



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 589**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00977665 .9**

(96) Fecha de presentación : **20.11.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1230392**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.2002**

(54) Título: **Sistema de seguridad.**

(30) Prioridad: **19.11.1999 GB 9927292**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2010

(73) Titular/es: **CRIME SOLUTIONS LIMITED**
1 Wall Hill Road, Allesley
Coventry CV5 9EN, GB

(72) Inventor/es: **Brown, Tom;**
Whiting, Paul;
Thelwell, Nichola;
Maxwell, Paul y
Maxwell, Paula

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

El presente invento está relacionado con marcadores de seguridad para marcar objetos y personas, métodos de uso de dichos marcadores, métodos de detección de dichos marcadores y dispositivos de seguridad que contienen dichos marcadores. En particular, los marcadores de seguridad usados comprenden una molécula de ácido nucleico que podrá identificarse exclusivamente a una fuente específica del marcador de seguridad.

Los marcadores de seguridad para la identificación de la propiedad de un artículo ya son conocidos en este campo. Algunos marcadores utilizan una formulación específica de diferentes compuestos químicos para identificar que un objeto es propiedad de una persona determinada o que está localizado en un lugar específico. Tales marcadores químicos se ven, por ejemplo, en la GB 2245583. Tales sistemas tienen sólo un número limitado de compuestos de identificación, dificultando por ello la identificación exclusiva de un gran número de lugares específicos.

Los marcadores de seguridad que comprenden el uso de moléculas de ácido nucleico son también conocidos en este campo, como se puede ver, por ejemplo, en las WO 94/04918, WO 87/06383 y WO 95/02702. Tales marcadores de seguridad pueden identificarse sencillamente por el uso de una sonda apropiada que puede hibridarse con el ácido nucleico dentro del marcador. El uso de la reacción en cadena de las polimerasas (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) para aislar y multiplicar una muestra de ácido nucleico en un marcador de seguridad es conocido, como se muestra en la WO 90/14441.

WO 95/02702 describe un método para hacer artículos con gotas que llevan ácidos nucleicos vinculadas a ellas.

US 5,451,505 describe un método para etiquetar y rastrear materiales usando ácidos nucleicos como taggants.

US 5,643,728 describe un método para marcar un líquido con una pluralidad de ácido nucleico con partículas.

Una ventaja de usar una molécula de ácido nucleico como marcador de seguridad es que se puede usar una secuencia única de nucleótidos para cada usuario del marcador de seguridad o para cada lugar específico en el que se utilice dicho marcador de seguridad. El uso de oligonucleótidos con secuencias aleatorias de ácido nucleico se revela en la US 5.139.812.

Los inventores se han dado cuenta de que existe un mercado para los marcadores de seguridad mejorados. Tales marcadores de seguridad pueden

utilizarse para etiquetar mercancías o alternativamente podrán usarse en un sistema de seguridad en el que son pulverizados sobre un intruso al activarse el dispositivo pertinente. En el último caso, tales marcadores de seguridad son útiles para demostrar que un intruso estuvo en la escena del crimen.

- 5 Cuando tal marcador se utilice específicamente con fines de detección criminal, es importante que la detección del marcador esté lo más libre de error posible para reducir la posibilidad de una falsa condena a terceras partes.

- 10 Los inventores se dieron cuenta de que la reacción en cadena de las polimerasas de una hebra de ácido nucleico usando un cebador apropiado, seguido por la secuenciación de dicho cebador, no siempre produce una secuencia consistente para cualquier marcador de DNA. Por lo tanto, es útil disponer de un respaldo para confirmar la secuencia de cualquier secuencia exclusiva de una zona de marcador del marcador de seguridad. Los inventores han proporcionado, por lo tanto, una segunda zona de cebador en el marcador de seguridad que permite
- 15 confirmar la secuencia de la zona del marcador facilitando la producción de la hebra complementaria por la PCR y su subsiguiente secuenciación utilizando un segundo cebador.

- 20 Por consiguiente, un primer aspecto del invento proporciona el método de producir un marcador de seguridad para marcar objetos y/o personas como se establece en las reivindicaciones.

- 25 Los términos “sustancialmente idéntico al primer cebador” o “sustancialmente el complemento inverso de un segundo cebador” se utilizan para significar que hay suficiente homología para permitir al primer o segundo cebador, y a la zona a la que están unidos en el marcador de seguridad, o a una molécula de ácido nucleico complementaria al marcador de seguridad, hibridizarse en condiciones de alto rigor. Tales condiciones se dan preferiblemente bajo condiciones típicas PCR.

Preferentemente, el marcador de seguridad es una molécula de ácido nucleico de hebra única que es más fácil de fabricar como oligonucleótido. Alternativamente, podrán usarse marcadores de doble hebra.

- 30 Preferentemente, en uso, el segundo cebador se utiliza para permitir que la molécula de ácido nucleico sea replicada por la PCR, produciendo así una segunda hebra complementaria de ácido nucleico. La hebra complementaria está formada de una zona de cebador que tiene la secuencia correcta para permitir al primer cebador unirse a ella. El primer cebador puede utilizarse, entonces, para multiplicar la hebra
- 35 complementaria de ácido nucleico.

Preferentemente, la zona del cebador complementario se localiza corriente abajo de la zona del marcador.

Los inventores se han dado cuenta también que donde se haya acoplado un marcador a un objeto o a un intruso, por ejemplo, existe con frecuencia una gran cantidad de fragmentos contaminantes de DNA, por ejemplo, de seres humanos y/o animales de compañía, tales como perros o gatos, que estén alrededor del objeto o intruso.

Por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico del primer cebador y la secuencia de ácido nucleico del segundo cebador se seleccionan de manera que haya una baja probabilidad de que sus respectivas zonas vinculantes del cebador ocurran con 150 bases o 120 o 100 bases una de otra en el DNA nativo. Es decir, que las secuencias que ocurren naturalmente a las que los cebadores usados con el marcador de seguridad pueden emparejarse en condiciones de alto rigor, no ocurren normalmente dentro de 150 bases una de otra en el DNA nativo.

Preferiblemente, la probabilidad es menor del 95%, especialmente menor del 97%, y más preferiblemente menor del 99%.

Por alto rigor queremos decir, por ejemplo, 1.5 mM $MgCl_2$, 53° de temperatura de recocido.

Esto se ha conseguido seleccionando cuidadosamente los cebadores usados contra las bases de datos de secuencias nucleótidas públicamente disponibles. Preferentemente, el DNA nativo es procariótico o eucariótico, especialmente el DNA de seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y/o insectos.

Esto tiene la ventaja de que es posible identificar rápidamente fragmentos de DNA amplificados que contengan la zona del marcador por tamaño. Uno u otro cebador puede emparejarse a un marcador de DNA no seguro, pero para producir un producto PCR se requiere que ambos cebadores se emparejen, pero es probable que éstos produzcan sólo DNA de un tamaño diferente al DNA del marcador de seguridad de DNA, permitiendo así que tales fragmentos sean fácilmente descartados.

Una vez que se haya identificado una muestra que contenga un marcador de seguridad, dicho marcador de seguridad podrá entonces secuenciarse para determinar la secuencia exacta de la zona del marcador.

Preferentemente, los cebadores y las zonas a las cuales se emparejan en el marcador de seguridad, o a una molécula complementaria, son 100% complementarios a su zona vinculante. Esto permite usar unos altos niveles de rigor para probar la presencia del marcador.

En una de sus posibles formas especialmente preferidas, los inventores han identificado ese ácido nucleico del oso perezoso de garganta marrón (*Bradypus variegatus*). La secuencia especialmente preferida del oso perezoso de garganta marrón es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al gene ND1 mitocondrial del oso perezoso.

Por ácido nucleico queremos decir DNA o RNA de hebra sencilla o doble de origen natural o sintético, o derivados sintéticos del mismo, que podrían estar total o parcialmente formados de bases raras o por bases modificadas.

Las zonas del cebador están dispuestas en el ácido nucleico para permitir a un cebador apropiado de ácido hibridarse selectivamente a la zona del cebador, permitiendo así al marcador de seguridad que contiene la zona del marcador amplificarse a partir de una muestra.

Preferentemente, la zona del cebador está formada de entre 15 y 50, preferentemente 17-30, especialmente 18 nucleótidos para permitir un rigor suficientemente alto de hibridación con un cebador apropiado usado para identificar la presencia del marcador de seguridad. El propio cebador puede usarse para amplificar directamente el marcador de seguridad, por ejemplo, por una reacción en cadena de polimerasas.

El primer cebador y el segundo cebador pueden ser el mismo o diferente.

La propia zona del marcador contiene una secuencia predeterminada de ácido nucleico que es preferentemente exclusiva al propietario de un marcador de seguridad particular o para un lugar particular, como una fábrica específica, o un coche específico. Por ejemplo, donde se use el marcador de seguridad sobre un artículo y el artículo haya sido borrado y, posteriormente, recuperado por la policía, una vez que el marcador de seguridad sea identificado secuenciando la secuencia del marcador, podrá localizarse al propietario del artículo robado. Alternativamente, por ejemplo, donde el marcador de seguridad se haya pulverizado sobre un intruso, entonces la secuencia exclusiva del marcador de seguridad puede identificar que el intruso ha estado dentro de las instalaciones de una fábrica en particular, o dentro de un coche cuando, por ejemplo, se haya activado un dispositivo de seguridad conteniendo el marcador de seguridad.

El término "complementario" define la relación entre dos hebras de DNA o DNA y RNA donde sean complementarias una con otra si sus secuencias están relacionadas por reglas de emparejamiento de bases. Así pues, ATCG es complementaria a la secuencia TAGC y está emparejada con ella por medio de una

unión de hidrógeno. Por lo tanto, la precisión de la secuenciación de la zona del marcador puede determinarse comparando la secuencia con la secuencia obtenida para el marcador del segundo cebador y viendo si las dos secuencias son complementarias una con otra. Este doble mecanismo de control es importante para la seguridad.

Preferentemente, la zona del marcador está formada de entre 10 y 30 nucleótidos, especialmente entre 15 y 25, más preferentemente 20 nucleótidos de longitud. Esto permite un gran número de secuencias exclusivas, cada una de las cuales es exclusiva a una aplicación particular del marcador de seguridad a generarse.

Uno de los cebadores o cada cebador puede separarse de la zona del marcador por un tramo de hasta 50, especialmente entre 20 y 40, más preferentemente un tramo de 20 a 30 nucleótidos de longitud. Los inventores han encontrado que el tramo de nucleótidos entre el cebador y la zona del marcador mejora la precisión de la secuenciación del marcador de seguridad.

La molécula de ácido nucleico en el marcador de seguridad podría etiquetarse. Podría etiquetarse, por ejemplo, con un tinte visible que permita al marcador de seguridad ser visto fácilmente a simple vista. Alternativamente, la etiqueta puede ser un tinte fluorescente que permita a la molécula de ácido nucleico ser identificada con una luz ultravioleta.

En la Tabla 1 se ilustra un ejemplo de marcadores de seguridad apropiados.

Tabla 1

Características espectrales de los tintos fluorescentes apropiados para etiquetar oligonucleótidos				
Tinte	Longitud onda absorción	Longitud onda emisión	Coef. Extinción $M^{-1}cm^{-1}$	Rendimiento cuántico
5-or 6-FAM (fluorescencia)	500	525		
TET	525	550		
JOE	530	555		
HEX	540	565		
TAMRA	555	580		
ROX	585	610		
BODIPY FL C3	502	510	82.400	
BODIPY FL-X	503	510	85.306	
BODIPY TMR-X C3	544	570	55.586	

BODIPY 493/503	493	503	79.169	
BODIPY 530/550	530	550	77.000	
BODIPY 558/568	558	568	95.700	
BODIPY 564/570	564	570	141.650	
BODIPY 576/589	576	589	83.400	
BODIPY 581/591	581	591	135.900	
BODIPY TR-X C3	587	616	67.700	
Cy2	489	506	150.000	>0,12
Cy3	550	570	150.000	>0,15
Cy3.5	581	596	150.000	>0,15
Cy5	649	670	250.000	>0,28
Cy5.5	675	694	250.000	>0,28
Cy7	743	767	250.000	0,28
FluorX	494	520	68.000	0,3
R6G (6-carboxi- 535 555 rodamina 6G	535	555		
Rojo Texas	584	603	116.300	

Alternativamente, el marcador de seguridad puede comprender una o más etiquetas separadas tales como etiquetas colorimétricas y/o fluorescentes.

Las moléculas de ácido nucleico, cuando se exponen a la superficie de cualquier objeto, pueden ser degradadas por nucleasas que ocurren naturalmente, tales como las exonucleasas 3' o 5'. Tales nucleasas pueden estar presentes en la piel de una persona o en las bacterias de la superficie de un objeto. Por lo tanto, es deseable mejorar la resistencia de los marcadores de seguridad al ataque de tales enzimas. Por lo tanto, preferentemente la molécula de ácido nucleico comprende, en uno o en ambos extremos, un agente de bloqueo. Tales agentes de bloqueo incluyen los agentes que se sabe que resisten los ataques de las nucleasas, tales como los grupos de enlaces de fosforotioatos, nucleasas no naturales, dendrímeros o aminoalquilos.

También es deseable hacer que el marcador de seguridad se vincule al objeto al que se ha acoplado. La molécula de ácido nucleico comprende preferentemente uno o más agentes de enlace que ayudan a unir la molécula de ácido al objeto. Los agentes de enlace pueden incluir biotina, vitamina E, colesterol y fosfotioatos. La biotina, la vitamina E y el colesterol pueden usarse, ya que son moléculas liposolubles

que permiten a la molécula de ácido nucleico fijarse a la piel del intruso. Además, la biotina es especialmente útil porque las moléculas de ácido nucleico que contengan biotina que haya sido obtenida de una muestra, pueden aislarse fácilmente pasando una solución hecha de la muestra por una columna que contenga avidina. La molécula de ácido nucleico que contengan biotina puede unirse a la avidina de la columna, permitiendo su aislamiento y purificación.

Los fosforotioatos son útiles como agentes de unión porque forman enlaces de bisulfuro con residuos de cisteína que ocurren de forma natural en las proteínas, tales como la lana, pelo, uñas, etc.

El marcador de seguridad puede eliminarse de la superficie de un objeto por cualquier medio apropiado. Por ejemplo, se ha encontrado que limpiar con un algodón usando etanol obtiene buenos resultados. También se pueden utilizar raspaduras de la piel. Se ha encontrado también que el ditioneitol (DTT) es útil para aislar marcadores de seguridad con fosfotioato incorporado en la molécula de ácido nucleico. El DTT desnaturaliza cualquier unión de bisulfuro entre el fosfotioato y las proteínas del objeto que ha sido marcado, liberando así el marcador de seguridad.

Se pueden utilizar marcadores de seguridad de distintos colores o con distintas etiquetas fluorescentes para situaciones diferentes. Por ejemplo, se puede utilizar un color específico en un país y no en otro, permitiendo así la identificación de criminales sospechosos cuando pasan por la aduana, por ejemplo. Alternativamente, se pueden utilizar diferentes colores para situaciones diferentes, por ejemplo, para demostrar si una persona ha realizado un robo de un coche o si ha participado en el robo de una fábrica.

El invento proporciona además el uso de un marcador de seguridad, según el invento, para marcar un objeto.

También se proporciona un método de marcar un objeto que consiste en aplicar un marcador de seguridad, según el invento, a dicho objeto. Un marcador de seguridad puede aplicarse por cualquier método apropiado, como el uso de un cepillo, un spray, un aerosol o una corriente. Preferentemente, el objeto es un ser humano, como un intruso.

También se proporcionan métodos de detectar los marcadores de seguridad, según el invento; el método comprende los siguientes pasos:

obtener una muestra de un objeto que potencialmente ha sido etiquetado con un marcador de seguridad, según el invento;

(ii) amplificar el marcador con dos cebadores capaces de unirse selectivamente al ácido nucleico del marcador; y

(iii) secuenciar cualquier marcador de seguridad identificado desde, al menos, un cebador para determinar la secuencia del ácido nucleico de la zona del
5 marcador dentro del marcador de seguridad.

El marcador de seguridad puede amplificarse, por ejemplo, por la PCR antes de la secuenciación del marcador de la primera zona.

El marcador de seguridad puede comprobarse adicionalmente con una segunda sonda capaz de hibridizar la segunda zona del cebador una vez que el
10 marcador ha sido replicado para formar una hebra complementaria, por ejemplo, por PCR, y entonces se secuencia la zona del segundo marcador.

Las zonas del marcador pueden secuenciarse por cualquiera de los métodos conocidos en el sector, como la secuenciación por dideoxi, por espectrometría de masas u otras técnicas conocidas en el sector.

15 Tal secuenciación puede ocurrir tras la amplificación inicial por PCR o directamente, por ejemplo, usando una minisequenciación.

La secuencia de la zona del marcador puede compararse con una base de datos para determinar la fuente del marcador de seguridad. Es decir, para permitir la identificación del propietario del objeto, por ejemplo, o para identificar dónde un posible
20 sospechoso ha estado expuesto al marcador de seguridad.

Otro aspecto del invento proporciona un kit de seguridad que comprende un marcador de seguridad según el invento.

El kit de seguridad puede comprender un marcador de seguridad en una solución apropiada, por ejemplo, en grasa. La grasa puede utilizarse para asegurar
25 que una muestra de un trapo quede marcada con éxito.

Ahora describiremos el invento, a modo de ejemplo, con referencia sólo a las figuras siguientes.

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático que representa un marcador de seguridad según el invento.

30 La Figura 2 muestra: (a) la secuencia del nucleótido obtenida de un marcador de seguridad según el invento, y (b) los rastros de la secuenciación obtenidos.

La Figura 3 muestra un diagrama esquemático indicando el uso de un marcador de seguridad del invento.

La Figura 4 muestra un resumen del uso de un marcador de seguridad según el invento.

La Figura 1a muestra una molécula de ácido nucleico de hebra sencilla. La molécula de ácido nucleico puede ser de DNA o RNA. La hebra comprende una primera zona de cebador y, corriente abajo de la zona del cebador, una zona de marcador y una zona de cebador complementario. Tras realizar una PCR con un cebador capaz de unir la segunda zona de cebador, se produce una hebra complementaria (1b). La hebra complementaria tiene una primera zona de cebador funcional capaz de ser unida por un primer cebador. También tiene una zona de marcador complementario a la zona del marcador del marcador original.

Los inventores han encontrado que una secuencia de cebador particularmente útil puede obtenerse del oso perezoso de garganta marrón. Ésta tiene la siguiente secuencia:

5'-ta cccacgattccgctacgac aactaataca ctgctatga aaaaatttcc tcccactcac
cctggccctatgca cgtgacacataacc-3'

Ésta se obtiene del gene ND1 mitocondrial del organismo.

Ésta fue utilizada para crear los siguientes cebadores:

1. 5'-ta cccacgattccgctac-3'
2. 5'-ggttatgtgtcacgtgca-3'

Se unieron las secuencias de cebador a unas secuencias exclusivas de marcador, por ejemplo, de la secuencia:

gaaaaaatttctcccactcac

que fueron separadas de las secuencias del cebador por un tramo de 22 bases de una zona de cebador, 10 bases de una segunda zona de cebador.

Las moléculas de ácido nucleico pueden prepararse por métodos convencionales de fase sólida, típicamente en un sintetizador automático de DNA. El método más común implica el uso de la química de la β -cianoetil fosforamidita, según se describe en las siguientes publicaciones:

The synthesis of chemically labelled PCR primers. D.J.S. Brown and T. Brown (1995 "PCR: essential data" Wiley, ed. C.R. Newton. Capítulo 7, pp 57-70).

Preparation of synthetic oligodeoxynucleotide probes. T. Brown and J. Grzybowski (1995) "Gene probes: a Practical Approach". IRL press. Capítulo 5, 146-167.

5 Los oligonucleótidos también pueden ser sintetizados por métodos manuales de fase sólida o por métodos de fase de solución, pero el método de base sólida automática tiene la ventaja de un alto rendimiento.

También puede utilizarse el DNA aislado de fuentes biológicas.

Las moléculas de ácido nucleico contenían opcionalmente vitamina-E, 10 colesterol, fosfotioato y/o FAM (un tinte fluorescente).

Las moléculas de ácido nucleico contenían opcionalmente vitamina-E, colesterol, fosfotioato y/o FAM (un tinte fluorescente).

Protocolo de reacción en cadena de polimerasas

15 Se utilizaron las técnicas convencionales de PCR para identificar y multiplicar las secuencias. La mezcla de reacción típica de 50 µL comprende:

10 x amortiguador PCR desarrollado para reacciones WYBR Green en el sistema de detección de ABI Prism Sequence 7700, que fue obtenido de Genesys.

200 µM dNTPs (usando una mezcla de dUTP y dTTP).

20 0.5 µM de concentración de ambos cebadores.

1.5 mM MgCl₂.

1 unidad de la enzima Hot GoldStar (una polimerasa TAQ).

0.5 unidades de UNG.

25 Las condiciones cíclicas típicas eran 53°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Se realizó una ampliación final a 72°C durante 7 minutos.

Se analizaron los resultados en cuanto al tamaño del producto usando 5 PI de producto en un gel agarosa al 2%.

30 La recuperación de un DNA de tejido de algodón (5 PI de una solución de 0,04 ng/ml de DNA añadido a un pequeño punto, dejado secar y dejado sobre el banco del laboratorio) dejando a remojo el tejido en 1 ml de agua estéril o de etanol durante 1 hora, seguido opcionalmente por la eliminación del tejido, es posible durante al menos 1 semana. Cuando se utilizó etanol, esto fue seguido por una precipitación de etanol.

El agua se congeló hasta el final de la semana cuando se ejecutaron juntas las reacciones PCR, usando el PI del agua. Todas las muestras dieron un buen producto PCR del tamaño esperado.

5 El lavar el tejido a 40°C redujo la cantidad del producto, como lo hace el planchado y el lavado seguido por el planchado.

Se encontró que la biotina y la vitamina-E no inhibían la PCR ni la secuenciación cuando estén vinculadas al extremo de 5' del objetivo. Se secuenciaron los productos PCR tras la purificación PCR usando un kit Quiagen. Ambos dieron secuencias con el cebador inferior dando mejor secuencia que el cebador superior.

10 Se encontró que la biotina y la vitamina-E siguieron en el tejido (5 PI de 0,04 ng/PI) durante 3 días y que pueden recuperarse poniéndose a remojo en 2 ml de agua durante 1 hora seguido por la congelación de la muestra.

15 Los objetivos de la biotina y la vitamina E también pudieron recuperarse de la piel limpiando con algodón húmedo (no-absorbente) después de dejar 5 PI de 0,04 ng/PI secarse durante 10 minutos en la superficie de la piel. La biotina dio el mejor resultado. No hubo contaminación cuando se limpió con un algodón un pedazo de la piel que no había sido tratado con el objetivo.

Tras 24 horas (la piel fue tratada normalmente, es decir, lavada) la biotina pudo recuperarse y dio un buen producto PCR, aunque menos que después de 10 minutos.

20 El colesterol también pudo recuperarse con éxito del tejido y de la piel tanto inmediatamente después de la aplicación como después de 24 horas usando agua o etanol. También se demostró que quedó en el tejido tras haberse lavado a 60°C.

25 Se hicieron dos marcadores diferentes que habían sido etiquetados con FAM. Uno fue etiquetado con FAM, el otro tenía FAM en un extremo y 3 enlaces de fosfotioato en el otro extremo, entre las bases adicionales de timina añadidas a la molécula. Se cree que los enlaces de fosfotioato se unen a las proteínas de la piel, haciendo que el marcador de seguridad se pegue a ella.

30 Se adjuntó FAM usando química de fosforamidita estándar con tiempo de acoplamiento extendido. Se añadió fosfotioato usando un ciclo de fosfotioato estándar, recambiando el yodo por tetraetilo tiuram disulfuro (TETD, Tetraethyl Thiuramdisulphide) como agente oxidante.

El objetivo con los enlaces de fosfotioato se recuperó con éxito frotando la piel con algodón con DTT al 1%, seguido por el remojo del algodón en 3 ml de etanol al 70% y 0,3 M de NaOAc.

La recuperación del tejido se realizó poniendo a remojo el tejido en 2 ml de DTT al 1% durante 10 minutos.

Entonces se recuperó el DNA de la muestra por precipitación del etanol, usando técnicas conocidas en el arte.

5 Se observó que ni los enlaces de FAM ni los de fosfotioato inhibían la PCR.

Además, los productos PCR fueron recuperados con éxito usando el sistema descrito anteriormente.

En la Figura 2 se ilustra un ejemplo de una secuencia obtenida de un marcador de seguridad. La Figura 2a muestra la secuencia del marcador y la Figura 2b
10 muestra el rastro de la secuencia del prisma ABI.

La Figura 3 muestra un espacio cerrado como una gran sala; igualmente podría ser un tráiler, caravana o cualquier otro tipo de vehículo. Además, el área no tiene por qué ser necesariamente un lugar cerrado.

El espacio indicado en 10 viene con un sensor convencional de movimiento.
15 Éste puede ser un sensor doble, ya sea infrarrojo pasivo y microondas, o infrarrojo pasivo y ultrasónico, para dar fiabilidad pero, en algunas circunstancias la tecnología sencilla será suficiente, si el área de cobertura no es hostil. El método de detección se indica en 12; se podrán conectar sensores múltiples para dar la cobertura correcta junto con los avisos pertinentes y los tiempos de entrada y salida. Los sensores están
20 conectados a un panel de control principal indicado en 14; el panel de control tiene la posibilidad de guardar la hora, la fecha y el lugar, y de identificar al usuario con un registro establecido y no establecido, etc. También tiene la posibilidad de enviar, a través de GSM o línea terrestre indicados en 17, el código de la secuencia de DNA, con la hora, la fecha y el lugar a una estación de control remota indicada en 18 tras su
25 activación, actualizando así automáticamente la base de datos indicada en 20. El método de comunicación es a través de un comunicador digital que envía un código digital a un receptor digital: dicho receptor digital tiene la habilidad de priorizar y apilar llamadas, si fuera necesario.

Tras su activación, el panel de control, de acuerdo con los criterios
30 preestablecidos de indicación de alarma, activará el aparato de dispersión; como el dispositivo combinado, según se indicó en 16, este aparato genera una neblina combinada con la secuencia del marcador de DNA, según se indicó en 21.

El aparato 16 genera una neblina que llena el espacio 10 a un índice de 17 m³ por segundo, 340 m³ en 20 segundos, funcionando a + 4 bar (58 PSI). La neblina se
35 produce de un líquido calentado (134° C). Como un líquido de base de glicol (etanol)

(CAS NO 64- 17-5), éste se mantiene a una temperatura precisa por medio de dos elementos calefactores indicados en 23, uno conectado al depósito del líquido indicado en 22, y el otro al termocambiador indicado en 24, para dar una neblina apropiada. En la manifestación presente, el marcador de seguridad puede introducirse en una acción capilar o añadirse directamente a través de la válvula doble indicada en 25, o por sí sola, desde su propio envase presurizado indicado en 26. El aparato 16 tiene un microprocesador integral indicado en 28 para controlar sus entradas y salidas y la temperatura operativa.

[0082 El marcador de seguridad también puede añadirse al agua estéril, CO₂, etc., y presurizarse. La liberación controlada puede hacerse a través de válvula, solenoide, tapa explosiva o bomba, para producir un líquido controlado finamente dividido, un chorro de vapor o spray.

En caso de que se produzca una situación de alarma, el aparato 16 se activa llenando el área 10 rápidamente con la solución, registrando al mismo tiempo la activación junto con los detalles de la hora, fecha y lugar, y un código exclusivo al RAM 29 y, entonces, es enviado a través del panel de control 14 a la sala de control 18 para ser registrado en la base de datos 20.

Un ejemplo típico usando un chorro de agua, que podría usarse en el control de disturbios y muchedumbres, para identificar a las personas u objetos presentes en un momento y lugar dados.

La neblina, según es generada por el aparato 16, se asentará en las ropas y partes expuestas del cuerpo de los intrusos y también en las mercancías situadas en el espacio 10. La neblina se secará para evitar la contaminación cruzada.

Si se detiene a un intruso en un lugar, o si se sospecha posteriormente de una persona o es conocida por las autoridades, entonces podrán escanear a dicha persona en condiciones controladas y, si se detecta un tinte encubierto, se podrá tomar una muestra del sospechoso o de sus ropas por el método normal. Lo mismo se podrá hacer con las mercancías que se sospeche que han sido robadas de un lugar. Usando las técnicas normales de la ciencia forense para amplificar el marcador de seguridad DNA por PCR y, entonces secuenciando en dos direcciones, se producirán unos datos que son precisos y fiables; esto es importante ya que este proceso se utilizará en los tribunales para asegurar una acusación fiscal exitosa.

Introduciendo estos datos en la base de datos segura se puede buscar y recuperar la secuencia correspondiente original tomada del material original suministrado.

De este modo, es posible proporcionar prueba de que una persona dada o un objeto dado estuvo presente en un lugar determinado a una hora de una fecha determinada.

5 Otra manifestación del invento presente es usar la exclusiva solución codificada para impregnar un material para su uso como método de autenticación y rastreo de cualquier material u objeto.

La Figura 4 resume el procedimiento de detección del marcador de seguridad.

De este modo, es posible proporcionar prueba de que una persona dada o un objeto dado estuvo presente en un lugar determinado a una hora de una fecha
10 determinada.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de producir un marcador de seguridad para marcar objetos y/o personas, comprendiendo:

(A) provisión de una molécula de ácido nucleico con una secuencia de 40-230 nucleótidos, comprendiendo dicha secuencia

10 (i) una primera zona de cebador constando de 15-50 nucleótidos, en la que dicha primera zona del primer cebador sea substancialmente idéntica a un primer cebador y vinculada a la zona del primer cebador,

(ii) una zona de marcador que consta de una secuencia predeterminada de ácido nucleico capaz de identificar la fuente del marcador de seguridad; y

15 (iii) una segunda zona de cebador que consta de 15-50 nucleótidos que sea substancialmente el complemento inverso de un segundo cebador y en la que dicha zona del segundo cebador sea capaz de estar ligada por el segundo cebador; y

20 (B) escaneado de la secuencia del ácido nucleico de la zona del primer cebador (o del primer cebador) y la secuencia del ácido nucleico de la zona del segundo cebador (o el segundo cebador) contra una base de datos públicamente disponible para confirmar que las secuencias del ácido nucleico de las zonas del primero y segundo cebador no ocurran en 150 bases la una de la otra en una secuencia de DNA nativo de humanos, perros, gatos, ratones, insectos u organismos procarióticos.

25 2. Un método de producir un marcador de seguridad según la Reivindicación 1, en el que la zona del cebador complementario está aguas debajo de la zona del marcador.

30 3. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la zona del primer cebador sea diferente de la zona del segundo cebador.

35 4. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la zona del cebador, o cada una de las zonas del cebador, venga derivada del oso perezoso de garganta marrón (*Bradypus variegatus*).

5. Un método de producir un marcador de seguridad según la Reivindicación 4, en el que la zona del cebador o cada una de las zonas del cebador venga derivada del gene ND1 mitocondrial.

5 6. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en la que la zona del marcador conste de entre 10 y 30 nucleótidos.

10 7. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la zona del cebador o cada una de las zonas del cebador conste de entre 17 y 30 nucleótidos.

15 8. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la zona del cebador o cada una de las zonas del cebador esté separada de la zona del marcador por un tramo de 20 a 50 nucleótidos.

9. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la molécula del ácido nucleico esté etiquetada.

20 10. Un método de producir un marcador de seguridad según la Reivindicación 9, en el que la etiqueta sea un tinte fluorescente.

25 11. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, constando adicionalmente de una etiqueta separada calorimétrica y/o fluorescente.

30 12. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la molécula del ácido nucleico conste de un agente bloqueador en uno o ambos extremos.

13. Un método de producir un marcador de seguridad según la Reivindicación 12, en el que el agente bloqueador consta de un compuesto de fosfotioato, un nucleoside no natural, un dendrómero o un grupo amino alquílico.

14. Un método de producir un marcador de seguridad según cualquier reivindicación precedente, en el que la molécula del ácido nucleico conste adicionalmente de uno o más agentes vinculantes ligados a la molécula del ácido nucleico.

5

15. Un método de producir un marcador de seguridad según la Reivindicación 14, en el que el agente vinculante sea biotina, vitamina E, colesterol o un fosfolípido.

16. Un método de producir un marcador de seguridad y vincular dicho
10 marcador a un objeto y/o persona, dicho método comprendiendo:

(i) producción de dicho marcador de seguridad por un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-15 y

(ii) aplicación de dicho marcador de seguridad a un objeto.

17. Un método según la Reivindicación 16, en el que el marcador de seguridad
15 es aplicado por medio de un cepillo, un pulverizador, un aerosol o un chorro.

18. Un método según las Reivindicaciones 16 o 17, en el que el objeto es un
20 ser humano.

20

19. Un método de producir y vincular un marcador de seguridad a un objeto y/o
persona seguido por la detección de dicho marcador de seguridad, dicho método
comprendiendo:

(i) producción y vinculación de dicho marcador de seguridad por un
25 método según cualquiera de las Reivindicaciones 16-18; y

(ii) detección de dicho marcador de seguridad por:

(a) obtención de una muestra de un objeto que ha sido etiquetado con
dicho marcador de seguridad;

(b) amplificación de la secuencia del ácido nucleico del marcador de
30 seguridad con dos cebadores capaces de vincularse selectivamente al ácido nucleico
del marcador, en el que el primer cebador se vincula a una secuencia complementaria
a la zona del primer cebador y el segundo cebador se vincula a la zona del segundo
cebador; e

(c) identificación de fragmentos amplificados que contienen la zona del
35 marcador de seguridad por tamaño.

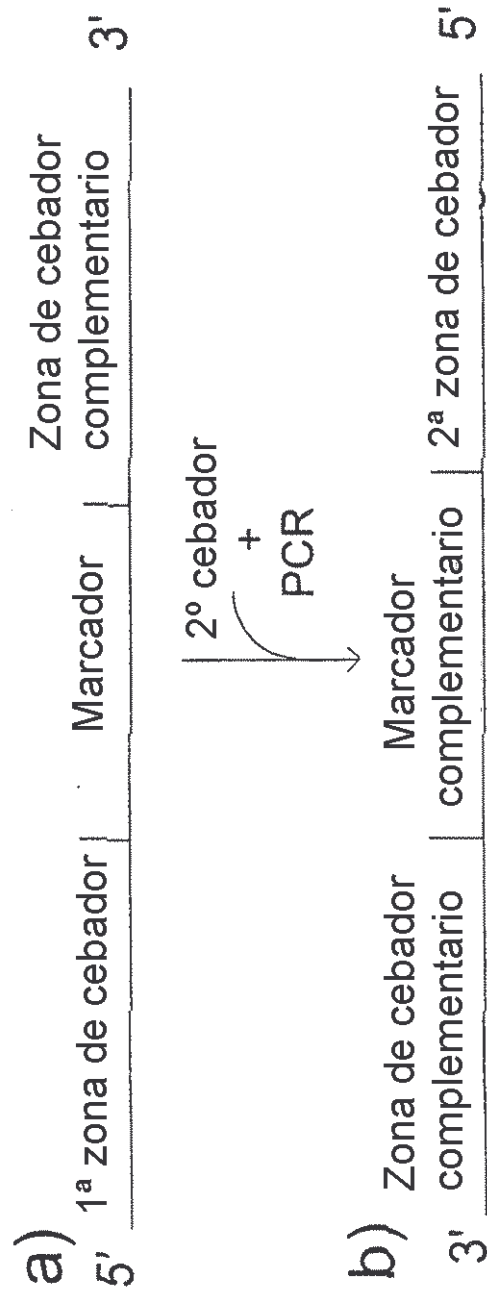
20. Un método según la Reivindicación 19, en el que el paso detectante (ii) comprende también la secuenciación de cualquier marcador de seguridad identificado desde al menos un cebador para determinar la secuencia de un ácido nucleico de la zona del marcador dentro del marcador de seguridad, en el que el marcador de seguridad identificado por el método es preferiblemente amplificado antes de la secuenciación de la zona del marcador.

21. Un método según la Reivindicación 19 o la Reivindicación 20, en el que el marcador de seguridad se investigue adicionalmente con una sonda teniendo una zona complementaria a la zona del marcador.

22. Un método según la Reivindicación 20, en el que dicha secuenciación es por secuenciación dideoxy o de espectrometría de masa.

23. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 22, en el que la secuencia de la zona del marcador se compara con una base de datos para determinar la fuente del marcador de seguridad.

FIGURA 1



A)

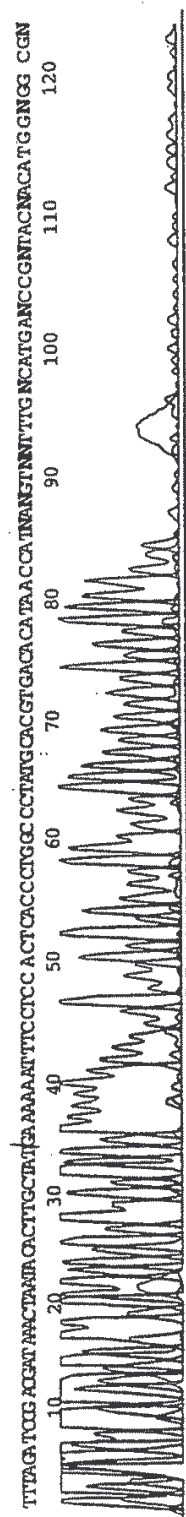
 $\overline{B}$ 

FIG. 3

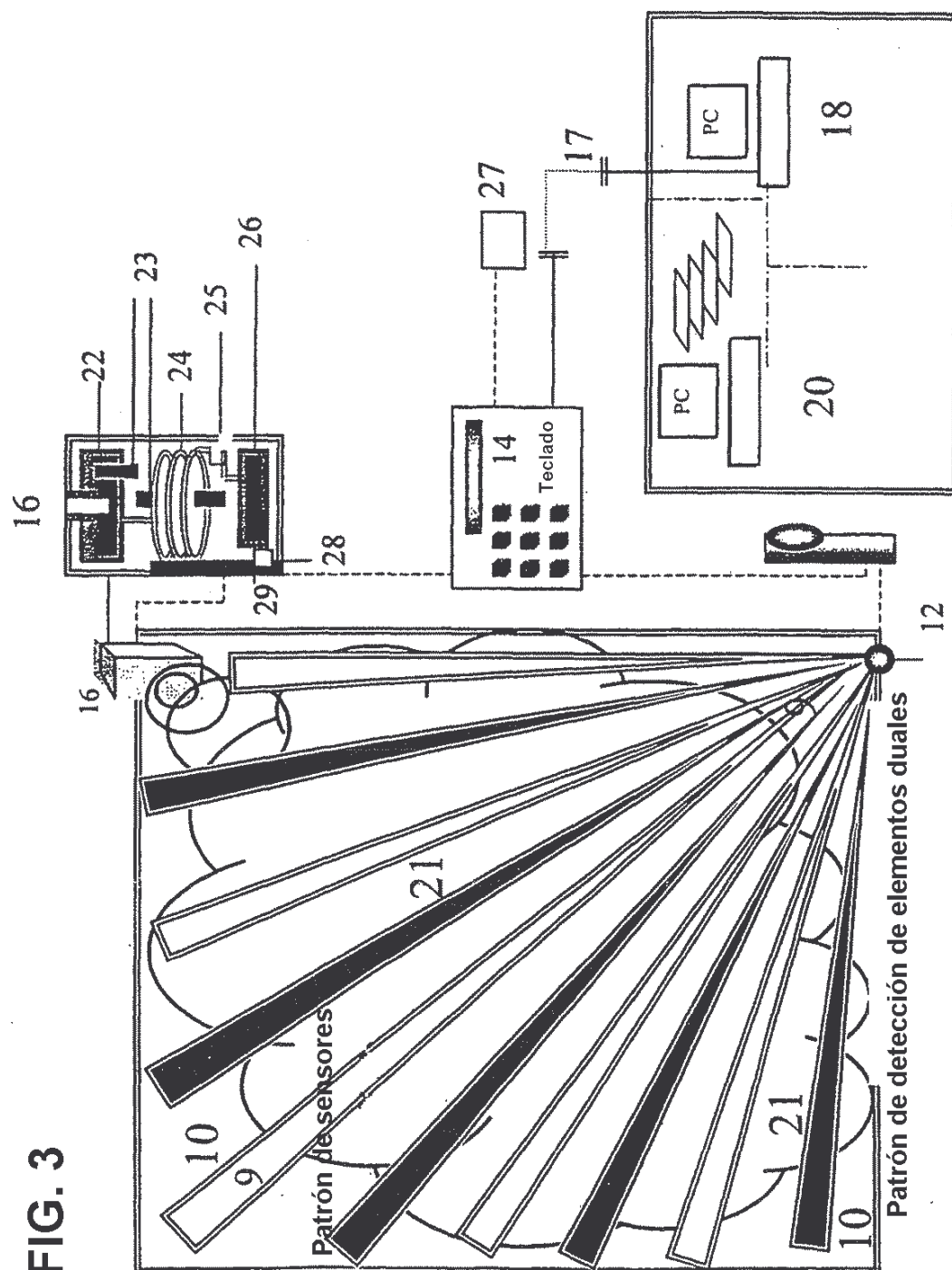


FIG. 4

