza como muestra sangre completa sin necesidad de separar las células sanguíneas. Concretamente, el procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de la presente invención se caracteriza por que, para medir electroquímicamente el 1,5-anhidroglucitol, se convierte o se elimina la glucosa y/o un derivado de la misma de la sangre completa tal cual, sin separar las células sanguíneas, y además se deja actuar una enzima para medir 1,5-anhidroglucitol, sin separar las células sanguíneas. Puesto que una enzima para medir 1,5-anhidroglucitol también actúa sobre la glucosa como sustrato como se ha descrito anteriormente, la glucosa y/o el derivado de la misma tiene que ser eliminando o convertido para evitar la interferencia de la glucosa. La etapa de eliminación o conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma y la etapa de medición del 1,5-anhidroglucitol en

el procedimiento de medición de la presente invención pueden llevarse a cabo sucesivamente o secuencialmente con otra etapa entre las mismas.

- 5 La sangre completa utilizada en la presente invención es sangre en un estado tal como se recoge cuyas células sanguíneas no se separan, y puede contener un anticoagulante, un inhibidor glucolítico, y/o similar contenidos en un recipiente para la recogida sangre para recoger la sangre, tal como heparina, fluoruro de sodio, y ácido monoiodoacético. Cuando se utiliza sangre almacenada, la sangre se recoge preferentemente mediante un
- 10 recipiente para la recogida de sangre que contiene fluoruro de sodio y heparina. Además, la sangre completa de la presente invención también incluye la sangre recogida con un dispositivo de lanceta o similar utilizado para la automedición de los niveles de azúcar en sangre sin un recipiente para la recogida de sangre o similar. Los sitios de recogida de sangre no están especialmente limitados, e incluyen una punta de un dedo así como la parte exterior del antebrazo, la pared abdominal, o el exterior de la parte superior del brazo. La cantidad de sangre recogida es, por ejemplo, 50  $\mu\text{l}$  o menos, preferentemente de 0,1 a 30  $\mu\text{l}$ . Más preferentemente es suficiente de 3 a 20  $\mu\text{l}$ .
- 15 La etapa de eliminación o conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma en una sustancia que no interfiera con la medición en la presente invención no está especialmente limitada mientras no afecte a la medición del 1,5-anhidroglucitol diana en sangre. Ejemplos de la misma incluyen los procedimientos de eliminación o conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma en una sustancia que no interfiera con la medición descrita en los DOCUMENTOS DE PATENTE 1 a 9. Resultan más preferentes los procedimientos que utilizan enzimas, y
- 20 ejemplos de los mismos incluyen los procedimientos de oxidación enzimática o fosforilación enzimática de la glucosa. La eliminación o conversión de la glucosa en sangre completa con enzimas ha avanzado sin ningún problema al contrario de la expectativa anteriormente mencionada, y esto ha permitido la medición de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa como se muestra en los ejemplos descritos más adelante.
- 25 Los ejemplos del procedimiento para la oxidación enzimática de la glucosa incluyen un procedimiento que comprende la oxidación de la glucosa con glucosa oxidasa, un procedimiento que comprende la oxidación de la glucosa con glucosa deshidrogenasa en presencia de una coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o ácido fosfórico de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADP). Los ejemplos del procedimiento para la fosforilación enzimática de la glucosa incluyen un procedimiento que comprende la fosforilación de la glucosa con hexoquinasa o
- 30 glucoquinasa para convertirla en glucosa-6-fosfato. Dependiendo de los tipos de enzimas utilizadas para medir 1,5-anhidroglucitol, puede ser necesario convertir adicionalmente la glucosa-6-fosfato producida por la fosforilación de la glucosa. En este caso, ejemplos de ello incluyen un procedimiento que comprende la oxidación de la glucosa a gluconolactona-6-fosfato con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de una coenzima  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , un procedimiento que comprende permitir que la hexoquinasa, la fosfohexosa isomerasa, y la 6-fosfofructoquinasa actúen en presencia de adenosina-5'-difosfato (ADP) y adenosina-5'-trifosfato (ATP) para convertir la glucosa en
- 35 fructosa-1,6-difosfato, y un procedimiento que comprende permitir que la glucosa isomerasa, la fructoquinasa, y la 6-fosfofructoquinasa actúen en presencia de nucleósido difosfato (NDP) y nucleósido trifosfato (NTP) para convertir la glucosa en la fructosa-1,6-difosfato.
- 40 Sobre todo, resulta más preferente el procedimiento de fosforilación de la glucosa con hexoquinasa o glucoquinasa. Por ejemplo, resulta especialmente preferente un procedimiento de fosforilación de la glucosa mediante el procedimiento de ciclación enzimática con hexoquinasa o glucoquinasa en presencia de iones magnesio, ATP, fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato quinasa (PK).
- 45 Las enzimas utilizadas para las conversiones anteriormente mencionadas no están especialmente limitadas mientras no requieran 1,5-anhidroglucitol como sustrato, y ejemplos de las mismas incluyen enzimas clasificadas como glucosa oxidasa (EC1.1.3.4), glucosa deshidrogenasas (EC1.1.1.47, EC1.1.1.118, EC1.1.1.119, y EC1.1.99.10), hexoquinasa (EC2.7.1.1), glucoquinasa (EC2.7.1.2), glucosa-6-fosfato quetol isomerasa (EC5.3.1.9) como fosfohexosa isomerasa, glucosa isomerasa (EC5.3.1.18), fructoquinasa (EC2.7.1.4), y fosfohexoquinasa
- 50 (EC2.7.1.11) como 6-fosfofructoquinasa de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC-IUB. También pueden utilizarse las que están disponibles en el mercado. No hay ningún problema para utilizar como hexoquinasa una hexoquinasa ADP-dependiente, tal como la hexoquinasa ADP-dependiente en concreto.
- Además, en el procedimiento que comprende la oxidación de la glucosa con glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa, también puede utilizarse gluconolactonasa (EC3.1.1.17) para convertir completamente la glucono-1,5-lactona generada en ácido glucónico, y puede utilizarse mutarotasa (EC5.1.3.3) en combinación, en caso necesario.
- 55 En el procedimiento de medición de la presente invención, también puede utilizarse hexoquinasa o glucoquinasa que fosforila tanto la glucosa como el 1,5-anhidroglucitol en el procedimiento que comprende la conversión de 1,5-anhidroglucitol en 1,5-anhidroglucitol-6-fosfato y la medición utilizando una enzima que actúa sobre el 1,5-anhidroglucitol-6-fosfato.
- 60 En la presente invención, la conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma en una sustancia que no interfiere con la medición se lleva a cabo, por ejemplo, poniendo en contacto entre sí un reactivo de conversión y la sangre completa. Concretamente, estas sustancias pueden mezclarse con antelación en un recipiente, o el reactivo de
- 65

conversión puede llevarse en una microplaca detectora que se describe más adelante. Ejemplos del reactivo de conversión incluyen una solución que consiste en hexoquinasa (HK) y/o glucoquinasa (GK), piruvato quinasa (PK), adenosina-5'-trifosfato (ATP), fosfoenolpiruvato (PEP), cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, y cloruro de potasio, y un agente seco de la solución. La hexoquinasa se deriva preferentemente de levaduras, y la glucoquinasa se deriva preferentemente de *Bacillus stearothermophilus*. El reactivo de conversión puede contener hexoquinasa y glucoquinasa, o bien una de ellas. La concentración de hexoquinasa y/o de glucoquinasa en la solución reactiva de conversión es de 1 a 500 u/ml, preferentemente de 20 a 300 u/ml. La concentración de piruvato quinasa en la solución reactiva de conversión es de 1 a 500 u/ml, preferentemente de 20 a 300 u/ml. La concentración de ATP es de 1 a 200 mM, preferentemente de 10 a 80 mM. La concentración de fosfoenolpiruvato es de 10 a 1.500 mM, preferentemente de 100 a 500 mM. La concentración de cloruro de magnesio o sulfato de magnesio es de 1 a 200 mM, preferentemente de 5 a 50 mM. La concentración de cloruro de potasio es de 1 a 200 mM, preferentemente de 5 a 50 mM.

Además, la adición a un reactivo de conversión de una enzima que actúa sobre cada sustancia de interferencia, tal como una oxidasa del ácido ascórbico, una oxidasa del ácido úrico, o una oxidasa de la bilirrubina, resulta eficaz para evitar la interferencia de la medición por interferencia de sustancias aparte de la glucosa. Por ejemplo, la concentración de una ascorbato oxidasa en la solución reactiva de conversión es de 1 a 1.000 u/ml, preferentemente de 5 a 500 u/ml.

Más adelante se explicará la etapa de medición electroquímica del 1,5-anhidroglucitol en sangre completa utilizando enzimas. Ejemplos de procedimientos para la medición incluyen un procedimiento que comprende medir directamente el peróxido de hidrógeno generado por una reacción de oxidación-reducción con una enzima y un procedimiento que utiliza un mediador redox que interviene en la transferencia de electrones implicada en una reacción de oxidación-reducción. Ejemplos de enzimas incluyen enzimas que oxidan el 1,5-anhidroglucitol, y resultan más preferentes las oxidorreductasas. Ejemplos de las mismas incluyen enzimas clasificadas como piranosa oxidasa (EC1.1.3.10), L-sorbosa oxidasa (EC1.1.3.11), L-sorbosa deshidrogenasa (EC1.1.99.12), 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (EC1.1.99.13) de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC-IUB.

Ejemplos de oxidorreductasas incluyen piranosa oxidasa producida por el hongo *Basidiomyces* n° 52 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM P-10106) descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 12, *Polyporus obtusus* ATCC26733 descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 7, y similares, L-sorbosa oxidasas producidas por *Trametes sanguinea* IFO4923, L-sorbosa deshidrogenasa producida por *Gluconobacter oxidans* UV-10 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM P-8422) descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 13 y similares, 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa producida por *Pseudomonas* sp. NK-85001 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM BP-1037) descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 11 y similares, 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa producida por hongos tales como *Eupenicillium crustaceum* IFO-8938 descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 14 y similares; 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa producida por *Trichoderma longibrachiatum* KDK3003 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM BP-6458) descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 15 y similares, 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa producida por *Rahnella aquatilis* 474 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM P-16158), *Enterobacter cloacae* 340 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM P-16157) y *Serratia marcescens* 825 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM P-16159) descritos en el DOCUMENTO DE PATENTE 16 y similares, 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa producida por *Agrobacterium tumefaciens* cepa NT1130 (Depositorio de Organismos Internacionales de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada: número de acceso FERM BP-5997) descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 6, que puede deshidrogenar el 1,5-anhidroglucitol sin requerir un aceptor de electrones, D-glucósido-3-deshidrogenasa producida por *Cytophaga marinoflava* ATCC19326 descrito en el DOCUMENTO DE PATENTE 10 y similares, y las enzimas descritas en los DOCUMENTOS DE PATENTE, 17, 18 y 12. Además, también pueden utilizarse otras oxidorreductasas que oxidan el 1,5-anhidroglucitol disponibles en el mercado. De ellas, resultan más preferentes piranosa oxidasa, L-sorbosa oxidasa y 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa. Además, después de identificar y mejorar o modificar los genes de estas enzimas mediante técnicas habituales de manipulación genética, también pueden utilizarse, a continuación, en el procedimiento de medición de la presente invención, enzimas producidas utilizando *Escherichia coli* recombinante o similar mientras sean oxidorreductasas que requieran 1,5-anhidroglucitol como sustrato.

Ejemplos de procedimientos de medición electroquímica incluyen amperometría (procedimiento que comprende la medición de una corriente eléctrica), coulometría (procedimiento que comprende la medición de una cantidad de electricidad), un procedimiento de barrido de potencial, y voltametría cíclica. De ellos, resultan más preferentes la amperometría y la coulometría.

Puede formarse un electrodo utilizado en procedimientos de medición electroquímica en una placa aislante,

utilizando oro, platino, carbono, paladio, plata, o cloruro de plata-plata. Ejemplos de materiales de la placa aislante incluyen plástico, tal como tereftalato de polietileno, policarbonato y carbonato de polivinilo y vidrio, y resulta más preferente el tereftalato de polietileno. Puede formarse un electrodo en esta placa por serigrafía, deposición al vacío, pulverización iónica, o similares. De estos procedimientos, resulta más preferente la serigrafía. Concretamente, es preferible formar un electrodo por serigrafía con una tinta de carbono conductora o cloruro de plata-plata en una placa hecha de tereftalato de polietileno utilizando y enfriando la placa de 100 a 150°C.

Como electrodo utilizado en la medición electroquímica de 1,5-anhidroglucitol de la presente invención, puede utilizarse un montaje con tres electrodos que forman un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia, o un montaje con dos electrodos que forman un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. En general, en la medición utilizando un montaje con tres electrodos, se aplica un potencial a un electrodo de trabajo utilizando como referencia un electrodo de referencia, y se mide una corriente eléctrica que fluye entre el electrodo de trabajo y un contraelectrodo. En la medición utilizando un montaje con dos electrodos, se utiliza un contraelectrodo como electrodo de referencia, se aplica un potencial predeterminado a un electrodo de trabajo utilizando el contraelectrodo de referencia, y se mide una corriente eléctrica que fluye entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

Existen diversos procedimientos para la medición electroquímica, y los ejemplos en la presente invención incluyen procedimientos de medición que comprenden la medición del peróxido de hidrógeno generado utilizando directamente un electrodo de peróxido de hidrógeno y un procedimiento de medición utilizando un mediador redox que interviene en la transferencia de electrones implicada en una reacción de oxidación-reducción. Ejemplos de mediador redox incluyen mediadores de la oxidación y mediadores de la reducción, y resultan más preferentes los mediadores de la oxidación. De ellos, resultan más preferentes los complejos de osmio, compuestos de quinona, compuestos de ferroceno, compuestos de fenotiacina, compuestos de fenoxacina, compuestos de fenacina, compuestos de indofenol, compuestos de difenilamina, compuestos fenólicos, y similares. Ejemplos de complejos de osmio incluyen  $[\text{Os}(\text{III})(\text{bipiridil})_2(\text{imidazoil})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  y sus polímeros. Ejemplos de compuestos de quinona incluyen benzoquinona, 2-metilbenzoquinona, 2,6-dimetilbenzoquinona, 2,6-diclorobenzoquinona, 2,5-dihidroxibenzoquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, 2-metil-1,4-naftoquinona, 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona, quinona de pirroloquinolina (PQQ), y ubiquinona. Ejemplos de compuestos de ferroceno incluyen PEG ferrocenil, TMA ferrocenil, N,N-dimetilaminometil ferroceno, y ferroceno metanol. Ejemplos de compuestos de fenotiacina incluyen tionina, azul de metileno, verde de metileno, sales de sodio de 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7'-bis(dimetilamino) fenotiacina, azul de toluidina O, azul I, azul C, azul A, nuevo azul de metileno, y azul de leucometileno de benzoilo. Ejemplos de compuestos de fenoxacina incluyen azul de Meldola. Ejemplos de compuestos de fenacina incluyen metosulfato de fenacina, metosulfato de 1-metoxifenacina, safranina y fenosafranina. Ejemplos de compuestos de indofenol incluyen 2-diclorofenol-indofenol (DCIP). Ejemplos de compuestos de difenilamina incluyen 4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina, sal de sodio de N-(carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina, clorhidrato de N-metil-N-fenil-1,4-fenilendiamina, y clorhidrato de N-metil-N-(3-metoxifenil)-1,4-fenilendiamina. Ejemplos de compuestos fenólicos incluyen p-aminofenol.

Además, ejemplos de mediadores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen compuestos de ferricianina (ferricianuro potásico, etc.), complejos de rutenio o sus polímeros, compuestos de bipiridina (metil viológeno, etc.), compuestos de trifenilmetano (verde malaquita, TPM-PS, etc.), compuestos de benzotiazolina (2-hidrazono-2,3-dihidro-3-metil-6-benzotiazol, sulfonatos del mismo, etc.), compuestos de cianina (gallocianina, ftalcianina, ficocianina, etc.), compuestos de azo (magenta J-3GL, Amarillo C-Y9, Negro C-BK4, etc.), compuestos de bipiridilazo (5-Br-PSAA, 5-Br-PAPS, TAMSMB, etc.), anilina y sus derivados (DAPS, HALPS, ADPS, ALPS, TOOS, ALOS, etc.), polianilina y sus derivados, compuestos fenólicos (p-aminofenol, etc.), compuestos de fenileno diamina (azul de Balamina B, 2,3,5,6-tetrametil-p-fenilendiamina, etc.), compuestos de rodamina (rodamina B, etc.), compuestos de xanteno (pironina Y, pironina B, fluoresceína sódica, etc.), compuestos de isoalloxacina (riboflavina, FAD, etc.), compuestos de índigo (ácido trisulfónico índigo, carmín de índigo, etc.), compuestos de fenantrolina (sulfonato de sodio batocuproína, sulfonato de sodio batofenantrolina, etc.), compuestos de sulfoftaleína (azul de metiltimol, etc.), compuestos de bencidina (TMBZ, TMBZ•PS, DAB, azul de anisidina, etc.), compuestos de tetrazolio (WST-1, MTT, Nitro-TB, XTT, etc.), citocromo C, lumicromo, ferredoxinas, EDTAs, NAD y NADP.

Los compuestos tales como los mediadores redox y las enzimas anteriormente mencionadas, llevados por el electrodo en la medición electroquímica de 1,5-anhidroglucitol de la presente invención, se disuelven en agua purificada o en una solución tampón adecuada como reactivo para electrodo y se aplican a un electrodo como solución reactiva para electrodo. La concentración del mediador redox mencionado anteriormente contenido en el reactivo para electrodo es, por ejemplo, aproximadamente de 0,01  $\mu\text{M}$  a 1 M, preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 200 mM como concentración en la solución reactiva para electrodo obtenida por disolución en agua purificada o en una solución tampón adecuada a aplicar al electrodo. La concentración de la enzima anteriormente mencionada es, por ejemplo, aproximadamente de 0,1 a 5.000 u/ml, preferentemente de 1 a 2.000 u/ml como concentración en la solución reactiva para electrodo obtenida por disolución en agua purificada o en una solución tampón adecuada a aplicar a un electrodo. Como solución tampón, pueden utilizarse tampones utilizados en las reacciones químicas habituales, y ejemplos de las mismas incluyen tampón ácido 2-morfolinoetansulfónico (MES), tampón ácido 2-[4-(2hidroxietil)-1-piperacil]jetanosulfónico (HEPES), tampón ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), tampón tris y tampón fosfato. El pH es de 3 a 10, preferentemente de 5 a 9. La concentración de la solución tampón es de 1 mM a 1 M, preferentemente de 5 a 500 mM.

La solución reactiva para electrodo contiene preferentemente compuestos de bajo peso molecular tales como ácido sulfobenzoico, azúcar y alcohol de azúcar, proteínas tales como albúmina, o compuestos macromoleculares hidrófilos tales como carboximetilcelulosa, polietilenglicol, alcohol de polivinilo, y polivinilpirrolidona como estabilizadores que aumentan la estabilidad de las enzimas y de los mediadores redox, que da como resultado una medición estable de 1,5-anhidroglucitol durante un largo período y una medición de 1,5-anhidroglucitol en sangre con una buena precisión. Ejemplos preferentes de ácido sulfobenzoico incluyen ácido 2-sulfobenzoico y ácido 3-sulfobenzoico. Cuando se utiliza como estabilizador un compuesto de bajo peso molecular tal como el ácido sulfobenzoico, la concentración del mismo es aproximadamente de 0,1 a 500 mM, preferentemente aproximadamente de 1 a 100 mM como concentración en la solución reactiva para electrodo a aplicar sobre el electrodo. Cuando se utiliza como estabilizador un compuesto macromolecular hidrófilo tal como la albúmina, la concentración del mismo es, por ejemplo, aproximadamente del 0,01 al 20%, preferentemente aproximadamente del 0,02 al 10% como concentración en la solución reactiva para electrodo a aplicar sobre el electrodo.

Preferentemente se permite al electrodo mencionado anteriormente llevar el reactivo para electrodo mencionado anteriormente. Esto puede lograrse mediante un procedimiento conocido. Por ejemplo, una cantidad predeterminada del reactivo para electrodo mencionado anteriormente se aplica sobre un electrodo mediante recubrimiento por rotación, por goteo, o por inmersión, y se seca. Además, complementariamente a tal adsorción física, el reactivo para electrodo mencionado anteriormente puede unirse químicamente a un electrodo. Para ser llevado en un electrodo, se añade a la solución reactiva para electrodo mencionada anteriormente el estabilizador mencionado anteriormente y a continuación se aplica y se seca o se lamina sobre una capa en la que se lleva una enzima o similar.

A continuación se explicará el electrodo diferencial. Un electrodo diferencial es, por ejemplo, un electrodo que tiene un electrodo de trabajo que lleva una enzima de oxidación-reducción y un reactivo mediador redox (por ejemplo, un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol), un electrodo de trabajo que lleva un reactivo mediador redox pero no contiene una enzima de oxidación-reducción (por ejemplo, un electrodo de trabajo para medir un blanco), y un contraelectrodo, que mide simultáneamente una muestra que contiene una sustancia interferente relacionada con el mediador redox o similar utilizando el electrodo de trabajo que lleva una enzima oxidación-reducción y un reactivo mediador redox y el electrodo de trabajo que lleva un reactivo mediador redox pero no contiene una enzima de oxidación-reducción, y elimina el efecto de la sustancia interferente restando una parte de señal debida a la interferencia, y la estructura de la misma no queda limitada mientras lleve a cabo una acción de este tipo. Ejemplos de los mismos incluyen los electrodos diferenciales que tienen un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidoreductasa y un mediador redox para medir 1,5-anhidroglucitol, un electrodo de trabajo para medir un blanco que contiene un mediador redox, y un contraelectrodo de los ejemplos que se describen más adelante.

Este procedimiento de medición electroquímica que utiliza un electrodo diferencial se denomina procedimiento diferencial, y es conocida la medición de la glucosa como diana. En este caso, las sustancias interferentes son ácido úrico y ácido ascórbico. La concentración en sangre de ácido úrico es de 120 a 770  $\mu\text{mol/l}$  y la del ácido ascórbico es de 11 a 210  $\mu\text{mol/l}$  en base a 5.500 a 33.000  $\mu\text{mol/l}$  de glucosa. Estas concentraciones son mucho menores que la de glucosa. Mientras, la concentración de 1,5-anhidroglucitol en sangre es de 6 a 300  $\mu\text{mol/l}$ , que es mucho menor que la de glucosa. En la medición electroquímica de 1,5-anhidroglucitol en sangre, el ácido úrico y el ácido ascórbico son sustancias similarmente interferentes. Sin embargo, la concentración de estas sustancias es mayor o casi igual que la de 1,5-anhidroglucitol. Es decir, se conocen procedimientos diferenciales empleados cuando la concentración de una sustancia interferente es significativamente menor que la de una sustancia a medir, pero hasta ahora no se ha descrito ningún procedimiento diferencial empleado cuando la concentración de una sustancia interferente es igual o mayor que la de una sustancia a medir. Por lo tanto, se desconoce si el procedimiento diferencial es eficaz, y si pueden obtenerse resultados correctos de la medición incluso cuando existe una sustancia interferente (ácido úrico, ácido ascórbico) con una concentración igual o mayor que la del 1,5-anhidroglucitol (sustancia a medir).

La microplaca detectora para medir 1,5 -anhidroglucitol se compone del electrodo mencionado anteriormente formado en una placa aislante, una parte de unión para ser conectada a un dispositivo de medición, una parte de unión que conecta el electrodo y la parte de unión, adicionalmente un material protector (parte aislante) para hacer el área del electrodo constata para aislar la parte conductora, y similares, que incluye adicionalmente una abertura para recoger la sangre de muestra, un espacio en el que entra la sangre, un canal de fluido, y similares. Esta estructura se forma con un material tipo película tal como una película de polietileno o una película de poliamida, un adhesivo tal como una cola termoplástica, un agente de pegado, tal como una cinta adhesiva de doble cara, y similares.

El 1,5-anhidroglucitol también puede medirse utilizando una microplaca detectora en la que un reactivo para electrodo no es llevado por un electrodo, y una muestra y el reactivo se mezclan con antelación y se añaden. Sin embargo, es preferible una microplaca detectora que incluya un electrodo que tiene un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidoreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol y un mediador redox y un contraelectrodo, y resulta más preferente una microplaca detectora que incluya un electrodo diferencial que tiene un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidoreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol



y un mediador redox, un electrodo de trabajo para medir un blanco que contiene un mediador redox pero no contiene una oxidorreductasa, y un contraelectrodo. El contraelectrodo puede llevar el reactivo para electrodo mencionado anteriormente, en caso necesario. Además, puede utilizarse una microplaca detectora con una parte de pretratamiento que contiene un reactivo que lleva a cabo la etapa de conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma en una sustancia que no interfiere con la medición.

En las Figs. 1 a 3 se muestran diagramas simplificados de un ejemplo de la microplaca detectora utilizada en la presente invención.

Se describe adicionalmente un kit para medir 1,5-anhidroglucitol en sangre completa compuesto por al menos la microplaca detectora mencionada anteriormente, un dispositivo de lanceta utilizado para recoger la sangre, y un dispositivo de medición para 1,5-anhidroglucitol. El dispositivo de lanceta puede ser similar a un dispositivo de lanceta unido a un dispositivo para la auto-monitorización de los niveles de azúcar en sangre. Este kit puede incluir adicionalmente un reactivo utilizado en la etapa de conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma en una sustancia que no interfiere con la medición.

Además, este kit para medir 1,5-anhidroglucitol puede tener un dispositivo para recoger una muestra, un reactivo para el pretratamiento, un calibrador, y similares. El dispositivo para recoger una muestra no está especialmente limitado mientras puedan recogerse aproximadamente varias decenas de  $\mu\text{l}$  o menos de sangre completa, y puede ser similar a un capilar utilizado en la medición del hematocrito.

En lo sucesivo, la presente invención se explicará más específicamente con respecto a los siguientes ejemplos y Ejemplos de Referencia. Sin embargo, estos ejemplos sólo muestran un aspecto de la presente invención y no limitan el alcance de la presente invención. En los ejemplos se utilizaron enzimas que se obtuvieron mediante procedimientos conocidos o que se encontraban disponibles el mercado.

El detector electroquímico utilizado en todos los ejemplos y en los Ejemplos de Referencia 9, 10 y 11 fue un multipotenciostato de 8 canales modelo PS-08 equipado con GPIB y RS232C fabricado por Toho Giken, y el detector electroquímico utilizado en los Ejemplos de Referencia 7 y 8 fue un multipotenciostato de 8 canales modelo PS-08 equipado con un generador de funciones FG-02 fabricado por Toho Giken. El término 1,5AG en las figuras indica 1,5-anhidroglucitol.

### Ejemplo 1

#### 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Para preparar un reactivo de conversión de la glucosa, se disolvieron, en tampón MES, 10,0 mM,  $\text{MgCl}_2$  17,6 mM, KCl 17,6 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 175,7 mM, ATP 17,6 mM, 123 u/ml de piruvato quinasa, 75 u/ml de glucoquinasa, 200 u/ml de ácido ascórbico oxidasa, cloruro sódico 100 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,1%, EDTA 0,1 mM, y seroalbúmina bovina (BSA) al 0,06%, como composición, después de ajustar el pH a 7,0 utilizando hidróxido sódico acuoso 1 N.

#### 2) Solución reactiva para electrodo

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, complejo de osmio (III) ( $[\text{Os}(\text{III})(\text{bipiridil})_2(\text{imidazoil})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ) 23,6 mM descrito en la patente japonesa nº 3713049, 930 u/ml de piranosa oxidasa (derivada del hongo *Basidiomyces* nº 52), y ácido 3-sulfobenzoico 50 mM, en esta composición.

#### 3) Microplaca detectora

Se serigrafió, un grosor de 10  $\mu\text{m}$ , una placa de base hecha de tereftalato de polietileno con una tinta de carbono (nombre del producto, pasta de carbono TU15ST: Asahi Chemical Research Laboratory Co. Ltd.) y se enfrió a 150°C durante 40 minutos para formar un electrodo de trabajo y una parte conductora y un contraelectrodo y una parte conductora. A continuación, se serigrafió, un grosor de 20  $\mu\text{m}$ , una parte, excepto la parte de electrodo y una unión con un dispositivo de medición, con una tinta protectora (nombre del producto, CR18G-KF: Asahi Chemical Research Laboratory Co. Ltd.) y se enfrió a 130°C durante 15 minutos. De esta manera se preparó el electrodo 11 mostrado en la Fig. 1. Para preparar una microplaca detectora, se recubrió el electrodo 11 con 4  $\mu\text{l}$  de la solución reactiva para electrodo obtenida en el punto 2) anteriormente indicado, en una posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se secó a 50°C durante 13 minutos.

#### 4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 5 muestras obtenidas añadiendo a plasma 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 que se describe más adelante, excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas, fueron 3,8, 7,8, 15,8, 31,4, y 63,9  $\mu\text{g/ml}$ ) y 10  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre el

electrodo 11 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico (multipotenciostato de 8 canales modelo PS-08 equipado con GPIB y RS232C: Toho Giken). Se creó una curva de calibrado a partir de las diferencias entre los niveles de Coulomb obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco, y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol.

5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20 µl de sangre completa de cada uno de 3 sujetos normales con niveles de ácido úrico casi iguales a los de las muestras obtenidas en el punto 4) anteriormente indicado o con bajos niveles de ácido úrico en las muestras medidas, con 10 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 11 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Se obtuvieron las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa de las 3 muestras utilizando la curva de calibrado creada en el punto 4) anteriormente indicado. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se utilizaron los valores medios de 4 mediciones para las muestras para la creación de la curva de calibrado, y se utilizó el valor de 1 medición para las muestras.

**Ejemplo de Referencia 1.**

Se centrifugaron las mismas muestras de sangre completa de los 3 sujetos normales utilizados para la medición en el punto 5) del Ejemplo 1, a 3.000 rpm durante 10 minutos, y se midió el sobrenadante (plasma) para el 1,5-anhidroglucitol utilizando un reactivo de medición de 1,5-anhidroglucitol (Lana 1,5AG Auto Liquid: Nippon Kayaku Co., Ltd.) y una analizador automatizado Hitachi 7150 (Hitachi, Ltd.) con los siguientes parámetros. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Procedimiento analítico	2 puntos
Punto de lectura	24-50
Volumen de la muestra	8 µl
Reactivo de pretratamiento (R1) de Lana 1,5AG Auto Liquid	240 µl
Reactivo de color (R2) de Lana 1,5AG Auto Liquid	120 µl
Temperatura	37°C
Longitud de onda de la medición (secundaria/principal)	700/546 nm

[Tabla 1]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol (µg/ml)	
	Ejemplo de referencia 1	Ejemplo 1
Muestra de sangre completa 1	9,8	10,4
Muestra de sangre completa 2	15,6	16,8
Muestra de sangre completa 3	17,2	17,2

Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con un reactivo para electrodo, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en las muestras de sangre completa (Ejemplo 1) estuvieron en buena consonancia con los obtenidos mediante un procedimiento de medición conocido en el Ejemplo de Referencia 1 (coeficiente de correlación, 0,9881), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse mediante la presente invención.

**Ejemplo 2**

1) Reactivo de conversión de la glucosa

Para preparar un reactivo de conversión de la glucosa, se disolvieron, en tampón MES, 10,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 17,6 mM, KC1 17,6 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 175,7 mM, ATP 17,6 mM, 123 u/ml de piruvato quinasa (PK), 97 u/ml de hexoquinasa, y 20 u/ml de ácido ascórbico oxidasa, como composición, después de ajustar el pH a 7,0 utilizando hidróxido sódico acuoso 1 N.

## 2) Solución reactiva para electrodo

(i) Para medir el 1,5-anhidroglucitol

- 5 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, complejo de osmio (III) ( $[\text{Os}(\text{III})(\text{bipiridil})_2(\text{imidazol})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ) 23,6 mM y 465,2 u/ml de piranosa oxidasa (derivada del hongo *Basidiomyces* n° 52), en esta composición.

(ii) Para medir el blanco

- 10 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvió, en agua purificada, complejo de osmio (III) ( $[\text{Os}(\text{III})(\text{bipiridil})_2(\text{imidazol})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ) 23,6 mM, en esta composición.

## 3) Microplaca detectora

- 15 Para medir el 1,5-anhidroglucitol y un blanco, se prepararon dos electrodos 11 de la misma manera que en el punto 3) del Ejemplo 1, y se aplicaron 4  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones reactivas para electrodo para medir 1,5-anhidroglucitol o un blanco del punto 2) anteriormente indicado, sobre cada uno de los electrodos en la posición 1 en la que se aplicó la muestra y se secaron a 50°C durante 13 minutos para preparar las microplacas detectoras.

- 20 4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las 5 muestras obtenidas añadiendo a plasma preparaciones de 1,5-anhidroglucitol con concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 9,4, 18,8, 37,5, 75,0, y 150,0  $\mu\text{g/ml}$ ) con 10  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre cada uno de los electrodos 11 para medir 1,5-anhidroglucitol y un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V, durante 10 segundos, al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo y los se midieron valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Se creó una curva de calibrado a partir de las diferencias entre los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol.

- 35 5) Medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de sangre completa de cada uno de 6 sujetos normales para medir el 1,5-anhidroglucitol, con 10  $\mu\text{l}$  de un reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada mezcla de reacción sobre cada uno de los electrodos 11 para medir 1,5-anhidroglucitol y un blanco, en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa de las 6 muestras, se compararon las diferencias entre los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco, con la curva de calibrado. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Se utilizaron los valores medios de 4 mediciones para las muestras para crear la curva de calibrado, y se utilizó el valor de 1 medición para las muestras.

**Ejemplo de Referencia 2**

- 50 Las mismas muestras de sangre completa tal como se midieron en el punto 5) del Ejemplo 2 se midieron para el 1,5-anhidroglucitol de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

- 55 [Tabla 2]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Ejemplo de referencia 2	Ejemplo 2
Muestra de sangre completa 4	16,4	16,7
Muestra de sangre completa 5	17,5	14,2
Muestra de sangre completa 6	26,2	23,5
Muestra de sangre completa 7	31,5	26,9
Muestra de sangre completa 8	27,2	24,4
Muestra de sangre completa 9	31,4	36,7

5 Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición, y se hizo reaccionar la sangre completa con el reactivo para electrodo, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa obtenidos mediante el procedimiento diferencial se correlacionaron bien con los obtenidos mediante la medición en el Ejemplo de Referencia 2 (coeficiente de correlación, 0,8943), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse mediante la presente invención.

### 10 Ejemplo 3

1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

15 2) Solución reactiva para electrodo

(i) Para medir el 1,5-anhidroglucitol

20 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, complejo de osmio (III)  $([\text{Os}(\text{III})(\text{bipiridil})_2(\text{imidazol})\text{Cl}]\text{Cl}_2)$  23,6 mM, 930 u/ml de piranosa oxidasa (derivada del hongo *Basidiomycetes* n° 52), y ácido 3-sulfobenzoico 50 mM, en esta composición.

(ii) Para medir el blanco

25 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, complejo de osmio (III)  $([\text{Os}(\text{III})(\text{bipiridil})_2(\text{imidazol})\text{Cl}]\text{Cl}_2)$  23,6 mM y ácido 3-sulfobenzoico 50 mM, en esta composición.

3) Microplaca detectora

30 Se prepararon, de la misma manera que en el punto 3) anteriormente indicado del Ejemplo 2, una microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol y una microplaca detectora para medir un blanco.

4) Creación de la curva de calibrado

35 Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de cada una de 5 muestras obtenidas añadiendo a plasma preparaciones de 1,5-anhidroglucitol con concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol de las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 9,5, 19,6, 39,6, 78,5, y 159,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con 10  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre cada uno de los electrodos 11 para medir 1,5-anhidroglucitol y para medir un blanco, en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Se creó una curva de calibrado a partir de las diferencias entre los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol.

5) Medición del 1,5-anhidroglucitol

50 Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de sangre completa de cada uno de 6 sujetos normales para medir el 1,5-anhidroglucitol con 10  $\mu\text{l}$  de reactivo de conversión de la glucosa y se dejó reposar la mezcla durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada mezcla de reacción en la posición 1 en la que se aplicó la muestra de los electrodos 11 para medir 1,5-anhidroglucitol y para medir un blanco. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 6 muestras de sangre completa, se compararon las diferencias entre los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco con la curva de calibrado. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Se utilizaron los valores medios de 4 mediciones para las muestras para crear la curva de calibrado, y se utilizó el valor de 1 medición para las muestras.

### 65 Ejemplo de Referencia 3

Las mismas muestras de sangre completa tal como se midieron en el punto 5) del Ejemplo 3 se midieron para el 1,5-anhidroglucitol de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Tabla 3

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Ejemplo de referencia 3	Ejemplo 3
Muestra de sangre completa 10	9,8	9,7
Muestra de sangre completa 11	15,6	15,5
Muestra de sangre completa 12	17,2	17,3
Muestra de sangre completa 13	24,6	25,1
Muestra de sangre completa 14	30,1	32,8
Muestra de sangre completa 15	29,0	30,8

5 Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición, y se hizo reaccionar la sangre completa con el reactivo para electrodo, sin separar las células sanguíneas, los valores de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa medidos mediante el procedimiento diferencial (Ejemplo 3) se correlacionaron bien con los medidos mediante un procedimiento de medición conocido en el Ejemplo de Referencia 3 (coeficiente de correlación, 0,9982), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse mediante la presente invención. Además, los resultados mostraron claramente una mejor correlación que la del Ejemplo 2 anteriormente indicado (coeficiente de correlación, 0,8943). Es decir, se ha demostrado que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa se mide con una mayor precisión utilizando, en combinación, un estabilizador y un procedimiento diferencial.

#### 15 **Ejemplo 4**

1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa del punto 1) en el Ejemplo 1.

2) Solución reactiva para electrodo

(i) Para medir el 1,5-anhidroglucitol

25 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, complejo de osmio (III) ( $[\text{Os(III)(bipiridil)}_2(\text{imidazol})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ) 11,8 mM y 111,0 u/ml de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en esta composición.

(ii) Para medir el blanco

30 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvió el componente en agua purificada de manera que la composición fuese complejo de osmio (III) ( $[\text{Os(III)(bipiridil)}_2(\text{imidazol})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ) 11,8 mM.

3) Microplacas detectoras

35 Se prepararon dos de los electrodos 11, preparados de la misma manera que en el punto 3) del Ejemplo 1, se aplicaron 4  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones reactivas para electrodo para medir 1,5-anhidroglucitol y para medir un blanco obtenidas en el punto 2) anteriormente indicado, sobre cada uno de los electrodos en la posición 1 en la que se aplicó la muestra y se secaron a 50°C durante 8 minutos para preparar las microplacas detectoras para medir 1,5-anhidroglucitol y para medir un blanco.

4) Creación de la curva de calibrado

45 Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de cada una de 3 muestras obtenidas añadiendo a plasma preparaciones de 1,5-anhidroglucitol con concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 24,2, 49,3, y 98,8  $\mu\text{g/ml}$ ) con 10  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre cada uno de los electrodos 11 para medir 1,5-anhidroglucitol y para medir un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Se creó una curva de calibrado a partir de las diferencias entre los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol.

55 5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20 µl de sangre completa de cada uno de 4 sujetos normales para medir el 1,5-anhidroglucitol con 10 µl de reactivo de conversión de la glucosa, y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre cada uno de los electrodos 11 para medir 1,5-anhidroglucitol y para medir un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 4 muestras de sangre completa, se compararon las diferencias entre los valores de corriente obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco con la curva de calibrado. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se utilizaron los valores medios de 4 mediciones para las muestras para crear la curva de calibrado, y se utilizó el valor de 1 medición para las muestras.

#### Ejemplo de Referencia 4

Las mismas muestras de sangre completa tal como se midieron en el Ejemplo 4 se midieron para el 1,5-anhidroglucitol mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol (µg/ml)	
	Ejemplo de referencia 4	Ejemplo 4
Muestra de sangre completa 16	9,4	10,0
Muestra de sangre completa 17	14,0	13,8
Muestra de sangre completa 18	27,8	26,2
Muestra de sangre completa 19	32,7	32,6

Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que contenía 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa, sin separar las células sanguíneas, los valores de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa medidos mediante el procedimiento diferencial (Ejemplo 4) se correlacionaron bien con los medidos en el Ejemplo de Referencia 4 (coeficiente de correlación, 0,9974), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse mediante la presente invención.

#### Ejemplo de Referencia 5

##### 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Para preparar un reactivo de conversión de la glucosa, se añadieron, a tampón MES 10,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 17,6 mM, KCl 17,6 mM, fosfoenpiruvato (PEP) 175,7 mM, ATP 17,6 mM, 123 u/ml de piruvato quinasa (PK) y 97 u/ml de hexoquinasa, como composición, después de ajustar el pH a 7,0 utilizando hidróxido sódico acuoso 1 N.

##### 2) Solución reactiva para electrodo

Para preparar las soluciones reactivas para electrodo con dos tipos de composiciones, se disolvieron, en agua purificada, complejo de osmio (III) ([Os(III)(bipiridil)<sub>2</sub>(imidazoil)Cl]Cl<sub>2</sub>) 11,8 mM, 930 u/ml de piranosa oxidasa (derivada del hongo *Basidiomycetes* n° 52), y ácido 2-sulfobenzoico 50 mM (Ejemplo de Referencia 5-1) ó ácido 3-sulfobenzoico 50 mM (Ejemplo de Referencia 5-2), en esta composición. La preparación de la solución reactiva para electrodo sin añadir ácido sulfobenzoico se denominó Ejemplo de Referencia 5-3.

##### 3) Microplaca detectora

Se preparó una microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol de la misma manera que en el punto 3) anteriormente indicado del Ejemplo 1.

##### 4) Procedimiento de medición

Utilizando la microplaca detectora preparada en el punto 3) anteriormente indicado el día 0 (inmediatamente después de la preparación) y después de almacenarse durante 5 días a temperatura ambiente y una humedad de aproximadamente el 20%, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20 µl de cada una de las muestras que contenían 0 µg/ml y 50 µg/ml de 1,5-anhidroglucitol con 10 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre cada uno de los electrodos 11 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra. 80 segundos más tarde, se aplicaron 0,15 V al electrodo de trabajo con respecto al contraelectrodo, durante 10 segundos, y se midieron los valores de corriente después de los siguientes 5 segundos con un detector electroquímico. Los valores medios y la desviación

estándar de 4 mediciones y las velocidades de cambio se muestran en las Tablas 5-1 y 5-2.  
[Tabla 5-1]

	0 µg/ml de 1,5-anhidroglucitol				
	Día 1		Día 5		Velocidad de cambio Día 5/Día 1
	Media (µA)	D.E.	Media (µA)	D.E.	
Ejemplo de Referencia 5-1	0,77	0,06	0,96	0,03	1,24
Ejemplo de Referencia 5-2	0,74	0,02	1,04	0,04	1,41
Ejemplo de Referencia 5-3	1,35	0,06	3,58	0,18	2,66

5 [Tabla 5-2]

	50 µg/ml de 1,5-anhidroglucitol				
	Día 1		Día 5		Velocidad de cambio Día 5/Día 1
	Media (µA)	D.E.	Media (µA)	D.E.	
Ejemplo de Referencia 5-1	1,99	0,06	2,16	0,08	1,08
Ejemplo de Referencia 5-2	1,89	0,02	2,21	0,04	1,17
Ejemplo de Referencia 5-3	2,68	0,13	4,73	0,22	1,76

10 En los Ejemplos de Referencia 5-1 y 5-2, las velocidades de cambio (valor medio de corriente el día 5/valor medio de corriente el día 1) fueron menores que en el Ejemplo de Referencia 5-3, lo que demuestra que se suprimía el incremento de los valores de corriente a lo largo del tiempo. Además, la desviación estándar era pequeña, lo que sugiere la fiabilidad de la medición, es decir, se mejoraba la precisión. Estos resultados demuestran el efecto de la adición de un estabilizador al reactivo para electrodo, que puede aplicarse a la medición electroquímica de  
15 1,5-anhidroglucitol en sangre completa.

### Ejemplo 5

1) Reactivo de conversión de la glucosa

20 Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa preparado en el punto 1) del Ejemplo 1.

2) Procedimiento de pretratamiento (medición común para el 1,5-anhidroglucitol y el blanco)

25 Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 10 µl de cada una de 4 muestras obtenidas añadiendo a plasma preparaciones de 1,5-anhidroglucitol con concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 3,8, 7,8, 15,8, y 31,4 µg/ml) ó  
30 4 muestras de sangre completa humana con 10 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos.

3) Procedimiento antes de la medición con el electrodo

(i) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

35 A la solución después del procedimiento de pretratamiento anteriormente mencionado, se añadieron sucesivamente 5 µl de tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) en el que se encontraba disuelta 2,6-dimetilbenzoquinona 22,0 mM y 5 µl de tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) en el que se encontraban disueltas 200 u/ml de piranosa oxidasa (derivada del hongo *Basidiomycetes* nº 52), se mezclaron, y se dejaron reposar durante 5 minutos.

(ii) Procedimiento de medición del blanco

40 A la solución después del procedimiento de pretratamiento anteriormente mencionado, se añadieron sucesivamente 5 µl de tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) en el que se encontraba disuelta 2,6-dimetilbenzoquinona 22,0 mM y 5 µl de  
45 tampón fosfato 100 mM (pH 7,0), se mezclaron, y se dejaron reposar durante 5 minutos.

4) Procedimiento de medición utilizando una microplaca detectora

Se serigrafió, un grosor de 10 µm, una placa de base hecha de tereftalato de polietileno con una tinta de carbono

(nombre del producto, pasta de carbono TU15ST: Asahi Chemical Research Laboratory Co. Ltd.) como electrodo de trabajo y una parte conductora, un contraelectrodo y una parte conductora, y un electrodo de referencia y una parte conductora, y se enfrió a 150°C durante 40 minutos. A continuación, se serigrafió, un grosor de 20 µm, con una tinta protectora (nombre del producto, CR18G-KF: Asahi Chemical Research Laboratory Co. Ltd.), excepto una parte de unión entre la parte de electrodo y un dispositivo de medición y se enfrió a 130°C durante 15 minutos para preparar un electrodo 12 mostrado en la Fig. 2. Se aplicaron, gota a gota, 15 µl de cada una de las mezclas de reacción obtenidas en el punto 3) anteriormente indicado sobre el electrodo 12 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se aplicaron 0,15 V durante 10 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia, y después de 5 segundos se midieron los valores de corriente de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol y de la microplaca detectora para medir un blanco con un detector electroquímico.

#### 5) Cálculo de las cantidades de 1,5-anhidroglucitol

Se creó una curva de calibrado a partir de los valores de corriente obtenidos restando los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco de los obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol mediante el procedimiento mencionado anteriormente utilizando muestras para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. Para las 4 muestras de sangre completa humana, se compararon similarmente los valores de corriente obtenidos restando los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco de los obtenidos de la microplaca detectora para medir el 1,5-anhidroglucitol con la curva de calibrado para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa. Los resultados se muestran en Tabla 6. Se utilizaron los valores medios de las 4 mediciones tanto para las muestras para la creación de la curva de calibrado como para las muestras.

#### Ejemplo de Referencia 6

Las mismas muestras de sangre completa tal como se midieron en el Ejemplo 5 se midieron para el 1,5-anhidroglucitol mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo de Referencia 1. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

[Tabla 6]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol (µg/ml)	
	Ejemplo de referencia 6	Ejemplo 5
	Muestra de sangre completa 20	16,7
Muestra de sangre completa 21	29,8	28,0
Muestra de sangre completa 22	28,9	28,6
Muestra de sangre completa 23	31,7	31,2

Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición, y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que no estaba soportado sobre un electrodo, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa (Ejemplo 5) estuvieron en buena consonancia con los medidos mediante un procedimiento de medición conocido en el Ejemplo de Referencia 6 (coeficiente de correlación, 0,9941), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse mediante la presente invención.

#### Ejemplo de Referencia 7

De acuerdo con el procedimiento para evaluar las velocidades de reacción de las enzimas y los mediadores descritos en Denki Kagaku Vol. 63, nº 10, p. 906-913 (1995), se examinaron las reacciones de la piranosa oxidasa derivada del hongo *Basidiomycetes* nº 52 mencionada anteriormente y los mediadores redox enumerados en la Tabla 7 con 1,5-anhidroglucitol.

Se serigrafió, un grosor de 10 µm, una placa de base hecha de tereftalato de polietileno con una tinta de carbono (nombre del producto, pasta de carbono TU15ST: Asahi Chemical Research Laboratory Co. Ltd.) como electrodo de trabajo y una parte conductora y un contraelectrodo y una parte conductora, se serigrafió, un grosor de 10 µm, con una tinta de cloruro de plata-plata (nombre del producto, Electrodag PE-409: Acheson) como electrodo de referencia y una parte conductora, y se enfriaron a 150°C durante 40 minutos. A continuación, se serigrafió, un grosor de 20 µm, una parte, excepto una parte de unión de la parte de electrodo y el dispositivo de medición, con una tinta protectora (nombre del producto, CR18G-KF: Asahi Chemical Research Laboratory Co. Ltd.) y se enfrió a 130°C durante 15 minutos para preparar un electrodo 13 mostrado en la Fig. 3. Se llevó a cabo la medición electroquímica utilizando un detector electroquímico (multipotenciostato de 8 canales equipado con un generador de funciones FG-02 modelo PS-08: Toho Giken).

Se colocaron 10 µl de una solución acuosa que contenía 20 u/ml de piranosa oxidasa y 60 µM de un mediador redox enumerado en la Tabla 7 sobre el electrodo 13 conectado a un detector electroquímico en la posición 1 en la que se



aplicó la muestra, se hizo un barrido de potencial de -0,5 V a +1 V a 1 mV/s utilizando como referencia el electrodo de referencia del electrodo 13, y se midió un valor de corriente de oxidación  $I_d$  por voltametría cíclica. A continuación, se colocaron 10  $\mu$ l de una solución acuosa que contenía 20 u/ml de piranosa oxidasa, un sustrato (500  $\mu$ g/ml de 1,5-anhidroglucitol), y 60  $\mu$ M de un mediador redox enumerado en la Tabla 7 sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se hizo un barrido de potencial de -0,5 V a +1 V a 1 mV/s utilizando como referencia el electrodo de referencia del electrodo 13, y se midió un valor de corriente catalítica  $I_k$  por voltametría cíclica. Se compararon las velocidades de reacción de los mediadores redox con la enzima mediante el valor  $I_k/I_d$  obtenido dividiendo el valor de corriente catalítica  $I_k$  por el valor de corriente de oxidación  $I_d$  con un mediador redox en solitario. En la Tabla 7 se muestran los resultados de  $I_k/I_d$  para cada mediador redox.

[Tabla 7]

Tabla 7

Mediador redox	$I_k/I_d$
Ferrocianuro de potasio	1,7
[Os(III)(bipiridil) <sub>2</sub> (imidazoil)Cl]Cl <sub>2</sub>	14,0
2,6-dimetil-p-benzoquinona	6,9
2-metil-1,4-naftoquinona	2,3
2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona	3,3
N,N-dimetilaminometil ferroceno	5,1
Ferroceno metanol	3,4
Acetato de tionina	10,0
Azul de metileno	5,3
Azul de toluidina O	4,1
Azur I	16,4
Azur C	5,8
Azul de Meldola	1,8
Metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazío	2,8
Sal sódica dihidrato de 2-diclorofenol-indofenol	2,8
4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina	3,3
Clorhidrato de N-metil-N-(3-metoxifenil)-1,4-fenilendiamina	2,6
Clorhidrato de N-metil-N-fenil-1,4-fenilendiamina	2,5
Nitro-TB*	1,9
2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) diamonio	1,5
Ácido 2-hidrazono-2,3-dihidro-3-metil-6-benzotiazol sulfónico	1,2
Bis-{4-[N-3'-sulfo-n-propil-N-n-butil]amino-2, 6-dimetilfenil}metano	1,5
Bis-{4-[N-3'-sulfo-n-propil-N-etil]amino-2, 6-dimetilfenil}metano	1,0
P-aminofenol	3,5
Sal sódica de N-(3-sulfopropil)-3,3',5,5'-tetrametilbencidina	1,5

\* Nitro-TB: 3,3'-[3,3'-dimetoxi-(1-1'-bifenil)-4,4'-dil]-bis[cloruro de 2-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio]

La Tabla 7 muestra que una piranosa oxidasa reacciona rápidamente con diversos mediadores redox tales como complejos de osmio, compuestos de ferroceno, compuestos de quinona, compuestos de fenotiacina, compuestos de fenoxacina, compuestos de fenacina, compuestos de difenilamina, compuestos de indofenol, y compuestos fenólicos. Estos resultados sugieren que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante procedimientos que utilizan estos mediadores redox y una piranosa oxidasa, por ejemplo, los procedimientos de los Ejemplos 1 a 3.

### Ejemplo de Referencia 8

Se examinaron las reacciones de la 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa anteriormente mencionada y los mediadores redox enumerados en la Tabla 8 de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 7. Se preparó un electrodo 13 de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 7.

Se colocaron 10  $\mu$ l de una solución acuosa que contenía 20 u/ml de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001) y 60  $\mu$ M de un mediador redox enumerado en la Tabla 8, sobre el electrodo 13 conectado a un detector electroquímico en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se hizo un barrido de potencial de -0,5 V a +1 V a 1 mV/s utilizando como referencia el electrodo de referencia del electrodo 13, y se midió un valor de corriente de oxidación  $I_d$  por voltametría cíclica. A continuación, se colocaron 10  $\mu$ l de una solución acuosa que contenía 20 u/ml de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa, un sustrato (500  $\mu$ g/ml de 1,5-anhidroglucitol), y 60  $\mu$ M de un mediador redox enumerado en la Tabla 8, sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se hizo un barrido de potencial de -0,5 V a +1 V a 1 mV/s utilizando como referencia el electrodo de referencia del electrodo 13, y se midió un valor de corriente catalítica  $I_k$  por voltametría cíclica. Se compararon las

velocidades de reacciones de mediadores redox con la enzima por el valor  $I_k/I_d$  obtenido dividiendo el valor de corriente catalítica  $I_k$  entre el valor de corriente de oxidación  $I_d$  cuando un mediador redox en solitario estaba incluido sin sustrato. En la Tabla 8 se muestran los resultados de  $I_k/I_d$  obtenidos para cada mediador redox.

5

[Tabla 8

Mediador redox	$I_k/I_d$
Ferrocianuro de potasio	3,4
[Os(III)(bipiridil) <sub>2</sub> (imidazoil)Cl]Cl <sub>2</sub>	18,0
2,6-dimetil-p-benzoquinona	8,9
2-metil-1,4-naftoquinona	64,4
2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona	11,2
N,N-dimetilaminometil ferroceno	5,0
Ferroceno metanol	4,9
Acetato de tionina	58,8
Azul de metileno	10,9
Azul de toluidina O	21,1
Azur I	18,3
Azur C	25,4
Nuevo azul de metileno	4,3
Metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazío	1,6
Sal sódica dihidrato de 2-diclorofenol-indofenol	10,3
4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina	3,6
Clorhidrato de N-metil-N-(3-metoxifenil)-1,4-fenilendiamina	1,4
Clorhidrato de N-metil-N-fenil-1,4-fenilendiamina	2,2
Bis-[4-[N-3'-sulfo-n-propil-N-n-butil]amino-2, 6-dimetilfenil]metano	1,3
P-aminofenol	3,2
Sal sódica de N-(3-sulfopropil)-3,3',5,5'-tetrametilbencidina	2,2
Verde malaquita	2,1

La Tabla 8 muestra que la 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa reacciona rápidamente con diversos mediadores redox tales como complejos de osmio, compuestos de ferroceno, compuestos de quinona, compuestos de fenotiaccina, compuestos de fenoxacina, compuestos de fenacina, compuestos de difenilamina, compuestos de indofenol, y compuestos fenólicos. Estos resultados sugieren que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante procedimientos que utilizan estos mediadores redox y 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa, por ejemplo, el procedimiento del Ejemplo 4.

### 15 Ejemplo de Referencia 9

#### 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Para preparar un reactivo de conversión de la glucosa, se añadieron, a tampón MES 50,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 14,8 mM, KC1 99,2 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 48 mM, ATP 2 mM, 20 u/ml de piruvato quinasa (PK), 16 u/ml de glucoquinasa, 10 u/ml de ácido ascórbico oxidasa, cloruro sódico 200 mM, EDTA.2Na 0,2 mM, y 1,2 g/l de BSA, como composición, después de ajustar el pH a 7,0 utilizando hidróxido sódico acuoso 1 N.

#### 25 2) Soluciones reactivas para electrodo

Para preparar las soluciones reactivas para electrodo (a), (b), y (c), se disolvieron, en tampón MES 100 mM (pH 7,0), (a) ferrocenil PEG 0,54 mM (Dojindo Laboratories); (b) 6,25 u/ml de peroxidasa de rábano (Toyobo Co., Ltd.); o (c) 50 u/ml de piranosa oxidasa (derivada del hongo *Basidiomycetes* n° 52), en esta composición.

#### 30 3) Microplaca detectora

En primer lugar, se aplicaron 10 µl de carboximetilcelulosa acuosa al 0,5% al sitio de electrodo de trabajo del electrodo 13 preparado en el Ejemplo de Referencia 7 y se secó a 50°C durante 10 minutos, para hacer la superficie del electrodo hidrófila. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 3 µl de la solución reactiva para electrodo (a) obtenida en el punto 2) anteriormente indicado, sobre la parte hidrófila y se secó, se aplicaron, gota a gota, 3 µl de la solución reactiva para electrodo (b), sobre la misma y se secó, y a continuación, se aplicaron adicionalmente, gota a gota, 3 µl de la solución reactiva para electrodo (c) y se secó para preparar una microplaca detectora.

#### 40 4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20 µl de cada una de 3

muestras obtenidas añadiendo a solución salina fisiológica preparaciones de 1,5-anhidroglucitol con concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 0, 10, y 50 µg/ml) y 10 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 15 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 de la microplaca detectora del punto 3) en la posición 1 en la que se aplicó la muestra y se dejaron reaccionar durante 5 minutos, a continuación se aplicaron 0 V utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), y se midieron los valores de corriente después de 5 segundos con un detector electroquímico. Se creó una curva de calibrado a partir de los valores de corriente y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol como se muestra en la Fig. 4. En la figura, 1,5AG indica 1,5-anhidroglucitol.

La curva de calibrado obtenida muestra una curva de calibrado con una buena dependencia de la concentración. Estos resultados sugieren que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante procedimientos que utilizan ferrocenil PEG y piranosa oxidasa, por ejemplo, los procedimientos de los Ejemplos 1 a 3.

### Ejemplo de Referencia 10

#### 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa del punto 1) del Ejemplo 1.

#### 2) Soluciones reactivas para electrodo

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, mediadores redox con las concentraciones de la Tabla 9 y 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001) con las concentraciones de la Tabla 9, en cada composición.

#### 3) Microplaca detectora

Para preparar una microplaca detectora, se aplicaron 2 µl de una solución reactiva para electrodo obtenida en el punto 2) anteriormente indicado sobre electrodo de trabajo del electrodo 13 preparado en el Ejemplo de Referencia 7 y se secó a 50°C durante 5 minutos.

#### 4) Creación de curvas de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 10 µl de cada una de 5 muestras obtenidas añadiendo a una solución de citrato sódico al 0,38% preparaciones de 1,5-anhidroglucitol con concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 0, 2,5, 11,9, 24,2, y 49,3 µg/ml) y 5 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se aplicó cada uno de los potenciales enumerados en la Tabla 9 utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), se midieron los valores de corriente después de 5 segundos con un detector electroquímico y se creó una curva de calibrado a partir de los valores de corriente y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. Estas curvas de calibrado se muestra en las Figs. 5 a 13.

[Tabla 9]

Tabla 9

Nº de ensayo	Mediador Redox	Concentración del mediador en la solución reactiva para electrodo (µM)	Concentración de AGDH* en la solución reactiva para electrodo (u/ml)	Potencial
Nº 1	2,6-dimetil-p-benzoquinona	150	50	0,5
Nº 2	2-metil-1,4-naftoquinona	150	50	0,1
Nº 3	Cloruro de tionina	75	50	-0,1
Nº 4	Azul de metileno	200	100	-0,2
Nº 5	Azul de toluidina O	12,5	50	-0,1
Nº 6	Azur C	75	50	0
Nº 7	4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina	75	50	0
Nº 8	Sal sódica dihidrato de 2-diclorofenol-indofenol	75	50	0,1
Nº 9	Metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazío	150	50	0

\* AGDH, 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa

- 5 Todas las curvas de calibrado obtenidas son curvas de calibrado uniformes dependientes de la concentración. Estos resultados sugieren que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente por amperometría utilizando estos mediadores y 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa.

#### Ejemplo de Referencia 11

10

- 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

15

- 2) Solución reactiva para electrodo

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, mediadores redox con las concentraciones enumeradas en la Tabla 10 y 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa con las concentraciones enumeradas en la Tabla 10 (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en cada composición.

20

- 3) Microplaca detectora

25

Para preparar una microplaca detectora, se aplicaron 2 µl de una solución reactiva para electrodo del punto 2) anteriormente indicado al electrodo de trabajo del electrodo 13 preparado en el Ejemplo de Referencia 7 y se secó a 50°C durante 5 minutos.

- 4) Creación de la curva de calibrado

30

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 10 µl de cada una de 6 muestras obtenidas añadiendo a una solución de citrato sódico al 0,38% preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 0, 2,5, 5,0, 11,9, 24,2, y 49,3 µg/ml) y 5 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se aplicó cada uno de los primeros potenciales de la Tabla 10 durante 10 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), y a continuación se aplicó el segundo potencial durante 110 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata). Se midieron los niveles de Coulomb durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación del segundo potencial con un detector electroquímico para coulometría, y se creó una curva de calibrado a partir de los niveles de Coulomb y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. Las curvas de calibrado se muestran en las Figs. 14 a 27.

40

[Tabla 10]

Tabla 10

Nº de ensayo	Mediador Redox	Concentración del mediador en la solución reactiva para electrodo (µM)	Concentración de AGDH* en la solución reactiva para electrodo (µM)	Primer potencial	Segundo potencial
Nº1	[Os(III)(bipiridil) <sub>2</sub> (imidazol)C][Cl <sub>2</sub> ]	300	25	0,15	0,25
Nº2	2,6-dimetil-p-benzoquinona	150	50	0,5	0,6
Nº3	2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona	150	50	0,5	0,6
Nº4	2-metil-1,4-naftoquinona	150	50	0,1	0,2
Nº5	Acetato de tionina	5	50	-0,1	0
Nº6	Cloruro de tionina	75	50	-0,1	0
Nº7	Azul de metileno	200	100	-0,2	-0,1
Nº8	Azul de toluidina O	12,5	50	-0,1	0
Nº9	Azur I	120	40	0,2	0,3
Nº10	Azur C	75	50	0	0,1
Nº11	Azul de Meldola	150	50	0	0,1
Nº12	4,4'-bis(dimetilamino) difenilamina	75	50	0	0,1
Nº13	Sal sódica dihidrato de 2-diclorofenol-indofenol	75	50	0,1	0,2
Nº14	Metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazío	150	50	0	0,1

\* AGDH, 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa

Todas las curvas de calibrado obtenidas son curvas de calibrado uniformes dependientes de la concentración. Estos resultados sugieren que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente por coulometría utilizando estos mediadores y 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa.

## 5 Ejemplo 6

### 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

### 2) Solución reactiva para electrodo

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, acetato de tionina 120  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich Japón K.K.) y 40 u/ml de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en esta composición.

### 3) Microplaca detectora

Para preparar la microplaca detectora, se aplicaron 2  $\mu\text{l}$  de la solución reactiva para electrodo obtenida en el punto 2) anteriormente indicado al electrodo de trabajo del electrodo 13 preparado en el Ejemplo de Referencia 7 y se secó a 50°C durante 5 minutos.

### 4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de 7 muestras obtenidas añadiendo a una solución de citrato sódico al 0,38% preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de las células sanguíneas fueron 0, 2,5, 5,0, 11,9, 24,2, 49,3, y 98,8  $\mu\text{g/ml}$ ) y 5  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron -0,1 V durante 10 segundos, seguido de 0 V durante 110 segundos, utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata). Se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación de 0 V, y se creó una curva de calibrado a partir de los niveles de Coulomb y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. En al Fig. 28 se muestra una curva de calibrado que presenta una buena linealidad.

### 5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras de sangre completa humana de 7 sujetos para medir 1,5-anhidroglucitol y 5  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron -0,1 V durante 10 segundos, seguido de 0 V durante 110 segundos, utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata). Se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación de 0 V y se compararon con la curva de calibrado para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 7 muestras de sangre completa. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los resultados son los valores medios de 4 mediciones.

## Ejemplo de Referencia 12

Para la comparación, se midieron las mismas muestras de sangre completa que las medidas en el punto 5) del Ejemplo 6 para 1,5-anhidroglucitol mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

[Tabla 11]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Ejemplo de referencia 12	Ejemplo 6
Muestra de sangre completa 24	8,5	10,1
Muestra de sangre completa 25	15,70	15,2
Muestra de sangre completa 26	12,9	12,1
Muestra de sangre completa 27	22,7	19,0
Muestra de sangre completa 28	25,6	24,5
Muestra de sangre completa 29	26,8	21,5
Muestra de sangre completa 30	28,5	26,3

5 Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que contenía acetato de tionina, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa (Ejemplo 6) estuvieron en buena consonancia con los medidos en el Ejemplo de Referencia 12 mediante un procedimiento de medición conocido (coeficiente de correlación, 0,9711), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante la presente invención.

### Ejemplo 7

10 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

15 2) Soluciones reactivas para electrodo

(i) Para medir el 1,5-anhidroglucitol

20 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, azul de metileno 50  $\mu\text{M}$  (Yoneyama Yakuhin Kogyo Co., Ltd.) y 100 u/ml de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en esta composición.

(ii) Para medir el blanco

25 Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, azul de metileno 50  $\mu\text{M}$  (Yoneyama Yakuhin Kogyo Co., Ltd.), en esta composición.

3) Microplacas de detección

30 Se aplicaron 2  $\mu\text{l}$  de la solución reactiva para electrodo para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco obtenida en el punto 2) anteriormente indicado, al electrodo de trabajo de los dos electrodos 13 mostrados en la Fig. 3 preparados en el Ejemplo de Referencia 7 y se secaron a 50°C durante 5 minutos para preparar una microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco.

35 4) Creación de la curva de calibrado

40 Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de cada una de 6 muestras obtenidas añadiendo a suero de oveja (Nippon Bio Test Lab.), que se sabe que prácticamente no contiene 1,5-anhidroglucitol, preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de células sanguíneas fueron 0,6, 2,8, 5,0, 10,0, 24,7, y 50,2  $\mu\text{g/ml}$ ) y 10  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron -0,2 V durante 10 segundos, seguido de -0,1 V durante 110 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata) de cada microplaca detectora. Se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación de -0,1 V. Se creó una curva de calibrado a partir de los niveles de Coulomb obtenidos restando los de la microplaca detectora para medir un blanco de los de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. En al Fig. 29 se muestra una curva de calibrado que presenta una buena linealidad.

50 5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

55 Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras de sangre completa de 7 sujetos del Ejemplo 6 y 10  $\mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10  $\mu\text{l}$  cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron -0,2 V durante 10 segundos, seguido de -0,1 V durante 110 segundos, utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata) de cada microplaca detectora. Se midieron los niveles de Coulomb durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación de -0,1 V con un detector electroquímico (multipotenciostato de 8 canales modelo PS-08 equipado con GPIB y RS232C: Toho Giken), y se compararon los niveles de Coulomb obtenidos restando los de la microplaca detectora para medir un blanco de los de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol con la curva de calibrado para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 7 muestras de sangre completa. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Los resultados son los valores medios de 4 mediciones.

65

**Ejemplo de Referencia 12**

5 Puesto que las muestras utilizadas en el Ejemplo 7 fueron las mismas muestras de sangre completa que en el Ejemplo 6, en la Tabla 12 se muestran los resultados del Ejemplo 6 como Ejemplo de Referencia 12.

[Tabla 12]

	Tabla 12	
	Concentración de 1,5-anhidroglucitol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Ejemplo de Referencia 12	Ejemplo 7
Muestra de sangre completa 24	8,5	9,6
Muestra de sangre completa 25	15,7	14,5
Muestra de sangre completa 26	12,9	12,9
Muestra de sangre completa 27	22,7	23,7
Muestra de sangre completa 28	25,6	20,9
Muestra de sangre completa 29	26,8	23,9
Muestra de sangre completa 30	28,5	24,1

10 Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una substancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que contenía azul de metileno, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa (Ejemplo 7) estuvieron en buena consonancia con los medidos en el Ejemplo de Referencia 12 mediante un  
15 procedimiento de medición conocido (coeficiente de correlación, 0,9658), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante la presente invención.

**Ejemplo 8**

20 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

25 2) Solución reactiva para electrodo

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, acetato de tionina  $120 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich Japón K.K.) y  $40 \text{ u/ml}$  de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en esta composición.

30 3) Microplaca detectora

Se aplicaron  $2 \mu\text{l}$  de la solución reactiva para electrodo obtenida en el punto 2) anteriormente indicado, al electrodo al electrodo de trabajo del electrodo 13 preparado en el Ejemplo de Referencia 7 y se secó a  $50^\circ\text{C}$  durante 5 minutos para preparar la microplaca detectora.

35 4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf,  $10 \mu\text{l}$  de cada una de 7  
40 muestras obtenidas añadiendo a suero de oveja (Nippon Bio Test Lab.) preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de células sanguíneas fueron  $0,6, 2,8, 5,0, 10,0, 24,7, 50,2$  y  $103,9 \mu\text{g/ml}$ ) y  $5 \mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota,  $10 \mu\text{l}$  cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron  $-0,1 \text{ V}$  utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), se midieron los valores de corriente después de 5 segundos con un detector electroquímico, y se creó una curva de calibrado a partir de los valores de corriente y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. En el Fig. 30 se muestra una curva de calibrado que presenta una buena linealidad.

50 5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf,  $10 \mu\text{l}$  de cada una de las muestras de sangre completa de los 7 sujetos del Ejemplo 6 y  $5 \mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota,  $10 \mu\text{l}$  cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, aplicaron  $-0,1 \text{ V}$  utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), se midieron los valores de corriente después de 5 segundos con un detector electroquímico, y se compararon los valores de corriente obtenidos con la curva de calibrado para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 7



muestras de sangre completa. Los resultados se muestran en la Tabla 13. Los resultados son los valores medios de 4 mediciones.

### Ejemplo de Referencia 12

Puesto que las muestras utilizadas en el Ejemplo 8 fueron las mismas muestras de sangre completa que en el Ejemplo 6, en la Tabla 13 se muestran los resultados de medición del Ejemplo 6 como Ejemplo de Referencia 12.

[Tabla 13]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Ejemplo de referencia 12	Ejemplo 8
Muestra de sangre completa 24	8,5	10,0
Muestra de sangre completa 25	15,7	14,7
Muestra de sangre completa 26	12,9	11,7
Muestra de sangre completa 27	22,7	19,5
Muestra de sangre completa 28	25,6	25,4
Muestra de sangre completa 29	26,8	21,6
Muestra de sangre completa 30	28,5	27,0

Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que contenía acetato de tionina, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa (Ejemplo 8) estuvieron en buena consonancia con los medidos en el Ejemplo de Referencia 12 mediante un procedimiento de medición conocido (coeficiente de correlación, 0,9700), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante la presente invención.

### Ejemplo 9

#### 1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

#### 2) Solución reactiva para electrodo

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, acetato de tionina  $120 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich Japón K.K.) y  $40 \text{ u/ml}$  de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en esta composición.

#### 3) Microplaca detectora

Para preparar una microplaca detectora, se aplicaron  $2 \mu\text{l}$  de la solución reactiva para electrodo obtenida en el punto 2) anteriormente indicado, al electrodo de trabajo del electrodo 13 que se preparó en el Ejemplo de Referencia 7 y se trató de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 9 y se secó a  $50^\circ\text{C}$  durante 5 minutos.

#### 4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf,  $10 \mu\text{l}$  de cada una de 4 muestras obtenidas añadiendo a una solución de citrato sódico al 0,38% preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de células sanguíneas fueron 0, 5,0, 11,9 y  $24,2 \mu\text{g/ml}$ ) y  $5 \mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota,  $10 \mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se aplicaron 0 V durante 110 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación, y se creó una curva de calibrado a partir de los niveles de Coulomb de la microplaca detectora y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. En el Fig. 31 se muestra la curva de calibrado que presenta una buena linealidad.

#### 5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf,  $10 \mu\text{l}$  de cada una de las muestras de sangre completa humana de 6 sujetos para medir 1,5-anhidroglucitol y  $5 \mu\text{l}$  del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota,  $10 \mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo

13 en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, se aplicaron 0 V durante 110 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata), se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación, y se compararon los niveles de Coulomb obtenidos con la curva de calibrado para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 6 muestras de sangre completa. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Los resultados son los valores medios de 4 mediciones.

### Ejemplo de Referencia 13

Para la comparación, se midieron las mismas muestras de sangre completa que las medidas en el punto 5) del Ejemplo 9 para 1,5-anhidroglucitol mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

[Tabla 14]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol (µg/ml)	
	Ejemplo de referencia 13	Ejemplo 9
Muestra de sangre completa 31	8,9	10,6
Muestra de sangre completa 32	16,2	15,2
Muestra de sangre completa 33	14,1	14,0
Muestra de sangre completa 34	23,3	21,3
Muestra de sangre completa 35	25,9	23,1
Muestra de sangre completa 36	32,1	24,7

Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que contenía acetato de tionina, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa (Ejemplo 9) estuvieron en buena consonancia con los valores medidos en el Ejemplo de Referencia 13 mediante un procedimiento de medición conocido (coeficiente de correlación, 0,9855), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante la presente invención.

### Ejemplo 10

1) Reactivo de conversión de la glucosa

Se utilizó el reactivo de conversión de la glucosa obtenido en el punto 1) del Ejemplo 1.

2) Soluciones reactivas para electrodo

(i) Para medir el 1,5-anhidroglucitol

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvieron, en agua purificada, azul de metileno 100 µM (Tokyo Kasei Kogyo) y 50 u/ml de 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa (derivada de *Pseudomonas sp.* NK-85001), en esta composición.

(ii) Para medir el blanco

Para preparar una solución reactiva para electrodo, se disolvió, en agua purificada, azul de metileno 100 µM (Tokyo Kasei Kogyo), en esta composición.

3) Microplacas detectoras

Se prepararon los dos electrodos 13 preparados en el Ejemplo de Referencia 7 y mostrados en la Fig. 3, se aplicaron 2 µl de la solución reactiva para electrodo para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco obtenida en el punto 2) anteriormente indicado al electrodo de trabajo del electrodo y se secó a 50°C durante 5 minutos para preparar una microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco.

4) Creación de la curva de calibrado

Para crear una curva de calibrado del 1,5-anhidroglucitol, se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20 µl de cada una de 4 muestras obtenidas añadiendo a suero de oveja (Nippon Bio Test Lab.) preparaciones de 1,5-anhidroglucitol a concentraciones conocidas (las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol en las muestras obtenidas mediante el procedimiento del Ejemplo de Referencia 1 excepto el procedimiento de separación de células sanguíneas fueron 0,6, 10,0, 50,2, y 103,9 µg/ml) y 10 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo

13 de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron -0,1 V durante 110 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata) de la microplaca detectora, y se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación de -0,1 V. Se creó una curva de calibrado a partir de las diferencias entre los niveles de Coulomb obtenidos de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitoland y los obtenidos de la microplaca detectora para medir un blanco, y las concentraciones de 1,5-anhidroglucitol. En el Fig. 32 se muestra la curva de calibrado que presenta una buena linealidad

#### 5) Procedimiento de medición del 1,5-anhidroglucitol

Se mezclaron, en tubos Eppendorf, 20 µl de cada una de las muestras de sangre completa de los 6 sujetos del Ejemplo 9 y 10 µl del reactivo de conversión de la glucosa y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron, gota a gota, 10 µl de cada una de las mezclas de reacción sobre el electrodo 13 de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol o para medir un blanco en la posición 1 en la que se aplicó la muestra, y se aplicaron -0,1 V durante 110 segundos utilizando como referencia el electrodo de referencia (cloruro de plata-plata) de la microplaca detectora, se midieron los niveles de Coulomb con un detector electroquímico durante 100 segundos desde el inicio de la aplicación de -0,1 V, y se compararon los niveles de Coulomb obtenidos restando los de la microplaca detectora para medir un blanco de los de la microplaca detectora para medir 1,5-anhidroglucitol con la curva de calibrado para obtener las cantidades de 1,5-anhidroglucitol en las 6 muestras de sangre completa. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Los resultados son los valores medios de 4 mediciones.

#### Ejemplo de Referencia 13

Puesto que las muestras utilizadas en el Ejemplo 10 fueron las mismas muestras de sangre completa que las utilizadas en el Ejemplo 9, en la Tabla 15 se muestran los resultados de las mediciones del Ejemplo 9 como Ejemplo de Referencia 13.

[Tabla 15]

	Concentración de 1,5-anhidroglucitol (µg/ml)	
	Ejemplo de referencia 13	Ejemplo 10
Muestra de sangre completa 31	8,9	11,0
Muestra de sangre completa 32	16,2	17,2
Muestra de sangre completa 33	14,1	15,0
Muestra de sangre completa 34	23,3	24,0
Muestra de sangre completa 35	25,9	24,5
Muestra de sangre completa 36	32,1	31,4

Cuando se dejó actuar el reactivo de conversión de la glucosa sobre la sangre completa para convertir la glucosa en una sustancia que no interfiere con la medición y se hizo reaccionar con el reactivo para electrodo que contenía azul de metileno, sin separar las células sanguíneas, los valores medidos de 1,5-anhidroglucitol en sangre completa (Ejemplo 10) tal como se midieron mediante un procedimiento diferencial estuvieron en buena consonancia con los medidos en el Ejemplo de Referencia 13 mediante un procedimiento de medición conocido (coeficiente de correlación, 0,9964), lo que sugiere que el 1,5-anhidroglucitol en sangre completa puede medirse electroquímicamente mediante la presente invención.

#### Aplicabilidad industrial

Puede medirse el 1,5-anhidroglucitol en una cantidad traza de sangre completa mediante el procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol de la presente invención que mide electroquímicamente el 1,5-anhidroglucitol sin utilizar una centrifuga o similar. Por lo tanto, el procedimiento de medición de la presente invención puede aplicarse a la medición rápida de 1,5-anhidroglucitol a pie de cama o en un centro de atención al paciente y a la medición por los propios pacientes en casa.

#### Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1]

La Fig. 1 es un diagrama simplificado que muestra un electrodo 11 utilizado en la presente invención;

[FIG. 2]

La Fig. 2 es un diagrama simplificado que muestra un electrodo 12 utilizado en la presente invención;

[FIG. 3]

La Fig. 3 es un diagrama simplificado que muestra un electrodo 13 utilizado en la presente invención;

## ES 2 382 397 T3

[FIG. 4]

La Fig. 4 es una curva de calibrado creada en el Ejemplo de Referencia 9;

5 [FIG. 5]

La Fig. 5 es una curva de calibrado del Ensayo N° 1 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 6]

La Fig. 6 es una curva de calibrado del Ensayo N° 2 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

10

[FIG. 7]

La Fig. 7 es una curva de calibrado del Ensayo N° 3 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 8]

15 La Fig. 8 es una curva de calibrado del Ensayo N° 4 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 9]

La Fig. 9 es una curva de calibrado del Ensayo N° 5 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

20

[FIG. 10]

La Fig. 10 es una curva de calibrado del Ensayo N° 6 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 11]

25 La Fig. 11 es una curva de calibrado del Ensayo N° 7 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 12]

La Fig. 12 es una curva de calibrado del Ensayo N° 8 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 13]

30 La Fig. 13 es una curva de calibrado del Ensayo N° 9 de la Tabla 9 del Ejemplo de Referencia 10;

[FIG. 14]

La Fig. 14 es una curva de calibrado del Ensayo N° 1 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

35

[FIG. 15]

La Fig. 15 es una curva de calibrado del Ensayo N° 2 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 16]

La Fig. 16 es una curva de calibrado del Ensayo N° 3 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

40

[FIG. 17]

La Fig. 17 es una curva de calibrado del Ensayo N° 4 de la Tabla del 10 Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 18]

45 La Fig. 18 es una curva de calibrado del Ensayo N° 5 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 19]

La Fig. 19 es una curva de calibrado del Ensayo N° 6 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

50

[FIG. 20]

La Fig. 20 es una curva de calibrado del Ensayo N° 7 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 21]

La Fig. 21 es una curva de calibrado del Ensayo N° 8 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

55

[FIG. 22]

La Fig. 22 es una curva de calibrado del Ensayo N° 9 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 23]

60 La Fig. 23 es una curva de calibrado del Ensayo N° 10 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 24]

La Fig. 24 es una curva de calibrado del Ensayo N° 11 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

65

[FIG. 25]

La Fig. 25 es una curva de calibrado del Ensayo N° 12 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 26]

La Fig. 26 es una curva de calibrado del Ensayo N° 13 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

5 [FIG. 27]

La Fig. 27 es una curva de calibrado del Ensayo N° 14 de la Tabla 10 del Ejemplo de Referencia 11;

[FIG. 28]

La Fig. 28 es una curva de calibrado creada en el Ejemplo 6;

10

[FIG. 29]

La Fig. 29 es una curva de calibrado creada en el Ejemplo 7;

[FIG. 30]

15 La Fig. 30 es una curva de calibrado creada en el Ejemplo 8;

[FIG. 31]

La Fig. 31 es una curva de calibrado creada en el Ejemplo 9; y

20

[FIG. 32]

La Fig. 32 es una curva de calibrado creada en el Ejemplo 10.

**Descripción de los números de referencia**

25

1. Posición en la que se aplica la muestra

2. Soporte

3. Electrodo de trabajo

30

4. Contraelectrodo

5. Material protector

35

6. Electrodo de referencia (tinta de carbono)

6a. Electrodo de referencia (tinta de cloruro de plata-plata)

11. Electrodo

40

12. Electrodo

13. Electrodo

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir electroquímicamente 1,5-anhidroglucitol en una muestra de sangre completa, que comprende las etapas de:
  - 5 eliminación o conversión de la glucosa y/o un derivado de la misma en la muestra de sangre completa que interfiere con la medición, sin separar las células sanguíneas en la muestra de sangre completa, permitir que actúe una enzima para medir 1,5-anhidroglucitol sobre el 1,5-anhidroglucitol de la muestra de sangre completa, sin separar las células sanguíneas; y
  - 10 medición electroquímica del 1,5-anhidroglucitol.
2. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 1, en el que la enzima para medir 1,5-anhidroglucitol es una oxidorreductasa.
3. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 2, en el que la oxidorreductasa es piranosa oxidasa, L-sorbosa oxidasa, o 1,5-anhidroglucitol deshidrogenasa.
4. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 3, en el que la oxidorreductasa se deriva de los géneros *Pseudomonas* o *Agrobacterium*.
- 20 5. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente en presencia de un mediador redox.
6. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 5, en el que el mediador redox es una complejo de osmio, un compuesto de quinona, un compuesto de ferroceno, un compuesto de fenotiacina, un compuesto de fenoxacina, un compuesto de fenacina, un compuesto de indofenol, un compuesto de difenilamina, o un compuesto fenólico.
- 25 7. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la glucosa y/o un derivado de la misma se convierte o se elimina de la muestra de sangre completa a medida que utiliza una enzima, sin separar las células sanguíneas.
- 30 8. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente en presencia de un estabilizador.
- 35 9. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 8, en el que el estabilizador es ácido 2-sulfobenzoico o ácido 3-sulfobenzoico.
10. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente por amperometría, coulometría, o voltametría cíclica.
- 40 11. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente utilizando un electrodo que tiene un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidorreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol y un mediador redox, y un contraelectrodo.
- 45 12. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 11, en el que el 1,5-anhidroglucitol se mide electroquímicamente utilizando un electrodo diferencial.
- 50 13. El procedimiento para medir 1,5-anhidroglucitol según la reivindicación 12, en el que el electrodo diferencial es un electrodo que tiene un electrodo de trabajo para medir 1,5-anhidroglucitol que contiene una oxidorreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol y un mediador redox, un electrodo de trabajo para medir un blanco que contiene un mediador redox pero que no contiene una oxidorreductasa para medir 1,5-anhidroglucitol, y un contraelectrodo.

FIG.1

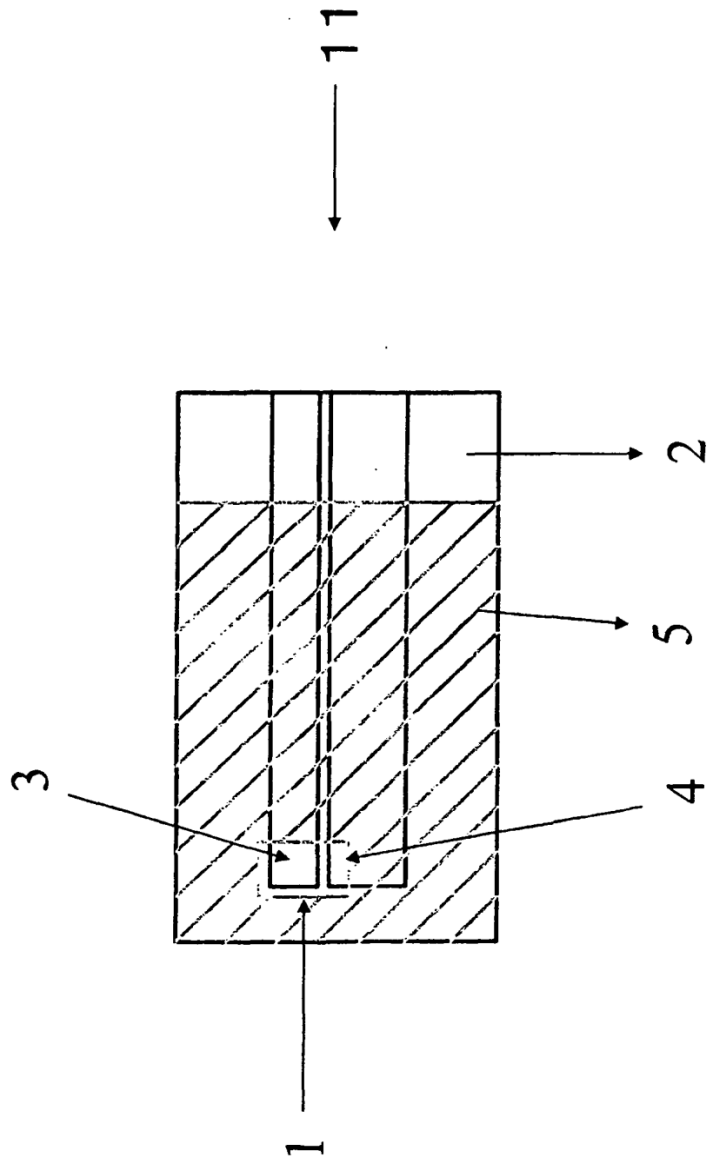


FIG.2

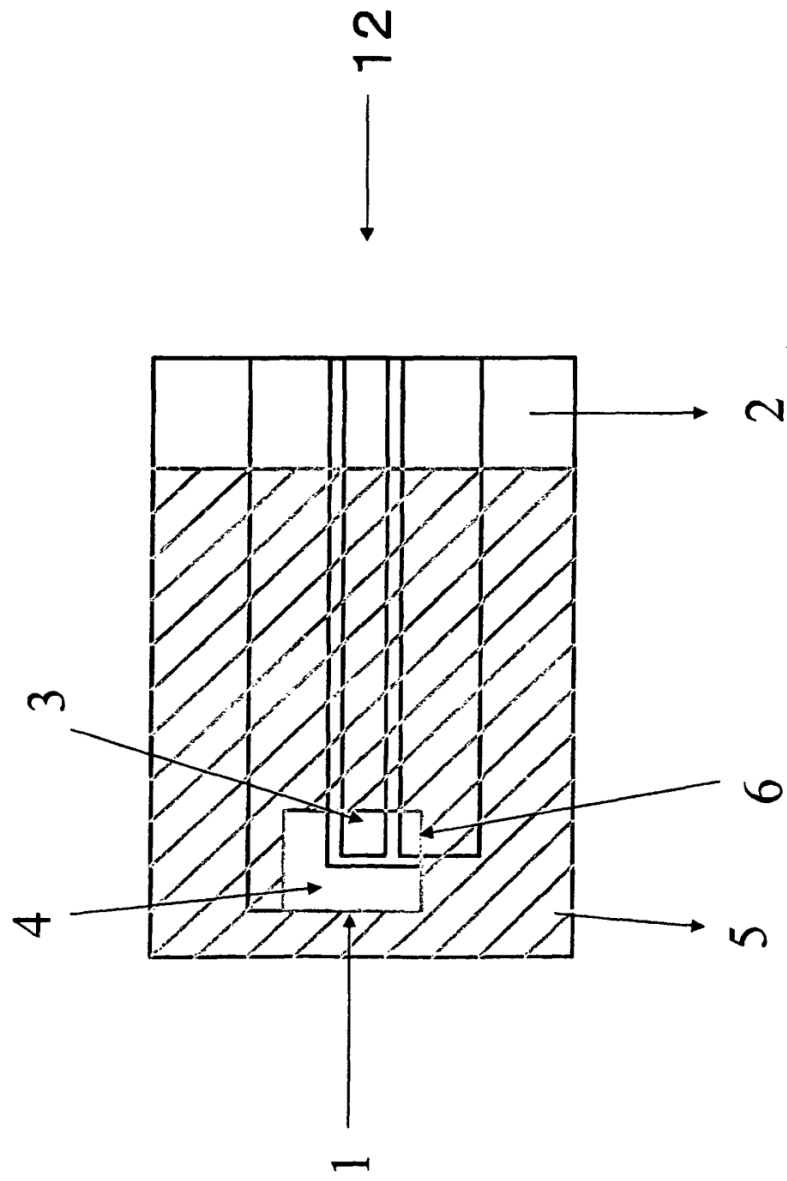




FIG.3

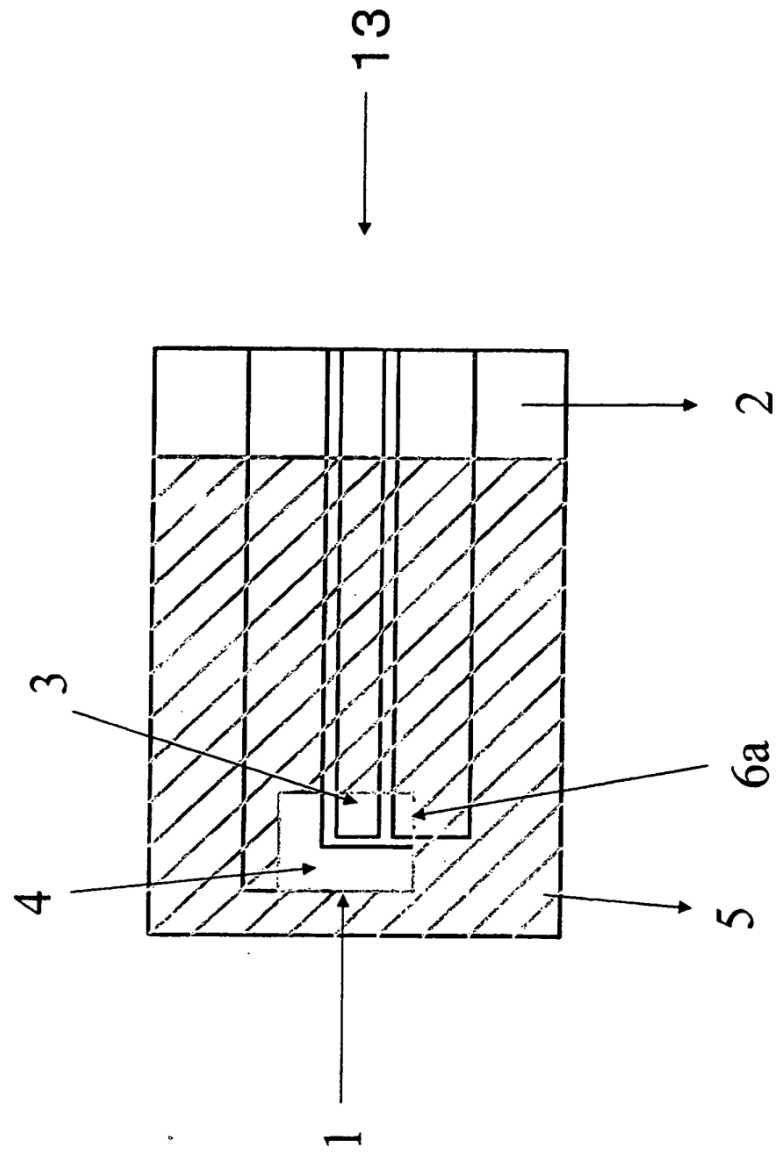


FIG.4

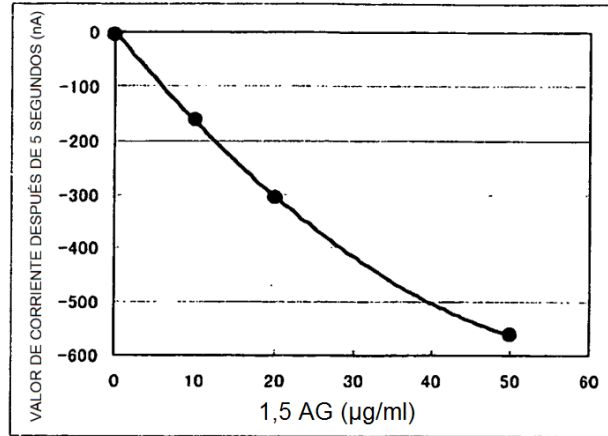


FIG.5

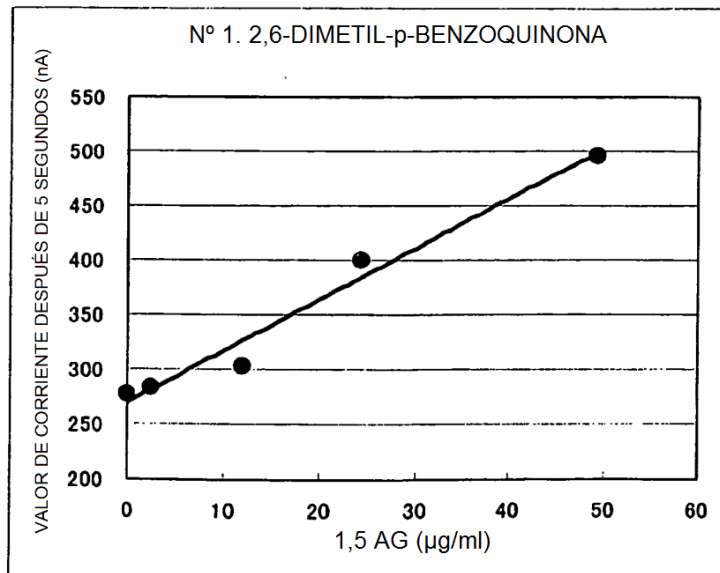


FIG.6

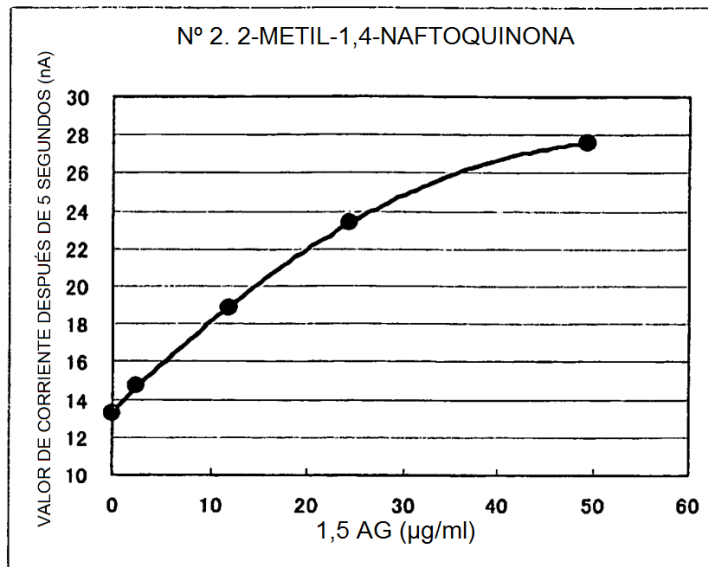


FIG.7

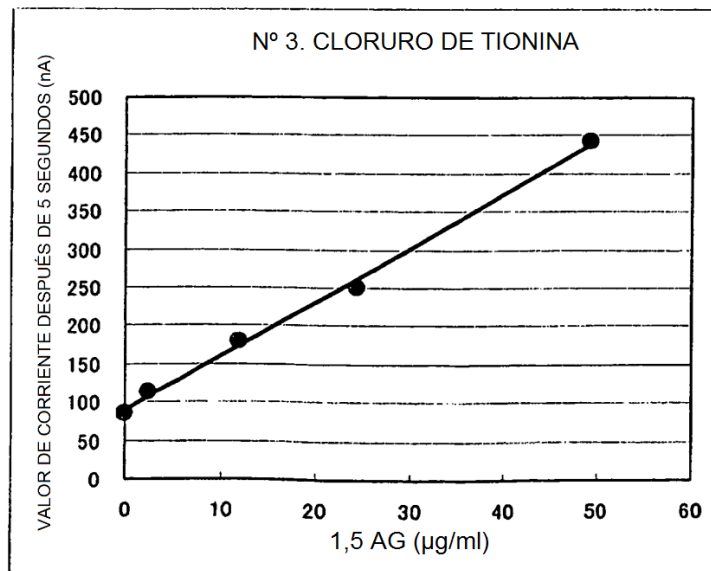


FIG.8

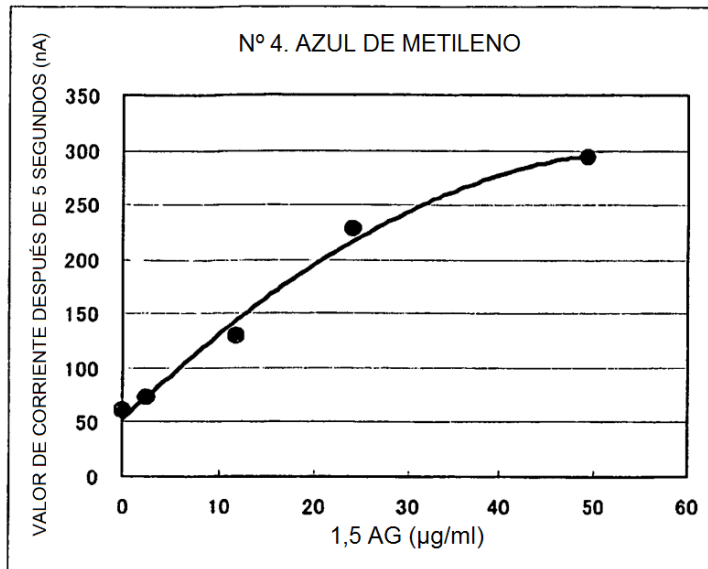


FIG.9

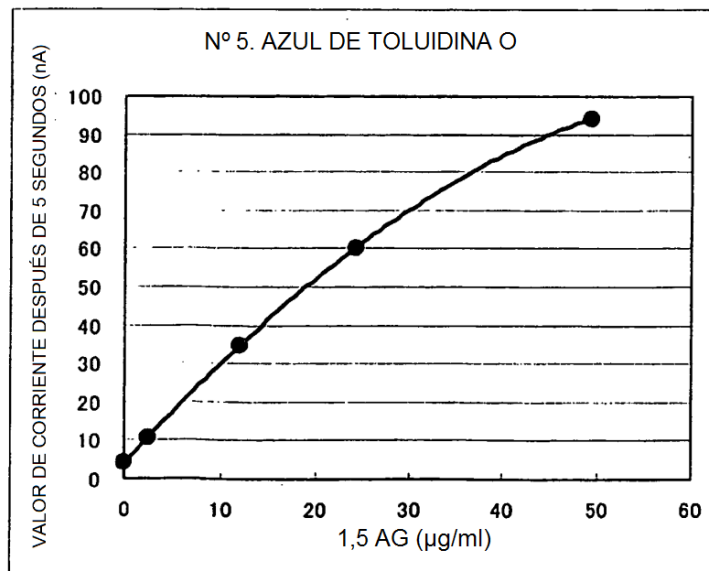


FIG.10

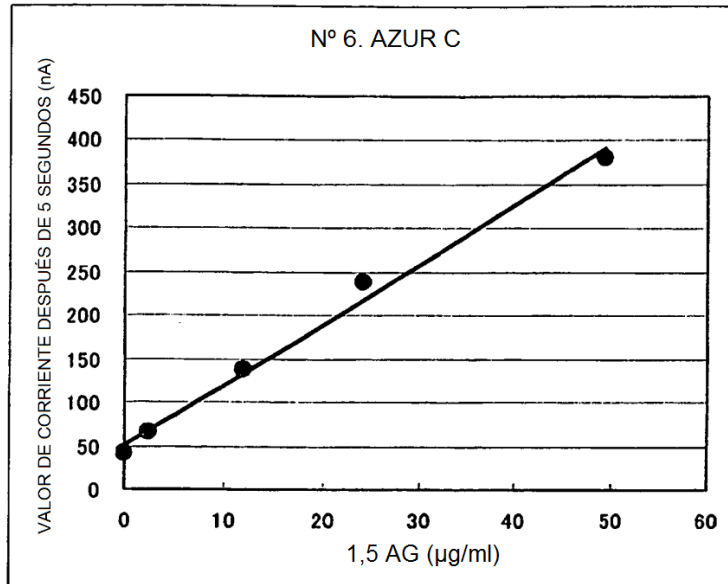


FIG.11

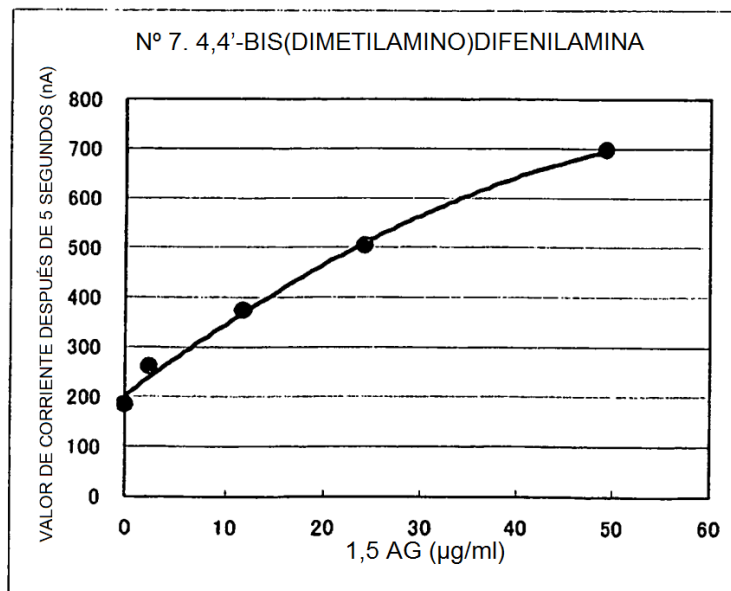


FIG.12

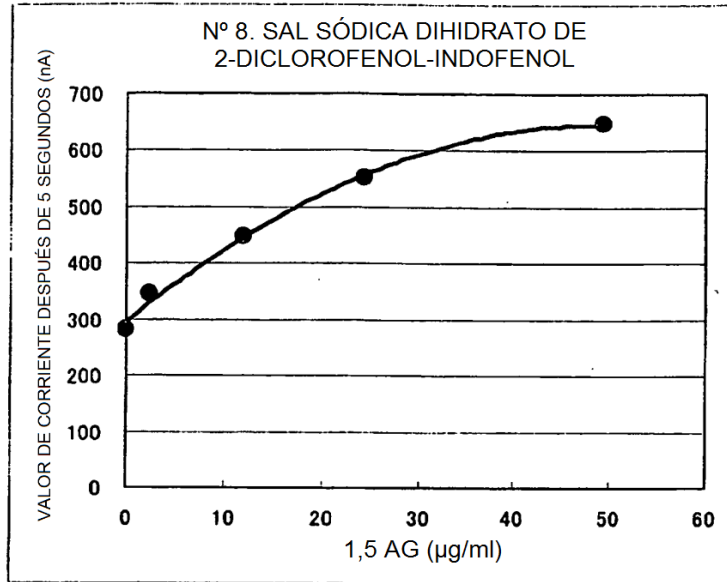


FIG.13

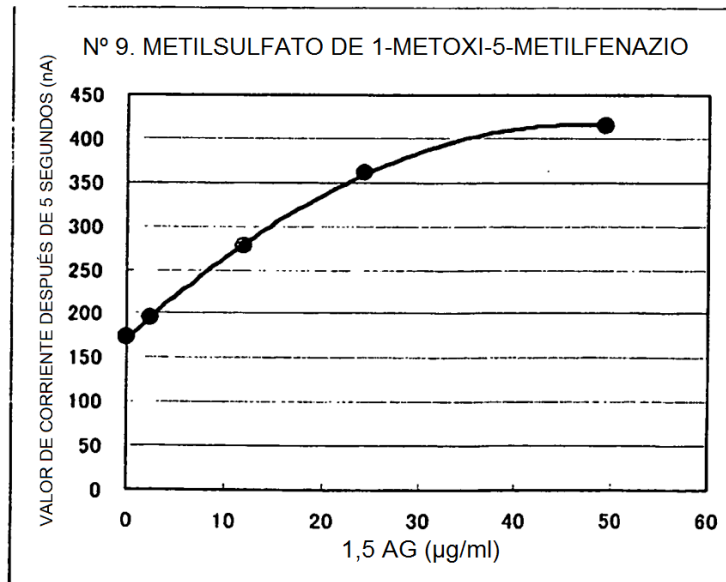


FIG.14

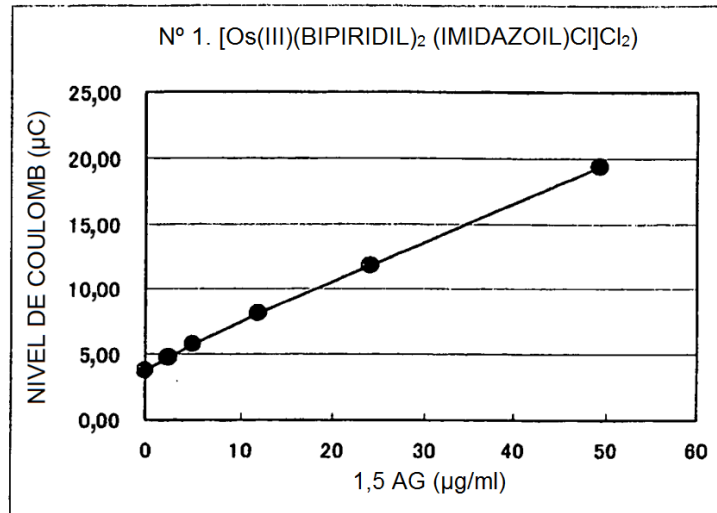


FIG.15

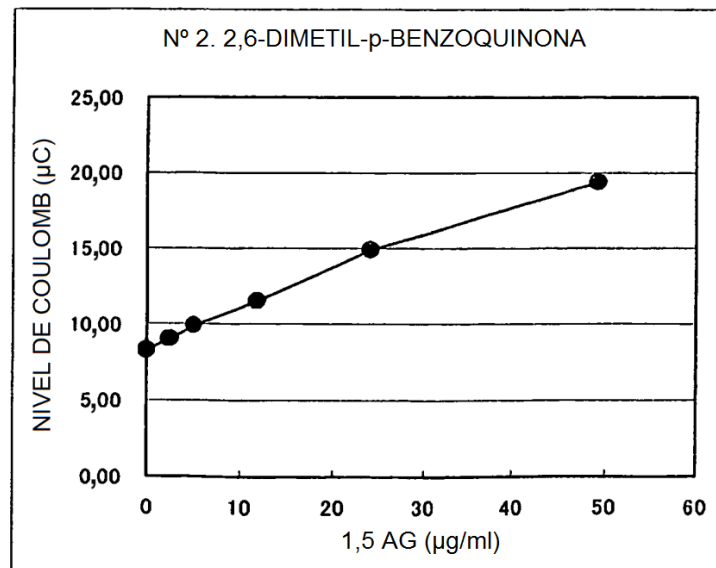


FIG.16

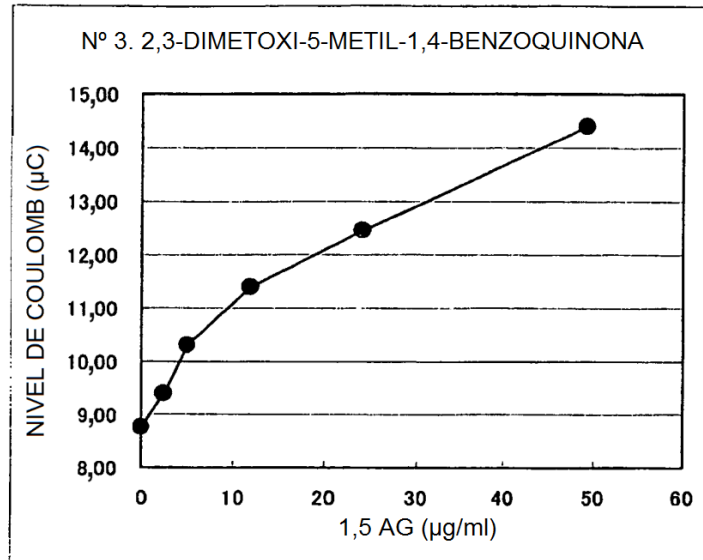


FIG.17

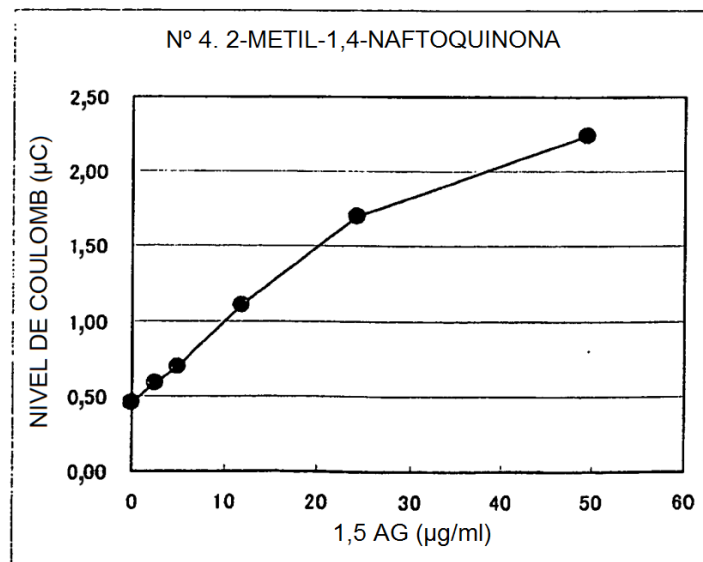




FIG.18

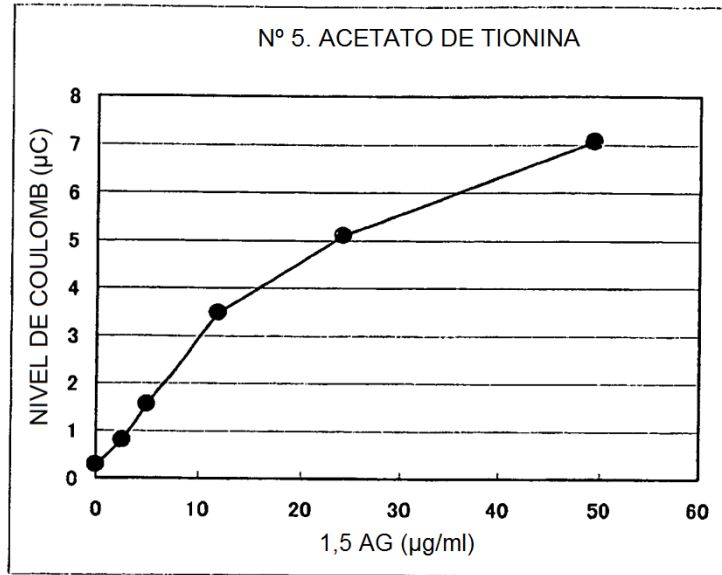


FIG.19

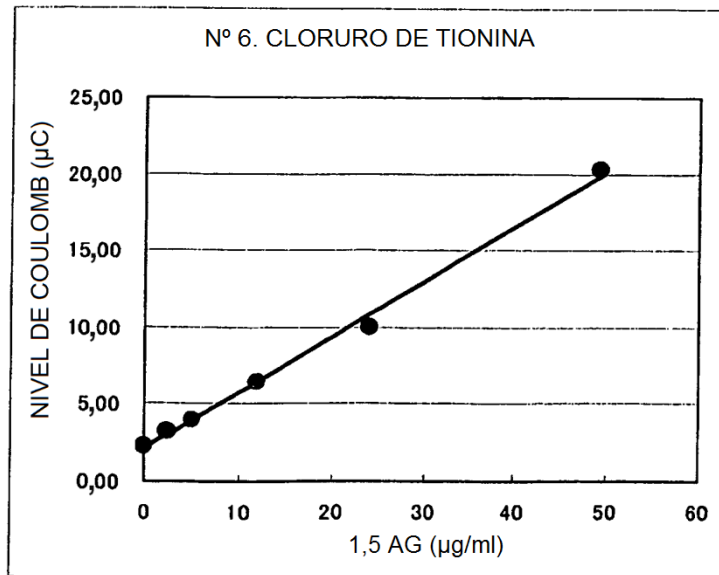


FIG.20

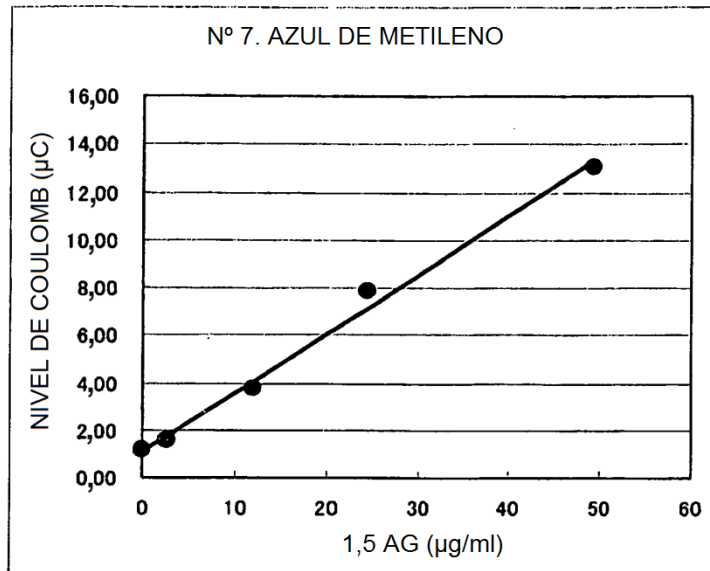


FIG.21

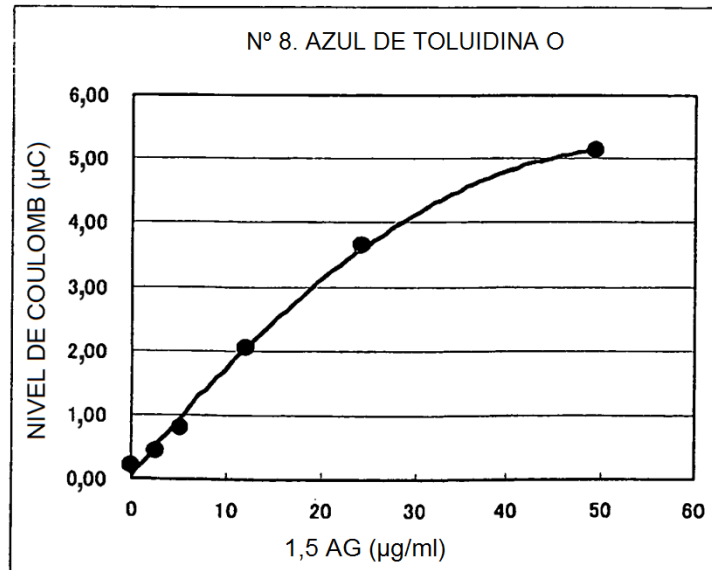


FIG.22

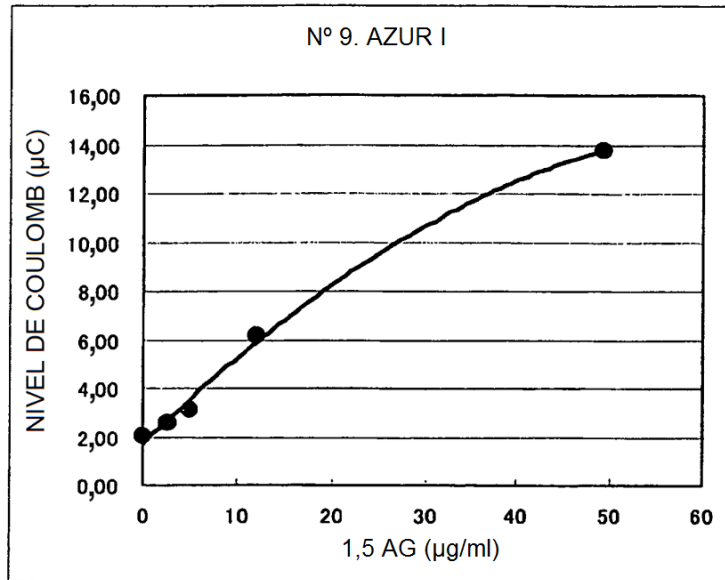


FIG.23

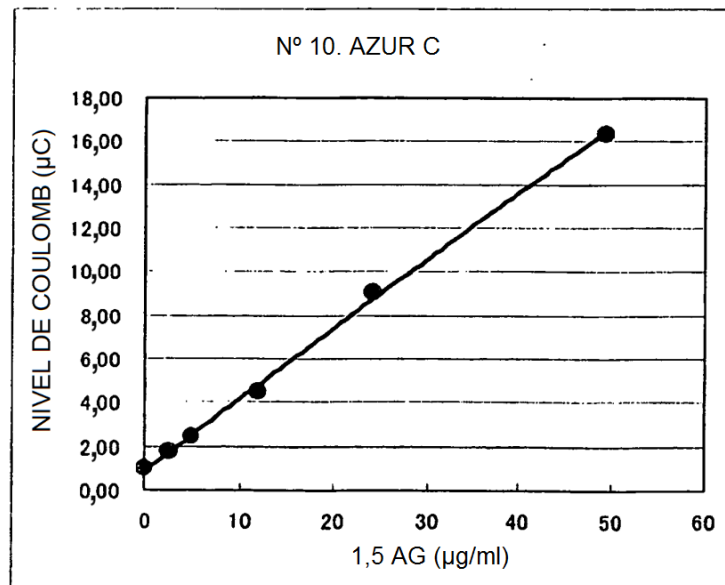


FIG.24

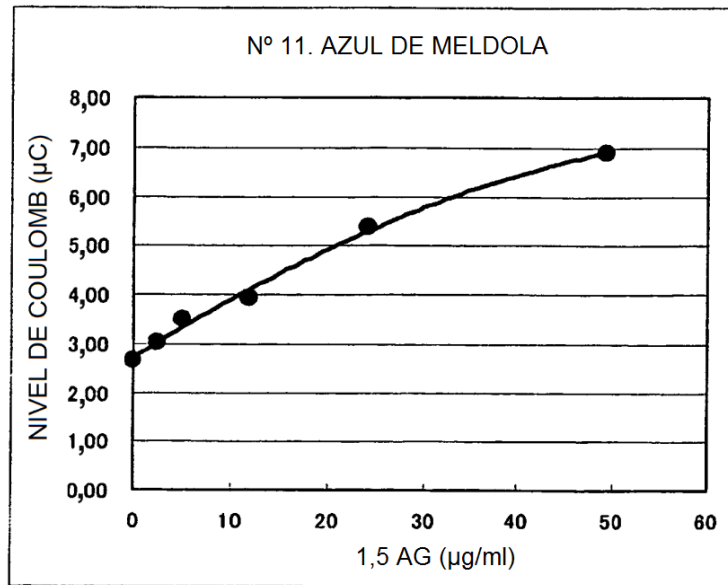


FIG.25

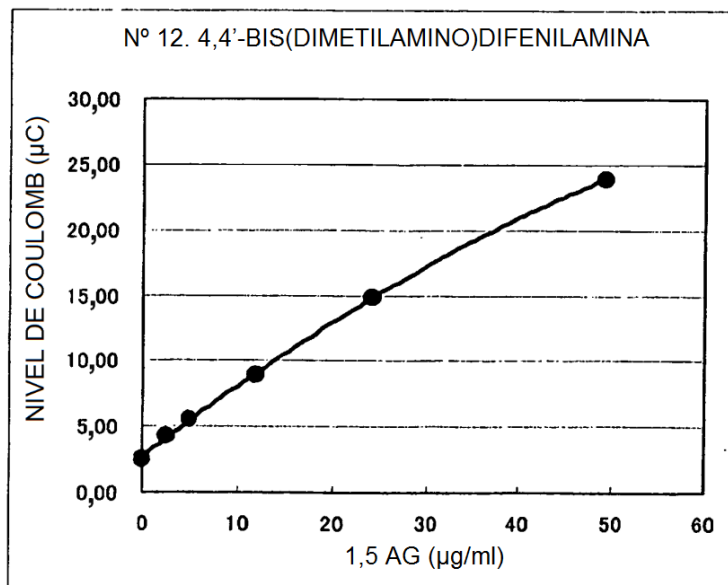


FIG.26

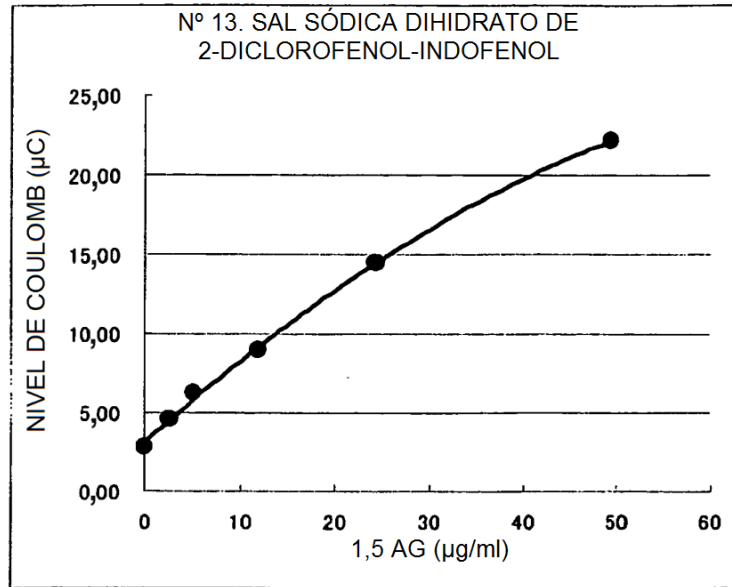


FIG.27

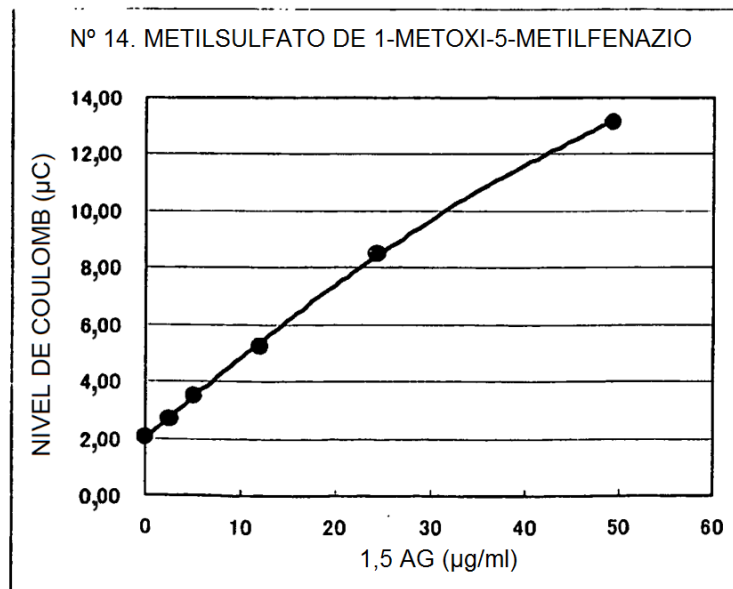


FIG.28

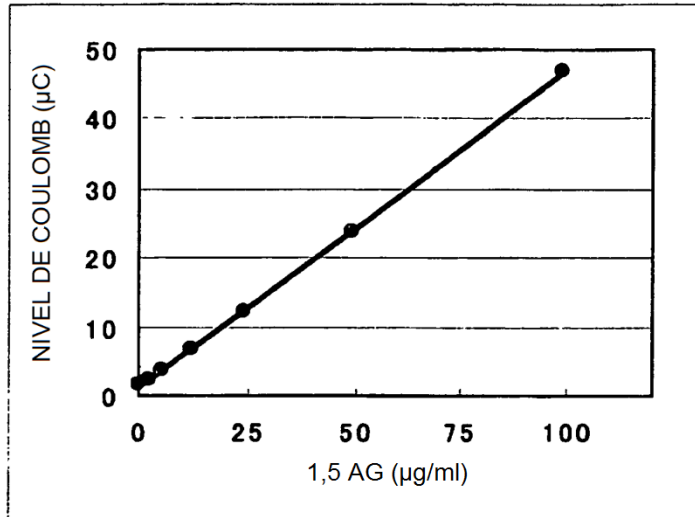


FIG.29

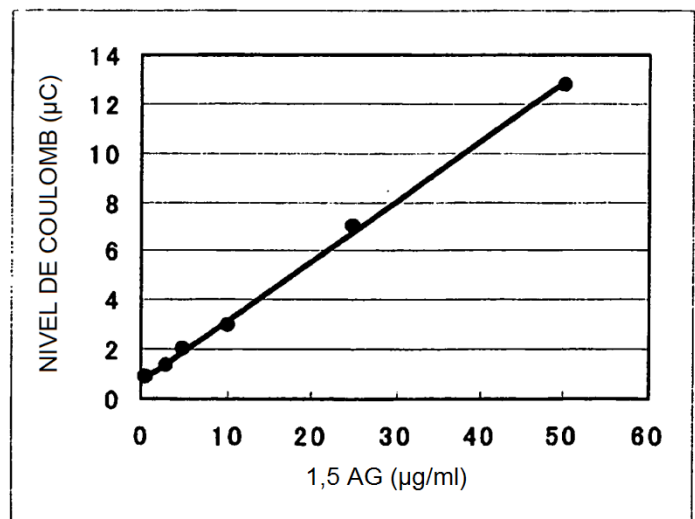


FIG.30

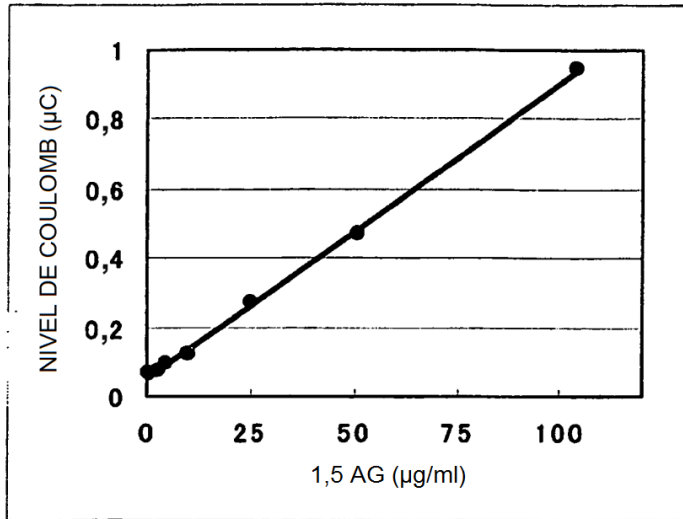


FIG.31

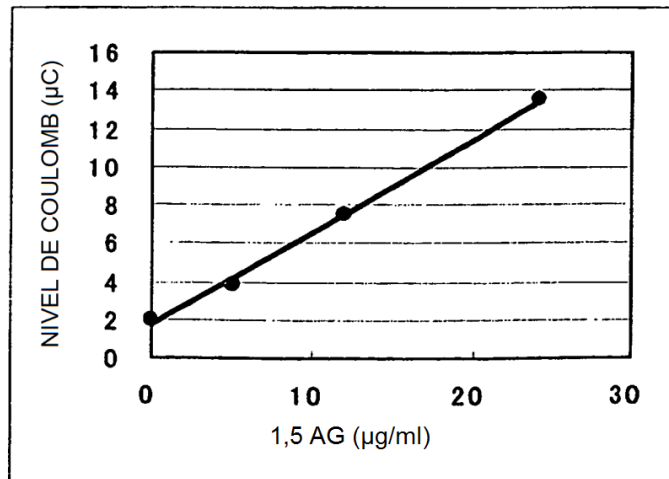


FIG.32

