



No. 11-132884- -00000-0000

Fecha: 2011-10-07 12:41:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 38



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA
VERIFICACIÓN Y PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE
ANALITOS, PARTICULARMENTE DE MICOTOXINAS**

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE **BAYER CROPSCIENCE AG**

DOMICILIO **MONHEIN, ALEMANIA**

74. APODERADO **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

22. BOGOTA, D.C., _____

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-132884- 00000-0000

FORMULARIO ÚNICO D
F

Fecha: 2011-10-07 12:41:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 38

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAYER CROPSCIENCE AG**
Dirección: **Alfred-Nobel -Str. 50, 40789 MONHEIM, ALEMANIA**
Nacionalidad o domicilio: **MONHEIN, ALEMANIA**
Lugar de Constitución: **MONHEIN, ALEMANIA**
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual: _____

Número:

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**
Dirección: **Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202**
BOGOTA D.C., COLOMBIA
Teléfono: **2444096** Fax: **2442496**
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cuál

Número: 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.
BOGOTA

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre:
Dirección: **VER HOJA ANEXA**
Nacionalidad o Domicilio:

5

PCT '(86)
Solicitud Internacional No. **PCT/EP2010/001924** Fecha: **26 - 03 -10**
Publicacion Internacional No. **WO 2010/115530 A1** Fecha: **14 - 10 - 10**

6

Título (54)

DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA VERIFICACIÓN Y PARA EL ANÁLISIS
CUANTITATIVO DE ANALITOS, PARTICULARMENTE DE MICOTOXINAS

7

Clasificación internacional (51) _____

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☐ NO ☒

EP

09/04/2009

09157714.8

9

Comprobante de pago No.

Fecha:

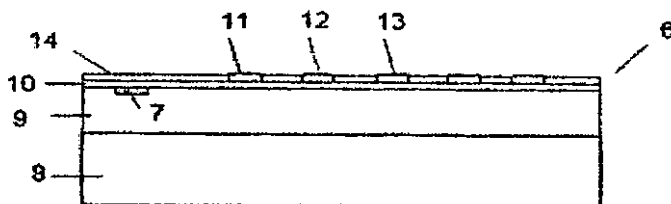
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

INVENTORES

- 1) **BURMEISTER, Jens**
Eidechsenweg 41,
51375 Leverkusen, ALEMANIA
Nacionalidad: Alemana
- 2) **DORN, Ingmar**
Ursulagartenstr.29,
50668 Köln, ALEMANIA
Nacionalidad: Alemana
- 3) **BAZILYANSKA, Viktoria**
Jan-Wellem-Str. 21,
51065 Köln, ALEMANIA
Nacionalidad: Alemana
- 4) **RACZEK, Ulrich**
In Holzhausen 40,
51381 Leverkusen, ALEMANIA,
Nacionalidad: Alemana

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPER).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12X12 cm.
- ☐ De ser el caso, información de otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas total o parcialmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional, Nuevas Reivindicaciones
- ☒ Otros: Informe de Búsqueda de Antecedentes Internacional junto con la traducción
Publicación Internacional No. WO 2010/115530 A1

FIGURA CARACTERISTICA



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

FIRMA:

C.C. 19.270.955 Bogotá T.P. 43.308 C.S.J.

Marcas - Patentes
Modelos - Diseños
Nombres Comerciales - Enseñas
Propiedad Intelectual
Registros en el Exterior
Registros Sanitarios INVIMA - ICA
Acciones Judiciales - Administrativas
Derecho Comercial - Industrial
Asesoría - Contratos - Otros
Corresponsalia a Nivel Mundial



Bogotá D.C. - Colombia
Avda. 22 Park Way No. 37 - 31 Of. 202
Tels. (571) 2444096 - 3690624
Fax (571) 2442496 A.A. No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com

Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Miembros ACPI - ASIP - AIPPI

Abogados Consultores - Marcas y Patentes

The Undersigned José Antonio Hernández Rodríguez, citizen, adult and living in Spain, in my position of legal Representative of the company Bayer CropScience AG with headquarters in Alfred-Nobel-Strasse 50 (building 6100), 40789 Monheim, Germany, which was initially incorporated at Monheim, Germany, grant ample and sufficient power of attorney to: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS and/or CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS, attorneys, adults, residing in Bogotá (Colombia), so that on our behalf and representation, carry out in Colombia and in any other Countries all types of errands and special procedures for the registration and renewal of all kinds of Product and Service trademarks, deposits of name and commercial logotype, industrial models and drawings, invention patents, utility models, Integrated circuits, name of domain, Copyrights, plant varieties, agricultural, veterinary and sanitary registries, capacity certificates, renewal, modification, transfer, assignment and expansions and to be responsible as general attorneys, for the supervision of all matters related to industrial and Intellectual property, being empowered to present and withdraw objections, to present appeals, to request testimonies, to receive documents, to pay legal fees, to approve exploitations, to agree on transactions on trademark agreements with third parties of legal entities, to abandon action, to substitute and to carry out all the necessary actions before any administrative authority of the aforementioned purposes in the event that such procedures shall be transferred unto a judicial field, the legal representatives are authorized to act as plaintiff or defendant before the competent authorities, having an ample power to settle, to submit to arbitration, to waive, to present appeals and all other necessary special faculties.

For that purpose, I kindly request to grant ample powers to our attorneys, who shall be able to exercise the functions independently or collectively.

The present power of attorney revokes and cancels any other previous powers of attorney given by the Company in the territory of the Colombian Republic.

Sincerely,

3371530Y Madrid
ID Card No. issued in

Please, submit to a public deed by public notary

Notarial Certificate:

The undersigned Notary Public certifies that the preceding signature reading José Antonio Hernández Rodríguez is authentic: that signer is (Authorized signatory) of Bayer CropScience AG and that he is empowered to grant this power, and that said Company exists and is duly organized in accordance with the laws of Monheim, Germany.

All the foregoing facts are known to the Notary due to his having examined the respective documents to which he, the Notary, attests.

Granted and signed, at _____ on _____ 200__

Notary Public. _____

This Power of Attorney should be authenticated with the filed Notarial certificate and legalized by Apostille or by the Colombian Consulate.

Atentamente se dirige a Usted José Antonio Hernández Rodríguez, ciudadano español, mayor y vecino de Madrid, para manifestarle que en mi condición de Representante legal de la firma Bayer CropScience AG domiciliada en Alfred-Nobel-Strasse 50 (building 6100), 40789 Monheim, Alemania, y constituida inicialmente en Monheim, Alemania, confiero poder general, amplio y suficiente a los Dres. JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, y/o CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS, Abogados, mayores y vecinos de Bogotá, D.C. (Colombia), para que en nuestro nombre y representación adelanten en Colombia y en otros países toda clase de diligencias y procedimientos especiales para el Registro y Renovación en su Despacho, de toda clase de Marcas de Producto y Servicio, Depósitos de Nombre y Enseña Comercial, Diseños Industriales y Patentes de Invención, Patentes modelo de Utilidad, Esquemas de Circuitos integrados, Nombres de dominio, Derechos de Autor, Variedades vegetales, registros agrícolas, veterinarios y sanitarios, certificados de capacidad, renovación, modificación, traspaso y ampliación de los mismos y atiendan como Apoderados generales todo asunto referente a la Propiedad Industrial e intelectual, quedando facultados para presentar y retirar Oposiciones, interponer recursos, solicitar testimonios, recibir documentos, cancelar costos legales, probar explotaciones, aceptar transacciones, llegar a acuerdos marcarios con terceras personas o entidades jurídicas, desistir, sustituir y hacer cuanto fuere necesario ante cualquier autoridad administrativa para los fines arriba indicados; y en caso de que el procedimiento debiera pasar a conocimiento judicial, quedan facultados para actuar como demandantes o demandados ante los Jueces que sean competentes, con poder amplio, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, interponer recursos y con todas las demás facultades especiales que fueren necesarias.

Con éste objeto, ruego le confieran personería suficiente a nuestros Apoderados quienes podrán obrar en forma conjunta o independiente e incluso sustituir el presente poder.

Atentamente,

3371530Y Madrid
DNI Rcpedido en

Certificación Notarial:

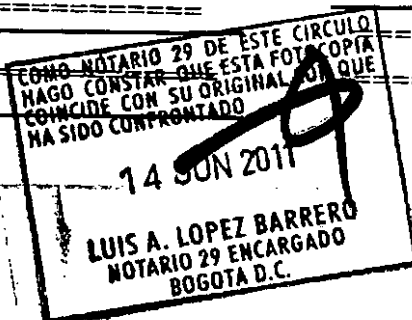
El infrascrito Notario Público certifica que la firma que antecede y dice José Antonio Hernández Rodríguez es auténtica: que el firmante es (Firmante autorizado) de Bayer CropScience AG, que tiene facultad para otorgar este poder y que dicha compañía existe y está debidamente organizada de conformidad con las Leyes de Monheim, Alemania.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en _____ el _____ de _____ de 200__

Notario Público. _____

Autenticarlo ante Notario con el lleno de la Certificación Notarial y refrendarlo por Apostilla o Consulado.



LE...//

...//GITIMACIÓN: Yo, SANTIAGO RUBIO LINIERS, Notario del Ilustre colegio de Madrid con residencia en esta Capital:-----

Conozco y considero legítima la firma que antecede de don JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ Y que he levantado acta del presente documento con el número 901 ,de mi protocolo, a los efectos del artículo 207 del reglamento Notarial. En Madrid a siete de abril de dos mil ocho. DOY FE.=.

Santiago

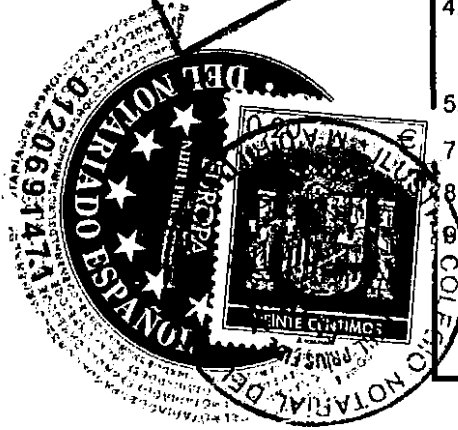
0,15 € SELLO DE LEGITIMACIONES Y LEGALIZACIONES



COMO NOTARIO 29 DE ESTE CIRCULO
HAGO CONSTAR QUE ESTA FOTOCOPIA
COINCIDE CON SU ORIGINAL CON QUE
HA SIDO CONFRONTADO

1 JUN 2011

LUIS A. LOPEZ BARRERO
NOTARIO 29 ENCARGADO
BOGOTA D.C.



Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

País: *España*

El presente documento público

Ha sido firmado por D. **Santiago Rubio Liniers**

3. Actuando en calidad de **NOTARIO**
4. Se halla sellado / timbrado con *el de su Notaria*

CERTIFICADO

5. En Madrid 6. El **10 . Abril . 2008**
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid.
8. Con el número **25048**

Sello / timbre: *[Firma]*

[Firma]
Dña M^a Nieves González de Echavarrí Díaz
Firma delegada del Decano

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

BAYER CROPSCIENCE AKTIENGESELLSCHAFT
Business Planning and Administration
Law and Patents, Patents and Licensing
Alfred-Nobel-Strasse 50, Building 6100
40789 Monheim
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 30 April 2010 (30.04.2010)	
Applicant's or agent's file reference BCS083094-WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2010/001924	International filing date (day/month/year) 26 March 2010 (26.03.2010)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 09 April 2009 (09.04.2009)
Applicant BAYER CROPSCIENCE AKTIENGESELLSCHAFT et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
09 April 2009 (09.04.2009)	09157714.8	EP	19 April 2010 (19.04.2010)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Yolaine Cussac e-mail PT05.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 05
Facsimile No. +41 22 338 82 70	

Dispositivo y procedimiento para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos, particularmente de micotoxinas

La presente invención se refiere a un dispositivo y a un procedimiento para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos y a su uso para la verificación y para el análisis cuantitativo de micotoxinas.

En la bioquímica y la medicina, los análisis se basan frecuentemente en la verificación de una interacción entre una molécula que está presente en cantidad y posición conocidas (la sonda molecular) y una molécula desconocida para verificar (la molécula objetivo o diana molecular).

Para la verificación de una interacción, se pone en contacto una sonda, que habitualmente está fijada a un soporte, con una molécula diana que se encuentra en una solución de muestra, y se incuba en condiciones definidas. Debido a la incubación, tiene lugar una interacción específica entre sonda y diana que puede detectarse de distintos modos. La verificación se basa en el hecho de que una molécula diana forma una unión específica solo con determinadas moléculas de sonda. La unión es claramente más estable que la unión de las moléculas diana a sondas que no son específicas de la molécula diana. Las moléculas diana que se han unido no específicamente pueden separarse por lavado, mientras que las moléculas diana unidas específicamente se fijan a las sondas.

En ensayos modernos, se depositan una pluralidad de sondas en forma de una colección de sustancias como matriz sobre un soporte, de modo que en una muestra pueden analizarse paralelamente al mismo tiempo varias sondas (D. J. Lockhart, E. A. Winzeler, "Genomics, gene expression and DNA arrays"; *Nature* 2000, 405, 827-836).

La verificación de la interacción específica entre una diana y su sonda puede realizarse mediante un denominado marcador mediante una pluralidad de procedimientos, que dependen

generalmente del tipo de marcador, que se incorpora antes, durante o después de la interacción de la molécula diana con las sondas. Típicamente, se trata en dichos marcadores de grupos fluorescentes, de modo que pueden leerse ópticamente por fluorescencia interacciones diana-sonda específicas con alta resolución espacial y, en comparación con otros procedimientos de verificación convencionales, sobre todo procedimientos sensibles a la masa, con bajo coste (A. Marshall, J. Hodgson, "DNA Chips: An array of possibilities", Nature Biotechnology 1998, 16, 27-31; G. Ramsay, "DNA Chips: State of the art", Nature Biotechnology 1998, 16, 40-44).

Es especialmente ventajoso a este respecto el uso de un biochip de campo evanescente como soporte de las moléculas de sonda. Un biochip de campo evanescente comprende una guía de onda óptica con la que pueden detectarse alteraciones de las propiedades ópticas de un medio que limita con la capa de guía de onda. En caso de transportar luz en modo guiado por la capa de guía de onda, el campo lumínico no cae bruscamente en la superficie de contacto del medio/guía de onda, sino que decrece exponencialmente en el denominado medio de detección limitante con la guía de onda. Este campo lumínico decreciente exponencialmente se designa como campo evanescente. En caso de alterarse las propiedades ópticas del medio limitante con la guía de onda dentro del campo evanescente, puede detectarse esto mediante una configuración de medida adecuada.

Así pues, la verificación de la unión específica de moléculas diana con las sondas inmovilizadas sobre la guía de onda puede realizarse mediante las propiedades ópticas cambiantes de la superficie de contacto de guía de onda/inmovilizado.

Preferiblemente, se detecta una señal fluorescente en el campo evanescente. El par de unión de sonda/molécula diana marcado fluorescentemente se excita por un campo evanescente. Se da un ejemplo de biochip de campo evanescente en el documento US 5.959.292.

Dependiendo de la colección de sustancias de tipo sonda inmovilizada sobre el soporte y de la naturaleza química de las moléculas dianas, pueden analizarse mediante este principio de ensayo, por ejemplo, las interacciones entre ácidos nucleicos y ácidos nucleicos, entre proteínas y proteínas, anticuerpos y antígenos así como entre ácidos nucleicos y proteínas.

5 Para posibilitar un procedimiento de verificación rápido práctico, se ha intentado desde hace algunos años reducir los aparatos quimiosensores o biosensores y disponer todos los reactivos posibles que son necesarios para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de una muestra en un denominado cartucho "listo para usar". Se utiliza particularmente la tecnología microfluídica y a este respecto se aspira a poner a disposición cartuchos desechables
10 económicos, almacenables y fáciles de operar que puedan proporcionar resultados instantáneos reproducibles.

Para la capacidad de almacenamiento y la capacidad de transporte de los cartuchos, se utiliza en el estado de la técnica particularmente la tecnología del ensayo en seco, en la que todos los reactivos están disponibles en estado seco en el cartucho eventualmente en cámaras
15 separadas. El líquido de muestra se transporta hacia delante habitualmente por canales microfluídicos desde una cámara a la siguiente.

El documento WO 2005/088300 describe, por ejemplo, un cartucho microfluídico integrado para el análisis de sangre que está compuesto por una parte inferior y una superior de un cuerpo. Ambos elementos se estructuran en cámaras y canales que se cierran mediante
20 el acoplamiento de ambas partes. El cartucho de ensayo presenta uno o varios elementos de pretratamiento (cámara de pretratamiento) para preparar una muestra, uno o varios elementos de ensayo en seco multicapa (cámara de detección) para el reconocimiento de una o varias moléculas diana de un líquido de muestra y uno o varios canales (diámetro ≤ 3 mm) que unen los elementos de pretratamiento con los elementos de ensayo en seco multicapa. Los
25 elementos de pretratamiento son particularmente elementos de filtro o elementos con

propiedades porosas en forma de un canal o una (micro/nano)almohadilla que portan eventualmente reactivos secos. La muestra se pasa en primer lugar por los elementos de pretratamiento y luego por el elemento de ensayo en seco multicapa. El elemento de reconocimiento de ensayo en seco multicapa presenta al menos una capa funcional que porta

5 las sondas para un ensayo cualitativo y cuantitativo de la molécula diana en forma seca y estable. Esta capa de reactivos está compuesta por una capa hidroabsorbente en la que están distribuidas más o menos regularmente sondas excitables en un material aglutinante polimérico hidrófilo (gelatina, agarosa, etc.). La detección se realiza mediante fotometría de reflexión a través de una ventana transparente a la luz, mediante irradiación de una capa de detección del

10 elemento de ensayo en seco multicapa en la que se difunde el líquido ópticamente excitable de la reacción de reconocimiento.

Para el transporte de la muestra, se utilizan fuerzas capilares o presión. Es una desventaja de este procedimiento que la configuración del elemento de ensayo en seco multicapa sea costosa y que el mezclado del analito con los reactivos de detección no sea

15 óptimo. Además, no es posible un control temporal exacto de las etapas de reacción individuales, particularmente del volumen y tiempos de incubación, de modo que los resultados del ensayo no son cuantitativamente reproducibles. No se describe una referenciación.

La tecnología de ensayo de flujo lateral (EFL) es también conocida desde hace muchos años para los análisis bioquímicos. Los ensayos de flujo lateral (EFL) aprovechan el efecto de

20 la reacción de anticuerpo-antígeno. Adicionalmente, se arrastra la muestra a analizar (solución) por fuerzas capilares a través de la superficie del sensor. Para la verificación de analitos mediante EFL, puede realizarse, por ejemplo, un inmunoensayo directo competitivo sobre una tira de nitrocelulosa, arrastrándose la muestra a analizar por toda la tira de celulosa por fuerzas capilares. La zona en que se ha inmovilizado el anticuerpo anti-analito sirve como zona de

25 detección para el ensayo de tira. Es un ejemplo de un ensayo EFL para la verificación de

micotoxinas (por ejemplo, desoxinivalenol) el "Reveal-Assay" (cartucho de ensayo) de la compañía Neogen, Lansing, MI, EE.UU. con el aparato de lectura adjunto "AccuScan". Se introduce el cartucho en el aparato de lectura y el aparato toma una imagen del intervalo de resultados del ensayo de tira. El aparato de lectura interpreta la imagen de resultados y, cuando reconoce una línea, emite una valoración. El aparato elimina la subjetividad de la interpretación y da una documentación objetiva y reproducible de los resultados del ensayo. El ensayo descrito es sencillo y relativamente rápido de llevar a cabo y no requiere aparatos de lectura costosos. Es una desventaja que el procedimiento permita solo una verificación cualitativa o en todo caso semicuantitativa de la micotoxina.

El documento WO 2007/079893 describe un procedimiento para la verificación rápida de micotoxina en el que se aplica una colección de sustancias de asociados de unión para micotoxinas y/o sondas para micotoxinas soportados inmovilizados en zonas de medida separadas espacialmente sobre la superficie de una guía de onda de capa fina, poniendo en contacto una muestra que contiene micotoxina y sondas de esta micotoxina con el miembro de unión inmovilizado y detectando la reacción de los asociados de unión inmovilizados con las micotoxinas y/o elementos de reconocimiento de micotoxinas mediante una alteración de señal en el campo evanescente, es decir, en la superficie de contacto con la guía de onda. Es especialmente ventajoso en el procedimiento que puede limitarse o incluso anularse totalmente la separación por lavado del miembro de unión marcado fluorescentemente o de una muestra o solución que contiene un miembro de unión marcado antes de la detección de una señal. Esto posibilita tanto un ahorro de tiempo en el análisis como una simplificación de la práctica, ya que puede anularse también la preparación de soluciones de lavado. La intensidad de señal se establece mediante la toma de una imagen del ensayo mediante un software adecuado, al igual que el cálculo de la cantidad de micotoxinas presente en la muestra. Sin embargo, es conocido en el estado de la técnica que es ventajoso un procedimiento de referenciación adecuado para

la fiabilidad del análisis cuantitativo. No se describe uno de dichos procedimientos de referenciación en el documento WO 2007/079893.

En el estado de la técnica, se describe el empleo de una o varias zonas de medida para la calibración de un ensayo. En el documento WO 01/13096, por ejemplo, se usan zonas de medida para la referenciación de parámetros químicos u ópticos iguales (por ejemplo, la intensidad de la luz de excitación disponible localmente) en varios recipientes de muestra distribuidos por la plataforma sensora, de modo que pueda determinarse la distribución espacial de los parámetros en cuestión sobre la plataforma sensora. El número y posición de las zonas de medida para la referenciación en la disposición de zonas de medida anteriormente citada son arbitrarios.

El documento EP-A 0.093.613 describe un procedimiento para la calibración de un ensayo para la cuantificación de una molécula diana en un líquido de muestra mediante un sensor basado en la excitación de fluorescencia en campo evanescente de una guía de onda óptica, que presenta una primera zona de medida (zona de medición) para la unión específica de un primer marcador, empleándose este primer marcador en una cantidad que depende de la presencia de un analito en la muestra, y una segunda zona de medida (zona de calibración) para la unión de un segundo marcador, en el que la unión del segundo marcador no está influida por la presencia de analito en la muestra. A este respecto, se usan en las zonas de medición y las zonas de calibración distintos pares de unión, que sin embargo son de naturaleza similar. La cantidad del segundo marcador en la zona de calibración durante el ensayo da un valor de señal para una concentración predeterminada de analito dentro de un intervalo de concentración. Ambas zonas de medida están colocadas pegadas entre sí sobre la misma estructura básica, para minimizar las diferencias causadas por posibles variaciones locales del sensor. El valor de señal de la zona de medición se divide entre el valor de señal de la zona de calibración colocada pegada para corregir los efectos no específicos del sensor

sobre la señal. La configuración del sensor y la dirección del rayo de excitación no se definen detalladamente.

El documento WO 2004/023142 describe un procedimiento para la calibración de un ensayo para la cuantificación de una molécula diana en un líquido de muestra mediante un sensor basado en la excitación de fluorescencia en campo evanescente de una guía de onda óptica, en el que los elementos de reconocimiento y moléculas de referencia (Cy5-BSA, BSA = seroalbúmina bovina) se puntean en micromatrices alternadas paralelas separadas ortogonales a la dirección de propagación de la luz de excitación soportada en la plataforma sensora del campo evanescente en puntos de medición o puntos de referencia. Para la referenciación de la intensidad de señal de cada punto de medición, se divide la intensidad de señal neta del punto de medición entre el valor medio de las intensidades de señal netas de los puntos de referencia dispuestos adyacentes en la misma fila en la dirección de propagación de la luz de excitación. Mediante esta referenciación, se compensan las diferencias locales de la intensidad de luz de excitación disponible ortogonal a la dirección de propagación de luz tanto dentro de cada micromatriz como entre distintas micromatrices.

En el uso de los procedimientos de referenciación descritos en la técnica, se ha mostrado que estos no eran adecuados para la referenciación del ensayo en sistema fluido. Se ha mostrado que con el uso de proteínas fluorescentes punteadas como referencia, pueden equilibrarse solo aquellas oscilaciones del sistema que tienen lugar al nivel del sensor como, por ejemplo, la atenuación de luz de fluorescencia o las oscilaciones en el punteado de las matrices.

Existía en el estado de la técnica el objetivo de proporcionar un agente económico, almacenable y fácil de operar para el análisis cuantitativo de analitos, particularmente de micotoxinas, mediante una colección de sustancias soportadas sobre una guía de onda de capa fina (biochip PWG, PWG= guía de onda plana) de asociados de unión inmovilizados en

zonas de medida separadas espacialmente (inmunoensayo). Es otro objetivo de la presente invención posibilitar una determinación absoluta, es decir, una referenciación de la señal producida.

Se consigue este objetivo según la invención mediante un cartucho microfluídico para el análisis cualitativo y/o cuantitativo de analitos, particularmente de micotoxinas, que incluye todos los reactivos necesarios para la práctica del procedimiento de ensayo en forma seca. El cartucho según la invención presenta un cuerpo estructurado en el que se han incorporado cavidades que están unidas entre sí por canales. Según la invención, el cartucho presenta al menos una entrada para la introducción de un líquido de muestra que contiene micotoxinas, al menos una cámara de reactivos y al menos una cámara de detección. En la cámara de reactivos, están ubicados en forma seca una o varias sondas de micotoxina marcadas para la reacción con micotoxinas del líquido de muestra y sondas de referencia marcadas para la reacción con un antígeno de referenciación. El suelo de la cámara de detección está compuesto por una guía de onda de capa fina (biochip PWG) que comprende una primera capa ópticamente transparente (a) sobre una segunda capa ópticamente transparente (b) que presenta un índice de refracción menor que la capa (a), y en la que esta incorpora una rejilla óptica, que está orientada perpendicularmente a la ruta de la luz de excitación, que se acopla mediante la rejilla óptica en la guía de onda de capa fina. Sobre la superficie de la guía de onda de capa fina se inmovilizan los reactivos de detección, concretamente, se aplican en filas de zonas de medida separadas espacialmente un ensayo de micotoxina (inmunoensayo) en forma de una colección de sustancias de asociados de unión inmovilizados para micotoxinas y/o para sondas de micotoxinas y un ensayo de control independiente que incluye un antígeno de referenciación inmovilizado. Las matrices se aplican sobre el biochip PWG de modo que las zonas de medida estén orientadas en filas paralelamente a la rejilla óptica. En la dirección de la luz de excitación, por encima y por debajo de cada fila de inmunoensayo, se encuentra una fila

de ensayo de control (véase la Fig. 1), de modo que puede obtenerse una intensidad de fluorescencia referenciada de la zona de medida del ensayo de micotoxina mediante la división de la intensidad de fluorescencia de la zona de medida del ensayo de micotoxina entre el valor medio de las intensidades de fluorescencia de las zonas de medida del ensayo de control
5 adyacentes en la dirección de la luz de excitación.

Sorprendentemente, se ha mostrado que la referenciación del inmunoensayo en sistema fluido mejora considerablemente cuando, en lugar del concepto de referenciación estática conocido, se usa la dinámica según la invención. Son ventajas de la referenciación dinámica que pueden equilibrarse tanto oscilaciones en el sistema fluido (por ejemplo, adsorción en los canales, oscilaciones de volumen, variaciones de las cantidades de anticuerpo
10 en la ruta) como oscilaciones en la superficie del biochip PWG (por ejemplo, atenuación, variaciones en el punteado).

Es por tanto un primer objeto de la invención un cartucho para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos en un líquido de muestra, que incluye un cuerpo estructurado
15 en el que están incorporadas cavidades que están unidas entre sí por canales, presentando el cartucho al menos una entrada para la introducción del líquido de muestra que contiene analitos, al menos una cámara de reactivos y al menos una cámara de detección, en el que

a. están ubicadas en forma seca en la cámara de reacción una o varias sondas de analito marcadas para la reacción con los analitos del líquido de muestra y una o varias sondas de
20 referenciación marcadas para la reacción con un antígeno de referenciación,

b. el suelo de la cámara de detección es una guía de onda de capa fina que comprende una primera capa ópticamente transparente (a) sobre una segunda capa ópticamente transparente (b) que presenta un índice de refracción menor que la capa (a), en la que en la capa (a) o (b) está incorporada una rejilla óptica que está orientada perpendicularmente a la
25 ruta de la luz de excitación, que mediante la rejilla óptica se acopla en la guía de onda de capa

fina,

- c. sobre la superficie de la guía de onda de capa fina están aplicados un inmunoensayo en forma de una colección de sustancias de asociados de unión para analitos y/o para sondas de analitos inmovilizados en filas de zonas de medida separadas espacialmente y un ensayo de control independiente que incluye el antígeno de referenciación inmovilizado y
- d. las filas respectivas están orientadas paralelamente a la rejilla óptica y se encuentra una fila de ensayo de control en la dirección de la luz de excitación por encima y por debajo de cada fila del inmunoensayo.

Preferiblemente, se selecciona el ensayo de control de modo que el antígeno de referenciación tenga un peso molecular similar al del analito, y que la sonda de referenciación presente propiedades de unión similares a las de la sonda de analito (afinidad, cinética de unión). Además, el ensayo de control no debe mostrar reactividad cruzada con el inmunoensayo y el antígeno no debe aparecer naturalmente en la matriz investigada.

Además, es ventajoso que el comportamiento de degradación del ensayo de control se parezca al del inmunoensayo, de modo que dé la estabilidad a largo plazo de la curva de calibración de un lote de producción.

En una forma de realización especial de la invención, los analitos son micotoxinas.

Preferiblemente, se usa un inmunoensayo como se describe en el documento WO 2007/079893, cuyo contenido se integra por referencia.

Se prefieren como inmunoensayo filas de conjugados de micotoxina-proteína, por ejemplo, conjugados de micotoxina-BSA.

Son ejemplos de ensayos de control los ensayos de micotoxinas que no aparecen naturalmente en la matriz investigada. El ensayo de control se selecciona preferiblemente de modo que verifique una molécula < 1000 g/mol. Se aplican con especial preferencia sobre el biochip PWG un ensayo de control para fluoresceína y una fila de conjugados de control-

proteína, por ejemplo, fluoresceína-BSA.

El biochip PWG está compuesto, por ejemplo, por un soporte de vidrio que está recubierto con una capa de pentóxido de tantalio. El grosor de capa asciende a 40 a 160 nm, preferiblemente a 80 a 160 nm, con especial preferencia a 120 a 160 nm, con muy especial
5 preferencia a 155 nm. El soporte de vidrio contiene una rejilla óptica con una profundidad de rejilla de 3 a 60 nm, preferiblemente de 5 a 30 nm, con especial preferencia de 10 a 25 nm, con muy especial preferencia de 18 nm, y un periodo de rejilla de 200 a 1000 nm, preferiblemente de 220 a 500 nm, con especial preferencia de 138 nm. Preferiblemente, la rejilla muestra un único periodo, es decir, es monodifractiva.

10 La superficie de pentóxido de tantalio está recubierta habitualmente con dodecilsulfato en forma de una monocapa. Se inmovilizan sobre esta superficie conjugados de analito-proteína, preferiblemente conjugados de micotoxina-BSA y conjugados de antígeno de referenciación-proteína, preferiblemente conjugados de fluoresceína-BSA. Para la inmovilización, se aplican habitualmente sobre la superficie los conjugados de proteína en
15 concentraciones de 0,1 a 5 mg/ml, preferiblemente de 0,2 a 2 mg/ml, con especial preferencia de 0,5 a 1,5 mg/ml, con muy especial preferencia de 1 mg/ml, y se adsorben allí.

Para la aplicación de los conjugados de proteína, pueden usarse uno o varios procedimientos que se seleccionan de los siguientes grupos: punteado de chorro de tinta, punteado mecánico mediante clavija o resorte, impresión por microcontacto, puesta en
20 contacto fluidica de las zonas de medida con los elementos de reconocimiento biológicos o bioquímicos o sintéticos mediante su alimentación en paralelo o en microcanales cruzados, mediante la acción de diferencias de presión o de potenciales eléctricos o electromagnéticos.

Después de la inmovilización de los conjugados de proteína, se pasivan las zonas aún libres de la superficie del biochip PWG mediante tratamiento con BSA para inhibir las uniones
25 inespecíficas.

El biochip PWG representa el suelo de la cámara de detección del cartucho según la invención y se integra en el cartucho.

El cartucho está compuesto por un cuerpo estructurado en el que se incorporan cámaras y canales, incorporándose las cámaras preferiblemente al cuerpo de modo que se formen al menos por un lado mediante la aplicación de una unidad de cierre. El cuerpo estructurado se cierra por arriba y por abajo mediante una unidad de cierre con excepción de la entrada, el suelo de la cámara de detección y orificios de aireación opcionales. Preferiblemente, se pone el biochip en su posición antes de la unidad de cierre y se mantiene en posición mediante la unidad de cierre. Preferiblemente, la unidad de cierre es una lámina de cierre.

Preferiblemente, se transporta en los canales y las cámaras un volumen definido precisamente de líquido de muestra, lo que se posibilita por el diseño de los canales y las cámaras y el empleo de un medio adecuado para el transporte del líquido de muestra. A este respecto, pueden controlarse igualmente con exactitud los tiempos de reacción, lo que contribuye a una mejor reproducibilidad de los análisis. Mediante un diseño conveniente de las cámaras y canales, se garantiza un perfil de flujo óptimo con volumen muerto reducido y eventualmente un contacto óptimo con los reactivos de detección inmovilizados.

Los canales unen la entrada, la cámara de reactivos y la cámara de detección entre sí y poseen habitualmente un diámetro de 0,1 a 2,5 mm, preferiblemente de 0,5 a 1,5 mm, con especial preferencia 1 mm.

En una forma de realización especial de los cartuchos, la cámara de reactivos presenta una almohadilla de reactivos sobre la que están ubicadas las sondas de analitos y referenciación, particularmente anticuerpos para micotoxinas y fluoresceína.

La almohadilla de reactivos se selecciona de modo que satisfaga los requisitos de la cámara de detección respecto al volumen de líquido transportado de la solución sobrenadante

y de la concentración de los componentes individuales en esta solución.

La almohadilla de reactivos está compuesta habitualmente por un material de tipo fibroso o poroso, por ejemplo, partículas finas o tejidos en el que se han ubicado los reactivos (adsorbido, fijado, dispersado o desecado). Una almohadilla de reactivos preferida está compuesta por vidrio o polímeros como, por ejemplo, celulosa. Se usan, por ejemplo, almohadillas de reactivos que se usan también en el denominado ensayo de flujo lateral y que son obtenibles comercialmente en distintas formas.

Una cámara de reactivos preferida requiere un volumen de líquido de 10 a 100 μm , preferiblemente de 20 a 60 μl , con especial preferencia de 40 μl y las sondas de analito y referenciación allí disueltas a una concentración de 10^{-7} M a 10^{-10} M, preferiblemente a concentraciones nanomolares.

Para el relleno de esta cámara de reacción, se selecciona como almohadilla de reactivos la compuesta por filtros de vidrio extragruoso de la compañía Pall Corporation (tamaño de poro 1 μm , grosor típico 1270 μm , caudal de agua típico 210 ml/min/cm² a 30 kPa), apilando dos trozos de filtro circulares de diámetro coincidente (habitualmente de 5 a 10 mm). La almohadilla de reactivos resultante se impregna habitualmente con aproximadamente 100 μl de solución que contiene las sondas marcadas fluorescentemente, así como habitualmente otros componentes para ayudar a la impregnación. La impregnación se realiza, por ejemplo, mediante desecado o liofilización.

La almohadilla de reactivos se opera habitualmente en los cartuchos de modo que se humedece con aprox. 80 μl de líquido de muestra (por ejemplo, extracto de micotoxina).

Después de un tiempo de preincubación de 1 a 10 min, se transportan habitualmente de 20 a 60 μl de solución a la cámara de detección.

Un control exacto del volumen es ventajoso en la presente invención pero no necesario, ya que pueden equilibrarse las variaciones entre los distintos cartuchos mediante el

procedimiento de referenciación según la invención.

Es un objeto adicional de la presente invención un procedimiento para la verificación de analitos, particularmente micotoxinas, mediante los cartuchos según la invención.

Es un segundo objeto de la presente invención un procedimiento para el análisis
5 cuantitativo de analitos que comprende las siguientes etapas:

- a. extracción opcional de los analitos de una matriz en un líquido de muestra,
- b. realización del ensayo en el cartucho según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que, después de la introducción del líquido de muestra en el cartucho, se transporta el líquido de muestra a la cámara de reactivos y se mezcla o hace reaccionar con las sondas marcadas allí
10 aplicadas, y entonces
- c. transporte del líquido de muestra a la cámara de detección y reacción del analito y/o de la sonda marcada con el inmunoensayo y el ensayo de control, seguido de
- d. iluminación de la guía de onda de capa fina para la excitación de las sondas marcadas del inmunoensayo y del ensayo de control para la fluorescencia y toma de una imagen de
15 fluorescencia, y entonces
- e. cálculo de las intensidades de fluorescencia referenciadas del inmunoensayo mediante el ensayo de control, calculando la intensidad de fluorescencia referenciada de cada zona de medida del inmunoensayo mediante la división de la intensidad de fluorescencia de la zona de medida del inmunoensayo entre el valor medio de las intensidades de fluorescencia de las
20 zonas de medida del ensayo de control adyacente en la dirección de la luz de excitación, y
- f. cálculo y visualización de los valores de analitos por referencia a una curva de calibración.

En caso de que las micotoxinas se encuentren en una matriz sólida, se trituran generalmente estas en una primera etapa opcional del procedimiento según la invención, a
25 continuación se extraen de la matriz las micotoxinas con un disolvente adecuado. Son ejemplos

de agentes de extracción soluciones acuosas de metanol, etanol o acetonitrilo. Son ejemplos de matrices sólidas trigo, maíz, cebada, centeno, cacahuetes, avellanas, etc. En caso de que el extracto contenga más de un 10% de disolvente no acuoso, es generalmente necesaria una etapa de dilución antes del relleno del cartucho. Las matrices líquidas (leche, zumo de frutas, vino, etc.) pueden llenarse directamente o después de una dilución adecuada en el cartucho.

En una etapa adicional, el usuario rellena el cartucho con el extracto o la solución de muestra y cierra el cartucho. Se incorpora a continuación el cartucho a un aparato de lectura. El aparato de lectura contiene una bomba que bombea aire al cartucho y así transporta la solución desde la entrada de muestra a la cámara de reacción, donde se humedece la almohadilla de reactivos allí aplicada.

En el humedecimiento de la almohadilla de reactivos, se liberan de la almohadilla de reactivos los anticuerpos con la ayuda del extracto y se mezclan entonces con el extracto.

El tiempo de incubación del extracto en la almohadilla de reactivos asciende preferiblemente a 1 a 20 min, con especial preferencia a 3 a 7 min. La bomba bombea entonces de nuevo aire al cartucho y desplaza así el volumen de líquido a la cámara de detección por el biochip PWG. De nuevo, se realiza una etapa de incubación que dura habitualmente 1 a 100 min, preferiblemente 5 a 15 min.

Preferiblemente, se termostatiza el cartucho durante el procedimiento a una temperatura que asciende preferiblemente a 20 a 37°C, con especial preferencia a 25°C.

Después de la incubación de los anticuerpos marcados sobre el biochip PWG, se acopla un rayo láser en la rejilla óptica. Mediante la iluminación plana del biochip PWG, se excitan los anticuerpos marcados para fluorescencia. Con la ayuda de una cámara y un filtro de fluorescencia adecuado, se recoge una imagen de fluorescencia del biochip.

Un software de evaluación de imágenes, que está instalado en el ordenador del aparato de lectura, determina entonces la intensidad de fluorescencia de las zonas de medida del

ensayo de micotoxina y de control. Mediante la división de la intensidad de fluorescencia de la zona de medida del ensayo de micotoxina entre el valor medio de las intensidades de fluorescencia de las zonas de medida del ensayo de control adyacentes en dirección de la luz de excitación, se obtiene una intensidad de fluorescencia referenciada de la zona de medida del ensayo de micotoxina.

La referencia cuantitativa entre las intensidades de fluorescencia referenciadas de la zona de medida del ensayo de micotoxina y la concentración de una micotoxina en la solución que se ha pipeteado al cartucho, se establece habitualmente mediante la toma de curvas de calibración. Las referencias matemáticas resultantes se almacenan en el ordenador del aparato de lectura.

En caso de medir una muestra, se establece la intensidad de fluorescencia referenciada después de la toma de la imagen de fluorescencia y se calcula por referencia a la curva de calibración la correspondiente concentración de micotoxina. El valor de micotoxina se representa sobre la pantalla del aparato de lectura.

El dispositivo según la invención y el procedimiento según la invención se ilustran detalladamente mediante los siguientes ejemplos y figuras, sin limitarse a los mismos.

Figuras:

- Fig. 1: Construcción de la matriz de micotoxina
- Fig. 2: Configuración del cartucho
- Fig. 3: Vista lateral del biochip PWG
- Fig. 4: Dimensiones del biochip PWG.

Números de referencia:

- 1 cartucho
- 2 entrada
- 3 canal

22

- 4 cámara de reactivos con almohadilla de reactivos
- 6 biochip PWG
- 7 rejilla
- 8 placa de vidrio
- 5 9 capa de guía de onda
- 10 monocapa de dodecilsulfato/capa adhesiva
- 11 puntos de referencia/ensayo de control
- 12 puntos de conjugados de micotoxina-BSA/inmunoensayo
- 13 puntos de referencia/ensayo de control
- 10 14 BSA

El cartucho (1) está compuesto por un cuerpo estructurado en el que se han incorporado canales y cavidades.

Se produjo el cartucho según la invención, por ejemplo, en un procedimiento de moldeo por inyección. El cuerpo está compuesto por una placa de polioximetileno (POM) negro en el que se han abierto y taladrado los canales y cámaras.

El cartucho (1) comprende una entrada (2) para la alimentación de un líquido de muestra con los analitos a detectar a una cámara de muestra del cartucho (1), una cámara de reactivos con una almohadilla de reactivos (4) a la que se transporta el líquido de muestra por un canal (3), y una cámara de detección (5) a la que se transporta el líquido de muestra por otro canal (3), y comprende un biochip PWG (6).

En la cámara de reactivos (4), se encontraban anticuerpos marcados con un colorante de fluorescencia, que son específicos de las micotoxinas del líquido de muestra, y anticuerpos marcados que son específicos de fluoresceína, impregnados sobre la almohadilla de reactivos.

Tanto el biochip PWG (6) como la almohadilla de reactivos se fijaron entre dos láminas de poliolefina a las placas de POM, que servían también como láminas de cierre para el sellado

del cartucho de ensayo. La lámina de cierre superior era de 180 μm de grosor y su lámina de cierre inferior era de 80 μm de grosor.

La lámina inferior presentaba en la zona del biochip PWG (6) una ventana que garantizaba un acceso libre a la región de medida del biochip (6).

5 Se incorporó el líquido de muestra al inicio del ensayo por la entrada (2) a la cámara de muestra y se cerró herméticamente la entrada (2) con una tapa adecuada. Con la ayuda de la unidad de transporte, se incorporó por la entrada un volumen de aire definido al cartucho (1). Este volumen de aire desplazó al líquido de muestra de modo que circuló por la cámara de reactivos (4) y humedeció completamente la almohadilla de reactivos.

10 Mediante la conducción del líquido de muestra a la cámara de reactivos (4), se disolvieron los anticuerpos, se mezclaron con el líquido de muestra y formaron una unión específica con las micotoxinas contenidas en el líquido de muestra (conjugado micotoxina-anticuerpo). A este respecto, se saturaron los sitios de unión libres del anticuerpo con cantidades crecientes de micotoxinas en el líquido de muestra.

15 Después de un cierto tiempo de residencia (10 minutos) a una temperatura de 25°C, se transportó el líquido de muestra que contiene conjugados de micotoxina-anticuerpo y los anticuerpos para fluoresceína en la siguiente etapa a la cámara de detección (5).

En la cámara de detección (5), se detectó el desarrollo o el punto final de la reacción de verificación bioquímica.

20 La cámara de detección (5) se rellenó completamente con el líquido de muestra. El sistema de canales se ventiló completamente. La ventilación completa del sistema de canales tuvo lugar por los orificios de ventilación que estaban aplicados a la lámina de cierre superior.

La cámara de detección (5) comprendía un biochip PWG (6). El biochip PWG (6) está representado esquemáticamente en vista en planta en la Fig. 2 y en la Fig. 3

25 esquemáticamente en vista lateral.

El biochip PWG (6) en la cámara de detección (5) estaba compuesto por una placa de vidrio (8) de 10 mm x 12 mm con un grosor de 0,7 mm ($12,0 \pm 0,05$ mm x $10,0 \pm 0,05$ mm x $0,70 \pm 0,05$ mm). En un lado del biochip PWG (6) se encontraba una capa guía de onda fina (9) de 155 nm de Ta_2O_5 (pentóxido de tantalio). La zona de medida del chip estaba compuesta por una zona cuadrada central de 10 mm x 6 mm. Paralelamente a esta zona de medida, se encuentra una banda falciforme de 500 μ m de ancho: la rejilla (7) para el acoplamiento de la luz de excitación. La exactitud de la colocación de la rejilla (7) con los lados ascendía a $\pm 0,05$ mm. La profundidad de rejilla ascendía a 18 nm y el periodo de rejilla a 318 nm, con un ciclo de trabajo de 0,5.

Sobre el biochip PWG (6) se aplicó una monocapa de dodecilsulfato como capa adhesiva (10). Sobre la capa adhesiva (10), se encontraban inmovilizados por adsorción/añadidos por goteo conjugados de micotoxina-BSA en forma de un inmunoensayo (12) en forma de filas de puntos paralelas a la rejilla óptica (matrices). Por encima y por debajo de cada fila de puntos de conjugados de micotoxina-BSA (inmunoensayo (12)), se encontraba una fila de puntos de BSA-fluoresceína (ensayo de control/puntos de referencia (11, 13)) (Fig. 1). La superficie libre entre el inmunoensayo (12) y el ensayo de control estaba bloqueada con BSA (14) (pasivación).

En la cámara de detección (5), los conjugados de micotoxina-anticuerpo, y eventualmente anticuerpos con sitios de unión libres, así como los anticuerpos para fluoresceína del inmunoensayo (12), acceden a los conjugados de analito-BSA o del ensayo de control (11, 13) inmovilizados sobre el biochip PWG (6). Los anticuerpos con sitios de unión libres formaban una unión específica con los correspondientes conjugados de analito-BSA inmovilizados.

Cuanto más anticuerpos con sitios de unión libres estaban presentes en la solución, es decir, cuanto menor proporción del correspondiente analito hubiera en el líquido de muestra,

más se unían los anticuerpos marcados con un colorante de fluorescencia sobre el biochip PWG. Los anticuerpos saturados con analitos en el líquido de muestra permanecían en solución.

Mediante el acoplamiento de radiación electromagnética con el biochip PWG (6), podían
5 excitarse para fluorescencia los anticuerpos unidos a los conjugados de analito-BSA inmovilizados y marcados con un colorante de fluorescencia en campo evanescente de la guía de onda. Los anticuerpos que se encontraban en solución y marcados con un colorante de fluorescencia no se excitaban en este sentido. De este modo, se conseguía una cuantificación indirecta de las micotoxinas contenidas en el líquido de muestra.

10 Mediante la división de la intensidad de fluorescencia del punto de micotoxina entre el valor medio de las intensidades de fluorescencia del punto de referencia, se obtuvo una intensidad de fluorescencia referenciada del punto de micotoxina.

La referencia cuantitativa entre las intensidades de fluorescencia referenciadas del punto de micotoxina y la concentración de una micotoxina en la solución que se ha pipeteado
15 en el cartucho se estableció mediante la toma de curvas de calibración. Las relaciones matemáticas resultantes se almacenaron en el ordenador del aparato de lectura.

Ejemplo 1

Fabricación de cartuchos para la determinación de desoxinivalenol (DON) en un biochip PWG

Se limpiaron 24 biochips PWG (Unaxis, Liechtenstein) de medidas exteriores 10 mm x
20 12 mm de apariencia vítrea con una capa (155 nm) de pentóxido de tantalio en la que se había inscrito una rejilla óptica (profundidad de rejilla 18 nm) y se recubrieron con dodecilsulfato. Con la ayuda de un dispensador de tipo Nanoplotter (Ge-SIM, Alemania), se aplicaron conjugados de desoxinivalenol y seroalbúmina bovina (DON-BSA, Biopure, Austria), así como conjugados de seroalbúmina bovina y fluoresceína (BSA-FITC, Sigma, Alemania) sobre el biochip. Los
25 puntos se aplicaron en forma de filas alternadas respectivamente de 16 puntos de conjugado

de BSA-FITC y puntos de conjugado de BSA-DON sobre el biochip PWG, de modo que las filas se dispusieran respectivamente de forma paralela a la rejilla óptica. Se dejaron secar los puntos y se trataron a continuación con una solución acuosa de BSA nebulizada. Se lavó el biochip PWG y se dejó secar a continuación. Se pegaron los biochips PWG a los cartuchos con
 5 cinta adhesiva de doble cara. Los cartuchos contenían una cámara de muestra para la toma de muestra, una cámara de reactivos con una almohadilla de fibra de vidrio y una cámara de detección para el biochip PWG. Las cámaras estaban unidas entre sí por canales. Se impregnó el material de fibra de vidrio con soluciones de concentraciones nanomolares de anticuerpos que estaban marcados con el colorante de fluorescencia DY-647 (Dyomics, Alemania),
 10 usándose anticuerpos monoclonales contra desoxinivalenol y fluoresceína. Se disolvieron los anticuerpos en un tampón que contenía PBS (= solución salina tamponada con fosfato), 0,1% de ovoalbúmina, 0,05% de Tween y 5% de sacarosa. Se secaron las almohadillas de reactivos obtenidas a vacío y a continuación se estamparon en los cartuchos. Se cerraron los cartuchos por ambos lados con láminas de cierre para impermeabilizar los canales.

15 Ejemplo 2

Toma de una curva patrón (curva de calibración) para la cuantificación de DON

Se prepararon soluciones de DON a concentraciones que alcanzaban de 0 a 6000 ppb y se rellenaron 17 cartuchos separados respectivamente con 200 µl de solución. Se cerraron los cartuchos y a continuación se incorporaron al aparato de lectura MyToLab (Bayer
 20 Technology Services, Alemania). Se ajustó el aparato de lectura de modo que la unidad de transporte interna del aparato transportara el líquido incorporado al cartucho en primer lugar a la almohadilla de reactivos y, después de 5 min de tiempo de preincubación, a la cámara de detección. Se mantuvo la temperatura constante a este respecto a 25°C. Después de 10 min de tiempo de incubación en la cámara de chip, se realizó el acoplamiento del láser con la rejilla
 25 óptica del biochip PWG. Se tomó una imagen de fluorescencia por cada biochip PWG individual

a un tiempo de integración de 2 a 3 s. Se dividieron las intensidades de fluorescencia obtenidas para cada punto de DON entre el valor medio de las intensidades de fluorescencia de los puntos de BSA-FITC situados por encima y por debajo del punto de DON respectivo. Se establecieron los valores medios de las intensidades de fluorescencia así referenciadas de los 16 puntos de DON. Se ajustaron las intensidades de fluorescencia referenciadas dependientes de la concentración obtenidas con la ayuda del programa informático Origin 7G (Origin Lab Corporation, EE.UU.) mediante un ajuste sigmoideo.

Ejemplo 3

Medida de DON en muestras de trigo contaminado artificialmente

Se molieron granos de trigo y se añadió a la harina resultante una cantidad conocida de una solución de DON, que se dejó secar. La muestra homogeneizada contenía 888 mg/kg (ppb) de DON. Se extrajeron 5 g de muestra de harina con 25 ml de metanol al 70% agitando intensamente durante 3 min. Se dejó sedimentar el extracto y se diluyó el sobrenadante con tampón en relación 1:3. Se rellenaron 7 distintos cartuchos con el extracto diluido. Se midieron los cartuchos a continuación como se describe anteriormente en el aparato de lectura MyToLab y se establecieron las intensidades de fluorescencia referenciadas de los puntos de DON. En relación con la curva patrón descrita anteriormente, se establecieron las concentraciones de DON, obteniéndose los valores de 1042, 757, 710, 660, 431, 728 y 984 ppb. El valor medio de la determinación de DON ascendió a 760 ppb con una desviación estándar porcentual de un 27%.

REIVINDICACIONES

1. Cartucho para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos en un líquido de muestra, que incluye un cuerpo estructurado en el que están incorporadas cavidades que están unidas entre sí por canales, presentando el cartucho al menos una entrada para la introducción
5 del líquido de muestra que contiene analitos, al menos una cámara de reactivos y al menos una cámara de detección, en el que
 - a. están ubicadas en forma seca en la cámara de reacción una o varias sondas de analito marcadas para la reacción con los analitos del líquido de muestra y una o varias sondas de referenciación marcadas para la reacción con un antígeno de referenciación,
 - 10 b. el suelo de la cámara de detección es una guía de onda de capa fina que comprende una primera capa ópticamente transparente (a) sobre una segunda capa ópticamente transparente (b) que presenta un índice de refracción menor que la capa (a), en la que en la capa (a) o (b) está incorporada una rejilla óptica que está orientada perpendicularmente a la ruta de una luz de excitación, que mediante la rejilla óptica se acopla en la guía de onda de
15 capa fina,
 - c. sobre la superficie de la guía de onda de capa fina están aplicados un inmunoensayo en forma de una colección de sustancias de asociados de unión para analitos y/o para sondas de analitos inmovilizados en filas de zonas de medida separadas espacialmente y un ensayo de control independiente que incluye el antígeno de referenciación inmovilizado y
 - 20 d. las filas respectivas están orientadas paralelamente a la rejilla óptica y se encuentra una fila de ensayo de control en la dirección de la luz de excitación por encima y por debajo de cada fila del inmunoensayo.
2. Cartucho según la reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno de referenciación
25 tiene un peso molecular similar al del analito, la sonda de referenciación presenta propiedades

de unión similares a las de la sonda de analito, el ensayo de control no muestra reactividad cruzada con el inmunoensayo y el antígeno de referenciación no aparece en la matriz investigada.

5 3. Cartucho según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las sondas de analito son anticuerpos.

4. Cartucho según la reivindicación 1 a 3, caracterizado porque los analitos son micotoxinas.

10

5. Cartuchos según la reivindicación 4, en los que en el ensayo de control el antígeno de referenciación es ≤ 1000 g/mol.

15 6. Cartucho según una de las reivindicaciones 4 o 5, en el que el antígeno de referenciación es fluoresceína.

7. Cartucho según una de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el inmunoensayo contiene conjugados de micotoxina-proteína y/o el ensayo de control conjugados de molécula de control-proteína.

20

8. Procedimiento para el análisis cuantitativo de analitos que comprende las siguientes etapas:

a. extracción opcional de los analitos de una matriz en un líquido de muestra,

b. realización del ensayo en el cartucho según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que

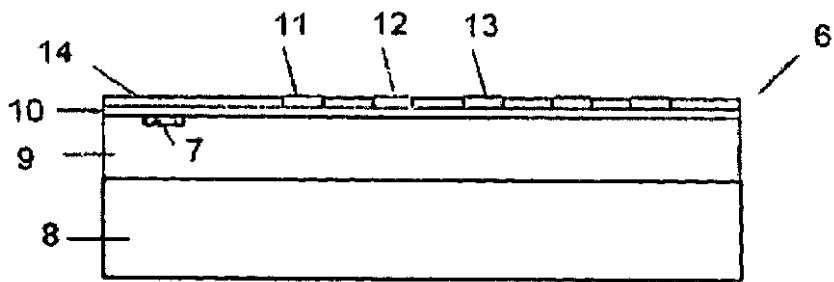
25 después de la introducción del líquido de muestra al cartucho, se transporta el líquido de

muestra a la cámara de reactivos y se mezcla o se hace reaccionar con las sondas marcadas allí aplicadas, y entonces

- c. transporte del líquido de muestra a la cámara de detección y reacción de los analitos y/o de las sondas marcadas con el inmunoensayo y ensayo de control, seguido de
 - 5 d. iluminación de la guía de onda de capa fina para la excitación de las sondas marcadas del inmunoensayo y del ensayo de control para la fluorescencia y toma de una imagen de fluorescencia, y entonces
 - e. cálculo de las intensidades de fluorescencia referenciadas del inmunoensayo mediante el ensayo de control, en el que la intensidad de fluorescencia referenciada de cada zona de
 - 10 medida del inmunoensayo se calcula mediante la división de la intensidad de fluorescencia de la zona de medida del inmunoensayo entre el valor medio de las intensidades de fluorescencia de las zonas de medida del ensayo de control adyacentes en la dirección de la luz de excitación, y
 - f. cálculo y visualización de los valores de analitos por referencia a una curva de
 - 15 calibración.
-
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el cartucho se termostatiza durante el procedimiento a una temperatura de 20 a 37°C.
 - 20 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 o 9, en el que la duración de la reacción asciende en la etapa b. a 1 a 20 min y/o la duración de la reacción en la etapa c. asciende a 1 a 100 min.
 11. Uso del cartucho según una de las reivindicaciones 1 a 7 y del procedimiento según una
 - 25 de las reivindicaciones 8 a 10 para la verificación y para el análisis cuantitativo de micotoxinas.

Dispositivo y procedimiento para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos, particularmente micotoxinas

Resumen



5

Fig. 3

La presente invención se refiere a un dispositivo y a un procedimiento para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos y a su uso para la verificación y para el análisis cuantitativo de micotoxinas.

27

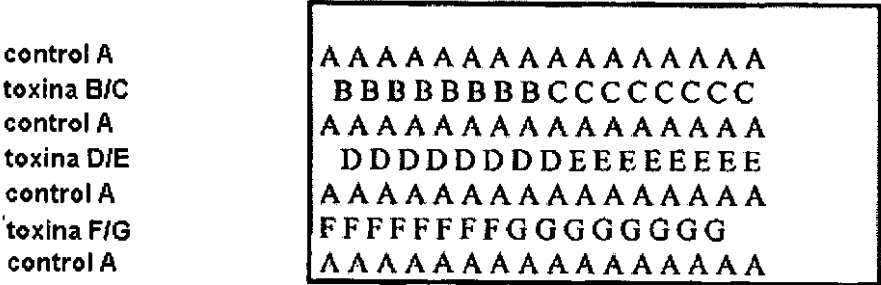


Fig. 1

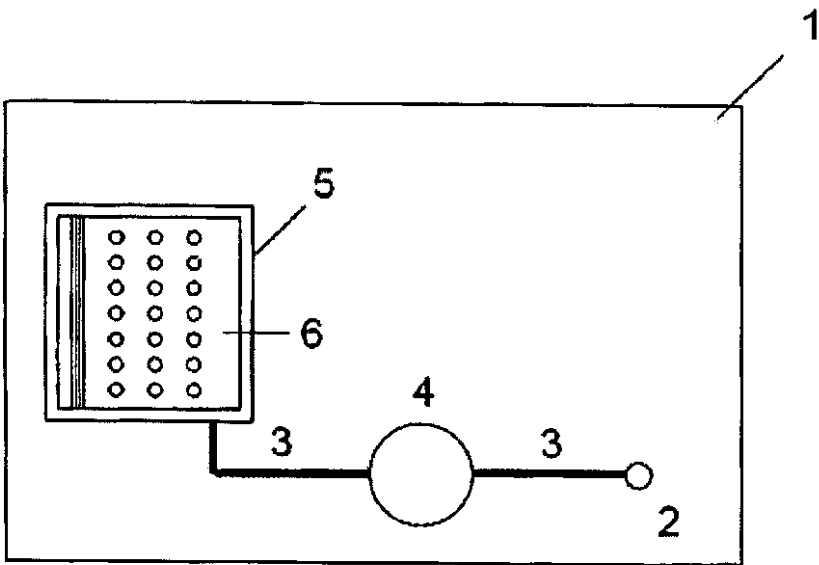


Fig. 2

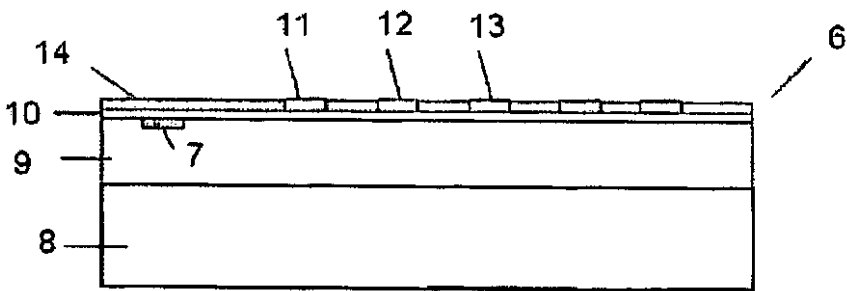


Fig. 3

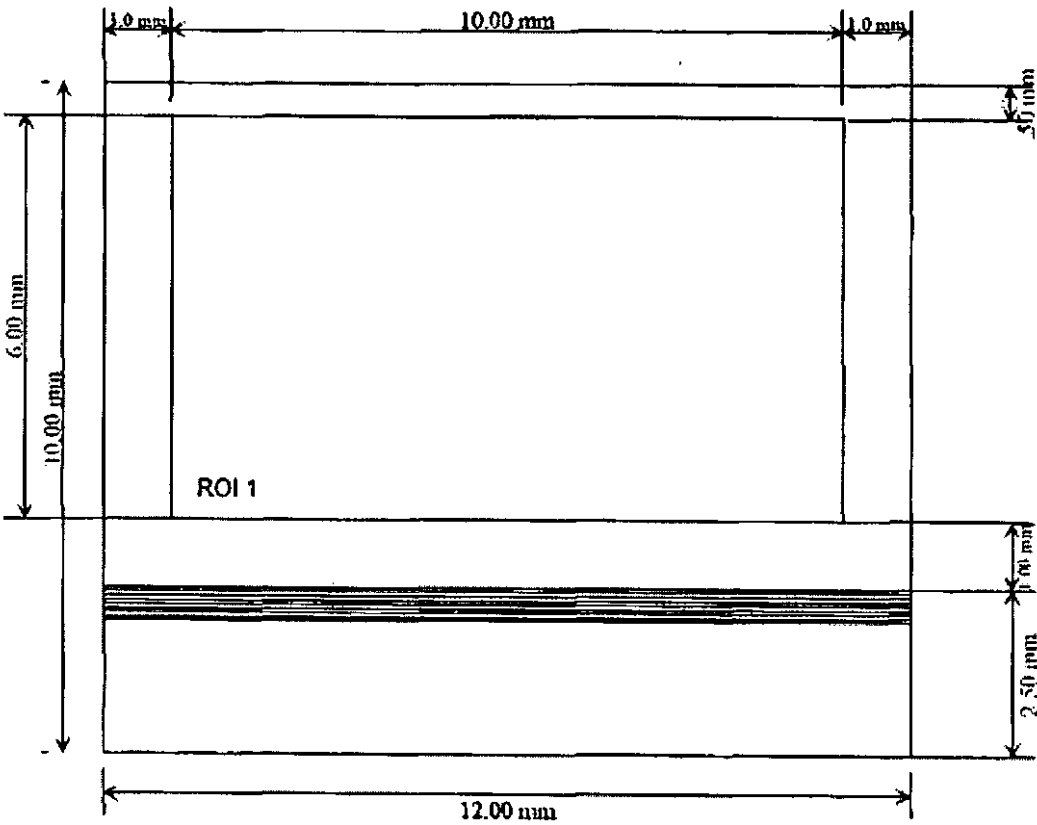


Fig. 4

PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante (s) **BAYER CROPSCIENCE AG**

(72) Inventor(es): **BURMEISTER, Jens; DORN, Ingmar; BAZILYANSKA, Viktoria; RACZEK, Ulrich**

(74) Apoderado: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		09157714.8		09/04/2009		EP

(85) Fecha inicio fase nacional: **09/11/2011**

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **26 - 03 - 10**
No. de solicitud **PCT/EP2010/001924**

(87) Publicación internacional
Fecha: **14 - 10 - 10** (dd/mm/aa)
N° publicación: **WO 2010/115530 A1**

(54) Título: **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA VERIFICACIÓN Y PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANALITOS, PARTICULARMENTE DE MICOTOXINAS**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional:			
(71) Solicitante(s): BAYER CROPSCIENCE AG			
(72) Inventor(es): BURMEISTER, Jens; DORN, Ingmar; BAZILYANSKA, Viktoria; RACZEK, Ulrich			
(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	09157714.8	09/04/2009	EP
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 09/11/2011		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 14 - 10 - 10	
Fecha de presentación de la solicitud: 26 - 03 - 10		No. Publicación: WO 2010/115530 A1	
No. de solicitud PCT/EP2010/001924			



(54) Título: **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA VERIFICACIÓN Y PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANALITOS, PARTICULARMENTE DE MICOTOXINAS**

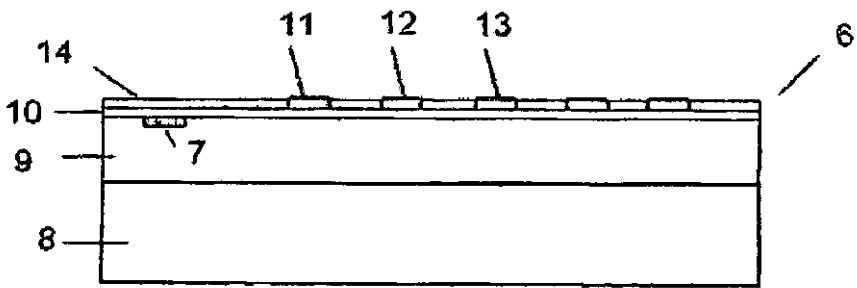
(57) Resumen: Cartucho para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos en un líquido de muestra, que incluye un cuerpo estructurado en el que están incorporadas cavidades que están unidas entre si por canales, presentando el cartucho al menos una entrada para la introducción del líquido de muestra que contiene analitos, al menos una cámara de reactivos y al menos una cámara de detección, y a su uso para la verificación y para el análisis cuantitativo de micotoxinas.

CONTINUA AL RESPALDO

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION			
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:		(51) Int Cl: (71) Solicitante(s)		BAYER CROPSCIENCE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 09157714.8	(32) Fecha 09/04/2009	(33) País EP	(72) Inventor(es)	BURMEISTER, Jens; DORN, Ingmar; BAZILYANSKA, Viktoria; RACZEK, Ulrich
				(74) Apoderado:	JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS
(85) Fecha límite inicio fase nacional:		09/11/2011		(87) Publicación Fecha:	Internacional Fecha (dd/mm/aa) 14 - 10 - 10
Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				N° publicación:	WO 2010/115530 A1
Fecha de presentación de la solicitud:		26 - 03 - 10			
No. de solicitud		PCT/EP2010/001924			
(54) Título: DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA VERIFICACIÓN Y PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANALITOS, PARTICULARMENTE DE MICOTOXINAS					

Resumen:

Cartucho para la verificación y para el análisis cuantitativo de analitos en un líquido de muestra, que incluye un cuerpo estructurado en el que están incorporadas cavidades que están unidas entre sí por canales, presentando el cartucho al menos una entrada para la introducción del líquido de muestra que contiene analitos, al menos una cámara de reactivos y al menos una cámara de detección, y a su uso para la verificación y para el análisis cuantitativo de micotoxinas.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0089940

Bogotá D.C., Septiembre 13 de 2011 - 13:23:30

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA

NI 800.020.909

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	406564325	13/09/2011	9.853.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja-Aplicado al Expediente No.

Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.
Marca: P071 E820101 001924
Expediente:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-132884- -00000-0000

Fecha: 2011-10-07 12:41:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 38

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 13 de 2011 - 13:23:37

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0070752

Bogotá D.C., Julio 22 de 2011 - 11:33:22

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA

NI 800.020.909

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444386670	22/07/2011	16.423.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Marca: Reivindicación Adicional

Expediente: 1257 / EP 2010 / 001924

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-132884-00000-0000

Fecha: 2011-10-07 12:41:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 38

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 22 de 2011 - 11:33:25



No. 11-132884- -00000-0000

Fecha: 2011-10-07 12:41:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 38

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO L

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐