

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 925**

51 Int. Cl.:

B41M 3/14 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G07D 7/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/US2015/021165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15142990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15765671 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024 EP 3119610**

54 Título: **Marcadores ópticos cifrados para aplicaciones de seguridad**

30 Prioridad:

18.03.2014 US 201461954950 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.09.2024

73 Titular/es:

**APDN (B.V.I.) INC. (100.0%)
Nemours Chambers, PO Box 3170, Road Town
Tortola 1110, VG**

72 Inventor/es:

**SZCZEPANIK, MACIEJ, B. y
LIANG, MINGHWA, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 978 925 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcadores ópticos cifrados para aplicaciones de seguridad

Antecedentes

5 La presente invención se refiere a un método para marcar de manera cifrada un ítem. Los marcadores fluorescentes son útiles como marcadores de identificación y seguridad, pero la ventaja de que se puedan visualizar fácilmente irradiando con luz de longitud de onda de excitación apropiada es también una desventaja porque el marcador fluorescente puede detectarse, analizarse y copiarse fácilmente, haciéndolos sujetos a falsificación. El documento DE2518871 divulga un método de la técnica anterior para marcar de manera cifrada un ítem.

10 Resumen

15 La presente invención proporciona un método para marcar de manera cifrada un ítem, haciendo uso de marcadores cifrados que no son fácilmente detectables, pero que pueden revelarse mediante tratamiento con un reactivo específico usado como revelador para revelar una propiedad física fácilmente detectable del marcador, tal como, una emisión de fluorescencia característica después de la excitación con una longitud de onda de excitación particular.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para marcar de manera cifrada un ítem, el método que comprende:

20 proporcionar un profluoróforo polimerizable que sea capaz de producir un compuesto fluorescente tras la reacción con un revelador, en donde el profluoróforo polimerizable encapsula un marcador de seguridad de ADN; y

recubrir el ítem con un recubrimiento que comprende el profluoróforo; o unir una etiqueta o indicios que comprendan el profluoróforo al ítem; o incrustar el profluoróforo en al menos una porción del ítem;

y proporcionar así un ítem marcado de manera cifrada.

25 El marcador cifrado se puede revelar in situ, o se puede retirar una muestra cepillando, raspando o rayando el objeto o ítem marcado y revelando el marcador cifrado o una muestra del mismo con el revelador apropiado para revelar un marcador manifiesto o una señal óptica. El marcador puede revelarse mediante la exposición del marcador cifrado in situ o una muestra del mismo al revelador en solución, un aerosol, un vapor o un sólido, tal como, por ejemplo, un polvo o gránulos que incluyen el revelador.

30 Alternativamente, puede haber una transferencia suficiente de las moléculas marcadoras cifradas desde el objeto o ítem marcado simplemente pasando un hisopo que lleva el revelador, por ejemplo, un hisopo empapado en una solución del revelador o un hisopo en el que el revelador está unido o inmovilizado covalentemente. Las moléculas marcadoras cifradas transferidas se revelan luego sobre o dentro del hisopo, o sobre el objeto o ítem marcado. El hisopo, o el objeto o ítem marcado, puede inspeccionarse fácilmente para detectar la presencia de las características ópticas reveladas, tal como fluorescencia con emisión a una longitud de onda específica después de la excitación con la longitud de onda de luz apropiada.

35 El revelador puede ser un revelador químicamente reactivo que reacciona con el marcador para producir un producto marcador detectable, o el revelador puede ser un agente quelante u otro agente aglutinante que en combinación con el marcador produce un producto marcador detectable.

40 El método de la presente invención comprende el uso de un "fluoróforo cifrado" (también denominado en este documento "profluoróforo") y no tiene las propiedades de un fluoróforo y, por lo tanto, es difícil de reconocer como marcador de seguridad, pero durante el revelado o la reacción con un revelador, que es un reactivo específico adecuado para el revelado del profluoróforo, se transforma en un fluoróforo con una señal fácilmente detectable. Además, el cifrado suele mejorar la estabilidad física y química del profluoróforo.

45 En una realización, los marcadores de la presente invención combinan las características tanto de los fluoróforos cifrados como de los cromóforos cifrados, en donde los fluoróforos cifrados no son fluorescentes o esencialmente no fluorescentes y los cromóforos cifrados son incoloros o esencialmente incoloros, lo que los hace difíciles de detectar o reconocer como marcadores de seguridad. Sin embargo, durante el revelado o la reacción con un revelador, estos marcadores cifrados se transforman en un fluoróforo fácilmente detectable y un cromóforo fácilmente detectable. En una realización, dicho marcador combinado se puede interrogar simultáneamente para determinar la fluorescencia con luz UV de una longitud de onda de excitación apropiada, así como el color visible a simple vista mediante inspección visual del marcador iluminado después del revelado con un revelador apropiado. Los marcadores cromogénicos (también denominados en este documento "cromógenos" o "procromóforos") de la presente invención son "cromóforos cifrados" y son incoloros o casi incoloros y, por tanto, son difíciles de reconocer como marcadores de seguridad, pero al revelarse o reaccionar

con un revelador, un reactivo específico, se transforman en un cromóforo fácilmente detectable. En una realización, los cromóforos de la invención se hacen visibles a simple vista después del revelado de los respectivos marcadores cromogénicos con el reactivo revelador específico del marcador cromogénico.

El marcador está incrustado en el ítem de interés.

- 5 El ítem de interés puede frotarse, frotarse o tratarse con un hisopo empapado en una solución de un revelador, que es un reactivo específico, capaz de transformar el marcador fluoróforo cifrado o el compuesto marcador cromogénico en un fluoróforo o cromóforo, respectivamente, con

una señal fácilmente detectable. En una realización, el revelador puede inmovilizarse en el hisopo, por ejemplo, mediante adsorción o mediante enlace covalente. Alternativamente, el ítem de interés puede exponerse
10 directamente al revelador en forma de vapor, aerosol o solución. El revelado de

y la autenticación del marcador fluoróforo cifrado o del compuesto marcador cromogénico se puede realizar mediante cualquier método adecuado, tal como por ejemplo y sin limitación, en un solo paso en donde el
15 marcador fluoróforo cifrado o el compuesto marcador cromogénico se revela directamente in situ en o sobre el objeto marcado, o en un procedimiento de dos pasos, en donde el marcador se transfiere primero a un dispositivo de muestreo o hisopo, etc., y luego se trata con un revelador apropiado suministrado en forma de vapor, aerosol o solución, o rociando el dispositivo de muestreo o hisopo, etc. con un polvo o gránulos que consisten en o contienen el revelador.

Descripción detallada

Definiciones

20 Alquilo, como se usa en este documento, se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada saturado de un número específico de átomos de carbono. Por lo tanto, la expresión alquilo incluye, pero no se limita a, metilo (Q alquilo), etilo (alquilo C2), propilo (alquilo C3), isopropilo (también alquilo C3), n-butilo (alquilo C4), isobutilo (también alquilo C4), sec-butilo (también alquilo C4) y t-butilo (también alquilo C4).

25 Alquenilo se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace entre dos átomos de carbono.

Alquinilo se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace entre dos átomos de carbono.

30 Cicloalquilo, como se utiliza en este documento, significa un sustituyente o grupo de enlace de un sistema de anillo hidrocarbonado monocíclico, policíclico o con puente saturado. En un anillo de cicloalquilo sustituido, el sustituyente está unido al átomo de carbono del anillo reemplazando un átomo de hidrógeno. Por ejemplo, cicloalquilo C3-C10 designa un anillo de tres a diez átomos de carbono, o un anillo de tres o más átomos de carbono en donde los átomos de carbono restantes forman uno o más sustituyentes alquilo del anillo.

35 Heterociclilo, como se usa en este documento, significa un sustituyente o grupo de enlace de sistema de anillo hidrocarbonado monocíclico, policíclico o con puente, saturado, parcialmente insaturado o insaturado, en donde al menos un átomo de carbono del anillo ha sido reemplazado por un heteroátomo tal como, entre otros, nitrógeno, oxígeno, azufre, selenio, boro o fósforo. Un sistema de anillos de heterociclilo puede ser un sistema de anillos que tiene uno, dos, tres o cuatro átomos de nitrógeno en el anillo, o un sistema de anillos que tiene
40 cero, uno, dos o tres átomos de nitrógeno en el anillo y un átomo de oxígeno o azufre en el anillo. El sistema de anillos heterocíclico puede incluir más de un heteroátomo en el anillo. Un sustituyente heterociclilo se deriva al retirar de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono o nitrógeno del anillo. Heterociclilo incluye, pero no se limita a, furilo, tienilo, 2H-pirrol, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, pirrolidinilo, pirrolilo, 1,3-dioxolanilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, 2-imidazolinilo, imidazolidinilo, 2-pirazolinilo, pirazolidinilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, 2H-piraniilo, 4H-piraniilo, piridinilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, morfolinilo, 1,4-ditianiilo, tiomorfolinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piperazinilo, azepanilo,
45 diazepinilo, indoliziniilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[b]furilo, benzo[b]tienilo, 1H-indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, 4H-quinoliziniilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, ftalzinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, 1,8-naftiridinilo, pteridinilo, quinuclidinilo.

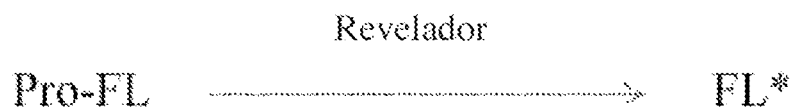
50 Como se señaló anteriormente, heterociclilo también incluye heterociclos aromáticos, tales como pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, furilo, tienilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, y puede estar opcionalmente sustituido, por ejemplo con alquilo. Heterociclilo también incluye heterociclos bicíclicos con uno o ambos anillos que tienen un heteroátomo, por ejemplo, imidazopirazinilo, benzofuranilo, benzodioxolilo, benzotiofenilo y quinolinilo.

Arilalquilo significa un grupo arilo unido al átomo de carbono del extremo de un grupo alquilo tal como, por ejemplo, alquilo C1-C4.

Arilo significa un sustituyente o grupo de enlace de un sistema de anillo hidrocarbonado monocíclico o policíclico, conjugado con electrones π , aromático e insaturado, de seis, ocho, diez o catorce átomos de carbono. Un grupo arilo se deriva al retirar un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo de carbono. Arilo incluye, pero no se limita a, fenilo, naftalenilo, azuleno y antraceno.

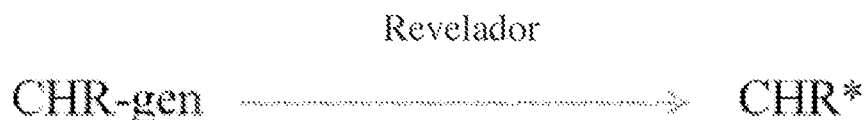
- 5 Halo- significa fluoro (-F), cloro (-Cl), bromo (-Br) o yodo (-I).
- Carboxilo significa un sustituyente de fórmula -COOH.
- Hidroxilo significa un sustituyente de fórmula -OH.
- Ciano significa un sustituyente de fórmula -C≡N.
- Nitro significa un sustituyente de fórmula -NO₂.
- 10 Oxo significa un sustituyente de fórmula =O en el que el átomo de oxígeno tiene un doble enlace.
- Amino significa un sustituyente de fórmula -NH₂ o un grupo de enlace que tiene la fórmula -NH-.
- Alquilamino o dialquilamino significa un sustituyente de fórmula -NH-alquilo o -N(alquilo)₂, respectivamente.
- Azido significa un sustituyente de fórmula -N₃ también representado como -N=N⁺=N⁻.
- 15 Se discutirán a continuación los compuestos útiles en la práctica de la presente invención. Los profluoróforos cifrados pueden volverse polimerizables mediante la adición de grupos funcionales apropiados. Los compuestos útiles en la práctica de la presente invención como profluoróforos marcadores o compuestos cromogénicos incluyen formas profluoróforas de colorantes de xantano tales como rodaminas, rodoles y fluoresceínas, así como derivados de cumarina, cianina y oxazina.

Esquema general I



- 20 El esquema I muestra el caso general de un profluoróforo (Pro-FL) también denominado indistintamente en este documento compuesto fluorogénico, tratado con un revelador para producir un compuesto fluorescente (FL*) que tiene una longitud de onda de emisión característica cuando se estimula con luz de la longitud de onda de excitación apropiada, en donde la luz emitida es fácilmente detectable ya sea a simple vista o mediante medición espectroscópica.

Esquema general II



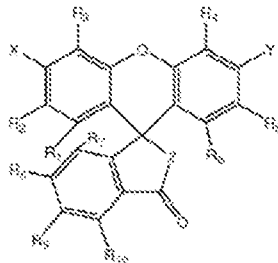
- 25 El esquema II muestra el caso general de un compuesto cromogénico (gen CHR) también denominado indistintamente en este documento forma leuco de un cromóforo (es decir, un cromógeno) tratado con un revelador para producir un cromóforo o tinte (CHR*) que tiene una absorción característica que es fácilmente detectable a simple vista o mediante medición espectroscópica.
- 30 Ejemplos de derivados de fluoresceína útiles en la práctica de la presente invención como profluoróforos marcadores o compuestos cromogénicos son derivados de cada uno de los siguientes compuestos:

fluoresceína, 5-(y-6)-carboxifluoresceína (FAM), 5-(y-6)-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína (TET), 5-(y-6)-2',4',4,5',7',7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-(y-6)-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), eosina Y (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína), Eosina B (4',5'-Dibromo-2',7'-dinitrofluoresceína), Rosa de Bengala (4,5,6,7-Tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína), Eritrosina (2',4',5',7'-Tetrayodofluoresceína), 2,7-Diclorofluoresceína, Amarillo Yakima, VIC, NED y muchos más conocidos por los expertos en la técnica de los compuestos y tintes fluorescentes. Estos derivados son generalmente incoloros o esencialmente incoloros y carecen de fluorescencia apreciable; y puede tratarse con un revelador adecuado para producir el compuesto fluorescente o el tinte mismo.

Ejemplos de rodaminas útiles como profluoróforos marcadores o compuestos cromogénicos incluyen, por ejemplo: derivados de tetrametilrodamina (TRITC), 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 5-(y-6)-carboxi-X-rodamina (ROX), Rodamina 110 (sales de xantilio, 3,6-diamino-9-(2-carboxifenil)-), Rodamina B, Rodamina 6G, etc.

Ejemplos de oxazinas útiles como profluoróforos marcadores o compuestos cromogénicos incluyen derivados de: rojo nilo, azul nilo, violeta de cresilo y oxazina 170, etc., que se puede tratar con un revelador para revelar el marcador rojo nilo, azul nilo, violeta de cresilo u oxazina 170 no derivatizados.

Por ejemplo, en una realización, el profluoróforo puede ser un xantano, tal como por ejemplo:



Fórmula I

en donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), nitro (NO₂), ciano (CN), carbonilo (CHO o C(O)R), Ci-C₈

alquilo, arilo y cicloalquilo C₃-C₈, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más grupos funcionales tales como carboxilo, carbonilo, amino, ciano, nitro, alquilo, alquenilo, alquinilo o azido.

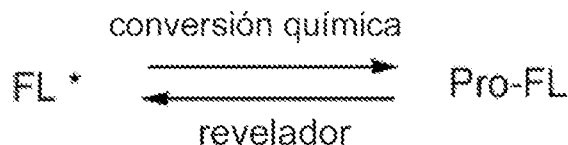
Alternativamente, un par de grupos R seleccionados independientemente de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ pueden formar un anillo entre sí o entre R_n (uno de R₁-R₁₀) y X o Y o ambos; X e Y son oxígeno sustituido, X=OR o nitrógeno, Y=NRR' en donde los sustituyentes

R y R' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₈, arilo, acilo C₁-C₈ (estando cada alquilo, arilo y acilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente de halo, nitro (NO₂) y alquilo C₁-C₃), alquilsulfonilo (RSO₂-) y arilsulfonilo (ArSO₂-), (en donde el alquilsulfonilo y el arilsulfonilo están opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente de halo, nitro (NO₂) y alquilo C₁-C₃), triarilo y triarilsililo; y Z representa oxígeno (O), azufre (S), selenio (Se) o nitrógeno sustituido (N-R''), en donde R'' se define como para R anteriormente; o R'' es un grupo amino, NR'R''', un grupo hidroxilo u OR''', en donde

R''' se selecciona independientemente entre las opciones para R como se define anteriormente.

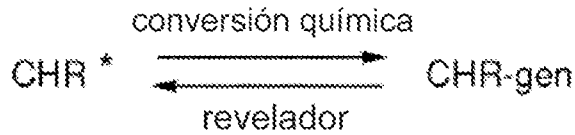
En una realización, el profluoróforo (Pro-FL) útil en la práctica de la presente invención se puede preparar a partir del fluoróforo (FL *) mediante conversiones químicas, conocidas en la técnica, y como se representa en el esquema general III, como se muestra a continuación.

Esquema general III



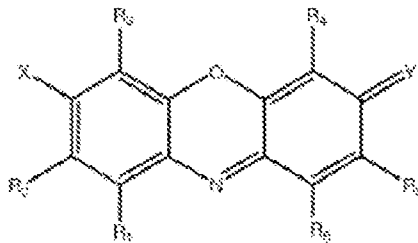
En otra realización, dicho cromógeno (CHR-gen) se puede preparar a partir del cromóforo (CHR*) mediante conversiones químicas, conocidas en la técnica, y como se representa en el Esquema general IV, que se muestra a continuación.

Esquema general IV



- 5 Ejemplos de las conversiones anteriores de fluorógeno en profluorógeno o cromóforo en cromógeno de acuerdo con la presente invención se representan en los ejemplos 1, 2 y 6 a continuación.

En otra realización, el profluoróforo puede ser una oxazina tal como por ejemplo:



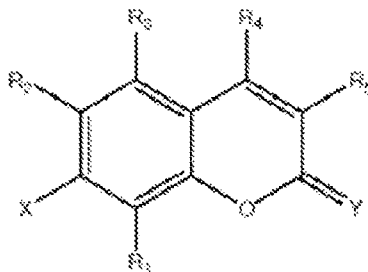
Fórmula II

- 10 en donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ son hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), nitro (NO₂), ciano (CN), carbonilo (CHO o C(O)R), alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈ o arilo. Cada uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ también puede formar un anillo opcionalmente sustituido entre sí o entre R_n y X

- o Y, o ambos. X e Y son oxígeno sustituido, X=OR o nitrógeno, Y=NRR' en donde los sustituyentes R, R' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₈, arilo y acilo C₁-C₈, trialquilo y triarilsililo; estando cada alquilo, arilo y acilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente de halo, nitro (NO₂) y alquilo C₁-C₃, alquilsulfonilo (RSO₂-) y arilsulfonilo (ArSO₂-), en donde el alquilsulfonilo y el arilsulfonilo están cada uno opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente de halo, nitro

(NO₂) y alquilo C₁-C₃.

En otro caso, en una realización, el profluoróforo puede ser una cumarina tal como:



Fórmula III

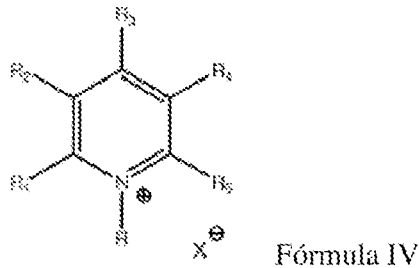
- 20

en donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente, hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), nitro (NO₂), ciano (CN), carbonilo (CHO o C(O)R), alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈ o arilo; en donde cada alquilo, arilo y acilo está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente de halo, nitro (NO₂) y alquilo C₁-C₃, alquilsulfonilo (RSO₂-) y arilsulfonilo (ArSO₂-), en donde el alquilsulfonilo y el

arilsulfonilo están cada uno opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, nitro (NO₂) y alquilo C₁-C₃.

R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ también pueden formar un anillo entre sí o entre R_n y X; en donde X representa oxígeno sustituido, X=OR o nitrógeno sustituido, X=NRR' en donde los sustituyentes R,

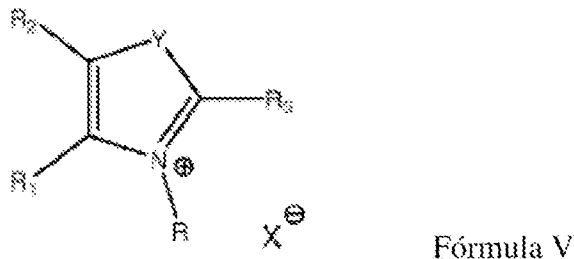
- 5 R' son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o acilo C₁-C₈ (estando cada alquilo, arilo y acilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, nitro (NO₂) y alquilo C₁-C₃), alquilsulfonilo (RSO₂-) y arilsulfonilo (ArSO₂-), en donde el alquilsulfonilo y arilsulfonilo están opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, nitro (NO₂), y grupos alquilo C₁-C₃; trialquilo y triarilsililo, y Y representa oxígeno (O) o NH.
- 10 En otra realización, el profluoróforo puede ser un compuesto de fórmula IV, como se muestra a continuación:



en donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente, hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), nitro (NO₂), ciano (CN), alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, o arilo, estando cada alquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente de halo, nitro

- 15 (NO₂), y alquilo C₁-C₃. R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ también pueden formar un anillo entre dos cualesquiera de R₁ y R₂, R₃, R₄ y R₅, o entre uno cualquiera de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ y el N de fórmula IV; y en donde R es hidrógeno, alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, arilalquilo (tal como bencilo), o arilo en donde cada uno de los alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, arilalquilo y arilo están opcionalmente sustituidos con uno a seis sustituyentes seleccionados independientemente entre carboxilo (COOH), sulfonato (SO₃H) y amino (NH₂). X en la fórmula IV representa un contraión ejemplificado por, pero no limitado a: cloruro, bromuro, yoduro, tosilato, mesilato y perclorato.
- 20

En otra realización, el profluoróforo puede ser un compuesto de fórmula V, como se muestra a continuación:

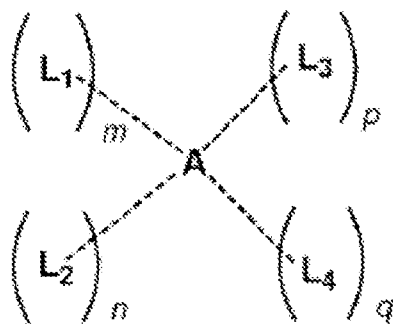


- en donde R₁, R₂ y R₃ son hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), nitro (NO₂), alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈ o arilo, cada uno independientemente opcionalmente sustituido con uno a tres halo, nitro (NO₂), grupos alquilo C₁-C₃. R₁, R₂ y R₃ también pueden formar una estructura cíclica entre dos cualesquiera de R₁, R₂ y R₃, o entre uno cualquiera de R₁, R₂ y R₃ y N o Y del heterociclo de fórmula V; y
- 25

en donde R es hidrógeno, o alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, arilalquilo (tal como bencilo) o arilo, estando cada alquilo, cicloalquilo y arilalquilo independientemente opcionalmente sustituido. Los sustituyentes adecuados incluyen, entre otros, carboxilo (COOH), sulfonato (SO₃H) y amino (NH₂), etc.

- 30 X representa un contraión adecuado tal como por ejemplo, pero sin limitación: cloruro, bromuro, yoduro, tosilato, mesilato y perclorato. Y es oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio o C(CH₃)₂.

En otra realización de la invención, el profluoróforo puede ser cualquiera de las fracciones A, L₁, L₂, L₃, L₄ en la fórmula VI (a continuación):



Fórmula VI

En donde la suma de $m+n+p+q$ es un número entero positivo entre 1 y 12; m es al menos uno; y n , p y q son cada uno independientemente cero o un número entero positivo. En una realización, el complejo se forma a partir de A , L_1 , L_2 , L_3 , L_4 en la fórmula VI con o sin la ayuda de un catalizador o activador como se explica a continuación.

Además, L_1 , L_2 , L_3 , L_4 pueden ser diferentes entre sí ($L_1 \neq L_2 \neq L_3 \neq L_4$); o dos o más de las fracciones L_1 , L_2 , L_3 , y L_4 pueden ser iguales. En una realización particular, las fracciones L_1 , L_2 , L_3 , L_4 son todas iguales ($L_1 = L_2 = L_3 = L_4$).

La estructura representada por la fórmula VI es un compuesto de coordinación tal como, por ejemplo, un compuesto organometálico, donde A es un ion central que está quelado por los ligandos L_1 , L_2 , L_3 , L_4 . El ion central A y los ligandos L_1 , L_2 , L_3 , L_4 se eligen de tal manera que sólo la combinación de A coordinada por los ligandos L_1 , L_2 , L_3 , L_4 generará una señal espectroscópica discreta manifestada por color o fluorescencia, o ambos.

L_1 , L_2 , L_3 , L_4 puede ser cualquier fracción química capaz de formar enlaces de coordinación con el ion central A , a través de pares de electrones disponibles en un átomo de nitrógeno, oxígeno, azufre o selenio del ligando. Una categoría de moléculas útiles en la presente invención como ligando incorpora un compuesto heterocíclico y derivados del mismo, que pueden incluir, entre otros, un heterociclo seleccionado entre: furano, tiofeno, pirrol, oxazol, tiazol, imidazol, pirazolidinilo, pirazol, isoxazol, isotiazol, oxadiazol, triazol, tiadiazol, tetrazol, 2H-pirano, 4H-pirano, piridina, bipyridilo, terpiridina, triazina, piperidina, pirrolidina, 1,4-dioxano, morfolina, 1,4-ditiano, tiomorfolina, pirazina, piridazina, pirimidina, piperazol, azepano, diazepina, indolizina, indol, isoindol, bencimidazol, benzoxazol, benzotiazol, purina, quinolizidina, quinolina, isoquinolina, diazanaftalenos, pteridina y fenantrolina.

Otra categoría de ligandos L incluye quelantes polidentados y sus derivados, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano- N,N,N',N' -tetraacético (BAPTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido trietilentetramina- N,N,N',N'',N''',N'''' -hexaacético (TTHA), N,N,NN' -tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)- N,N,N',N' -tetraacético (EGTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-5,12-diona deshidratada (5,12-dioxociclám), calixarenos (por ejemplo, meso-octametil-calix(4)pirrol, calix[4]areno-25,26,27,28-tetrol, calix[6]areno), éteres corona (por ejemplo, dibenzo-15-corona-5, ciclen), ciclodextrinas (por ejemplo, α -ciclodextrina).

Otra categoría de ligandos, L , incluye, entre otras, β -dicetonas (por ejemplo, acetilacetona y sus derivados, incluyendo hexafluoroacetilacetona; 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona; 1,3-difenil-1,3-propanodiona); óxidos de fosfina (por ejemplo, óxido de trifenilfosfina, óxido de n -trioctilfosfina); ácidos aromáticos y fenoles y sus derivados (por ejemplo, tiron, catecol, ácido salicílico); Bases de Schiff y sus derivados (por ejemplo, la 2-fenolsalicilimina representada en el ejemplo 5 a continuación).

Otra clase de ligandos, L , incluye moléculas de disolvente. Esta clase es químicamente muy diversa e incluye varios de los compuestos mencionados anteriormente, tales como los compuestos heterocíclicos (piridina, colidina, furano, tetrahidrofurano (THF), etc.) y éteres de corona (15-corona-5, etc.), así como otras moléculas que representan una amplia selección de funcionalidades químicas. Estos incluyen, por ejemplo, las siguientes moléculas y sus derivados: agua, alcoholes (metanol, etanol, etc.), aminas (trietilamina, diisopropilamina, morfolina, dimetilamina, N,N -dimetilaminopiridina (DMAP), etc.), éteres (éter dietílico, etc.), disolventes apróticos polares (dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), hexametilfosforamida (HMPA), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), 1-metil-2-pirrolidinona (NMP), acetonitrilo (AcCN), sulfolano, tetraetilenglicol dimetil éter (tetraglima), etc.).

En realizaciones de la presente invención, el ion central A puede ser cualquier ion cargado positivamente capaz de formar un compuesto de coordinación con uno o más de los ligandos, L . Una categoría de iones útil en la

práctica de la presente invención es la categoría de iones metálicos, que incluyen, entre otros, iones de metales de transición, iones de metales alcalinos y alcalinotérreos, lantánidos y actínidos.

5 El ion central A puede proporcionarse en forma de una sal orgánica o inorgánica. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen, entre otras, sales de ácidos minerales tales como sulfatos, sulfitos, sulfuros, nitratos, nitritos, carbonatos, boratos, fosfatos, selenatos, fluoruros, cloruros, bromuros, yoduros, cloratos, percloratos, etc. Las sales orgánicas adecuadas incluyen, entre otras, sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácidos monocarboxílicos (por ejemplo, sales de ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, píválico, 2-etilhexanoico, palmítico, esteárico, oleico, benzoico, salicílico, 4-sulfosalicílico, etc.), sales de ácidos policarboxílicos (por ejemplo, sales de ácidos oxálico, malónico, succínico, glutárico, adípico, cítrico, trimésico, melítico, etc.).

10 Otra clase de ion central A incluye fracciones que contienen átomos de oxígeno tales como hidróxidos y óxidos, etc.

15 La elección de la forma suministrada del ion central A para cualquier realización particular de la presente invención está dictada por la aplicación (es decir, el objeto o ítem a marcar y su entorno) y las propiedades del portador (es decir, la naturaleza del medio que incluye el marcador, tal como por ejemplo un recubrimiento, una pintura o una capa de barniz).

20 En una realización, el complejo se forma a partir de A, L₁, L₂, L₃, L₄ en la fórmula VI con la ayuda de un catalizador o activador. Los catalizadores y activadores útiles en la práctica de la presente invención incluyen agentes básicos y nucleofílicos, ejemplificados pero no limitados a, bases orgánicas e inorgánicas simples (hidróxidos, aminas, alcóxidos, fenóxidos y similares). Esta categoría también comprende sales inorgánicas u orgánicas de ácidos débiles y bases fuertes que generan, tras la solvólisis, soluciones alcalinas, por ejemplo, carbonatos, bicarbonatos, boratos, fosfatos, acetatos de amonio, metales alcalinos y alcalinotérreos, etc. Son hidróxidos de ejemplo hidróxidos alcalinos y alcalinotérreos tales como hidróxidos de amonio, litio, sodio, potasio, rubidio, cesio, calcio, estroncio o bario así como hidróxidos de tetraalquilamonio, tales como

25 hidróxido de tetrametilamonio o tetrabutilamonio. Ejemplos de aminas útiles como catalizadores y activadores incluyen, entre otros: trietilamina, diisopropilamina, bencilamina, morfolina, pirrolidina, piperidina, dimetilaminoanilina, etc. Ejemplos de alcóxidos y fenóxidos útiles como catalizadores y activadores incluyen, entre otros: alcóxidos y fenóxidos alcalinos, tales como: metóxido, etóxido o fenóxido de sodio o potasio.

30 En otra realización, el catalizador es una sustancia ácida, como se define en la teoría de Brønsted-Lowry o de Lewis, y puede representarse mediante un ácido orgánico o inorgánico simple, así como cualquier sal inorgánica u orgánica de base débil y ácido fuerte que genere condiciones ácidas tras la solvólisis, por ejemplo, cloruro metálico, bromuro, nitrato, sulfato, etc.

Los compuestos útiles como reveladores, es decir, agentes descifradores en la práctica de la presente invención incluyen compuestos conocidos en la técnica como buenos quelantes o agentes complejantes, tales como por ejemplo y sin limitación:

35 • Compuestos aromáticos heterocíclicos, por ejemplo, imidazoles, fenantrolinas, piridinas, tiazoles y sus derivados;

• Quelantes polidentados (EDTA, EGTA, BAPTA, DOTA, DTP A);

• β-dicetonas (por ejemplo, acetilacetona y sus derivados, incluyendo, entre otros, hexafluoroacetilacetona; 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona; 1,3-difenil-1,3-propanodiona);

40 • Óxidos de fosfina (óxido de triocilfosfina; óxido de trifenilfosfina);

• Ácidos aromáticos y polifenoles (por ejemplo, ácido salicílico, catecol, tiron);

• Aldehídos aromáticos (por ejemplo, 4-(N,N-dimetilamino)benzaldehído, 4-(N,N-dimetilamino)cinamaldehído, p-anisalaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, etc.)

• Bases de Schiff y derivados (por ejemplo, 2-fenilsalicil imina representada en el ejemplo 5 a continuación).

45 Los compuestos útiles como reveladores, es decir, agentes descifradores en la práctica de ciertas realizaciones de la presente invención incluyen compuestos conocidos en la técnica como especies nucleofílicas, involucradas en la solvólisis o desprotección, tales como por ejemplo bases orgánicas e inorgánicas simples (hidróxidos, aminas, alcóxidos, fenóxidos y similares); sales orgánicas e inorgánicas simples (acetatos, sulfuros, yoduros, fluoruros, oxalatos, citratos y similares).

50 Los compuestos útiles como reveladores, es decir, agentes descifradores en la práctica de ciertas realizaciones de la presente invención, también incluyen compuestos conocidos en la técnica como especies ácidas, implicadas en la solvólisis o desprotección, tales como ácidos orgánicos e inorgánicos simples. En otras

realizaciones, el revelador puede ser una especie electrófila para solvólisis o desprotección, tal como, por ejemplo, un compuesto de aldehído, por ejemplo, benzaldehído o salicilaldehído, o derivados de los mismos.

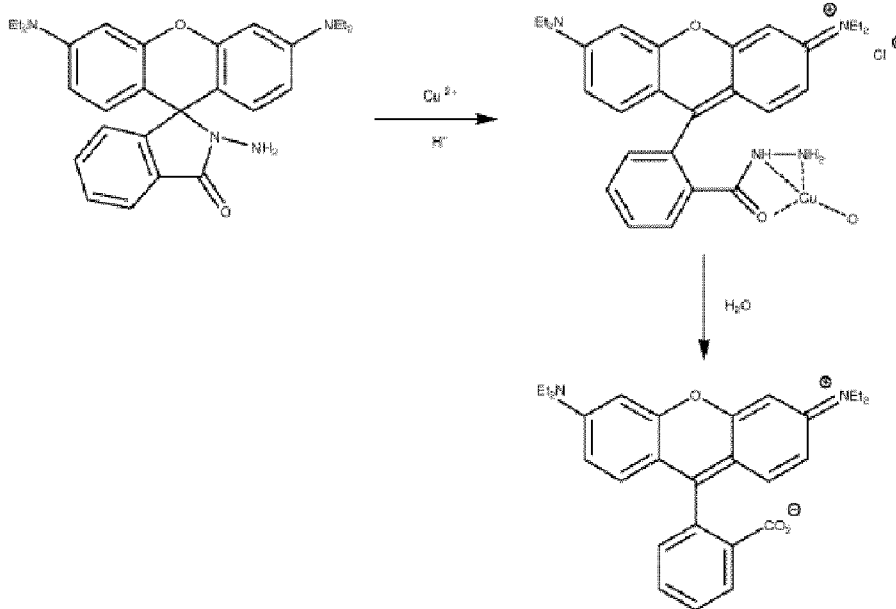
En algunas realizaciones específicas, el profluoróforo o cromógeno se puede usar como revelador y cualquiera de los compuestos químicos enumerados anteriormente se puede usar en el recubrimiento o incrustarse en el material marcado. A continuación se puede utilizar el cromógeno o profluoróforo como revelador.

En algunas realizaciones específicas, el revelador puede requerir la presencia del catalizador para acelerar la reacción de descifrado del fluoróforo cifrado (que también puede denominarse profluoróforo) o el cromóforo cifrado (que también puede denominarse procromóforo o cromógeno) y hacer que el marcador sea útil como sistema rápido de autenticación en el campo. Los catalizadores útiles en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, agentes básicos y nucleofílicos, ejemplificados pero no limitados a, bases orgánicas e inorgánicas simples (hidróxidos, aminas, alcóxidos, fenóxidos y similares). En otra realización, los catalizadores pueden ser un ácido orgánico o inorgánico simple.

Ejemplos

1. Profluoróforos

Los profluoróforos cifrados son fluoróforos encubiertos/ocultos que se revelan mediante el revelado con un reactivo específico que convierte la forma profluoróforo o leuco, que puede ser incolora y muestra poca o ninguna fluorescencia, en el fluoróforo activo que también puede tener un color intenso bajo luz visible



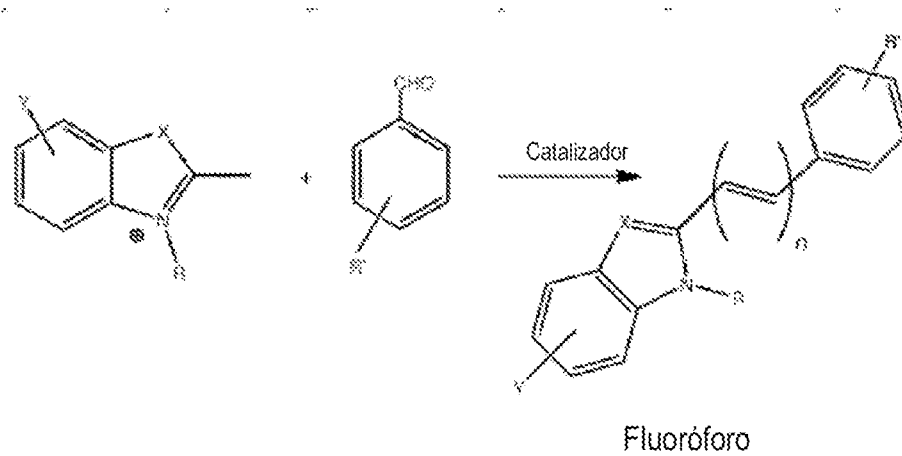
Por ejemplo, el compuesto rodamina B hidrazida, un compuesto incoloro, se puede revelar con iones metálicos Cu^{2+} en condiciones ácidas para producir un compuesto magenta con intensa fluorescencia de color rojo anaranjado. Vea la reacción ilustrada arriba, que

muestra la conversión de la hidrazida incolora al compuesto coordinado de cobre magenta por el ion cobre, que a su vez se hidroliza lentamente al carboxilato incoloro. En otros ejemplos de profluoróforos, las propiedades naturales de susceptibilidad a una reacción de hidrólisis de primer orden se pueden utilizar como una "marca de tiempo" en donde la tasa de desintegración en el aire o en un portador específico en condiciones normales es característica del fluoróforo cifrado particular. Por ejemplo, el compuesto puede ser una forma leuco elegida para que sea relativamente estable en un líquido, tal como una tinta, y se desintegra durante un período de semanas para producir una forma coloreada e intensamente fluorescente.

2. Fluoróforos de dos partes

Los fluoróforos de dos partes se ensamblan a partir de dos componentes no fluorescentes o muy débilmente fluorescentes (A) y (B), en algunos casos en presencia de un catalizador. Sólo tras la reacción de los componentes (A) y (B) se produce el fluoróforo real. La reacción entre ambos componentes también puede generar cambios colorimétricos además de revelar fluorescencia. El componente (A) del fluoróforo de dos partes se puede utilizar como marcador oculto de seguridad/autenticación y la verificación se puede lograr añadiendo el segundo componente (B) al componente (A) para producir el fluoróforo activo. En determinadas realizaciones, este proceso puede mejorarse mediante la adición de un catalizador.

Por ejemplo, se pueden usar sales de benzazolio sustituidas como componente (A) y revelarse con un reactivo específico (y un catalizador opcional) como se ejemplifica a continuación:

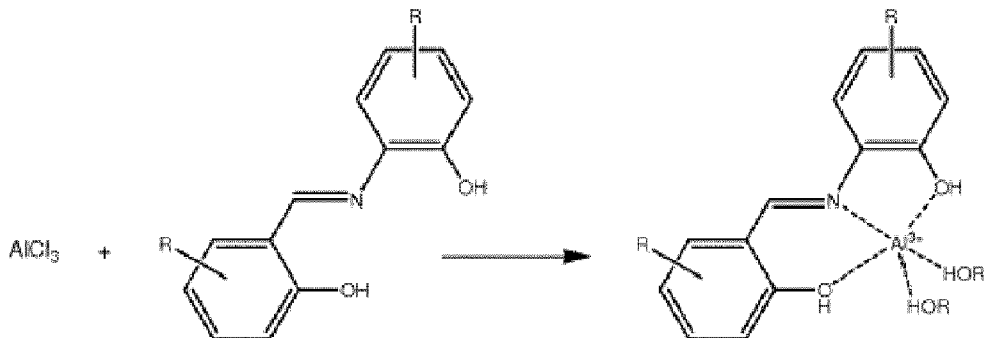


5 Estos componentes (A) no fluorescentes son estables y sólo se revelan mediante exposición a los segundos componentes (B) apropiados y no se descifran espontáneamente con el tiempo.

Se pueden usar sustituyentes alternativos de los compuestos aromáticos para cambiar las propiedades espectrales o el perfil de solubilidad del fluoróforo a opción del químico o del diseñador del profluoróforo como marcador críptico.

3. Profluoróforos termoestables

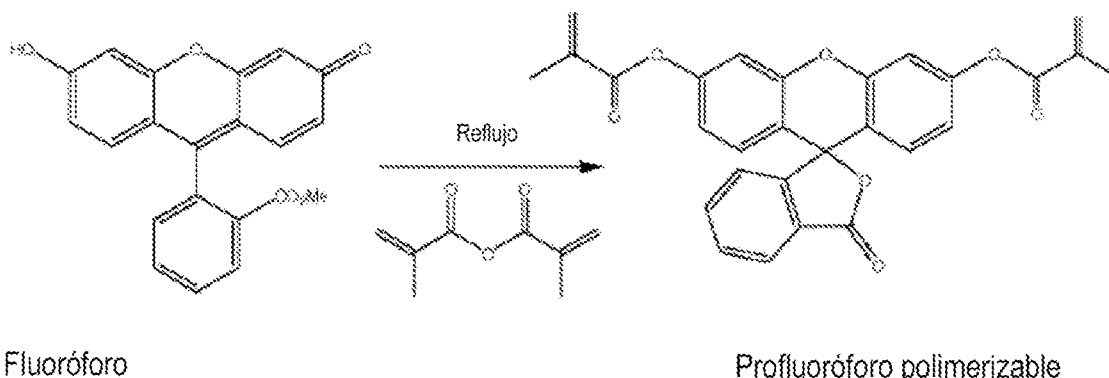
10 Los elementos inorgánicos se pueden utilizar como marcadores termoestables o incluso resistentes al fuego que pueden revelarse mediante el revelado con un reactivo específico, que puede ser un componente orgánico. Por ejemplo, se puede utilizar cloruro de aluminio ($AlCl_3$) como marcador encubierto que se puede incorporar, por ejemplo, a una tinta, una laca o un barniz y se revela mediante la adición de un agente quelante específico que se vuelve intensamente fluorescente formando un compuesto de coordinación con nuevas propiedades espectrales. En algunos casos, puede ser necesario un catalizador para acelerar la reacción. A continuación se muestra un ejemplo de la formación de un fluoróforo a base de aluminio a partir de un marcador de cloruro de aluminio ($AlCl_3$):



20 Otros elementos o iones inorgánicos útiles como profluoróforos termoestables incluyen aniones tales como iones fosfato, iones yoduro, iones fluoruro e iones acetato; y cationes tales como iones metálicos. Se puede utilizar la elección adecuada de sustituyentes alternativos de los compuestos de coordinación aromáticos o quimiosensores para cambiar las propiedades espectrales y otras propiedades fisicoquímicas del fluoróforo a opción del diseñador.

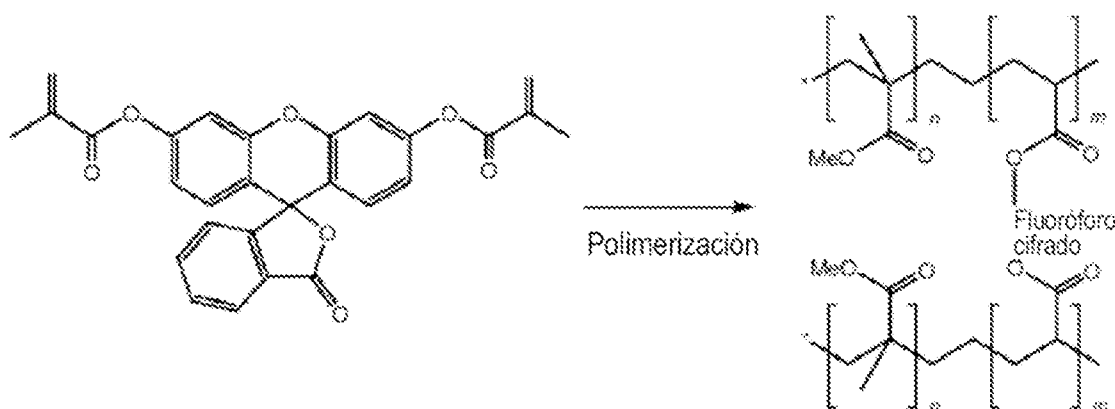
4. Profluoróforos cifrados polimerizables

25 Los profluoróforos cifrados pueden volverse polimerizables mediante la adición de grupos funcionales apropiados. Estos profluoróforos cifrados pueden basarse en fluoróforos excelentes (brillantes y con altos rendimientos cuánticos) que se sintetizan de forma fácil y económica. Se pueden proporcionar procromóforos y profluoróforos con propiedades de emisión cromófora y de fluorescencia, dependiendo del cromóforo o plantilla de fluoróforo elegido.



La estabilidad química y la hidrofobicidad de los profluoróforos se pueden controlar mediante la elección de los grupos acilo o sustituyentes del anillo aromático apropiados.

- 5 En el método de la invención, el profluoróforo polimerizable encapsula un marcador de seguridad de ADN. Por tanto, los fluoróforos cifrados también se pueden incorporar en nanopartículas que contienen ADN, tal como el ADN encapsulado. A continuación se muestra la polimerización del profluoróforo polimerizable ejemplificado anteriormente en un polímero de metacrilato de metilo:

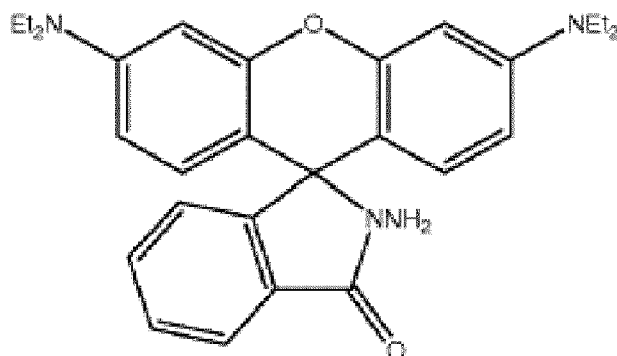


Profluoróforo polimerizable

- 10 Dichos polímeros se pueden usar para encapsular marcadores de seguridad, tales como ADN u otras biomoléculas, o se pueden ensamblar como micropartículas o nanopartículas para usar como marcadores transferibles, o para incorporarlos en polímeros u otros materiales con o sin ADN atrapado u otros marcadores detectables.

- 15 Los siguientes ejemplos 1-6 son realizaciones de los compuestos descritos anteriormente útiles como marcadores ópticos cifrados.

Ejemplo 1: Síntesis de rodamina B hidrazida

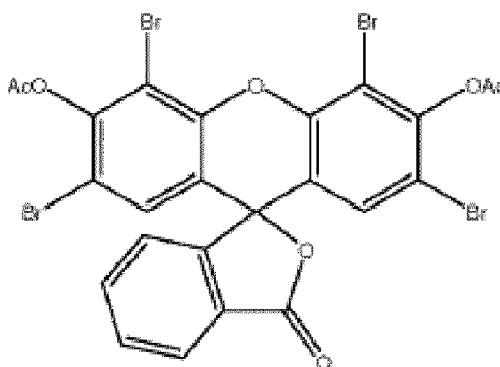


2-amino-3',6'-bis(dietilamino)espiro[isoidolina-3,9'-xanteno]-1-ona

Se disolvió rodamina B (479 mg) en etanol y se añadió a esta mezcla un exceso de hidrazina acuosa al 65% con agitación vigorosa. Después de reflujo durante 2 horas, la mezcla de reacción se enfrió y se recogió un precipitado blanquecino. El sólido se lavó extensamente con una mezcla de etanol: agua y el producto 2-amino-3',6'-bis(dietilamino)espiro[isoidolin-3,9'-xanteno]-1-ona se secó al vacío.

5

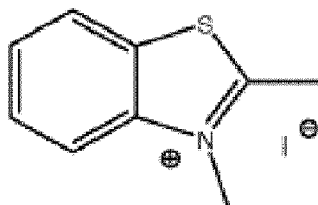
Ejemplo 2: Síntesis de diacetato de eosina Y



(6'-acetoxi-2',4',5',7'-tetrabromo-3-oxo-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-3-il)acetato

10 Se suspendió eosina Y (648 mg) en anhídrido acético y la mezcla se agitó a reflujo durante 5 horas. Luego se añadió lentamente la mezcla de reacción a la mezcla de hielo y agua. El sólido marrón claro resultante se recogió y se lavó con varias porciones de agua. Luego el producto se disolvió en dimetilformamida (DMF) y se precipitó añadiendo agua. Después de lavar con agua, el producto sólido acetato de (acetoxi-2',4',5',7'-tetrabromo-3-oxo-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-3-il) se secó al vacío.

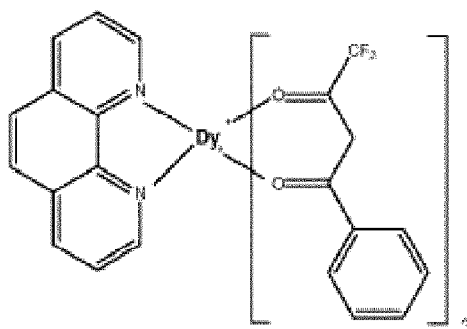
15 Ejemplo 3: Síntesis de yoduro de 1-dimetilbenzotiazolio



Yodhidrato de 2,3-dimetil-1,3-benzotiazol

20 A 2-metilbenzotiazol (2,54 ml) en tolueno yodometano anhidro (2.5 ml) se le añadió en porciones. La mezcla se sometió a reflujo durante 6 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente y después se dejó durante varias horas a 4°C. El precipitado amarillo resultante se recogió y se lavó repetidamente con acetona. Después, el producto sólido de hidroyoduro de 2,3-dimetil-1,3-benzotiazol se secó al vacío.

Ejemplo 4: Síntesis de un complejo de disprosio fluorescente



25

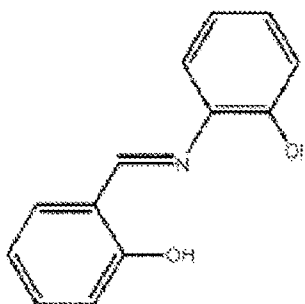
dimetildisproso; metilo; [(E)-[3-oxo-3-fenil-1-(trifluorometil)propiliden]-3-oxidanilo];

1, 10-fenantrolina

Se disolvieron 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (649 mg) y 1,10-fenantrolina en etanol absoluto (3 ml). A esta solución se añadió gota a gota hidróxido de sodio acuoso (1 M) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Por separado, se disolvió nitrato de disproso hidrato (456 mg) en agua (1 ml) y la solución se añadió a la diona alcalina. La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 5 horas para dar una forma sólida blanca del dimetildisproso; metilo; [(E)-[3-oxo-3-fenil-1-(trifluorometil)propiliden]-3-oxidanilo]; producto de 1,10-fenantrolina.

Ejemplo 5: síntesis de 2-fenolsalicilo

10

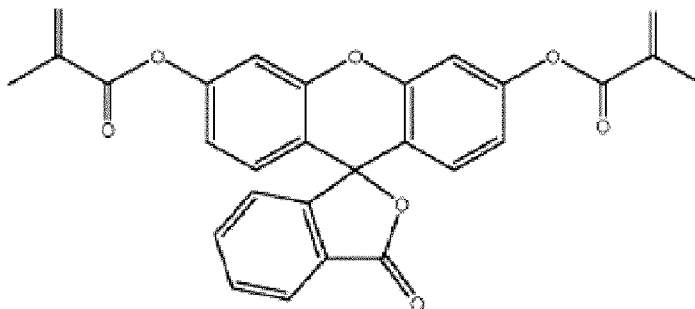


2-[(E)-(2-hidroxifenil)iminometil]fenol

Se añadió una solución de 2-hidroxianilina (2.84 g) en etanol a una solución que contenía 2-hidroxibenzaldehído (3.4 g) en etanol. La mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno y después se enfrió hasta temperatura ambiente. El precipitado naranja de 2-[(E)-(2-hidroxifenil)iminometil]fenol se lavó con etanol enfriado con hielo y se secó al vacío.

15

Ejemplo 6: Síntesis de dimetacrilato de fluoresceína



20 [6'-(2-metilprop-2-enoiloxi)-3-oxo-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-3'-ilo]

2-metilprop-2-enoato

Se suspendió sal sódica de fluoresceína (376 mg) en anhídrido metacrílico y la mezcla se agitó a reflujo durante 5 horas. Luego se añadió lentamente la mezcla de reacción a la mezcla de hielo y agua. El sólido marrón claro resultante se recogió y se lavó con varias porciones de agua. Luego el producto se disolvió en dimetilformamida y se precipitó añadiendo agua. Después de lavar con agua el sólido amarillo, el producto 6'-(2-metilprop-2-enoiloxi)-3-oxo-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-3'-il]2-metilprop-2-enoato se secó al vacío.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para marcar de manera cifrada un ítem, comprendiendo el método:
proporcionar un profluoróforo polimerizable que sea capaz de producir un compuesto fluorescente tras la reacción con un revelador, en donde el profluoróforo polimerizable encapsula un marcador de seguridad de ADN; y
5 recubrir el ítem con un recubrimiento que comprende el profluoróforo; o unir una etiqueta o indicios que comprendan el profluoróforo al ítem; o incrustar el profluoróforo en al menos una porción del ítem;
y proporcionar así un ítem marcado de manera cifrada.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el profluoróforo se ensambla como una micropartícula o nanopartícula con ADN atrapado en su interior.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el profluoróforo se incorpora en nanopartículas que contienen ADN.