

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de febrero de 2014 (06.02.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/019099 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01) G09F 3/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2012/000036

(22) Fecha de presentación internacional:
31 de julio de 2012 (31.07.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(72) Inventores; e

(71) Solicitantes : JAIME, Juan Carlos [AR/AR]; Calle San Jerónimo 167, Piso 2, Oficina "A", Córdova, X5000AGC (AR). SIMONETTA, Rubén [AR/AR]; Calle San Jerónimo 167, Piso 2, Oficina "A", Córdova, X5000AGC (AR). NARANJO, Mauricio [AR/AR]; Calle De Los Latinos, n° 6275, Córdova, X5000AGC (AR). LOPEZ, Joaquín [CL/CL]; Cirujano Guzman 70 depto 1505, Providencia, Santiago, 7500545 (CL).

BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(74) Mandatario: FLORES, José Miguel; Av. Presidente Riesco 5561, of. 1804, Las Condes, Santiago, 7561127 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING AND DETECTING A MARKER OF OBJECTS TO BE IDENTIFIED, RELATED MARKER, AUTHENTICATION METHOD AND VERIFICATION METHOD

(54) Título : PROCEDIMIENTO PARA OBTENER Y DETECTAR UN MARCADOR DE OBJETOS A IDENTIFICAR, EL MARCADOR, MÉTODO PARA LA AUTENTICACIÓN Y MÉTODO PARA LA VERIFICACIÓN

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining a marker of objects to be identified which includes at least one DNA fragment and, preferably, a plurality of polymorphous DNA fragments such as micro-satellites and single-base polymorphisms modified in the three-dimensional structure thereof, adsorbed on micro-encapsulated, metal nanoparticles which are active under Raman radiation. The invention also relates to said marker, to the method for detecting the marker, to the method for instantaneously authenticating the objects marked with the obtained marker, to the method for verifying the objects marked with the obtained marker, and to the method for adding a marker to an object to be identified.

(57) Resumen: Procedimiento para obtener un marcador de objetos a identificar que comprende al menos un fragmento de ADN y, preferentemente, una pluralidad de fragmentos polimórficos de ADN del tipo microsatélites y polimorfismo de una única base modificados en su estructura tridimensional, adsorbidos a nanopartículas metálicas y micro encapsulados que son activos a la radiación RAMAN. También se protege dicho marcador; el método de detección del marcador; el método para autenticar instantáneamente los objetos marcados con el marcador obtenido; el método para verificar los objetos marcados con el marcador obtenido y el método para incorporar un marcador a un objeto a identificar.

WO 2014/019099 A1

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER Y DETECTAR UN MARCADOR DE OBJETOS
A IDENTIFICAR, EL MARCADOR, MÉTODO PARA LA AUTENTICACIÓN Y
MÉTODO PARA LA VERIFICACIÓN

DESCRIPCIÓN

5

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología, específicamente de la biología molecular, el cual se refiere a un procedimiento para obtener un marcador de objetos a identificar que comprende al menos un fragmento
10 de ADN y, preferentemente, una pluralidad de fragmentos polimórficos de ADN del tipo microsatélites y polimorfismo de una única base modificados en su estructura tridimensional, adsorbidos a nanopartículas metálicas y micro encapsulados que son activos a la radiación RAMAN. Un método para realizar su detección/autenticación instantánea, y su posterior identificación por técnicas de biología molecular y un
15 sistema de seguridad compuesto por diez niveles.

También se protege el método de detección del marcador obtenido por el procedimiento señalado, el método para autenticar instantáneamente los objetos marcados con el marcador obtenido, el método para verificar los objetos marcados con el marcador obtenido y el método para incorporar un marcador a un objeto a
20 identificar.

Los componentes a los que se hace referencia podrán seleccionarse entre diversos equivalentes sin que ello implique apartarse de los principios de la invención establecidos en la presente documentación.

Antecedentes de la invención

25 Resulta permanente la búsqueda de elementos, disposiciones y mecanismos que otorguen mayor seguridad a las transacciones que habitualmente se realizan.

Desde tiempos remotos el hombre ha intentado evitar los robos, los engaños y las falsificaciones utilizando para ello documentos que, a poco de estar en el comercio, debieron modificarse para incorporar elementos que resultaran de difícil reproducción. Los lacres con figuras obtenidas a partir de distintos cuños de uso
5 reservado cumplieron las expectativas de las primeras épocas pero debieron prontamente modificarse los métodos de impresión así como los de incorporación de elementos de seguridad que los avances técnicos y la incipiente calidad de los equipos puestos a disposición del gran público han ido superando.

Al borrado de los valores de los cheques para rehacerlos por valores
10 superiores se les ha opuesto el marcado del papel.

La falsificación de papel moneda y documentación en general ha llevado a la adopción de papeles y tintas especiales, tintas ópticas, incorporación de elementos de seguridad en la pasta, protección con películas traslúcidas, etc.

Los inventores conocen la existencia de elementos que resultan propios de
15 cada una de las personas. Tal es el caso de las huellas digitales y tal es también, el caso del ADN.

En efecto, cada individuo posee un rastro biológico que resulta particular y que las técnicas actuales permiten identificar con prácticamente, certeza absoluta.

Si bien esto es así, no escapa al conocimiento de los inventores que la
20 incorporación del ADN completo de un ser vivo a un objeto para lograr una identificación positiva certera resultaría fácilmente aprovechada por los falsificadores ya que bastaría con estar cerca del poseedor de tal ADN para obtener una muestra del mismo.

En efecto, un cabello, la saliva depositada en una copa, una gota de
25 sangre y hasta una mota de piel serían suficientes para obtener el ADN necesario para agregarlo al objeto falsificado que, entonces, aparentará ser verdadero.

Esto ya ha sido previsto por los inventores en el documento 200020102319 AR que diera origen a las presentaciones US 10/307012 y EP 33801366 que se consideran el arte previo más cercano al tema que se desarrolla en la presente
30 documentación.

En efecto, teniendo en cuenta la posibilidad enunciada, los inventores han divulgado en los documentos citados que el objeto a identificar debería ser marcado con al menos un determinado fragmento polimórfico de ADN.

Al utilizar solamente un fragmento polimórfico de dicho ADN, al falsificador no le basta con conseguir el ADN completo, sino que deberá conocer cual es la fracción (o combinación de fracciones) del ADN utilizado. Considerando que se encuentra ante miles de millones de combinaciones posibles, resulta prácticamente imposible utilizar la combinación seleccionada por el usuario, obteniéndose en consecuencia, un marcador sumamente efectivo.

Si bien el marcador amparado por los documentos citados resulta sumamente efectivo, los inventores han considerado que la capacidad de procesamiento de los ordenadores permite realizar millones de operaciones por segundo incrementando las posibilidades de los falsificadores.

Los inventores conocen que, como se ha divulgado en los documentos citados, la detección de los fragmentos de ADN utilizados como marcador de objetos requiere de una infraestructura que no se encuentra a disposición de todos los laboratorios, de forma que una simplificación del método de detección de los fragmentos de ADN permitiría ampliar el uso de los marcadores de la clase que se preconiza. Además, como todo especialista en biología molecular sabe, aunque el laboratorio que quiera realizar la falsificación sea muy especializado en estas técnicas, este tipo de fragmentos polimórficos detallados en la presente invención (STR/SNP) NO PUEDEN DUPLICADOS SINO SE DETERMINA LA EXACTA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS Y LA DE LOS SITIOS VECINOS A LOS MISMOS (ya que los reactivos (primers) necesarios para realizar su detección se fabrican a partir de ese conocimiento.

Con tales observaciones realizadas sobre la materia divulgada, los inventores han determinado que resulta un objeto del presente invento el de obtener un marcador conformado a partir de fragmentos polimórficos del ADN de cualquier ser vivo existente en la naturaleza.

Ello implica que los fragmentos a utilizarse pueden obtenerse tanto de seres humanos como de animales y de plantas así como de microorganismos y virus.

Para la obtención del marcador que se divulga en la presente documentación, resulta ideal una combinación de fragmentos polimórficos del ADN obtenido de todas dichas especies.

5 Con el fin de realizar la detección instantánea por espectroscopia RAMAN y además aumentar el grado de complejidad que servirá para alejar la falsificación del marcador que se divulga, los inventores han procedido a modificar geométricamente la estructura tridimensional de dichos fragmentos polimórficos para luego adsorberlos sobre nano partículas metálicas.

10 Este mayor grado de complejidad evita que el falsificador descubra la estructura del marcador, máxime cuando la misma se integra con concentraciones relativas y absolutas de los STRs y SNPs utilizados.

Un segundo objetivo del presente invento es el de contar con un procedimiento y un aparato que permitan la detección y la autenticación instantánea, en tiempo real, de los objetos marcados.

15 Un tercer objetivo del presente invento es el de contar con un procedimiento compuesto por múltiples niveles de seguridad; niveles que un falsificador debería superar para poder reproducir el marcador.

El Acido Desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula en la que se encuentra almacenada la información genética de un individuo determinado.

20 Si bien la estructura geométrica tridimensional del ADN es la tan divulgada doble hélice, en cuya estructura tridimensional se puede observar un surco mayor y un surco menor. El primero de ellos es profundo y amplio mientras el surco menor es poco profundo y estrecho.

25 Es del conocimiento de los inventores que hay moléculas como las moléculas de las proteínas, que se unen a la parte interior de los surcos del ADN, mediante uniones específicas denominadas puentes de hidrógeno, y uniones no específicas conocidas como interacciones de Van der Waals así como otras interacciones electrostáticas generales.

En el caso de las proteínas, las mismas reconocen donantes y aceptores de puentes de hidrógeno y grupos metilo (hidrofóbicos), siendo éstos últimos exclusivos del surco mayor.

Hay cuatro patrones posibles de reconocimiento en el surco mayor, y sólo dos en el surco menor tal y como se ha representado en la Figura número 1.

Sabemos que algunas moléculas se unen al ADN por el surco mayor mientras otras lo hacen por el surco menor, en tanto que algunas otras se unen por ambos surcos.

En éste tercer caso, el evento desestabiliza la molécula de ADN.

10 Todos los seres vivos de una misma especie comparten muchas partes idénticas de ADN pero existen otras partes que son diferentes. Estas partes diferentes son los llamados "fragmentos polimórficos" que se definen como una de las dos o más formas (alelos) existentes en un locus cromosómico que difiere en una secuencia de nucleótidos o que tiene un número variable de repeticiones en tándem.

15 Los fragmentos polimórficos son millones, y hacen que cada ser vivo existente en la naturaleza sea único.

Estos sitios del ADN polimórfico pueden eventualmente utilizarse con propósito de identificación tal como ocurre en la ciencia forense.

20 Entre los fragmentos de ADN polimórfico, algunos presentan variaciones en tándem como los Minisatélites o VNTR y los Microsatélites o STRs, denominaciones que dependen de la longitud de las repeticiones de las variaciones en tándem mientras que otros fragmentos presentan variaciones de un solo nucleótido como son los denominados SNPs.

25 Cualquier fragmento de ADN polimórfico tiene dos variantes alélicas, cada una heredada de uno de los progenitores.

En el caso de los STRs, las variantes alélicas existen en promedio en un número que varía entre 7 y 15; mientras que los SNPs, sólo tienen dos variantes alélicas por locus.

Los SNPs, sin embargo, aun cuando tienen menor poder discriminatorio que los STRs, tienen la gran ventaja de estar presentes en el genoma en cantidades millonarias, siendo responsables de los caracteres fenotípicos de los seres vivos.

En resumen, cada ser vivo es único y es, en consecuencia, diferente de cualquier otro existente en el planeta. Esta diversidad en la naturaleza depende de los sitios polimórficos del ADN, tales y como los microsatélites (STRs) y polimorfismos de una única base (SNPs), ente otros.

En la documentación a la que se hiciera referencia, así como en la presente, se utilizan STRs o SNPs, por una parte por la viabilidad de ser analizados y detectados por métodos de amplificación por PCR y, por otra parte, porque hay millones para elegir entre todos los seres vivos que existen en la naturaleza.

Se ha dicho que es un objeto del presente invento la detección instantánea de los fragmentos polimórficos, para lo cual los inventores utilizan la técnica de espectroscopia Raman, y preferiblemente, SERS Raman (Surface enhanced Raman Spectroscopy) que provee uno de los más sensibles métodos de análisis cuantitativo y cualitativo no destructivo del material a analizar. La aparatología mencionada permite detectar por SERS Raman una solución de 0,9 nM (nanomolar) de STR/SNP, siendo el volumen mínimo de detección de 100 -150 fentolitros, conteniendo al menos 60 moléculas de STR.

Un espectro Raman es similar a un espectro infrarrojo y consiste en una longitud de onda cuya distribución de bandas se corresponde con las vibraciones moleculares específicas de la muestra que va a ser analizada.

Por tal causa cuando se analiza un espectro de emisión Raman se observa que los picos correspondientes a la longitud de onda son característicos de la estructura y composición química molecular de cada sustancia analizada, mientras que la intensidad de la luz Raman dispersada por las moléculas en la muestra, depende de la concentración de las mismas.

En la práctica, un espectroscopio Raman está compuesto por una fuente de luz, generalmente un láser, que es focalizado sobre la muestra generando una radiación dispersa inelástica, la cual es recolectada ópticamente y dirigida dentro de

un espectrofotómetro de selectiva longitud de onda, en donde el detector convierte la energía que imprimen los fotones en una señal de intensidad eléctrica. Con las técnicas de SERS se puede aumentar la señal de Raman en 10^6 a 10^{14} , por lo que es posible lograr una sensibilidad que permite la detección de una sola molécula.

5 Para lograr una máxima sensibilidad, se provoca la adsorción de los fragmentos polimórficos STRs y/o SNPs en nanopartículas de al menos un metal seleccionado entre oro, plata, platino y cobre, donde el tamaño de dichas nanopartículas oscila en un rango comprendido entre 5 y 200 nm. Este aumento de sensibilidad se logra debido a que las partículas metálicas forman una superficie
10 rugosa en el orden de los 10 nanómetros, que resulta pequeña comparada con la longitud de onda de la radiación incidente. El pequeño tamaño de las partículas (lo óptimo es de entre 50 a 100nm) permite la excitación del metal y aumenta la sensibilidad de detección del ADN adsorbido en su superficie.

 Se ha procedido a la compulsa de diversos documentos determinándose
15 que el documento número CN1302905 se refiere a un material antifalsificación conteniendo iones metálicos de ADN preparados por mezcla de una solución acuosa de una sal metálica soluble con alto poder de coordinación con una solución de ADN y alcohol para obtener un decantado de M-ADN soluble en agua con el agregado de gelatina, dextrina, la solución acuosa de un almidón soluble ó goma para el marcado
20 ó tinta para impresionar.

 El documento número US2008/0189066 se refiere al uso y modificaciones de un espectroscopio Raman para autenticar objetos que han sido marcados con distintos fragmentos de STR o de SNP.

 En el caso del documento citado precedentemente, se hace notar que los
25 fragmentos a detectar han sido obtenidos sin modificarlos, es decir, seleccionándolos tal y como se presentan en la naturaleza.

 El documento número US20030235836 se refiere al uso de fragmentos polimórficos STRs o SNPs micro encapsulados que son utilizados para marcar objetos que luego serán detectados en laboratorio con técnicas de biología molecular.

La patente US 20080189066 se refiere a un método y aparato de autenticación mediante espectroscopía de Raman, para autenticar artículos que tienen una marca de seguridad que contiene un fragmento de ADN para evitar el fraude utilizando un espectrómetro Raman. Los picos en el espectro Raman se detectan para generar datos de los picos de Raman como marca de seguridad. La seguridad de los datos de picos de Raman es comparada con una biblioteca de picos de Raman para determinar si existe una coincidencia.

Estas técnicas permiten una individualización instantánea que podemos denominar indirecta ya que se produce por detección de diversas sustancias químicas incorporadas en el medio de transporte.

Como sucede en el documento relativo a las modificaciones del espectroscopio Raman, los fragmentos polimórficos mencionados son obtenidos sin modificaciones.

Resumen de la Invención

El invento que se revela consiste en un procedimiento para obtener y detectar un marcador de objetos a identificar, el método para la autenticación instantánea de los objetos marcados y el método para la verificación de dichos objetos y el marcador obtenido con dicho procedimiento.

El presente invento consiste en un marcador de objetos a identificar que divulga la incorporación de al menos un fragmento polimórfico de ADN y, específicamente, la incorporación de una pluralidad de fragmentos polimórficos de ADN del tipo microsatélites (STR) y polimorfismo de una única base (SNP) modificados en su estructura molecular, adsorbidos a nanopartículas metálicas en los objetos a identificar para su posterior detección o autenticación en forma instantánea y su identificación por técnicas de biología molecular.

El invento comprende también **un procedimiento para obtener dicho marcador de objetos** que comprende un primer paso de selección de al menos un ser vivo para proceder a la extracción de ADN de cualquiera de sus células; un segundo paso de purificación del ADN obtenido; un tercer paso de amplificación de los fragmentos polimórficos del tipo microsatélites y/o polimorfismo de una base

única; un cuarto paso de determinación de las variantes alélicas del al menos un ser vivo elegido; un quinto paso de modificación de la estructura geométrica del al menos un fragmento polimórfico del tipo microsatélite y polimorfismo de una base única; un sexto paso de concentración y microencapsulado del ADN; un séptimo paso de solubilización de las microcápsulas conteniendo ADN; un octavo paso de determinación y/o corrección del grado de fluidez y concentración de la solución y un noveno paso de incorporación de la solución mediante un aplicador adecuado y marcación del objeto deseado.

El invento comprende asimismo un método para detectar en forma instantánea el marcador por SERS Raman de los fragmentos polimórficos utilizados.

También el invento comprende un método que incluye una primera etapa de validación o autenticación instantánea por comparación del espectro obtenido con los espectros almacenados en una base de datos y una segunda etapa de identificación de los fragmentos polimórficos utilizados en el laboratorio con técnicas de biología molecular que utilizan los pares de primers adecuados para amplificar dichos fragmentos STRs o SNPs empleados determinando las variantes alélicas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1, corresponde a un esquema de las diferentes modificaciones de la estructura tridimensional del ADN.

La Figura 2, corresponde a un esquema de ADN-nano tag. Se muestra la unión de partículas metálicas con el ADN forman agregados característicos formando una verdadera red molecular factible de ser detectada por SERS Raman.

La Figura 3, corresponde a un esquema de la representación del ADN unido a dendrímeros, los cuales forman estructuras tridimensionales con un espectro de Raman característico.

La Figura 4, corresponde a una representación esquemática de aptámeros de oligonucleótidos o péptidos que se unen a la molécula de ADN que forman estructuras tridimensionales con un espectro de Raman característico.

La Figura 5, corresponde a una representación de un agente intercalante en el ADN como el Bromuro de Etidio, los cuales afectan la estructura tridimensional del ADN y provocan cambios en el espectro de Raman.

5 La Figura 6, corresponde a un espectro de Raman del ADN intercalado con Bromuro de Etidio.

La Figura 7, es una representación esquemática de distintas proteínas que se unen a los surcos mayores y menores de la doble hélice de ADN, desestabilizando su estructura tridimensional y generando un espectro Raman característico.

10 La Figura 8, corresponde a complejos ADN-Metal divalente que producen agregados produciendo alteración en el espectro Raman entre $1300-1400\text{ cm}^{-1}$.

La Figura 9, corresponde a un espectro de emisión Raman, donde se observa que los picos correspondientes a la longitud de onda son característicos de la estructura y composición química molecular de cada sustancia analizada, mientras que la intensidad de la luz Raman dispersada por las moléculas en la muestra es
15 dependiente de la concentración de las mismas.

La Figura 10, corresponde a un diagrama de la utilización de ADN inter-especie como Tag anti falsificación.

La Figura 11, corresponde a un diagrama de la utilización de ADN personal como Tag anti falsificación.

20 La Figura 12, corresponde a un diagrama de la utilización de SNP Fenotípicos para autenticar pasaportes.

La Figura 13 A, muestra ADN extraído de la saliva de una persona y se amplifican los seis genes SNPs que se detallan.

25 La Figura 13 B, muestra el posible escenario hipotético para la determinación de color de ojos azules y marrones según las variantes genotípicas de estos seis SNPs.

La Figura 14, es una representación de la utilización de Microesferas con ADN polimórfico como tag anti-falsificación de billetes.

Descripción detallada de la invención

Una vez establecidos los componentes del invento, así como la secuencia de pasos desarrollados para explicar su naturaleza, se los complementa seguidamente con la relación funcional y operativa de los mismos y del resultado que proporcionan.

Con el objeto de contar con un marcador de objetos a identificar que constituya un medio seguro para proteger objetos de valor, y su detección instantánea, el presente invento propugna un compuesto químico que pueda ser utilizado como marcador y un procedimiento mediante el cual se obtenga dicho marcador y donde la incorporación del mismo a un objeto permita la individualización y validación de dicho objeto.

Preferentemente, los inventores han considerado que dicho marcador deberá ser un compuesto químico que pueda ser detectado con posterioridad pero únicamente por las personas que conocen su estructura y utilicen un espectroscopio Raman o bien en el caso de desconocer la estructura, aquellos que utilicen un espectroscopio Raman asociado a una base de datos en donde la estructura del fragmento polimórfico esté almacenada y codificada.

Dentro de todos los compuestos químicos que pueden utilizarse y conforme las explicaciones que se divulgan en la presente documentación, los inventores prefieren utilizar el ácido desoxirribonucleico (ADN) como marcador de los objetos a identificar.

Preferentemente dicho marcador de los objetos a identificar, consiste en al menos un fragmento polimórfico de ADN.

Con relación al procedimiento para incorporar el marcador consistente en al menos un fragmento polimórfico de ADN en los objetos a identificar, el presente invento comprende una pluralidad de pasos donde en un primer paso se procede a seleccionar al menos un ser viviente para proceder a la extracción del ADN que se habrá de utilizar.

La utilización como marcador de al menos un fragmento polimórfico de ADN de un ser viviente que propugnan los inventores, debe ser interpretada en un

sentido amplio, es decir que quien tome la decisión de realizar la marcación de un objeto, podrá seleccionarse a sí mismo como donante del ó de los fragmentos de ADN ó podrá seleccionar a cualquier ser viviente, ya sea de origen animal, vegetal, humano, bacteria y/o virus, por lo cual se reduce aún más la posibilidad de falsificar el
5 marcador.

La extracción del ADN se realiza a partir de células o fluidos corporales obtenidos por técnicas comunes tal y como resultan, por ejemplo, el hisopado bucal, la punción sanguínea, la recolección de muestras epiteliales o folículos pilosos, etc.

En un segundo paso se libera el ADN obtenido en una solución compuesta
10 por Tris-HCl 10 mM – EDTA 0,1 mM, SDS al 20% (peso/ volumen) y Proteinasa K 10 mgr/ml., para proceder luego a la purificación en medio de Fenol/Cloroformo – 10:9 (volumen/volumen).

En un tercer paso se amplifican STRs y/o SNPs por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa tal y como se preconiza en las patentes norteamericanas
15 números 4683195; 4683202 y 4800159. La mezcla que se coloca en un termociclador, comprende la muestra de ADN en una concentración de entre 6 pgr y 0,05 pgr; una solución Buffer de PCR 10X, dNTP 10X, oligonucleótidos que flanquean la región polimórfica 10X de cada uno y Taq polimerasa de 5000 unidades por ml.

En un cuarto paso se determinan las variantes alélicas del o de los
20 fragmentos polimórficos elegidos en un secuenciador automático tipo ABI PRISM 310 – Applied Biosystem o superior.

En un quinto paso y debido a que las moléculas de ADN tienen un único espectro Raman porque están formadas por los mismos cuatro nucleótidos, se procede a modificar la estructura tridimensional del o de los fragmentos polimórficos
25 STRs o SNPs para posteriormente obtener una adsorción a nanopartículas de al menos un metal seleccionado entre oro, plata, platino y cobre; al mismo tiempo que se van formando a partir de la reducción de sus cationes cuando se aplica el método de Lee and Meisel (J. PHYS. CHEM. 86:3391- 3395, 1982) las nanopartículas metálicas tienen un tamaño de entre 5 y 200 nm.

La estructura tridimensional del ADN puede ser modificada a partir de las tres estructuras que se conocen en la naturaleza A-ADN, B-ADN y Z-ADN y sus otras conformaciones posibles como C-ADN, D-ADN, E-ADN, L-ADN, P-ADN, S-ADN, etc., así como el H-ADN de triple cadenas y el ADN-G4 o ADN cuádruples. Es de destacar que muchas de las conformaciones que posee el ADN son debidas a la cantidad de G-C que poseen en su secuencia nucleotídica, siendo esta característica la usada en el presente desarrollo para obtener una firma espectrográfica Raman única y específica para los fragmentos polimórficos usados para marcar objetos, agregando de esta manera un nivel de seguridad adicional a la propia identificación de los fragmentos polimórficos STRs o SNPs evitando así su reproducción por un posible falsificador.

Los inventores saben que hay múltiples formas de modificar la estructura tridimensional del ADN por lo que el procedimiento que se describe ha sido realizado mediante alguno de los siguientes métodos:

a.-Las nanopartículas metálicas con el ADN adsorbido que son incorporadas como marcador, permiten aumentar la señal de SERS Raman entre 10^6 y 10^{14} veces y pueden ser agregadas en forma individual o en forma de coloides produciendo agregados como dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. con las moléculas de ADN. Esta propiedad se ve potenciada cuando a las nanopartículas metálicas se agrega al menos un grupo de unión tal y como por ejemplo un polímero seleccionado entre fenilacetileno, politetrafluoretileno, polipropileno, poliacrilamida, etc.; tal y como se ha representado en Figura 2.

También el grupo de unión puede ser seleccionado entre otros tipos de moléculas como silanos, alcanos o sus derivados que se unen a las moléculas de ADN formando agregados característicos que conforman una verdadera red molecular que se detecta como una señal espectrográfica Raman única.

b.-La estructura puede ser modificada asimismo con complejos ADN - dendrimeros del tipo PAMAM o similar que forman una estructura tridimensional característica dando un espectro Raman único tal y como lo describe Caminade A.M, en "Characterization of dendrimers", Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 2130-2146, 2005; tal y como se ha representado en Figura 3.

c.-Otra forma de modificación se realiza a partir de la unión covalente de los fragmentos polimórficos con ADN sintético del tipo PNAs (peptide nucleic acid). En efecto, los PNAs son un tipo de poliamidas análogas al ADN con unidades monoméricas de Adenina, Guanina, Tiamina y Citosina en donde las uniones de azúcar correspondientes a un oligonucleótido son reemplazadas por uniones amida. Los compuestos PNAs, descubiertos por Nielsen (Science, 254:1497-15; 1991) se pueden conseguir de empresas como PE Biosystem (Foster City, California); tal y como se ha representado en Figura 4.

d.-Otro grupo de unión que puede utilizarse surge de la unión de fragmentos polimórficos a "aptámeros" resultando éstos últimos una especie de ADN creado a través de repetidos ciclos de selección in vitro. El proceso denominado SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) consiste en producir ciclos repetitivos de exposición de un potencial aptámero (ligando de ADN) al fragmento polimórfico STR o SNP, permitiendo que ocurra la unión para luego separar el ADN libre de ligandos y simplificar éstos para repetir el proceso de unión. Después de un número de ciclos, los aptámeros exhiben alta afinidad y especificidad y preservan el ADN contra los fragmentos polimórficos usados como blanco. Como los aptámeros están compuestos por oligonucleótidos se pueden incorporar fácilmente a los fragmentos STRs o SNPs; tal y como se ha representado en Figura

5.

Para éste caso, los métodos de preparación de aptámeros son bien conocidos en patentes como US 5.270163, US.5.567588, US.5.670637 y US.5.843653.

e.-Los agentes intercalantes se encajan entre las bases a lo largo del ADN de forma que las moléculas intercaladas de dichos agentes afectan la estructura del ADN produciendo cambios en la torsión de la doble hélice en el sitio de intercalación, sitio que, en la mayoría de los agentes intercalantes, resulta una secuencia G-C.

Como ejemplo de agentes intercalantes podemos citar al Bromuro de Etidio, adriamicyn, 9-aminoacridine (9AA) y proflavine (PF) (3,6-diaminoacridine) bien descritos por James M. Benevides en "Mechanisms of drugs - DNA recognition distinguished by Raman spectroscopy" Journal of Raman Spectroscopy-Vol 39 Pag. 1627-1624 entre otros; tal y como se ha representado en Figura 6.

f.-Otro grupo de unión que permite la vinculación de la proteína con los surcos mayores y menores del ADN, principalmente utiliza alguna droga que interaccione tanto con el surco menor como con el surco mayor ya que es allí cuando se produce precipitación o agregación cambiando la estructura tridimensional del ADN. Ejemplos de éste tipo de drogas son la Spermina que interacciona con el surco mayor y la Spermidina, putrescina, Hoechst 33258, Netropsin, Pentamidine, etc. Entre otras que reaccionan con el surco menor.

Un detalle de cada droga que interacciona con los surcos mayores y menores del ADN puede verse en "NBD Atlax index NMR drug –DNA complexes". La interacción de estas drogas con los surcos mayores y menores del ADN está directamente relacionada con la cantidad de A-T, por lo tanto de la secuencia de cada fracción de STR o SNP se puede obtener un espectro característico del fragmento polimórfico usado para marcar el objeto; tal y como se ha representado en Figura 7.

g.-Existen complejos DNA- metal divalentes como Sr^{+2} , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} y Cd^{+2} , que producen variaciones entre 1300-1400 cm^{-1} formando agregados ya que reaccionan con el fosfato y/o con las bases nitrogenadas, desestabilizando la doble hélice por ruptura de los puentes de hidrógeno axial como lo describe J.G. Duguid en su trabajo "Raman Spectroscopy of DNA-Metal Complexes" (Biophysical Journal Volume 69 Dic.1995- Pag 2623-2641; tal y como se ha representado en Figura 8.

En el sexto paso se procede al concentrado por ultracentrifugación para lo cual se utilizan microconcentradores del tipo del Centricon 100; posteriormente y a fin de evitar la degradación, se microencapsulan los fragmentos polimórficos mediante la técnica de inversión de fase. Es en este paso donde el ADN polimórfico a ser microencapsulado se disuelve en un solvente, para luego y en el mismo solvente, pasar a disolver un polímero agregado con una concentración de entre 0,25% y 10% peso/volumen. Este polímero utilizado puede ser seleccionado, indistintamente entre aquellos biodegradables y los no biodegradables.

Dentro de los primeros resultan preferidos aquellos tales como los ácidos láctico y glicólico y ésteres tales como polianhídridos, poliuretanos, el poliácido butírico, el poliácido valerino, etc.

Por su parte, dentro de los polímeros no biodegradables resultan de utilización preferida el acetato de viniletileno y el poliácido acrílico, resultando también aceptable el empleo de poliamidas y copolímeros, así como sus mezclas. Los polímeros utilizados también pueden seleccionarse entre los naturales, en cuyo caso resulta preferido el empleo de al menos uno de entre el grupo que comprende dextrán, celulosa, colágeno, albúmina, caseína, o los similares.

La mezcla resultante es posteriormente introducida en un no solvente en una relación solvente/no solvente de al menos 1/40 y hasta 4/200 para obtener la formación espontánea de microcápsulas. En este paso, el solvente es un solvente orgánico seleccionado entre cloroformo y cloruro de metileno, mientras que los no solventes que resultan preferidos son el etanol y el hexano.

Adicionalmente, para enmascarar el o los fragmentos polimórficos de ADN seleccionados y dificultar aún más la falsificación del correspondiente marcador, se pueden incorporar otros fragmentos de ADN distintos a los elegidos.

En un séptimo paso se procede a solubilizar las microesferas de ADN o el ADN microencapsulado en una solución neutra a la detección por espectroscopia Raman.

Con el fin de enmascarar el espectro Raman del o los fragmentos polimórficos de ADN seleccionados y dificultar aún más la falsificación del correspondiente marcador, se puede usar una mezcla de sustancias orgánicas que siendo Raman activas, no influyan en el espectro emitido por los fragmentos polimórficos, obteniendo en teoría un millón de espectros únicos y característicos de las mismas en un rango de emisión de entre 500 y 2000 cm^{-1} . Estas sustancias están bien descritas en la patente US 20060234248.

Las microesferas con el o los fragmentos polimórficos pueden estar solubilizadas en distintas variedades de tinta, tal y como tinta flexográfica, tinta litográfica, tinta serigráfica, tinta de huecograbado, tinta reactiva moneda, tinta borrable, tinta reactiva de bolígrafo, tinta de reacción al calor, tinta visible al infrarrojo, tintas variables óptimamente, tintas penetrantes, tintas fotocromáticas, tinta reactiva a disolvente químico y al agua.

En un octavo paso se procede a determinar y en su caso a corregir el grado de fluidez y concentración de la solución que debe ser apropiada para posibilitar su aplicación en los objetos a marcar.

Se ha estimado que el grado de fluidez debe permitir que el aplicador
5 deposite una solución con una concentración de entre 6 pg y 10 pg de marcador por mm² de superficie.

Por último, en el noveno paso, el marcador se incorpora a un aplicador que puede ser seleccionado entre una lapicera de pluma, microfibra, bolígrafo, diversos tipos de filtros, atomizador, instrumento de dibujo, pincel, sello o bien una máquina
10 automática tal como una impresora electrofotográfica del tipo chorro de tinta o máquina de litografía offset, letterpress, huecograbado, xerografía, serigrafía y sistemas de impresión textil o similar, etc.

En una alternativa de realización se emplea un medio intermediario entre la solución conteniendo el marcador y el objeto a marcar, en cuyo caso, dicho medio
15 intermediario se embebe en dicha solución.

El medio intermediario puede seleccionarse entre diversas sustancias, tales como nitrocelulosa, papel, madera, cartón, material plástico, nylon cargado, tela, sustancias orgánicas en forma de gotitas o gel, inorgánicas, etc.

Una vez seleccionado el aplicador, se procede a la marcación de los
20 objetos designados.

El invento comprende asimismo un **método de detección del marcador** a partir de la detección de los fragmentos de ADN polimórficos que se incluyen en el marcador aplicado mediante un método adecuado para la detección de nucleótidos, entre los cuales se incluyen pero no se limitan a: Normal Raman scattering,
25 Resonance Raman scattering, surface enhanced Raman scattering, surface enhanced resonance Raman scattering, coherent anti-Stokes Raman spectroscopy (CARS), stimulated Raman scattering, inverse Raman spectroscopy, stimulated gain Raman spectroscopy, hyper-Raman scattering, molecular optical laser examiner (MOLE) or Raman microprobe or Raman microscopy or confocal Raman
30 microspectrometry, three-dimensional or scanning Raman, Raman saturación

spectroscopy, time resolved resonance Raman, Raman decoupling spectroscopy or UV-Raman microscopy.

El espectrómetro Raman usado para generar el espectro del fragmento polimórfico presente en el objeto marcado, puede ser de escritorio o portátil, con un
5 laser cuya longitud de onda esta comprendida en el rango de **400 a 1200 nm**, con voltaje variable; preferentemente en la presente invención se han utilizado detectores Raman portátiles de 633 y de 785 nm, siendo ilustrativo pero no limitante a aparatos de otras características; tal y como se ha representado en Figura 9.

El invento comprende asimismo un método para validación que comprende
10 una primera etapa de suprimir la fluorescencia característica del ADN; una segunda etapa de comparación de los valores superior e inferior de la intensidad de los picos obtenidos en el espectro emitido por los ADN polimórficos con los valores de referencia límite que previamente se almacenaron en una biblioteca de espectros, dando una respuesta de autenticación instantánea ya sea por positivo o negativo.

En relación con dicha primera etapa y con la utilización y funcionamiento
15 del espectrógrafo Raman utilizado, la supresión de la fluorescencia se logra con una serie de pasos que comprenden un paso de determinación de un valor medio de intensidad en los datos del espectro obtenido dentro de una sección en torno a cada punto de la marca de dicho espectro de respuesta y un paso de restar dicho valor
20 medio de cada uno de los puntos que produjo el ADN utilizado como marcador.

Por su parte dicha segunda etapa comprende un paso de comparación de
los datos de los picos Raman obtenidos, con los datos de los picos Raman almacenados en la base de datos y un paso de comparación de los números de
onda e intensidad de cada pico, con los datos espectrográficos almacenados en la ya
25 mencionada base de datos.

Dichos datos almacenados corresponden al espectro de cada uno de los fragmentos polimórficos STRs o SNP que hayan sido utilizados para marcar el objeto.

Es de conocimiento de los inventores que las longitudes de onda en un
espectro de emisión Raman son características de la composición química y
30 estructura de las moléculas en una muestra, mientras que la intensidad de la luz

dispersa es dependiente de la concentración de moléculas en la muestra. Es por ello que en el presente desarrollo se utilizan concentraciones variables a partir de 0,9 nM (nanomolar) de los fragmentos polimórficos STR o SNP que es el límite de detección de SERS Raman, creando de ésta manera un nuevo nivel de seguridad ya que el posible falsificador deberá conocer también la concentración del o de los fragmentos polimórficos para reproducir el espectro emitido por el objeto marcado.

Los valores detectados del espectro Raman emitido por los fragmentos polimórficos pueden ser enviados a través de un sistema de telecomunicación, una línea telefónica analógica, una línea telefónica digital, un teléfono celular y/o un equipo unido a una red de datos entre otros.

Una vez detectado y autenticado el objeto marcado se procede a la identificación del o de los fragmentos polimórficos de STRs o SNPs tipificando los mismos preferentemente por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para ello es absolutamente necesario en una primera instancia conocer el nombre de los mismos para poder utilizar los reactivos y condiciones de amplificación adecuadas para realizar el análisis correspondiente.

Es por ello importante mencionar que a cada fragmento usado para marcar el objeto, los inventores lo relacionaron a un número de código existente en los bancos de genes, la combinación de los fragmentos polimórficos STRs o SNPs usados crea un único código, equivalente a un número de PIN, que se corresponde con el sitio exacto, dentro de los miles de sitios polimórficos del genoma del o los seres vivos.

Y es el poseedor de dicho código el dueño mismo del objeto marcado.

En caso de haber algún tipo de controversia se puede revelar a cuál de todos los fragmentos corresponde cada uno de los números de PIN y cualquier laboratorio de biología molecular del mundo podrá corroborar la existencia del mismo, en forma independiente de quien haya sido el proveedor del o los fragmentos mencionados.

De esta manera, en caso de controversia, se garantiza el derecho de todas las partes ya que es posible reproducir la prueba concerniente a la identidad del

objeto marcado en forma independiente, en cualquier lugar del mundo y todas las veces que resulte necesario.

Una vez conocido el nombre del fragmento polimórfico utilizado, la tipificación se realiza por el método de Reacción en Cadena de la polimerasa aunque también podrá llevarse a cabo mediante procedimientos y técnicas que resultan habituales en el arte previo tal como el empleo de geles como propugna J. M. Robertson (1994); electroforesis capilar según Mc. Cord (1993); detección por hibridización múltiple o capilaridad múltiple propuesta por Y. Wang (1995), mediante el uso de microchips como establece Woolley (1996); por espectrometría de masa según Becker (1997); etc. A su vez, podrán detectarse los polimorfismos de una sola base por medio de un análisis conformacional de cadena única como demuestran Orita y otros (1989); oligonucleótido alelo específico como indican Landeegren y otros (1988); múltiple extensión de primer según Syvanen y otros (1990) o bien por cualquiera de otras tecnologías entre las que pueden mencionarse las de chips, espectrometría de masa, etc.

Adicionalmente, los inventores conocen que los SNPs son responsables de los caracteres fenotípicos de los seres vivos, por lo que se incluye en la presente invención un procedimiento con los mismos doce pasos mencionados, en donde los únicos marcadores genéticos polimórfico utilizado son los SNPs y específicamente aquellos que son responsables de caracteres fenotípicos que sirven para individualizar al ser vivo o a algún producto derivado de los mismos por Ej. Se puede marcar un vino con los SNPs que le dan color, olor o gusto, o bien en un pasaporte se puede colocar una gota con todos los fragmentos de SNPs responsables de los caracteres fenotípicos de una persona, como color de ojos, pelos, color de piel etc. Creando, luego ser detectada por SERS Raman y digitalizada una "foto genética" que es posible de cotejar con la persona que posee el pasaporte. Por Ejemplo variantes en el SNP SLC24A4, están asociadas con el color de ojos y pelos, una variante cercana a KITLG esta asociada al color de pelo, dos variantes de TYR están asociadas al color de ojos y pecas, una variante en 6p 25,3 está asociado con pecas, el color de ojos azules fue encontrado en tres SNPs variantes del OCA2 así como los distintos tonos del color piel están relacionados con la región 5' proximal del control regulatorio del OCA2. Distintos autores están investigando y encontrando cada vez mas cantidad de genes relacionados a los caracteres fenotípicos entre los

que podemos citar a Sulen, P, Gudbjartsson en "Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans" Nat. Gen 2007 Dec:39(12):1415, y Duffy DL en "A three SNP haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye color variation" entre otros; tal y como se ha representado en Figura 12 y 13 A y 13 B.

5 Con el marcador divulgado en la presente documentación pueden marcarse e identificarse con absoluta certeza innumerables objetos tales como pinturas, esculturas, insumos del deporte, obras de arte, artesanías, videocasetes, grabadores, televisores y cualquier objeto del hogar, también computadoras, impresoras, software, elementos de oficina y equipamientos de negocios.

10 Asimismo se podrán identificar perfumes, ropas, carteras, portafolios, cajas de diferentes productos, blister de medicamentos, medicamentos, partes de automóviles, aeroplanos, bicicletas, certificados de acciones, billetes de avión, entradas de reclamo de equipaje, controles, instrumentos negociables, papeles comerciales, documentos legales, testamentos, escrituras de propiedad, contratos,
15 fideicomisos, arrendamientos, cesiones, servidumbres, documentos postales, sellos, bonos, tarjetas de identificación, certificados de nacimiento, licencias de conducir, facturas de envío, etiquetas, formularios médicos, historias clínicas, prescripciones, obras de arte originales, valiosos sellos, documentos bancarios, tarjetas de crédito, autorizaciones de tarjetas de crédito, facturas, notas, permisos, autorizaciones,
20 solicitudes, y declaraciones de impuestos, billetes, papel moneda, cheques, documentos notariales, cédulas de identificación, licencias de conducir, pasaportes, visas, tarjetas de crédito, de teléfonos y objetos similares tales como títulos académicos, inventarios, billetes de lotería y otros juegos de azar, etc.

 El presente invento proporciona diversas complejidades destinadas a evitar
25 la falsificación de los objetos marcados. Las mismas presentan los siguientes niveles de seguridad:

Primer Nivel: Consiste en la determinación de la estructura química del polímero. Para que un falsificador analice la composición del o de los fragmentos polimórficos utilizados para marcar el objeto, debe en una primera instancia, conocer
30 la estructura del polímero usado para microencapsular dichos fragmentos a fin de lograr la apertura del mismo sin alterar el ADN en su interior.

Segundo Nivel: Consiste en la identificación del fragmento polimórfico. En caso que el falsificador pase el primer nivel, para identificar el o los fragmentos polimórficos utilizados para marcar el objeto debe usar la técnica de mayor sensibilidad de detección que es la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo cual debe conocer el nombre del o de los fragmentos polimórficos STRs o SNPs a los fines de identificar su secuencia y, en consecuencia los pares de primers necesarios así como las condiciones de reacción adecuadas para lograr la amplificación de los mismos.

Si bien podría pensarse que se podría utilizar el método de la clonación del o de los fragmentos polimórficos, ello no resulta posible lograrlo debido a que, por una parte, dichos fragmentos polimórficos han sido modificados y, por otra parte, las concentraciones que se utilizan en el presente desarrollo lo impiden.

Tercer Nivel: Consiste en la tipificación del o de los fragmentos polimórficos, ya que suponiendo que el falsificador ha conseguido evadir los niveles anteriores deberá conocer también las variantes alélicas de cada uno de los fragmentos polimórficos para reproducir con exactitud aquellas usados para marcar el objeto.

Cuarto Nivel: Consiste en trabajar con una concentración de los marcadores que se condice con el limite inferior de los fragmentos polimórficos de STR o SNP utilizados para imposibilitar el uso de la técnica de clonado molecular.

Quinto Nivel: Consiste en la modificación de la estructura tridimensional de la molécula de ADN utilizando una o una combinación de conformaciones tridimensionales de dicha molécula, dificultando al falsificador revertir el proceso si no tiene conocimiento de la modificación producida en la estructura.

Sexto Nivel: Consiste en el enmascaramiento de los marcadores con distintos fragmentos de ADN de forma que el falsificador debe conocer cual o cuales de los fragmentos identificados por él se han usado para marcar el objeto. Con esa intención, a la combinación de fragmentos polimórficos utilizada para crear ese código único se agregan otros fragmentos de ADN distintos de los elegidos.

Séptimo Nivel: La utilización del espectro Raman de fragmentos polimórficos modificados determina que el falsificador debe conocer cual o cuales son los picos de longitudes de onda correspondientes a los fragmentos polimórficos cuya estructura tridimensional de la molécula de ADN han sido modificados.

5 **Octavo Nivel:** Consiste en el enmascaramiento de los espectros Raman de los marcadores con distintos espectros de sustancias Raman activas y determina que aun cuando el falsificador obtenga por metodología SERS Raman un espectro de emisión deberá distinguir cuales son los picos correspondientes a los fragmentos de ADN polimórficos usados para generar ese código único o PIN y los correspondientes
10 a las sustancias químicas Raman activas que se agregan para enmascarar los correspondientes a los restantes fragmentos de ADN.

Noveno Nivel: Consiste en la codificación de la base de datos para que, superados los niveles anteriores, el falsificador deba decodificarlos para interpretarlos y aplicar los espectros de respuestas.

15 **Décimo Nivel:** Consiste en la variación de la concentración relativa de cada fragmento polimórfico, de forma que la autenticación se realiza mediante la comparación entre los valores superior e inferior de la intensidad de los picos obtenidos en el espectro emitido por los ADN polimórficos con los valores límite que previamente se almacenaron en una base de datos de espectros de respuesta.
20 Como los valores correspondientes a la intensidad en un espectro Raman están directamente relacionados con la concentración de cada fragmento polimórfico de STRs o SNPs usados para marcar, el falsificador debería detectar cuál es la concentración relativa de cada fragmento polimórfico utilizado en los marcadores.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

25 Se completa dicha descripción con diversos ejemplos que han sido llevados a la práctica que permiten contar con un todo con fines ejemplificativos que persiguen una función puramente demostrativa pero en ningún caso limitativa de la invención.

De esta forma se ha reseñado una de las posibles secuencias de etapas que llevan a concretar el invento y la manera en que el mismo funciona, y se complementa la

documentación con la síntesis de la invención contenida en las cláusulas reivindicatorias que se agregan a continuación.

Ejemplo 1. Utilización de ADN inter-especies como Tag anti-falsificación

Se forma una molécula de ADN que no existe en la naturaleza. Para lograrlo se
5 amplifica 6 pg. de ADN extraído del gen del maíz ZmZ1P5, el gen Humano D13S317
y el gen canino ZUBECA6, Se determinan la variantes alélicas de cada uno de ellos
usando un secuenciador ABI PRISM 310 de Applied Biosystem. Al producto final de
PCR se lo mezcla con una solución final de 0,25 M de átomos de Plata según la
técnica descrita por Lee. Posteriormente se micro encapsuló en poliestireno se
10 disuelven en cantidad suficiente de agua, a los fines de aplicar en el objeto que se
desea marcar. Se realiza la detección de SERS Raman utilizando un Inspector
Raman de DeltaNu con un laser de 120 mW a 785 nm, una resolución de 8 cm^{-1} y un
rango de espectro de $200\text{-}2000\text{cm}^{-1}$. Y para autenticar se compararon los datos con
el programa NuSpec data acquisition and library software. En caso de litigio judicial
15 cualquier laboratorio especializado del mundo podrá identificar el perfil genético
utilizado como tag. Para ello se deben disolver las microesferas con un solvente
orgánico adecuado y una vez revelado el pin formado con los códigos de acceso a los
gen bank de cada especie, Ej ZmZIP5ZUBECA6D13S317 se podrán utilizar los
reactivos adecuados (primers) para que por medio de la PCR se puedan amplificar
20 nuevamente las variantes alélicas utilizadas (Véase figura 10).

Ejemplo N° 2. Utilización de ADN personal como Tag anti-falsificación.

Se forma una molécula de ADN personal. En caso de litigio judicial se revela el pin
formado con los códigos de acceso a los bancos de genes de cada STR/SNP,
sumado a la variante alélica de cada uno de los fragmentos utilizados para que
25 cualquier laboratorio especializado del mundo pueda recrear el perfil genético de los
fragmentos polimórficos utilizados como Tags sin depender del fabricante de los
mismos, como por ejemplo pin: X0629288X147201011M8652545.

Ejemplo N° 3. Utilización de SNP Fenotípicos para autenticar pasaportes.

Uso de SNPs responsables de los caracteres fenotípicos de una persona, como color
30 de ojos, pelos, color de piel etc. Creando, luego ser detectada por SERS Raman y

digitalizada una “foto genética” que es posible de cotejar con la persona que posee el pasaporte. Posteriormente se extraen 0,5 ugr de ADN de la saliva de una persona y se amplifican los seis genes SNPs que a continuación se detallan en la figura 13 A. El posible escenario hipotético para la determinación de color de ojos azules y marrones según las variantes genotípicas de estos seis SNPs, tal como se muestra en la figura 13 B.

Ejemplo N° 4. Micro esferas con ADN polimórfico como tag anti-falsificación de billetes

10 Su utilización para dicho fin, se representa en la Figura 14.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener un marcador de objetos a identificar, que comprende al menos un primer paso de selección de un ser viviente y extracción del ADN a utilizar y un octavo paso de determinación y corrección del grado de fluidez y concentración de la solución; **CARACTERIZADO** porque también comprende;

- un segundo paso de incluir el ADN obtenido en una solución compuesta por entre 9 y 10,2 mM de Tris-HCl; entre 0,95 y 0,11 de EDTA; SDS al 20% (peso/ volumen) y entre 9,8 y 10,3 mg/ml de Proteinasa K, procediendo a la purificación en medio de Fenol/Cloroformo en una proporción de 10:9 (volumen/volumen);
- un tercer paso de amplificar los fragmentos polimórficos cortos en tándem (STRs) o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), presentes en la muestra de ADN;
- un cuarto paso de determinación de las variantes alélicas del o de los fragmentos polimórficos elegidos;
- un quinto paso de modificación de la estructura tridimensional del o de los fragmentos polimórficos STRs - SNPs y su adsorción a nanopartículas en al menos un metal;
- un sexto paso de concentración y de microencapsulado de los fragmentos polimórficos; y
- un séptimo paso de solubilización de las microesferas de ADN o el ADN microencapsulado para la detección por espectroscopia Raman.

2. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque en el quinto paso, dicho metal es seleccionado entre; oro, plata, platino o cobre.

3. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque en el quinto paso la estructura tridimensional del ADN se modifica siguiendo un método seleccionado entre:

I.-el adiconado individual o en forma de coloides de las nanopartículas metálicas con el ADN adsorbido; cuyo adiconado en forma de coloides produce agregados del tipo de los dímeros, trímeros, tetrámeros, con las moléculas de ADN; a cuyas nanopartículas metálicas se agrega al menos un grupo de unión seleccionado entre un polímero, un silano o un alcano y sus derivados y cuyo polímero se selecciona entre fenilacetileno, politetrafluoretileno, polipropileno, poliacrilamida y similares,

II.-el adiconado de complejos ADN - dendrímeros del tipo PAMAM o similar para formar una estructura tridimensional característica con un espectro Raman único,

III.-por la unión covalente de los fragmentos polimórficos con ADN sintético del tipo PNAs (peptide nucleic acid),

IV.-por la unión de fragmentos polimórficos STRs - SNPs con aptámeros obtenidos con el proceso SELEX,

V.-por torsión de la doble hélice del ADN mediante el intercalado de moléculas de agentes intercalantes entre las bases y a lo largo de dicha doble hélice; cuyos agentes intercalantes se seleccionan entre el Bromuro de Etidio, adriamicyn, 9-aminoacridine (9AA) y proflavine (PF) (3,6-diaminoacridine),

VI.-por precipitación o agregación de una proteína a los surcos mayores y menores del ADN utilizando una droga seleccionada entre Spermina, Spermidina, Putrescina, Hoechst 33258, Netropsin, Pentamidine, o similares,

VII.-por formación de agregados que reaccionan con el fosfato y, o con bases nitrogenadas, desestabilizando la doble hélice por ruptura de los puentes de hidrógeno axial a partir de complejos DNA- metal divalentes como Sr^{+2} , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} y Cd^{+2} .

4. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 3, **CARACTERIZADO** porque en el punto VI del quinto paso la interacción de estas drogas con los surcos mayores y menores del ADN está directamente relacionada con la cantidad de A-T, por lo tanto de la secuencia de cada fracción de STR o SNP se puede obtener un espectro característico del fragmento polimórfico usado para marcar el objeto.

5. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque en el quinto paso las nanopartículas metálicas con el ADN adsorbido incorporadas como marcador, aumentan la señal de SERS Raman entre 10^6 y 10^{14} veces.

6. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 3, **CARACTERIZADO** porque en el quinto paso el grupo de unión se selecciona entre moléculas de silanos y alcanos o sus derivados unidos a moléculas de ADN formando agregados característicos conformadores de una red molecular con una señal espectrográfica Raman única.

7. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso se procede al concentrado por ultracentrifugación y al microencapsulado de los fragmentos polimórficos mediante la técnica de inversión de fase; cuyo ADN polimórfico a ser microencapsulado se disuelve en un solvente, para luego y en el mismo solvente, pasar a disolver un polímero agregado con una concentración de entre 0,25% y 10% peso/volumen; cuyo polímero utilizado se selecciona entre los biodegradables y los no biodegradables.

8. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 7, **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso, el solvente es un solvente orgánico

seleccionado entre cloroformo y cloruro de metileno, y el no solvente se selecciona entre el etanol y el hexano.

9. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 7,
5 **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso el polímero biodegradable se selecciona entre ácido láctico, ácido glicólico, un polianhídrido, un poliuretano, poliácido butírico, poliácido valerino, y similares.

10. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 7,
10 **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso el polímero no biodegradable se selecciona entre acetato de viniletileno, poliácido acrílico, poliamidas y copolímeros, así como sus mezclas.

11. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 7,
15 **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso los polímeros se seleccionan entre al menos uno del grupo que comprende dextrán, celulosa, colágeno, albúmina, caseína, o los similares.

12. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 7,
20 **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso la relación solvente/no solvente es de entre 1/40 y 4/200.

13. Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 1,
25 **CARACTERIZADO** porque en el sexto paso se procede al concentrado por ultracentrifugación con microconcentradores del tipo Centricon 100.

14. Marcador obtenido con el procedimiento de la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque las concentraciones de fragmentos polimórficos de ADN utilizadas son variables a partir de 0,9 nM.

5 15. Marcador según la reivindicación número 14, **CARACTERIZADO** porque a cada fragmento polimórfico de ADN utilizado se le asigna un número de código existente en los bancos de genes de forma que la combinación de los fragmentos polimórficos STRs - SNPs utilizados en el marcador crea un número
10 único, que se corresponde con los sitios exactos dentro de los sitios polimórficos del genoma del o los seres vivos cuyo ADN se haya utilizado.

16. Marcador según la reivindicación número 14, **CARACTERIZADO** porque se enmascara el o los fragmentos polimórficos de ADN seleccionados incorporando fragmentos de ADN distintos a los elegidos para conformar el número
15 único.

17. Marcador según la reivindicación número 14, **CARACTERIZADO** porque se enmascara el espectro Raman del o los fragmentos polimórficos de ADN incorporados al marcador adicionando una mezcla de sustancias orgánicas Raman
20 activas sin influencia en el espectro emitido por dichos fragmentos polimórficos.

18. Método de detección del marcador obtenido con el procedimiento de la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque el mismo comprende la detección de los fragmentos polimórficos de ADN incluidos en dicho marcador
25 detectándose los nucleótidos con un método seleccionado entre los siguientes pero sin limitación a ellos: Normal Raman scattering; Resonance Raman scattering; surface enhanced Raman scattering; surface enhanced resonance Raman scattering; coherent anti-Stokes Raman spectroscopy (CARS); stimulated Raman scattering; inverse Raman spectroscopy; stimulated gain Raman spectroscopy; hyper-Raman

scattering; molecular optical laser examiner (MOLE) or Raman microprobe or Raman microscopy or confocal Raman microspectrometry; three-dimensional or scanning Raman; Raman saturation spectroscopy; time resolved resonance Raman; Raman decoupling spectroscopy or UV-Raman microscopy.

5

19. Método para autenticar instantáneamente los objetos marcados con el marcador obtenido con el procedimiento de la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque comprende una primera etapa de suprimir la fluorescencia característica del ADN y una segunda etapa de comparación de los valores superior e inferior de la intensidad de los picos obtenidos en el espectro emitido por los fragmentos polimórficos de ADN con valores de referencia límite previamente resguardados para dar una respuesta de autenticación instantánea por coincidencia positiva o negativa.

20. Método para autenticar instantáneamente los objetos marcados, según la reivindicación número 19, **CARACTERIZADO** porque en la primera etapa de supresión de la fluorescencia, comprende un paso de determinación de un valor medio de intensidad en los datos del espectro obtenido dentro de una sección en torno a cada punto de la marca de dicho espectro de respuesta y un paso de restar dicho valor medio de cada uno de los puntos que produjo el ADN utilizado como marcador.

21. Método para autenticar instantáneamente los objetos marcados, según la reivindicación número 19, **CARACTERIZADO** porque la segunda etapa comprende un paso de comparación de los datos de los picos Raman obtenidos con los datos de los picos Raman almacenados en una base de datos y un paso de comparación de los números de onda e intensidad de cada pico, con los datos espectrográficos almacenados en una base de datos.

22. Método para autenticar instantáneamente los objetos marcados, según la reivindicación número 19, **CARACTERIZADO** porque los datos almacenados en una base de datos corresponden al espectro de cada uno de los fragmentos polimórficos STRs - SNPs utilizados para marcar el objeto a autenticar.

5

23. Método para autenticar instantáneamente los objetos marcados, según la reivindicación número 19, **CARACTERIZADO** porque los valores detectados del espectro Raman emitido por los fragmentos polimórficos de ADN se envían a través de alguno de los siguientes sistemas de telecomunicación: una línea telefónica analógica; una línea telefónica digital; un teléfono celular; un equipo unido a una red de datos o sistema equivalente.

10

24. Método para verificar los objetos marcados con el marcador obtenido con el procedimiento de la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque una vez detectado y autenticado el objeto marcado se procede a la identificación del o los fragmentos polimórficos de STRs - SNPs tipificándolos por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

15

25. Método para verificar los objetos marcados con el marcador, según la reivindicación número 24, **CARACTERIZADO** porque comprende un paso de establecer el nombre de los fragmentos polimórficos STRs – SNPs y un paso de adecuación de los reactivos y obtención de las condiciones de amplificación adecuadas.

20

26. Método para verificar los objetos marcados con el marcador, según la reivindicación número 24, **CARACTERIZADO** porque el número asignado a un único fragmento polimórfico e incluido en una base de datos puede ser determinado por el análisis de dicho fragmento polimórfico realizado por técnicas de biología molecular y

25

comparación del resultado de dicho análisis con los datos obrantes en dicha base de datos.

27. Método para verificar los objetos marcados con el marcador, según la reivindicación número 24, **CARACTERIZADO** porque la tipificación del o los fragmentos polimórficos de STRs - SNPs se realiza con procedimientos y técnicas que resultan habituales en el arte previo tales y como el empleo de geles; la electroforesis capilar; la detección por hibridización múltiple o capilaridad múltiple; mediante el uso de microchips y por espectrometría de masa entre otras.

28. Método para verificar los objetos marcados con el marcador, según la reivindicación número 24, **CARACTERIZADO** porque la detección de los polimorfismos de una sola base se realiza por un análisis conformacional de cadena única; o por oligonucleótido alelo específico; por múltiple extensión de primer o bien por cualquiera de otras tecnologías entre las que pueden mencionarse las de chips y espectrometría de masa.

29. Método para incorporar un marcador a un objeto a identificar, donde dicho marcador se obtiene con el procedimiento de la reivindicación número 1 y cuyo método comprende un paso de incorporar dicho marcador a un fluido y un paso de incluir el fluido conteniendo dicho marcador a un aplicador, **CARACTERIZADO** porque el marcador contenido en la solución está presente en una concentración de entre 6 y 10 pg por mm² de superficie.

30. Método para incorporar un marcador a un objeto a identificar, según la reivindicación número 29, **CARACTERIZADO** porque las microesferas con el o los fragmentos polimórficos de ADN se solubilizan en distintas variedades de tinta, tales y como tintas flexográficas, tintas litográficas, tintas serigráficas, tintas de huecograbado, tintas reactivas moneda, tintas borrables, tintas reactivas de bolígrafo,

tintas de reacción al calor, tintas visibles al infrarrojo, tintas variables óptimamente, tintas penetrantes, tintas fotocromáticas, tintas reactivas a disolventes químicos y al agua.

5 **31.** Método para incorporar un marcador a un objeto a identificar, según la reivindicación número 29, **CARACTERIZADO** porque el marcador se incorpora a un aplicador seleccionado entre una lapicera de pluma, una microfibra, un bolígrafo, un atomizador, un instrumento de dibujo, un pincel, un sello, una impresora electrofotográfica del tipo chorro de tinta, una máquina de litografía offset o de
10 letterpress, de huecograbado, de xerografía, de serigrafía, un sistema de impresión textil o similar, un filtro.

32. Método para incorporar un marcador a un objeto a identificar, según la reivindicación número 29, **CARACTERIZADO** porque entre la solución conteniendo el
15 marcador y el objeto a marcar se emplea un medio intermediario que embebido en dicha solución se selecciona entre nitrocelulosa, papel, madera, cartón, material plástico, nylon cargado, tela, sustancias orgánicas en forma de gotitas o gel, inorgánicas.

20 **33.** Método para incorporar un marcador a un objeto a identificar, según la reivindicación número 29, **CARACTERIZADO** porque la solución conteniendo el marcador se incorpora en pinturas, esculturas, insumos del deporte, obras de arte, artesanías, videocasetes, grabadores, televisores y cualquier objeto del hogar, también computadoras, impresoras, software, elementos de oficina y equipamientos
25 de negocios, perfumes, ropas, carteras, portafolios, cajas de diferentes productos, blister de medicamentos, medicamentos, partes de automóviles, aeroplanos, bicicletas, certificados de acciones, billetes de avión, entradas de reclamo de equipaje, controles, instrumentos negociables, papeles comerciales, documentos legales, testamentos, escrituras de propiedad, contratos, fideicomisos,
30 arrendamientos, cesiones, servidumbres, documentos postales, sellos, bonos,

tarjetas de identificación, certificados de nacimiento, licencias de conducir, facturas de envío, etiquetas, formularios médicos, historias clínicas, prescripciones, obras de arte originales, valiosos sellos, documentos bancarios, tarjetas de crédito, autorizaciones de tarjetas de crédito, facturas, notas, permisos, autorizaciones, solicitudes, y
5 declaraciones de impuestos, billetes, papel moneda, cheques, documentos notariales, cédulas de identificación, licencias de conducir, pasaportes, visas, tarjetas de crédito, de teléfonos y objetos similares tales como títulos académicos, inventarios, billetes de lotería y juegos de azar.

10 **34.** Procedimiento de conformidad con la reivindicación número 1, **CARACTERIZADO** porque comprende los siguientes niveles de seguridad: un primer nivel que consiste en la determinación de la estructura química del polímero usado para microencapsular el o los fragmentos polimórficos; un segundo nivel que consiste en la identificación del o los fragmentos polimórficos modificados que se utilizan; un
15 tercer nivel que consiste en la tipificación del o los fragmentos polimórficos determinando las variantes alélicas de cada uno de ellos; un cuarto nivel que consiste en trabajar con una concentración de los marcadores que se condice con el límite inferior de los fragmentos polimórficos de STR o SNP utilizados; un quinto nivel que consiste en la modificación de la estructura tridimensional de la molécula de ADN
20 utilizando una o una combinación de conformaciones tridimensionales de dicha molécula; un sexto nivel que consiste en el enmascaramiento de los marcadores con el agregado de distintos fragmentos de ADN; un séptimo nivel que consiste en utilizar el espectro Raman de los fragmentos polimórficos modificados; un octavo nivel que consiste en el enmascaramiento de los espectros Raman de los marcadores con
25 distintos espectros de sustancias Raman activas; un noveno nivel que consiste en la codificación de la base de datos; y un décimo nivel que consiste en variar la concentración relativa de cada fragmento polimórfico.

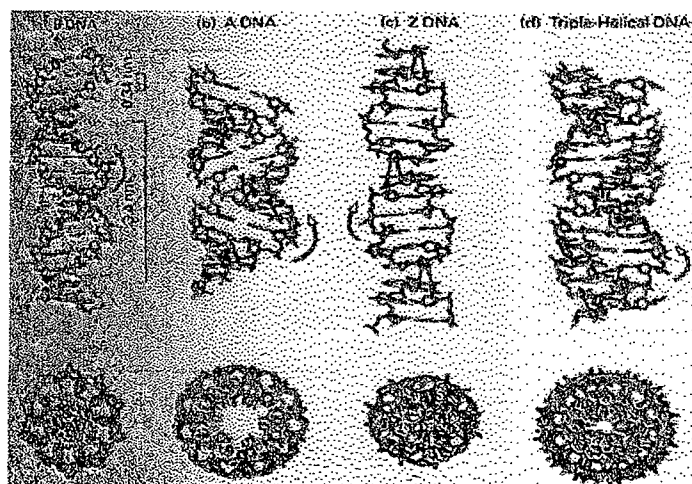


Figura 1

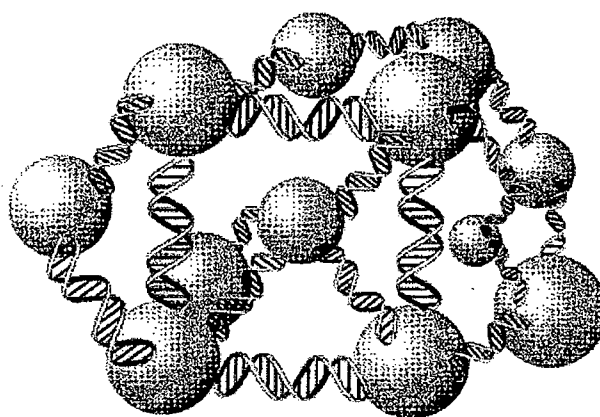


Figura 2

2/9

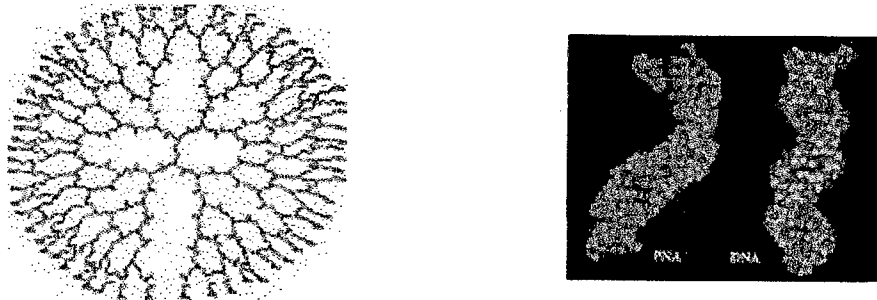


Figura 3

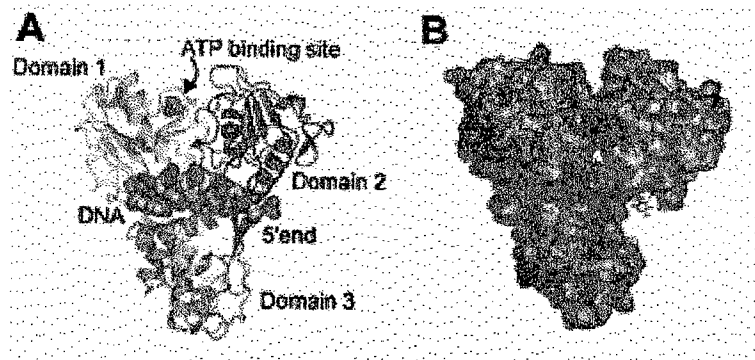


Figura 4



Figura 5

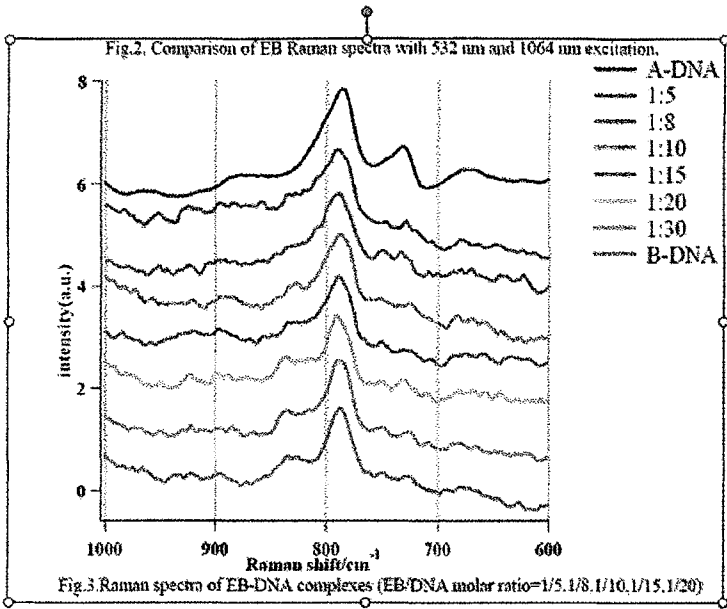


Figura 6

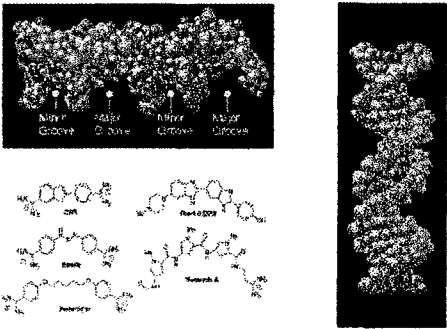


Figura 7

4/9

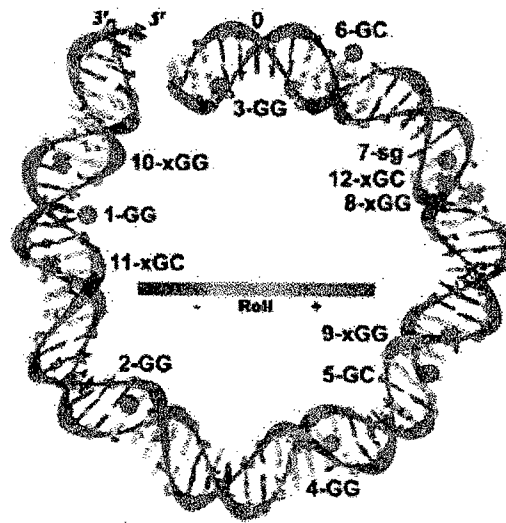


Figura 8

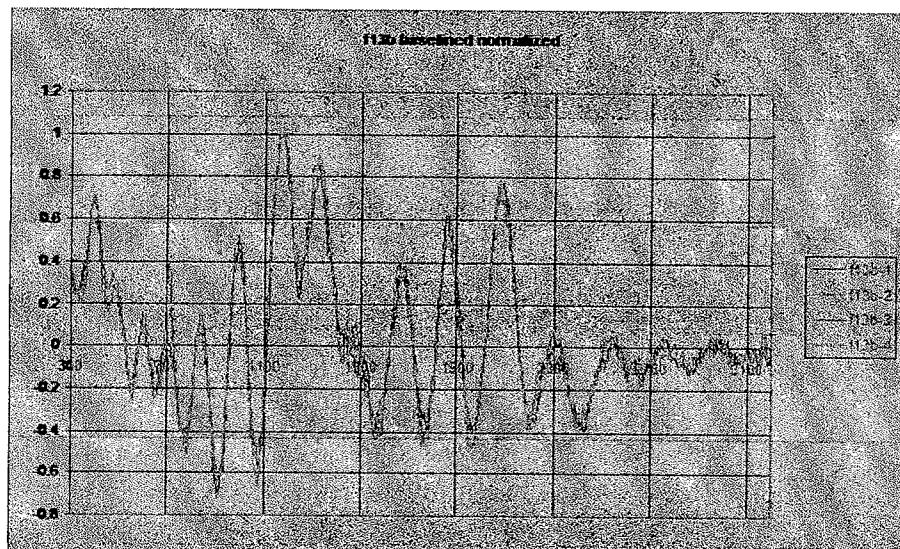


Figura 9

5/9

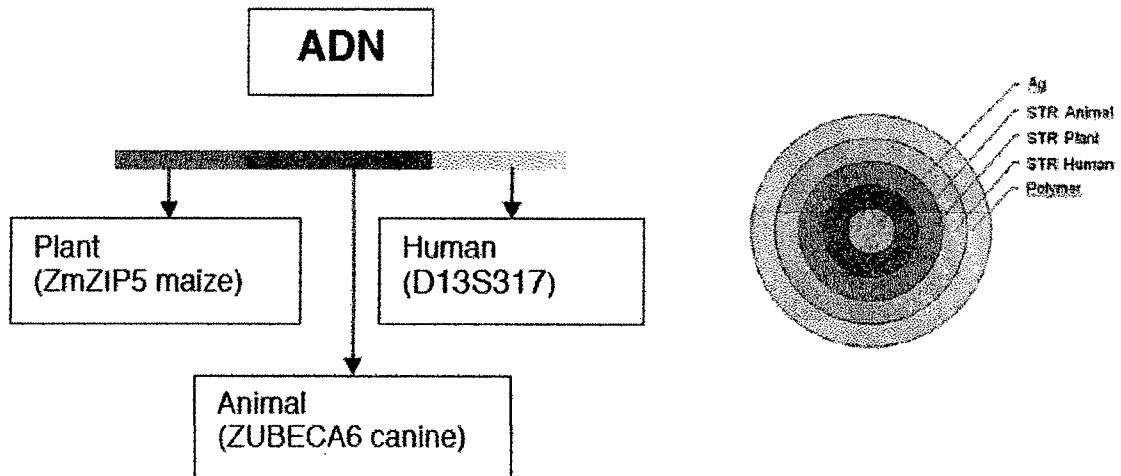
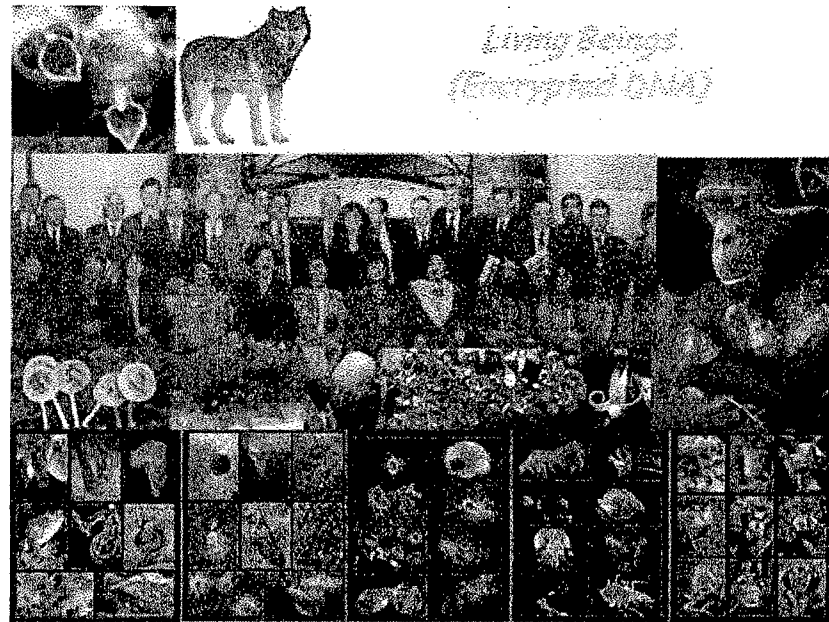


Figura 10

6/9

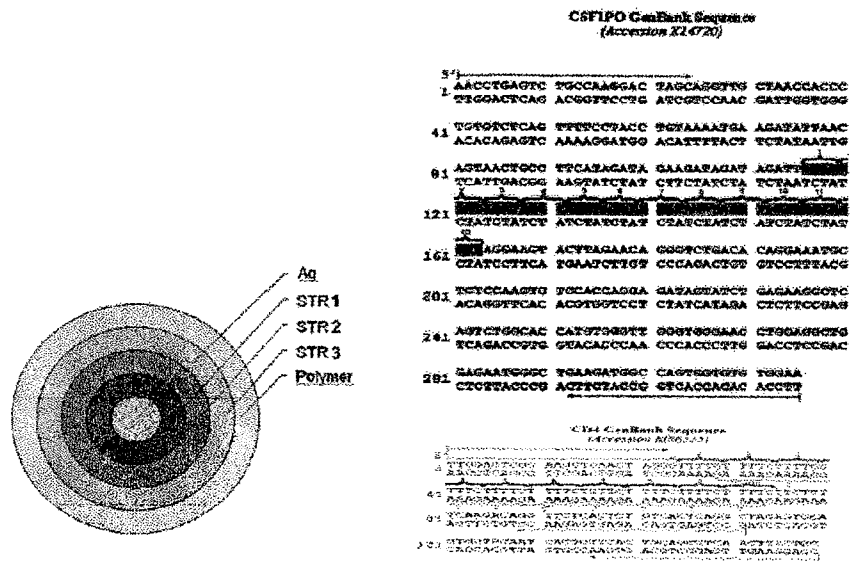


Figura 11

7/9

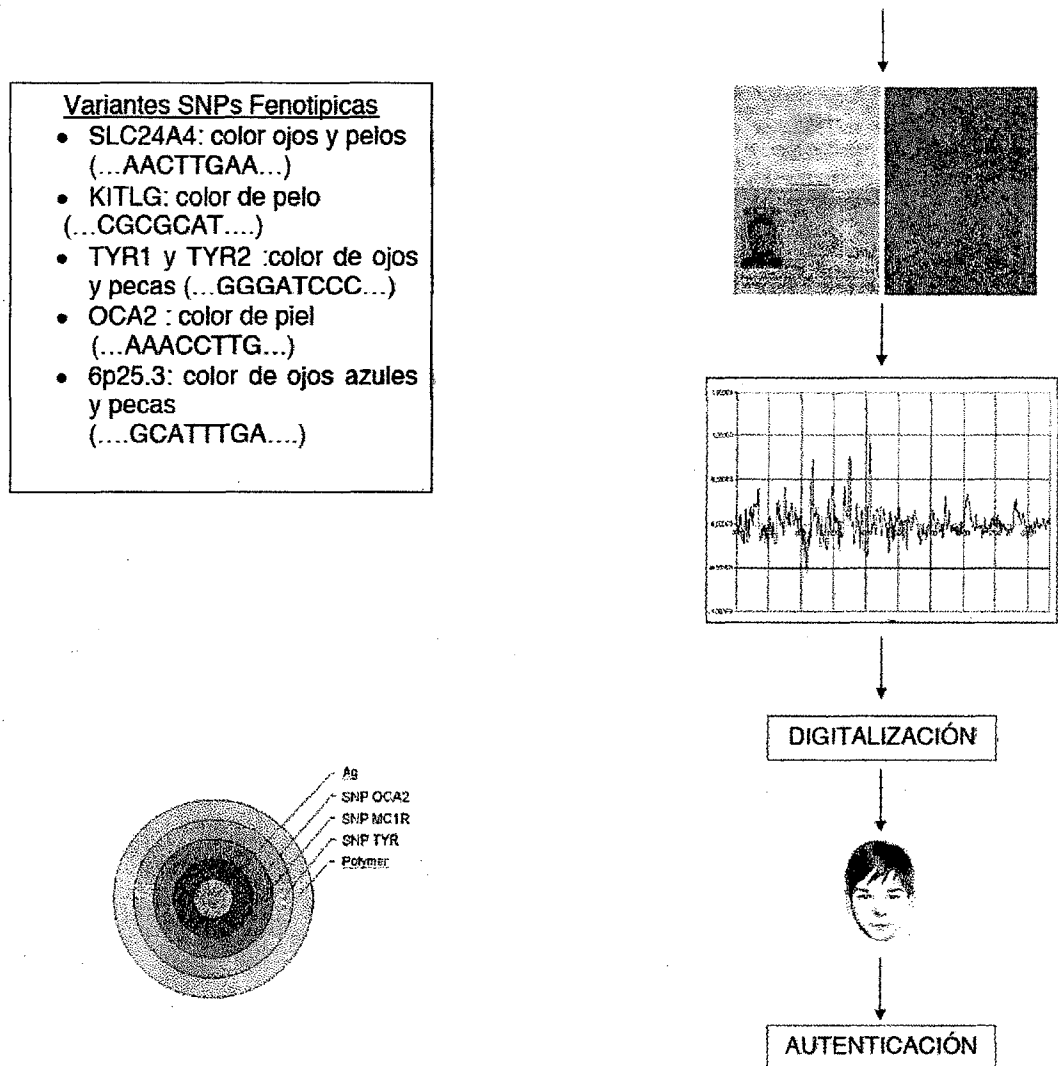


Figura 12

rs12913832	1	15-26039213	HERC2	87	TGGCTCTCTGTGCTGATCC GGCCCTGATGATGATAGC
rs1800407	2	15-25903913	OCA2	127	TGAAAGGCTGCCTCTGTTCT CGATGAGACAGAGCATGATGA
rs12896399	3	14-91843416	SLC24A4	104	CTGGCGATCCAATTCTTTGT CTTAGCCCTGGGTCTTGATG
rs16891982	4	5-33987450	SLC45A2 (MATP)	128	TCCAAGTTGTGCTAGACCAGA CGAAAGAGGAGTCGAGGTTG
rs1393350	5	11-88650694	TYR	80	TTCTCAGTCCCTTCTCTGC GGGAAGGTGAATGATAACACG
rs12203592	6	6-341321	IRF4	115	ACAGGGCAGCTGATCTCTTC GCTAAACCTGGCACCAAAAG

Figura 13 A

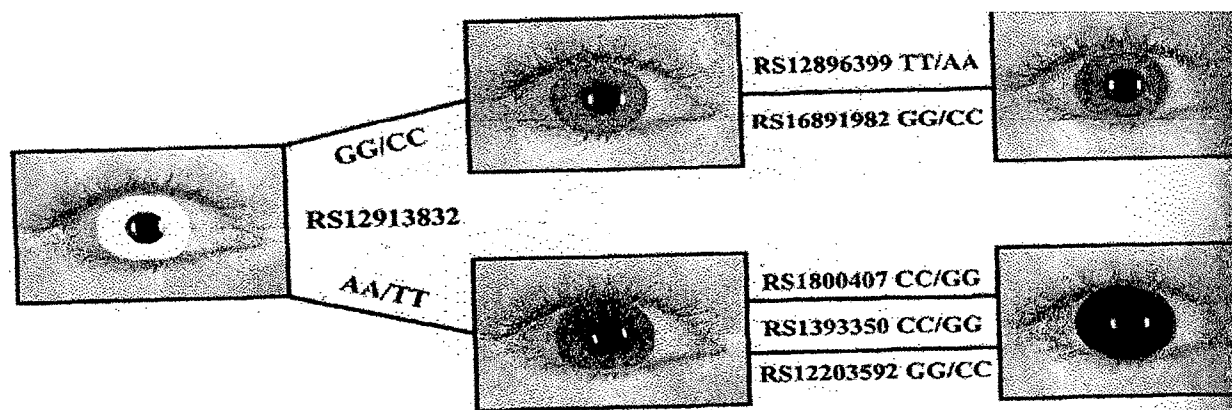


Figura 13 B

9/9

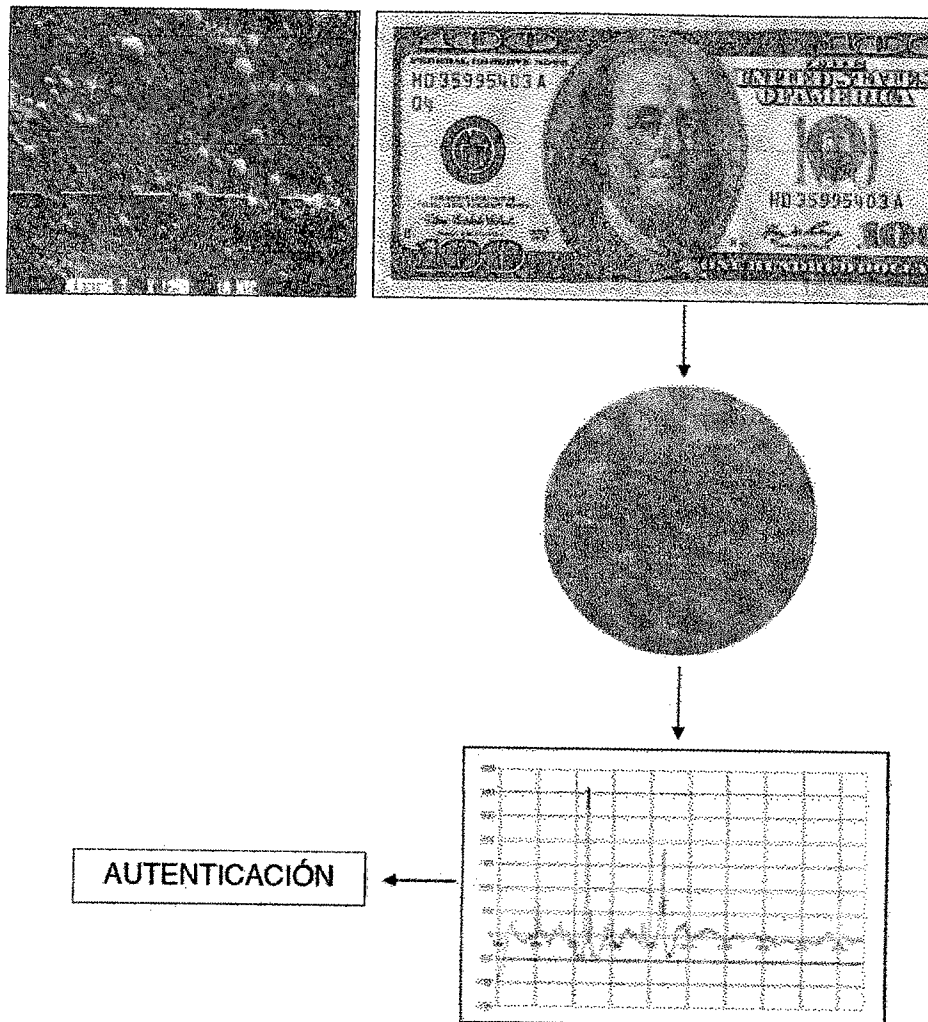


Figura 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2012/000036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

G09F3/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, G09F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003235836 A1 (GENETIC ASSAY SYSTEM CO)) 25/12/2003, claims	1-18
A	US 2003027336 A1 (UNIV DELHI AN INDIAN UNIVERSITY) 26/02/2003, the whole document	1-18
A	ES 2056405T T3 (BIOPROBE SYSTEMS SA) 01/10/1994, the whole document	1-18
A	WO 0218636 A2 (SEC DEP HOME DEPT ET AL.) 07/03/2002, the whole document	1-18
A	WO 9934984 A1 (DNA TECHNOLOGIES INC) 15/07/1999, the whole document	1-18
A	US 2012115154 A1 (HAMPIKIAN GREG) 10/05/2012, the whole document	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18/01/2013

Date of mailing of the international search report
(23/01/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Manso Tomico

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2012/000036

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see Supplemental Box

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-18**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

SUPPLEMENTAL BOX (continuation of Box III)

The present application contains the following inventions or groups of inventions such that they do not constitute a single general inventive concept, contrary to the requirements of PCT Rule 13.

Invention 1: claims 1-18

Method for obtaining a genetic object marker. Object marker and method for detection thereof.

Invention 2: claims 19-23, 24-28

Method for authenticating objects marked with a genetic marker. Method for verifying objects marked with a genetic marker.

Invention 3: claims 29-33

Method for incorporating a marker in an object to be identified.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/CL2012/000036

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2003027336 A1	06.02.2003	US6555376 B2 IN192520 A1	29.04.2003 24.04.2004
-----	-----	-----	-----
US2003235836 A1	25.12.2003	JP2004073188 A CN1470651 A ZA200304699 A CA2431579 A1 MXPA03005138 A AU2003204570 A1 AU2003204570B B2 EP1384790 A2 BR0301609 A AR037006 A1	11.03.2004 28.01.2004 14.07.2003 20.12.2003 22.01.2004 15.01.2004 30.10.2008 28.01.2004 17.02.2004 20.10.2004
-----	-----	-----	-----
ES2056405T T3	01.10.1994	JP3058800 A JP3059196B2 B2 EP0408424 A1 DE69008625T T2 AT105433T T US5139812 A MC2133 A FR2649518 A1	13.03.1991 04.07.2000 16.01.1991 01.12.1994 15.05.1994 18.08.1992 03.01.1992 11.01.1991
-----	-----	-----	-----
WO0218636 A2	07.03.2002	US2011262913 A1 US2009023154 A1 US2007065876 A1 US2004076972 A1 JP2004507746 A JP4703092B2 B2 EP1313884 A2 CA2420855 A1 AU8604201 A	27.10.2011 22.01.2009 22.03.2007 22.04.2004 11.03.2004 15.06.2011 28.05.2003 07.03.2002 13.03.2002
-----	-----	-----	-----
WO9934984 A1	15.07.1999	EP1045764 A1 US6030657 A	25.10.2000 29.02.2000
-----	-----	-----	-----
US2012115154 A1	10.05.2012	US2011276525 A1	10.11.2011
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/CL2012/000036

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

G09F3/00 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G09F

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2003235836 A1 (GENETIC ASSAY SYSTEM CO)) 25/12/2003, reivindicaciones	1-18
A	US 2003027336 A1 (UNIV DELHI AN INDIAN UNIVERSITY) 26/02/2003, todo el documento	1-18
A	ES 2056405T T3 (BIOPROBE SYSTEMS SA) 01/10/1994, todo el documento	1-18
A	WO 0218636 A2 (SEC DEP HOME DEPT ET AL.) 07/03/2002, todo el documento	1-18
A	WO 9934984 A1 (DNA TECHNOLOGIES INC) 15/07/1999, todo el documento	1-18
A	US 2012115154 A1 (HAMPIKIAN GREG) 10/05/2012, todo el documento	1-18

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
18/01/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23-ENERO-2013 (23/01/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico
Nº de teléfono 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/CL2012/000036

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver recuadro suplementario.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s: **1-18**

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

RECUADRO SUPLEMENTARIO DE REC. III

La presente solicitud comprende las siguientes invenciones o grupos de invenciones de tal manera que no forman un único concepto inventivo general, tal y como se menciona en la Regla 13 del PCT.

> Invención 1: reivindicaciones 1-18.

Procedimiento para obtener un marcador genético de objetos. Marcador de objetos y método de detección del mismo.

> Invención 2: reivindicaciones 19-23, 24-28.

Método para autenticar objetos marcados con un marcador genético. Método para verificar objetos marcados con un marcador genético

> Invención 3: reivindicaciones 29-33.

Método para incorporar un marcador a un objeto a identificar

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CL2012/000036

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2003027336 A1	06.02.2003	US6555376 B2 IN192520 A1	29.04.2003 24.04.2004
-----	-----	-----	-----
US2003235836 A1	25.12.2003	JP2004073188 A CN1470651 A ZA200304699 A CA2431579 A1 MXPA03005138 A AU2003204570 A1 AU2003204570B B2 EP1384790 A2 BR0301609 A AR037006 A1	11.03.2004 28.01.2004 14.07.2003 20.12.2003 22.01.2004 15.01.2004 30.10.2008 28.01.2004 17.02.2004 20.10.2004
-----	-----	-----	-----
ES2056405T T3	01.10.1994	JP3058800 A JP3059196B2 B2 EP0408424 A1 DE69008625T T2 AT105433T T US5139812 A MC2133 A FR2649518 A1	13.03.1991 04.07.2000 16.01.1991 01.12.1994 15.05.1994 18.08.1992 03.01.1992 11.01.1991
-----	-----	-----	-----
WO0218636 A2	07.03.2002	US2011262913 A1 US2009023154 A1 US2007065876 A1 US2004076972 A1 JP2004507746 A JP4703092B2 B2 EP1313884 A2 CA2420855 A1 AU8604201 A	27.10.2011 22.01.2009 22.03.2007 22.04.2004 11.03.2004 15.06.2011 28.05.2003 07.03.2002 13.03.2002
-----	-----	-----	-----
WO9934984 A1	15.07.1999	EP1045764 A1 US6030657 A	25.10.2000 29.02.2000
-----	-----	-----	-----
US2012115154 A1	10.05.2012	US2011276525 A1	10.11.2011
-----	-----	-----	-----