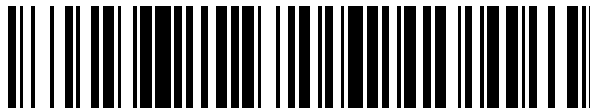


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 253**

51 Int. Cl.:
G07D 7/20 (2006.01)
G09F 3/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06716579 .5**
96 Fecha de presentación: **18.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1839279**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE AUTENTIFICACIÓN Y SISTEMA PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE DOCUMENTOS DE SEGURIDAD, DOCUMENTO DE SEGURIDAD Y ELEMENTO DE SEGURIDAD.**

30 Prioridad:
18.01.2005 NL 1028064

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

73 Titular/es:
VHP VEILIGHEIDSPAPIERFABRIEK UGCHELEN B.V.
HOENDERLOSEWEG 84
7339 GJ APELDOORN, NL

72 Inventor/es:
KRUL, Johannes

74 Agente: **Sugrañes Moline, Pedro**

ES 2 368 253 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de autenticación y sistema para la autenticación de documentos de seguridad, documento de seguridad y elemento de seguridad

5

La presente invención se refiere de forma general a la autenticación de documentos de seguridad.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la autenticación de un documento de seguridad, en el que el documento de seguridad comprende al menos uno de entre una enzima y un sustrato adecuado para la enzima, comprendiendo este procedimiento los pasos de

10

a) realizar una conversión enzimática entre la enzima y el sustrato sobre el documento de seguridad,
b) valorar un cambio detectable resultante de la conversión enzimática, proviniendo la información genética para la enzima de un microorganismo extremófilo.

15

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un sistema de autenticación para autenticar documentos de seguridad que comprende al menos una enzima y un sustrato adecuado para la enzima de manera que la enzima sea capaz de efectuar una conversión enzimática en la que se produzca un cambio resultante detectable, y el documento de seguridad comprende al menos uno de entre la enzima y el sustrato, proviniendo la información genética para la enzima de un microorganismo extremófilo.

20

Los documentos WO 90/14441, EP 0327163, US 5 139 812, US 5 429 952, US 5 643 728 y US 5 942 444 son ejemplos de sistemas y procedimientos de autenticación en los que se usan características de seguridad tomadas del mundo vivo.

25

El documento DE 102 05 506 describe un procedimiento de autenticación para artículos en el que una molécula marcadora se puede unir a una molécula de unión acoplada a una superficie presente o bien sobre el artículo que se ha de autenticar o bien sobre una segunda superficie en un dispositivo separado. Recientemente, véase el documento WO 03/038000, se ha propuesto el uso de fragmentos específicos de ADN y ARN de cadena sencilla en tales características de seguridad, compárese el documento WO 87/06383, en las que únicamente las partes o fragmentos complementarios hibridan con las biomoléculas. En el documento WO 03/038000 se propone que las partes complementarias estén provistas de una "bandera" en forma de una sustancia fluorescente en un extremo y un grupo inactivador en el otro extremo, de manera que sea fácil de detectar la unión por hibridación entre la biomolécula y la parte complementaria de la misma. Las partes complementarias unidas muestran fluorescencia, las partes no unidas no lo hacen. De esta manera es posible concebir y producir prácticamente infinidad de variantes en las que no es fácil para los falsificadores descubrir qué secuencia de nucleótidos concreta es significativa.

30

35

Entre las fuentes del mundo vivo disponibles para el desarrollo de características de seguridad, hasta ahora se han aprovechado poco en la práctica las posibilidades que ofrecen las enzimas. Una razón posible para ello es la falta de estabilidad de muchas enzimas durante el uso normal de un objeto protegido mediante una característica de seguridad basada en enzimas, bien en las condiciones de ensayo para determinar la autenticidad del objeto por medio de otros ensayos o bien en el ensayo de otras propiedades.

40

En el caso de, por ejemplo, la fabricación de billetes de banco, que pertenecen a la clase de documentos de seguridad que normalmente se protegen con varias marcas de autenticidad, hay que tener en cuenta el hecho de que los billetes de banco regularmente se dejan por accidente en la ropa, la cual se lava después; la característica de seguridad deberá ser resistente a este tratamiento de lavado. Este lavado afectará a la estabilidad de muchas enzimas. En este caso se habla de una desnaturalización de la enzima. La actividad o función original asociada a la totalidad de la estructura y/o composición de la biomolécula en cuestión se pierde entonces. Esta actividad o función, en particular la actividad catalítica de las biomoléculas, está muy estrechamente relacionada con la estructura tridimensional, la cual es a menudo frágil, es decir, esta estructura puede cambiar muy rápidamente y, con frecuencia, de forma irreversible como resultado de influencias perturbadoras. Aumentos de temperatura son causas frecuentes de la desnaturalización; a veces incluso una disminución de la temperatura provoca una inactivación.

45

50

Otro inconveniente más del uso de enzimas en las características de seguridad es el procedimiento relativamente complejo que es necesario para detectar la presencia de la enzima y, en particular, las bajas velocidades de reacción.

55

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una autenticación de documentos de seguridad que no presente dichos inconvenientes, o que los presente, al menos, en menor medida, o en proporcionar una autenticación alternativa adecuada.

60

Este objetivo se alcanza de acuerdo con la invención gracias al hecho de que en el procedimiento y sistema de autenticación la información genética para la enzima proviene de un microorganismo extremófilo. Los microorganismos extremófilos son microorganismos que prosperan en o requieren condiciones extremas, tales como una temperatura elevada (termófilos), una presión elevada (barófilos; bacterias barotolerantes) o un pH muy anormal (acidófilos

65

pH \leq 3; alcalófilos pH \geq 9) o combinaciones (poliextremófilos). El grado de acidez óptimo para la mayoría de los organismos no extremófilos se encuentra alrededor del pH neutro de 7. La aplicación de enzimas altamente resistentes en el sistema de autenticación de acuerdo con la invención reduce el riesgo de que como consecuencia del uso normal del objeto que se ha de proteger, se vean afectadas la actividad y función de la enzima en cuestión y, por lo tanto, ya no sea posible fácilmente la autenticación. En el caso de la invención, este riesgo sigue siendo limitado incluso en condiciones distintas de las de uso normal. Además, el uso de enzimas procedentes de organismos termófilos permite realizar el procedimiento de autenticación, con el que se comprueba la autenticidad de un objeto, a una temperatura aumentada, de manera que la conversión enzimática transcurre en mucho menos tiempo. Igual que en las reacciones químicas, un incremento de temperatura de aproximadamente 10°C da lugar a aproximadamente una duplicación de la velocidad de reacción de la conversión enzimática.

En esta solicitud, "documento de seguridad" se refiere a un documento que habitualmente se protege contra fraude mediante al menos una característica de seguridad. Los ejemplos incluyen documentos de valor, tales como billetes de banco, escrituras, carnés, vales, timbres, contratos y similares, documentos de identidad, tales como pasaportes, tarjetas de identidad, visados, tarjetas bancarias, tarjetas de crédito, documentos de acceso, billetes de entrada, y etiquetas, tales como marcas de fábrica de autenticidad, etiquetas y precintos a prueba de falsificación. También el material de embalaje, en particular para las industrias farmacéutica, cosmética, electrónica o alimentaria, puede comprender una o más características de seguridad con el fin de garantizar el contenido del envase, como, por ejemplo, los fármacos genuinos. El papel con el que se fabrican tales documentos se denomina "papel de seguridad". Este papel se fabrica en un entorno de producción seguro. Este papel puede comprender ya todas las características de seguridad que deban estar presentes posteriormente en el documento hecho a partir de él. No obstante, se pueden añadir al papel características de seguridad adicionales mediante, por ejemplo, impresoras, etc., para crear el documento de seguridad completo. Un documento siempre contendrá datos/ texto, mientras que el papel de seguridad carecerá de este tipo de información la mayor parte del tiempo. En el contexto de esta solicitud, "papel de seguridad" está contenido en la expresión "documento de seguridad". Es decir, el procedimiento y sistema de autenticación de acuerdo con la invención se pueden aplicar tanto a los documentos de seguridad como al papel de seguridad "en blanco".

Se conocen miles de enzimas y aún muchos más sustratos que se pueden convertir con enzimas; tanto las enzimas como los sustratos pueden ser completamente naturales o estar modificados. Para las enzimas, "natural" significa que la sustancia en cuestión es producida por una especie biológica no modificada conscientemente y es aislada y purificada posteriormente, mientras que "modificado" se refiere a una sustancia que es producida por una especie biológica y que sufre una modificación química después del aislamiento y/o la purificación o a un producto producido por una especie biológica y codificado por información genética modificada conscientemente en/por esa especie. Para los sustratos es válido más o menos lo mismo; no obstante, un sustrato también puede ser completamente sintético. La ventaja de las reacciones catalizadas por enzimas frente a las conversiones químicas ordinarias reside en la con frecuencia elevada especificidad que muestran las enzimas por el sustrato que se ha de convertir y, además, en el hecho de que las conversiones tienen lugar en condiciones relativamente suaves, mientras que a menudo se requieren condiciones mucho más severas/rigurosas para las conversiones químicas análogas. Además, las conversiones químicas no suelen ser muy (estereo)específicas, mientras que la actividad enzimática está vinculada estrictamente a la estructura tridimensional y al tamaño del sustrato (estereo-, regio- y quimioselectividad y especificidad).

Es conocido que la mayoría de las biomoléculas con una actividad catalítica son proteínas, pero ciertas moléculas de ARN también muestran una actividad catalítica. También es conocido que se pueden generar anticuerpos catalíticos para ciertos sustratos. Estos anticuerpos se generan contra estructuras químicas que se asemejan al estado de transición del sustrato durante una conversión enzimática (la forma activada del sustrato). En la presente descripción, el término "enzima" incluye biomoléculas naturales o modificadas artificialmente que muestran una actividad catalítica que es o no estereoespecífica.

En el procedimiento y sistema de autenticación de acuerdo con la invención, el documento de seguridad contiene al menos una sustancia seleccionada entre la enzima y el sustrato. Para efectuar la autenticación con la ayuda de la invención se puede proceder de diferentes maneras. Normalmente, para comprobar la autenticidad, la otra sustancia que no está presente en o sobre el documento de seguridad se pone en contacto con la sustancia que está presente en o sobre el documento de seguridad, con el fin de iniciar la conversión enzimática. Si se desea, se pueden haber previsto ya en o sobre el documento de seguridad otros materiales implicados en la conversión enzimática, o éstos se pueden añadir en el momento del ensayo, o una combinación de ambos. Más adelante se comentan ejemplos de tales materiales. El documento de seguridad contiene al menos una de las sustancias seleccionadas entre la enzima y el sustrato. El documento de seguridad puede contener también tanto la enzima como el sustrato, siempre que la conversión enzimática no pueda comenzar espontáneamente. Un ejemplo adecuado es un documento de seguridad en el que la enzima y el sustrato se prevén en regiones separadas. Otro ejemplo implica la separación física de la enzima y el sustrato, como, por ejemplo, en microcápsulas. Si se requieren sustancias adicionales, tales como co-enzimas y/o co-factores, para la conversión enzimática, éstos pueden o no estar presentes en o sobre el sustrato del documento o se pueden añadir más tarde durante la autenticación propiamente dicha.

En una realización preferida del procedimiento y sistema de acuerdo con la invención, la información genética para

la enzima proviene de un microorganismo hipertermófilo o termófilo. Tales enzimas presentan una resistencia muy alta a temperaturas aumentadas, como se desprende, por ejemplo, de la presencia de bacterias en fuentes termales. La ventaja de usar enzimas procedentes de organismos (hiper)termófilos *in vitro* reside en que: la actividad catalítica persiste durante mucho tiempo a temperatura aumentada, la velocidad de conversión a temperatura aumentada es alta en comparación con la que se alcanza a temperatura ambiente y la desnaturalización no se produce rápidamente a la temperatura normal de uso.

Se conoce el uso de enzimas de (hiper)termófilos en la multiplicación de (fragmentos de) moléculas de ADN (técnica de la PCR). En lo que a la información genética se refiere, la DNA polimerasa necesaria para este propósito proviene de un microorganismo presente en fuentes termales. Cuando durante la reacción de PCR se funde ADN de cadena doble (la cadena doble se desenrolla y se encuentran disponibles cadenas sencillas para la unión de los cebadores y la reproducción posterior) a temperatura aumentada, esta enzima polimerasa retiene su actividad catalítica de manera que el ciclo de multiplicación se puede reiniciar cada vez sin la necesidad de añadir enzima nueva.

Con el fin de obtener de una manera conveniente grandes cantidades de enzima a partir de organismos específicos, la información que codifica la enzima se introduce a menudo en un microorganismo que es fácil de manipular y cultivar. La manipulación genética asegura también que este organismo produce una cantidad relativamente grande de enzima (un denominado "superproductor"). La enzima se aísla y, dependiendo del uso deseado, se purifica en mayor o menor medida. La información genética de un microorganismo extremófilo también se puede incorporar en otro organismo vivo, atravesando de este modo la barrera entre especies, de manera que este otro organismo inicie la producción de la enzima de acuerdo con la información genética obtenida.

La velocidad de la conversión enzimática es una función de muchas variables, tales como la temperatura, la concentración de enzima, la concentración de sustrato, la concentración de co-enzimas, la presencia o ausencia de co-factores, activadores, inhibidores y similares. Un co-factor es un compuesto no proteico que está implicado en la reacción catalítica pero que, al final, vuelve a emerger inalterado del proceso catalítico en cuestión. Una co-enzima es un compuesto no proteico que participa directamente en la reacción catalítica y que, por ejemplo, se puede regenerar mediante otras reacciones enzimáticas. La distinción entre co-enzima y co-factor no siempre es tan clara.

Existen muchos tipos de inhibidores que abarcan desde los que solo afectan muy específicamente a la acción catalítica de ciertas enzimas hasta los que afectan a la integridad de las proteínas o a sus estructuras en general. Además, los inhibidores también se pueden clasificar en función del tipo de unión, a saber, los de unión reversible y los de unión irreversible. Una unión muy fuerte de un inhibidor a una enzima o una modificación covalente de un aminoácido que de alguna manera es crucial para la catálisis y/o la estructura del sitio catalítico conduce a una inhibición irreversible (unión fuerte significa en este caso: fuerte en relación con la unión del sustrato y/o de otro factor necesario para la conversión enzimática).

Una clase reciente de inhibidores que se puede aplicar en la memoria descriptiva son los ligandos de ácido nucleico. Tales ligandos de ácido nucleico son capaces de complejarse con los compuestos más diversos, incluidas las proteínas. Véase, por ejemplo, el documento US-A-6083696, en el que se describen ligandos con los que aumentaba 30.000 veces la inhibición de la elastasa mediante un péptido inhibidor cuando ese péptido inhibidor se unía a un ligando de ácido nucleico específico. Se descubrió que el efecto sobre la acción enzimática es muy específica, pues otras serina proteasas apenas se vieron influenciadas por esta combinación de inhibidores. También se puede concebir una combinación de un inhibidor con un nucleótido que debilita la inhibición.

Otros inhibidores que se pueden usar en la memoria descriptiva son aquellos que anulan la acción catalítica de las enzimas menos específicamente porque afectan de una forma muy general a la integridad de una proteína (estructura) y/o se pueden unir a las cadenas laterales de un aminoácido concreto. El efecto de la modificación es de gran alcance, especialmente si el residuo de aminoácido modificado de esta manera desempeña un papel esencial en la integridad estructural de la biomolécula y/o en el proceso catalítico. Son bien conocidos los efectos de los metales pesados (entre otros la unión de grupos azufre) y de los inhibidores de la función nerviosa, tales como los ligantes específicos de grupos -OH de serina.

Existen enzimas cuya cinética no se puede describir mediante el modelo de Michaelis-Menten (véase más adelante). La unión del sustrato a estas enzimas muestra un comportamiento (cooperativo) mucho más complejo; como consecuencia, la cinética de tales enzimas se desvía de la cinética de Michaelis-Menten. Estas enzimas se denominan "alostéricas" y, con frecuencia, ocupan posiciones reguladoras en rutas bioquímicas. A una concentración constante de sustrato, este tipo de enzimas puede catalizar a una velocidad diferente bajo la influencia de los denominados efectores alostéricos. En esta descripción, estos y otros efectores se denominan simplemente inhibidores o activadores, según el efecto que ejerzan sobre la velocidad de conversión enzimática a una concentración concreta de sustrato.

La enzima ventajosamente está estabilizada, de manera que está incluso más protegida frente a las condiciones de uso del sistema de autenticación de lo que ya lo está de por sí. Ejemplos de ello incluyen la adhesión a un soporte o portador sólido o el confinamiento en ellos, por ejemplo en un soporte particulado. Otra posibilidad reside en la estabilización mediante una biomolécula que no participa en la reacción, tal como una proteína y/o un polinucleótido.

Asimismo es posible proteger una enzima adicionalmente por inmovilización/ incorporación en un material que retiene agua, tal como un poliuretano. Véase, por ejemplo, Koepsel y Russel (Science, 309, pág. 377; www.sciencemag.org). Para el propósito de la invención, la enzima y, eventualmente, un número (limitado) de otros componentes necesarios para la reacción se pueden usar en un recubrimiento que cubre total o parcialmente un papel de seguridad o documento de seguridad. Un artículo totalmente recubierto permite realizar una autenticación simple y rápida. Un artículo localmente recubierto presenta un mayor nivel de protección. En un papel de múltiples capas, la enzima y/o el sustrato pueden estar presentes también en una capa intermedia o en capas diferentes si están presentes ambos componentes.

En una realización preferida de la invención, la enzima está presente en un reactivo iniciador, comprendiendo el reactivo iniciador una sustancia o medio para estabilizar la enzima. El reactivo iniciador se define en este caso como la última adición que se efectúa con el fin de iniciar la conversión enzimática. Esta sustancia se selecciona preferentemente del grupo que incluye una co-enzima, un co-factor o un sustrato, o uno de los sustratos en el caso de las reacciones con múltiples sustratos. El reactivo iniciador o el documento de seguridad también puede incluir ventajosamente un activador de la enzima y/o un inhibidor de la enzima, de manera que la reacción enzimática se puede controlar y/o modificar de una manera predeterminada.

La conversión enzimática puede pertenecer tanto a la clase de las reacciones con un solo sustrato como a la clase de las reacciones con múltiples sustratos.

Usando una enzima que es el resultado de la información genética de una enzima extremófila, la probabilidad de que un artículo genuino (es decir, no falsificado) sea considerado erróneamente como falso en la autenticación es baja. Esto aumenta la fiabilidad del procedimiento para la autenticación de documentos de seguridad. El documento de seguridad está provisto ventajosamente de la enzima. Con vistas a la velocidad del procedimiento de autenticación, la conversión enzimática se realiza ventajosamente a una temperatura elevada, ventajosamente en el intervalo de 50 a 95°C. En comparación con la reacción enzimática que transcurre a temperatura ambiente, la velocidad en este intervalo de temperaturas es generalmente varias veces mayor (4-100 a 200 veces), por lo que el tiempo necesario para el ensayo se reducirá considerablemente.

La conversión enzimática está vinculada ventajosamente a una reacción de seguimiento química y/o enzimática. Aunque esto hace la autenticación *en sí* más compleja, esta reacción de seguimiento aumenta el nivel de protección del documento de seguridad. Preferentemente está presente en/sobre el documento una concentración muy baja de un sustrato o de otro compuesto implicado en la conversión, demostrándose la presencia de este compuesto reciclando el producto de reacción de éste en la reacción de seguimiento; esto permite usar tan solo trazas de una determinada sustancia, cuya presencia, no obstante, se puede demostrar de esta manera.

Las condiciones de reacción para la realización de la conversión enzimática, tales como pH, fuerza iónica, etc., ventajosamente se mantienen constantes en al menos aquella parte de la superficie del documento de seguridad que se ha de ensayar.

Si se requiere un mayor nivel de protección, también se pueden variar las condiciones de reacción durante la ejecución del procedimiento, dependiendo de la naturaleza de los reactivos presentes sobre los objetos que se han de proteger. Si, por ejemplo, durante el ensayo la enzima está presente o aplicada en regiones discretas que se encuentran a una distancia determinada entre sí, es posible realizar una primera reacción enzimática a temperatura ambiente y cambiar (aumentar) después la temperatura en cada transición a otra región, o viceversa. Las constantes o velocidades de reacción, que se pueden medir de este modo, proporcionan una "huella dactilar" única del documento en cuestión. En una realización alternativa, también es posible efectuar el ensayo en un área del documento de seguridad, en diferentes partes, preferentemente no solapantes, del mismo, usando, por ejemplo, un dispositivo de impresión de líneas.

Se pueden realizar reacciones enzimáticas con la misma enzima y varios sustratos, preferentemente en regiones discretas, de manera que se puede obtener información aún más específica sobre la autenticidad.

También se encuentra dentro del alcance de la invención una comprobación doble usando diferentes enzimas, de las cuales al menos una proviene de un microorganismo extremófilo.

La etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención puede incluir la valoración visual del cambio resultante, un cambio de color por ejemplo. El cambio resultante también se puede leer con máquinas, tales como (espectro)fotómetros, en cuyo caso el grado y/o la velocidad del cambio pueden constituir, si se desea, una indicación adicional de la autenticidad. La etapa de valoración también puede incluir la investigación de un cambio olfatorio o de un cambio táctil.

En una realización preferida se determina la velocidad de la conversión enzimática, como se explicará exhaustivamente a continuación.

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a un documento de seguridad como se ha definido ante-

riormente en la presente memoria, que incluye documentos de valor, tales como billetes de banco, escrituras, contratos y similares, documentos de identidad, tales como pasaportes, tarjetas de identidad, visados, tarjetas bancarias y tarjetas de crédito, vales, timbres, documentos de acceso, billetes (de entrada), sellos y etiquetas; como se ha descrito anteriormente, también el material de embalaje puede comprender características de seguridad con el fin de garantizar el contenido del envase, como, por ejemplo, los fármacos genuinos (la expresión "documento de seguridad" incluye este material de embalaje), documento que ha sido provisto de una característica de seguridad basada en una conversión enzimática entre una enzima y un sustrato. De acuerdo con la invención, la característica de seguridad comprende una enzima cuya información genética proviene de un microorganismo extremófilo. Preferentemente, los documentos de seguridad usados en la invención comprenden al menos una característica de seguridad común y una característica de seguridad basada en una conversión enzimática. Ejemplos de tales características de seguridad comunes son filamentos/hojas de seguridad, marcas de agua, dispositivos ópticamente variables como los que cambian de color, estructuras interferenciales y hologramas, fibras (dicróicas, fluorescentes, magnéticas), características luminiscentes con emisiones dentro y fuera de la región visible, características magnéticas, conductancia, agentes químicos específicos y microimpresión, etc.

Las realizaciones preferidas antes comentadas también se pueden aplicar al documento de seguridad de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de la invención, la enzima está presente o aplicada a cierta concentración en al menos parte de la superficie del documento de seguridad. Esta realización se usará generalmente cuando se desee una autenticación rápida y relativamente sencilla. Este es el caso, por ejemplo, cuando se usa solo la presencia o ausencia de una reacción enzimática específica para determinar la autenticidad.

Está claro que en el procedimiento y sistema de acuerdo con la invención al menos uno de los reactivos necesarios (enzima y sustrato) está presente en o sobre el documento de seguridad que se ha de ensayar y el otro se pone en contacto con él durante el ensayo.

En una realización alternativa, la enzima está presente o aplicada en/sobre regiones discretas de la superficie del documento de seguridad. El documento y elemento de seguridad reivindicados comprenden la enzima. Esto permite variar la concentración de la enzima o de otros reactivos necesarios a lo largo de las diferentes regiones, de manera que se pueden determinar características específicas de la conversión enzimática relacionadas con ella, como, por ejemplo, concentraciones, grado de cambio, velocidad de conversión, constantes de reacción, etc., que pueden variar de una región a otra. Una verificación o autenticación de este tipo es compleja, de manera que en general se aplicará únicamente en el caso de documentos muy valiosos y únicos. Con el fin de aumentar adicionalmente el nivel de seguridad, puede estar presente en el sistema de autenticación/ documento de seguridad una proteína, tal como una segunda enzima, como fondo encubridor. La concentración de esta proteína puede ser, por ejemplo, mucho mayor que la de la primera enzima, aunque la primera enzima sea la enzima que cause la conversión deseada en la determinación de la autenticidad. Si es necesario, también se pueden añadir proteínas no catalíticas, tales como albúmina bovina u ovoalbúmina.

En otra realización más, el documento de seguridad de acuerdo con la invención comprende al menos dos enzimas diferentes dispuestas en dos regiones que se solapan al menos parcialmente.

En la invención se pueden aprovechar numerosas propiedades cinéticas muy características de los sistemas enzimáticos en todo tipo de condiciones variables. Estas propiedades no se pueden falsificar excepto mediante una característica completamente idéntica, la cual, en vista de las numerosas variantes posibles, es prácticamente imposible de copiar mediante "ingeniería inversa".

El uso de enzimas para fines analíticos consiste normalmente en la determinación de una concentración/cantidad de sustrato presente en una muestra. Se pueden distinguir de forma general dos planteamientos diferentes, a saber, la determinación del punto final y el planteamiento cinético.

Se habla de una determinación del punto final cuando todo el sustrato que se ha de determinar se ha convertido por completo, de manera que la diferencia entre el estado inicial y el estado final en el ensayo constituye una medida cuantitativa inequívoca de la(s) concentración(es)/cantidades que se han de determinar. Con el fin de conseguir una conversión completa se usan en algunos casos etapas auxiliares, como hacer que transcurran reacciones de seguimiento por medio de las cuales siempre se contrarreste un posible establecimiento de equilibrio desfavorable en la primera reacción y/o se produzcan cambios medibles en la señal. Mediante el uso de, por ejemplo, un gran exceso de un segundo sustrato (agua, por ejemplo, si se necesita como segundo sustrato) también se impone un desplazamiento de la(s) concentración(es) de equilibrio, de manera que el primer sustrato (el que se ha de medir) se convierte casi cuantitativamente. Esta diferencia entre los estados inicial y final constituye una medida cuantitativa de la(s) concentración(es) que se han de determinar. Las cantidades/concentraciones de enzima que se han de usar determinan en gran medida la velocidad a la que se establece el estado final, manteniendo el resto de las condiciones de reacción constantes. Las cantidades exactas de enzima usadas no son críticas para una determinación del punto final, siempre que la concentración de sustrato que se ha de determinar sea varias veces mayor que la concentración de enzima; o en otras palabras: la cantidad de sustrato que se une a la enzima debe ser despreciablemente

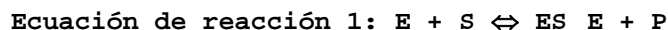
pequeña en relación con la cantidad no unida a la enzima.

En la determinación del punto final, la temperatura no es muy importante, siempre que se pueda estar seguro de que la conversión del sustrato se completa en el intervalo de tiempo disponible para la determinación. Puesto que una temperatura aumentada incrementa la velocidad de la conversión enzimática, el punto final se alcanza antes; por supuesto, las concentraciones de equilibrio dependen de la temperatura, pero bajo el resto de las condiciones de reacción para la determinación del punto final el desplazamiento del equilibrio por la temperatura no tiene un efecto significativo en la concentración de sustrato obtenida.

Si se desea trabajar más rápido para determinar una concentración desconocida de sustrato, se puede efectuar una determinación cinética. Ésta permite realizar una determinación precisa de una concentración desconocida de sustrato en tan solo unos pocos segundos en base a una velocidad de conversión enzimática, siempre que se conozcan los datos de calibración para las velocidades de por lo menos una concentración conocida del mismo sustrato en idénticas condiciones de ensayo.

La velocidad enzimática de una reacción de un solo sustrato en el estado estacionario viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten. Si está presente un segundo sustrato en un gran exceso en relación con el primer sustrato, la reacción también se puede considerar como una reacción de un solo sustrato (reacción de pseudo-sustrato único); el agua, por ejemplo, es un segundo reactivo de este tipo, presente en gran exceso (aproximadamente 55,5 M) en la conversión de fosfato de p-nitrofenilo catalizada por fosfatasa alcalina en las condiciones de ensayo habituales.

En la deducción de la ecuación de velocidad para una reacción de un solo sustrato, mostrada en la ecuación de reacción 1 más adelante, se asume que la concentración de sustrato ($[S]$) es muchas veces mayor que la de la enzima ($[E]_0$) y que la cantidad de sustrato es inicialmente muchas veces mayor que la del producto ($[P]$). Estas hipótesis normalmente también se aplican a los ensayos enzimáticos *in vitro*. Asimismo se asume que en la primera reacción (véase más adelante) se establece un equilibrio, mientras que, inicialmente, en la segunda reacción aún no se ha establecido ningún equilibrio ($[P]$ muy baja). También se asume que: $d[ES]/dt = 0$; denominada la hipótesis del "estado estacionario".



La velocidad de reacción al comienzo de la reacción viene dada entonces por

$$V = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [S]}{K_M + [S]}$$

en la que:

v es la velocidad medida inicialmente;

$[E]_0$ es la concentración de enzima total;

$[E]$ es la concentración de enzima libre, a una concentración muy baja de sustrato $[E] \approx [E]_0$;

$[S]$ es la concentración de sustrato libre (pero como $[E]_0 \ll [S]_0$, en las condiciones de ensayo normales $[S] \approx [S]_0$);

$[S]_0$ es la concentración de sustrato total;

k_{cat} es una constante catalítica característica de la enzima en las condiciones de ensayo dadas;

K_M es una constante de disociación aparente que puede servir de constante de disociación global para todas las formas unidas a enzima en las condiciones de ensayo dadas (generalmente: $K_M = [E][S]/\Sigma [ES]$, en la que el denominador es la suma de todas las formas enzimáticas unidas); el producto $k_{\text{cat}} [E]_0$ se denomina V_{max} .

Cuando $[S] \gg K_M$, la velocidad (v) de la reacción medida es casi igual a V_{max} y, por lo tanto, directamente proporcional a la cantidad de enzima usada y no proporcional a la concentración de sustrato; en tales condiciones, la enzima está saturada con sustrato y el aumento de la concentración de sustrato apenas incrementa la velocidad de conversión, o no la incrementa en absoluto.

Cuando $[S] \ll K_M$, la velocidad de reacción es directamente proporcional tanto a la concentración de enzima como a la de sustrato; debido a la proporcionalidad directa a $[S]$, esta es la condición en la que se realizará preferentemente una determinación cinética a partir de la concentración de sustrato.

Las ecuaciones de velocidad para las reacciones de múltiples sustratos son más complicadas que las ecuaciones indicadas anteriormente; más aún, las ecuaciones de velocidad también dependen del mecanismo de la enzima en cuestión. A la inversa, a partir de una ecuación de velocidad completa se puede deducir qué mecanismo enzimático está implicado; mecanismo enzimático significa en este caso la secuencia de unión de los sustratos y las co-enzimas y también de liberación de los productos de conversión durante el ciclo catalítico completo.

La K_M de una enzima concreta para un sustrato concreto es un dato característico en una reacción catalizada por enzima en unas condiciones dadas. La K_M para el mismo sustrato puede ser completamente diferente para enzimas que catalizan la misma reacción pero que provienen de órganos diferentes (isoenzimas) u organismos diferentes. Aunque la K_M no es una constante de disociación directa, la K_M es representativa de la afinidad de la enzima por el sustrato en cuestión en las condiciones dadas; una interferencia con la enzima puede provocar un cambio en la K_M , especialmente si esta interferencia afecta al sitio de unión al sustrato, por ejemplo a través de un cambio de carga en una cadena lateral de un aminoácido y/o a través de un cambio conformacional en la proteína y/o a través de un impedimento/ cambio estérico (este último puede ser el resultado de un cambio en el tamaño de las cadenas laterales de los aminoácidos).

Es posible determinar la K_M para un sustrato concreto midiendo las velocidades iniciales correspondientes a diferentes concentraciones de sustrato y una concentración/cantidad conocida (generalmente constante) de enzima; en ese caso, las demás concentraciones, como las de un posible segundo sustrato y de co-enzimas y co-factores, se fijan habitualmente en niveles elevados (saturación).

Con el fin de medir la K_M puede ser suficiente realizar solo una medición con una concentración inicial conocida del sustrato y observar esta reacción a lo largo del tiempo.

En ambos casos, la K_M del sistema sustrato/enzima en cuestión se puede calcular y/o determinar mediante todo tipo de procedimientos gráficos y/o algoritmos.

Según se determina a partir de un diagrama de Lineweaver-Burk, la K_M para un sustrato concreto aparentemente cambia en presencia de inhibidores concretos; esto se debe al hecho de que esta K_M aparente contiene también datos relativos a la inhibición, datos que son característicos del inhibidor usado en las condiciones dadas.

Con los mismos procedimientos antes mencionados se puede obtener también la V_{max} de un sistema enzimático. Esta cantidad es proporcional tanto a la constante catalítica (k_{cat}) como a la cantidad de enzima usada. La V_{max} cambia aparentemente en presencia de inhibidores concretos; a partir de este cambio y a una concentración de inhibidor dada es posible medir la constante de inhibición (K_i) que corresponde a este tipo de inhibidor. También existen inhibidores que cambian aparentemente tanto el término de K_M como el término de V_{max} de tal manera que la relación entre los dos permanezca constante. Finalmente, existen inhibidores que dan lugar a un patrón de inhibición mixto. En todos los casos de inhibición, sin embargo, es posible determinar la K_M , la V_{max} y la K_i siempre que las demás condiciones de reacción, como la concentración de sustrato, la concentración de inhibidor, etc., sean conocidas.

Para la determinación de una concentración de sustrato para la conversión en cuestión generalmente se elige una enzima que presenta una velocidad de conversión alta junto con una buena estabilidad y especificidad. La velocidad de conversión a una $[S]$ y $[E]$ dadas es una función de la constante de conversión catalítica k_{cat} y la constante de unión K_M . En términos generales, una K_M elevada en combinación con una k_{cat} elevada resulta favorable para una conversión rápida. (Véase, por ejemplo, "Structure and mechanism in protein science", 3ª ed. 1999, Alan Fersht. W. H. Freeman and Company, Nueva York, pág. 362).

La ecuación de velocidad enzimática de Michaelis-Menten antes mencionada no refleja explícitamente las influencias de todos los tipos de factores que habitualmente se mantienen constantes durante el ensayo, tales como el pH y la temperatura. Tales factores, sin embargo, ejercen cada uno una marcada influencia sobre la velocidad de una reacción enzimática.

La influencia de un cambio de temperatura es generalmente la misma que la que se produciría si las reacciones fueran capaces de progresar sin catálisis. Sin embargo, si la temperatura aumenta demasiado, la reacción catalizada se detendrá abruptamente debido a la desnaturalización del biocatalizador. El uso de enzimas procedentes de microorganismos extremófilos y, en particular, hipertermófilos reduce el riesgo de desnaturalización por una temperatura elevada.

Tras la exposición a valores de pH extremos, muchas biomoléculas se desnaturalizan, y en el intervalo en el que aún no se produce una desnaturalización, el pH puede ejercer un gran efecto sobre la velocidad catalítica de una reacción catalizada por enzima. En ensayos *in vivo* en los que se estudian las velocidades de conversión de enzimas o en los que se usan enzimas para la determinación de concentraciones, el pH normalmente se mantiene constante mediante tampones de pH. La naturaleza química del tampón propiamente dicho también puede influir en la velocidad de las conversiones, al igual que lo puede hacer la concentración del mismo. Esto último normalmente se puede atribuir a los efectos de la fuerza iónica en la unión de la enzima y el sustrato. Un cambio en las concentraciones de iones salinos también influye en las interacciones iónicas en la enzima, de manera que puede haber un cambio en la estructura tridimensional y, asociado a él, en la actividad catalítica. Si la concentración de sal aumenta mucho, se producen efectos de salificación debidos a una (des)hidratación competitiva; una proteína puede precipitar entonces sin que ello conduzca necesariamente a una pérdida irreversible de la actividad catalítica.

Cabe señalar en este punto que una enzima ayuda a alcanzar un establecimiento más rápido del equilibrio. Una enzima no es capaz de cambiar la posición de un equilibrio. La posición de equilibrio a una temperatura y presión

dadas viene determinada únicamente por los datos termodinámicos de los reactantes (sustratos, co-enzimas, productos) implicados en la conversión, es decir, de aquellas sustancias que no se regeneran en el ciclo catalítico. Puede ocurrir, sin embargo, que no se establezca el equilibrio pese al hecho de que la reacción sea catalizada por una enzima.

5

Para la determinación, de acuerdo con la invención, de la presencia de un compuesto concreto en el documento de seguridad es suficiente con que se produzca un cambio específico. Este cambio puede ser perceptible directamente mediante los sentidos normales de una persona y/o legible por máquinas. Estos cambios perceptibles sensorialmente pueden ser visuales y/u olfatorios y/o táctiles. Para una percepción sensorial a veces también se necesita una herramienta sencilla, tal como una lupa o la denominada luz negra (luz UV).

10

En principio son adecuadas para la invención todas las formas posibles de medir actividades enzimáticas/conversiones enzimáticas.

15

Para cambios medibles/cuantificables habitualmente se emplean técnicas espectrales. Estos cambios se pueden manifestar en forma de un cambio en la absorción, reflexión, fluorescencia o fosforescencia, y todo ello en la región UV y/o visible y/o próxima a IR. Con mucho, la mayoría de las actividades enzimáticas se miden por (espectro)fotometría o fluorimetría. Otros ejemplos aplicables más específicamente incluyen, entre otras cosas, la bioluminiscencia, con la cual, por ejemplo, se pueden medir rápidamente concentraciones de ATP muy bajas. La energía (química) del compuesto ATP rico en energía se transfiere a un grupo fluorescente durante la denominada reacción de la luciferasa. La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente y, por lo tanto, también a la presencia de, por ejemplo, un organismo productor de ATP; de esta manera se puede establecer la presencia de contaminaciones microbianas. Las actividades enzimáticas también pueden dar como resultado un cambio en la actividad óptica, por ejemplo un cambio en el ángulo de polarización; un ejemplo es el efecto de la sacarasa sobre la sacarosa, en la que la dextrorrotación de una solución de sacarosa se convierte en una levorrotación después de la escisión del enlace glucosídico entre D-fructosa y D-glucosa; la levorrotación específica de la D-fructosa es mayor que la de la glucosa dextrógira D-glucosa. Algunas veces se mide una actividad enzimática titulando grupos del sustrato liberados durante la reacción.

20

25

30

En la estabilidad de las enzimas (en este caso la actividad catalítica), incluida la estabilidad térmica, influye un gran número de condiciones. Como es de esperar, esta estabilidad térmica es alta en el caso de las enzimas que son codificadas por la información genética de microorganismos (hiper)termófilos. Dependiendo del tipo de documento de seguridad y de las condiciones de uso normales del mismo, también puede resultar significativo si puede producirse, por ejemplo, una inactivación enzimática como consecuencia de una oxidación con oxígeno del aire o por sensibilidad a sustancias concretas, tales como (trazas de) metales pesados. Esto puede limitar las posibilidades de incorporar directamente tal enzima sensible en un objeto que se ha de autenticar. Por otra parte, también se pueden aprovechar precisamente estas sensibilidades de una enzima. Es posible usar una enzima que es sensible a oxígeno pero que está completamente protegida contra el aire mediante un recubrimiento y/o capas de barrera; si alguien intenta falsificar el documento, las capas protectoras pueden alterarse, y durante el ensayo no se detectará actividad de la enzima inactivada. También se puede obtener una indicación de falsificación si al menos una de la(s) enzima(s) es sensible a compuestos/soluciones oxidantes y/o reductores y/u orgánicos que se usan en un intento de alterar los datos en/sobre el documento. Entonces no se detecta actividad enzimática como resultado de la desnaturalización previa de la enzima en las condiciones de falsificación.

35

40

45

En otro ejemplo más, el documento de seguridad se puede proveer localmente de un inhibidor según un patrón concreto (por ejemplo, en forma de un código (de barras) o una figura geométrica visible y/o medible) mientras que los demás reactantes se distribuyen homogéneamente. Al comprobar la autenticidad añadiendo el reactivo de ensayo, se verá claramente que la reacción no transcurre, o apenas lo hace, en los lugares con inhibidor, mientras que la reacción transcurre mucho más rápidamente en el área inmediatamente adyacente. Por analogía, se puede aplicar asimismo un sistema de este tipo con (la distribución de) un activador en lugar de con un inhibidor.

50

Existen numerosas opciones para estabilizar enzimas *in vitro*. Las enzimas disponibles en el mercado están estabilizadas de diversas maneras. Unas veces se suministran en forma seca (como liofilizado), otras en una concentración elevada de sulfato de amonio, unas veces en una solución de glicerol con o sin tampón, otras en una concentración elevada de una sal simple (NaCl), otras solo en un tampón, algunas veces se añade EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y en algunas ocasiones las enzimas se suministran con uno de los sustratos o con ASB (albúmina de suero bovino).

55

Se pueden inmovilizar enzimas sobre o en portadores (sólidos). La unión a un portador sólido puede mejorar la estabilidad; los parámetros cinéticos pueden cambiar. La incorporación de enzimas en portadores sólidos también puede influir en los parámetros cinéticos mediante, por ejemplo, limitaciones de difusión o por un cambio de polaridad del entorno directo de la enzima. La estabilización en un recubrimiento se ha mencionado ya con anterioridad. La estabilización de al menos una actividad enzimática de una manera diferente brinda la posibilidad de proteger un documento de múltiples maneras diferentes. Por ejemplo, una enzima está presente en diferentes condiciones de estabilización y, por lo tanto, la actividad de la enzima variará de forma correspondiente.

60

65

Por el documento US 6287765 se conoce una forma específica de unir proteínas, en la que al menos una proteína (enzima) se une a un polinucleótido polifuncional. Poniendo en contacto varias proteínas (enzimas) en una composición específica/funcional por medio de estos polímeros nucleotídicos polifuncionales se puede, entre otras cosas, acoplar de manera coordinada varias reacciones enzimáticas. Esto último es, en cierta medida, comparable a los complejos multienzimáticos, aunque en estos últimos toda la organización tridimensional/estructural está ajustada de forma óptima para el curso eficaz de varias reacciones consecutivas; ejemplos conocidos de estos últimos son los complejos alfa-cetoácido deshidrogenasa y el complejo ácido graso sintetasa.

De lo anterior se desprende claramente que existen muchas opciones diferentes para estabilizar todo tipo de enzimas; cada tipo de enzima requiere un planteamiento individual. Un modo óptimo de conservación/ estabilización es de gran importancia para asegurar de la mejor manera posible la reproducibilidad de un ensayo cuantitativo en la característica.

La mayoría de los sustratos enzimáticos son bastante o muy estables en condiciones atmosféricas normales a temperatura ambiente. La estabilidad de los co-factores y las co-enzimas oscila entre extremadamente estable y altamente inestable. Los co-factores en forma de iones metálicos (por ejemplo Mg^{2+}) son, por ejemplo, extremadamente estables, pero las co-enzimas con un alto contenido energético, tales como NAD(P), H o ATP, no son muy estables a temperatura ambiente en condiciones atmosféricas.

Para la aplicación de la invención a un documento de seguridad puede ser necesario proteger los reactantes, enzimas y otros materiales necesarios para la conversión enzimática contra las influencias que puedan afectar al documento durante el uso normal, por ejemplo los agentes químicos hidrosolubles en documentos expuestos a condiciones de humedad. Ejemplos de protecciones aplicables incluyen el almacenamiento de los agentes químicos en microcápsulas, no liberándose estos agentes químicos, bien por disolución de las cápsulas o bien mediante un efecto mecánico, hasta que se añada el reactivo iniciador. También es posible unir un reactivo hidrosoluble natural por medio de un espaciador a una matriz sólida, por ejemplo a alguna parte de una característica y/o del documento. Finalmente, es posible inmovilizar las sustancias hidrosolubles acoplándolas a micropartículas insolubles en agua y, si es necesario, por medio de espaciadores. Si, por otra parte, los sustratos en una característica poseen una naturaleza fuertemente no polar, existe un riesgo mucho menor o nulo de eliminar el efecto por lavado en un entorno polar y no es necesario en sí tomar tales medidas.

Un ensayo enzimático generalmente se lleva a cabo midiendo un estado inicial en el que aún no se ha producido ninguna conversión enzimática; después se realiza una última adición, cuyo resultado es el inicio y el progreso de la reacción. La última adición siempre deberá incluir, por lo tanto, al menos uno o más reactivos que son esenciales para iniciar la reacción; éste puede ser una enzima y/o un sustrato que falte y/o una co-enzima que falte (y posiblemente un co-factor que falte). La última adición también puede incluir una mezcla de varios factores, tales como una enzima y uno de los sustratos y/o una co-enzima. También es posible que la última adición carezca de la enzima porque esta última está presente ya, según un ejemplo de la característica, en/sobre el sustrato de la característica que se ha de ensayar. Otra posibilidad reside en que el reactivo iniciador contenga al menos parte de los sustratos para una reacción enzimática, estando presente la enzima correspondiente en el documento, así como otra enzima para la cual al menos parte de los sustratos está presente en/sobre el documento. Hay que asegurarse de que no se pueda producir una conversión espontánea antes del ensayo ni en la última adición ni en/sobre el documento que se ha de ensayar. También es concebible añadir en la última adición algo por medio de lo cual comience una reacción de seguimiento; este primer establecimiento desfavorable del equilibrio puede desplazarse enteramente hacia el de una reacción "irreversible".

Una realización mínima del sistema de autenticación de acuerdo con la invención incluye todos los requisitos para al menos una conversión enzimática reproducible cualitativa y/o cuantitativamente. También se pueden variar adicionalmente las condiciones que puedan influir en al menos una conversión enzimática.

Es posible que estén presentes muchas sustancias que son completamente inertes respecto a al menos una conversión enzimática y que, por tanto, no influyen en esta conversión pero que presentan una característica propia, tal como color, propiedades luminiscentes, conductividad, actividad óptica tal como efectos polarizantes y propiedades magnéticas, etc. También se pueden incluir todo tipo de sustancias que sirvan simplemente para ponérselo difícil a un falsificador descubrir qué sustancias son realmente importantes en el sistema. Así, por ejemplo, se puede usar una mezcla de (estereo)isómeros en la que únicamente uno de estos isómeros es importante y usar además, si fuera necesario, compuestos encubridores que no son activos en el ensayo de autenticación. También se pueden incluir numerosas secuencias de nucleótidos irrelevantes (inertes) en el caso de desearse una inhibición (potenciada) mediante una secuencia de polinucleótidos.

En otra variante, el documento de seguridad contiene, al menos localmente, diferentes concentraciones de sustrato a las que, tras la adición del reactivo iniciador, las conversiones se producen a la misma velocidad inicial ya que, en estas condiciones, la reacción progresa al principio en condiciones de V_{max} . Sin embargo, el resultado final de las conversiones es diferente puesto que las concentraciones de producto serán diferentes. En otra variante puede transcurrir una reacción enzimática a concentraciones de sustrato localmente diferentes y al mismo tiempo se miden las diferentes velocidades de conversión. A partir de estas mediciones se pueden establecer/calcular los parámetros

cinéticos relevantes para el sistema.

De acuerdo con otra variante más, se diseñan regiones discretas de manera que en una región progrese una reacción no inhibida mientras que en/sobre al menos otra parte de la marca transcurra la misma conversión enzimática en condiciones inhibidas. En otras variantes se puede trabajar con activadores o con combinaciones de activadores e inhibidores.

La presente invención se explica con más detalle a continuación con la ayuda del dibujo adjunto, en el que:

- 10 la fig. 1 es una realización de un documento de seguridad con una característica de seguridad local;
- la fig. 2 es una característica de seguridad con varias superficies componentes;
- las figs. 3 a 6 muestran características de seguridad con ligeras variaciones por superficie componente;
- las figs. 7 a 11 muestran características de seguridad en forma de un código de barras con ligeras variaciones por barra;
- 15 la fig. 12 es una característica que se compone de diferentes símbolos.

La figura 1 muestra un documento de seguridad 1, en este caso un billete de banco. El documento de seguridad está provisto de características de seguridad conocidas en sí, tales como un filamento de seguridad 2 y una marca de agua 3. Se aplica localmente una realización de una característica de seguridad 4 de acuerdo con la invención, que, en el ejemplo dado, cubre solo una parte limitada del documento 1. La característica 4 puede ser completamente uniforme y continua, pero también es posible introducir discontinuidades dentro de la característica. Las figuras siguientes muestran una serie de ejemplos ilustrativos de ello. Con fines de claridad y para simplificar, solo tienen lugar una o dos conversiones enzimáticas en estas figuras y ejemplos. Un experto en la técnica, sin embargo, puede aumentar fácilmente el número de ejemplos, incluyendo, por ejemplo, diferentes sistemas enzimáticos dentro de la característica y/o escogiendo enzimas con la misma especificidad pero de diferentes orígenes, con el resultado de que los parámetros catalíticos pueden diferir en las condiciones dadas.

Los ejemplos pretenden ilustrar la invención, a saber, al menos una reacción enzimática concreta con al menos una conversión predeterminada con un cambio detectable, en particular después de añadir un reactivo iniciador en condiciones conocidas con respecto a la composición final y todos los factores relevantes que puedan influir en una reacción enzimática, presentando la enzima una buena resistencia a las condiciones normales de uso. También se puede detectar mediante el sistema una condición anormal de uso, como un intento de falsificación, pues la conversión enzimática esperada fallará entonces parcial o totalmente.

En los ejemplos dados, el reactivo iniciador contiene al menos una enzima. No obstante, los ejemplos se pueden incrementar fácilmente añadiendo variantes en las que el documento de seguridad está provisto de al menos la enzima y en las que el reactivo iniciador no contiene la enzima.

La figura 2 muestra una realización general de la característica de seguridad 4. Cada una de las regiones componentes O_1 a O_9 dadas puede presentar una composición idéntica de la característica; si todas las regiones componentes presentan una composición idéntica, la característica es uniforme. No obstante, las regiones componentes también pueden diferir unas de otras en cuanto a la composición; en ese caso existen una o más discontinuidades en la característica.

En este ejemplo es posible cualquier combinación posible de l_1, l_2, l_3 y b_1, b_2, b_3 dentro de las condiciones de contorno: $l_1 + l_2 + l_3 = l$ y $b_1 + b_2 + b_3 = b$ para la disposición rectangular de la característica dada en este caso, en la que l representa la longitud y b representa la anchura. Es obvio que la característica se puede dividir en más partes que las nueve regiones dadas en este caso (en una subdivisión de este tipo generalmente: l se puede dividir en l_1 a l_x inclusive, con una longitud $0 \leq l_n \leq l$ y $\sum l_n = l$; b se puede dividir en b_1 a b_y inclusive, con una anchura $0 \leq b_n \leq b$ y $\sum b_n = b$; el número de regiones componentes $\leq x \cdot y$ en una división de este tipo). La forma dada de la característica se usa únicamente porque representa un ejemplo geométrico sencillo; no obstante, se puede concebir cualquier forma con cualquier subdivisión.

En una realización concreta (figura 3) se hace énfasis en las variaciones posibles de la composición sobre/en las diferentes superficies componentes. La variación puede residir en uno o más factores que influyen en la velocidad de una conversión enzimática, como: la concentración de sustrato y/o el tipo de sustrato y/o la concentración de un inhibidor y/o el tipo de inhibidor y/o la concentración de un co-factor y/o la concentración de una co-enzima y/o la concentración de un activador y/o el pH y/o la fuerza iónica y/o la composición iónica o combinaciones específicas de todos estos factores. La concentración de la enzima no se tiene en cuenta en este caso y, por conveniencia únicamente, se asume que es constante en estos ejemplos. Un experto en la técnica puede ampliar fácilmente el número de posibilidades/ combinaciones.

Cabe señalar que las concentraciones totales de los factores pueden ser a veces idénticas pero que las concentraciones eficaces de los mismos pueden ser, sin embargo, diferentes. Así, se puede usar una concentración concreta fija de un co-factor, por ejemplo en forma de un ion metálico, pero introducir al mismo tiempo variaciones en la presencia/las concentraciones de un agente complejante de metales que puede formar un complejo con el ion metálico

relevante (por ejemplo, EDTA). La concentración del ion metálico libre generalmente es determinante de la velocidad de una reacción enzimática; esta velocidad también dependerá entonces de la concentración de EDTA a una concentración total dada del metal. Algunos de estos iones metálicos libres se pueden complejar con uno de los reactantes y/o con la enzima; estos iones, por tanto, no se pueden denominar realmente libres, pero son eficaces en la reacción catalizada por enzima, al contrario que los iones complejados con EDTA. Un ejemplo conocido de reacciones enzimáticas que dependen de un metal son aquellas en las que está implicado al menos un grupo fosfato. Estas reacciones son con frecuencia dependientes de iones Mg^{2+} (el Mg^{2+} se compleja con una o más cargas negativas de los grupos fosfato de los compuestos que están implicados en la reacción). Aunque las concentraciones totales de, por ejemplo, el ion Mg^{2+} pueden ser idénticas, se obtienen velocidades de conversión diferentes en presencia de una concentración fija de Mg^{2+} y en presencia de concentraciones variables de EDTA.

En la figura 4 se muestra una realización concreta en la que la concentración de sustrato para al menos un tipo de conversión enzimática en al menos una de las regiones componentes difiere de las de las demás regiones, permaneciendo las demás condiciones/ concentraciones constantes. Como resultado de ello se obtiene durante el ensayo al menos una velocidad de conversión enzimática y/o estado final desviado en al menos una de las diferentes regiones componentes. También es posible complejar un ion metálico que forma parte de la enzima activa. La enzima será entonces total o parcialmente inactiva; la actividad se puede restablecer añadiendo un exceso del ion metálico en la última adición. Esto de nuevo es un ejemplo de las numerosas posibilidades que existen para crear un sistema de ensayo muy complicado que difícilmente se puede falsificar.

En la figura 5 se muestra otra realización concreta en la que se usa un sustrato diferente para una conversión enzimática concreta en al menos una de las regiones componentes, con el resultado de que esta región muestra una señal diferente después del ensayo. Por ejemplo, se puede usar un sustrato S_p en al menos las regiones componentes O_2 y O_8 (estas regiones componentes se eligen completamente al azar) mientras que al menos una de las demás superficies componentes (por ejemplo, O_1 y O_6) comprende otro sustrato S_q . La señal visible y/o medible en las regiones O_2 y O_8 puede diferir de la de las regiones O_1 y O_6 con S_q debido a una velocidad de conversión diferente y/o propiedades espectrales diferentes de los sustratos y/o los productos respectivos; lo más probable es que los parámetros cinéticos sean diferentes.

Es posible, por ejemplo, hacer que una conversión esté asociada a un cambio de color medible y/o perceptible directamente visualmente, mientras que la otra conversión esté asociada a un cambio medible y/o perceptible para el cual, por ejemplo, se requiera luz UV para ser vista/medida; esta señal también puede ser una señal fluorescente.

En otra realización concreta de acuerdo con la fig. 6, se usa una reacción enlazada en al menos una región componente, usando un sustrato concreto, y en otra región componente se usa el mismo sustrato sin una reacción enlazada, de manera que se genera localmente otra señal. Así, por ejemplo, en la región componente O_5 (ejemplo aleatorio) se puede obtener la conversión visible y/o medible de $S_a \rightarrow P_a$ y en la región componente O_8 (ejemplo aleatorio), la conversión visible y/o medible de $S_a \rightarrow P_a$ seguida de $P_a + C \rightarrow P_b + D$ o $P_a \rightarrow P_b$, produciéndose el cambio visible y/o medible en la segunda reacción; las diferentes señales pueden diferir en color y/o intensidad y/o emisión. De nuevo, las conversiones pueden ser perceptibles visualmente y/o medibles mediante un (espectro) fotómetro y/o mediante un fluoro(espectro) fotómetro que mide en la región UV y/o visible y/o (próxima a la) infrarroja. En el ejemplo dado, solo se indica una reacción de seguimiento, pero también se pueden usar varias reacciones de seguimiento dentro de una región componente o reacciones de seguimiento que difieran entre sí en regiones componentes diferentes.

Como se ha indicado anteriormente, a veces se puede regenerar uno de los reactantes (sustratos y/o co-enzimas) mediante las reacciones de seguimiento, de manera que bastará con una concentración inicial relativamente baja de este reactante. Además, la retirada de los productos de la(s) primera(s) reacción(es) afectará favorablemente al grado de conversión del sustrato de esta(s) primera(s) reacción(es). Se necesitarán enzimas adicionales para las reacciones de seguimiento.

En la fig. 7 se muestra una realización concreta en la que la característica se caracteriza por una distribución discontinua de los factores/ reactantes presentes en la característica y necesarios para la conversión enzimática, en forma de un código de barras (in)visible y/o medible. En cada una de las barras en las que puede tener lugar la reacción, la composición de los factores/ reactantes puede ser idéntica pero también puede ser diferente. Si la composición en las partes activas de la característica es idéntica, una vez transcurrida la reacción se verá, por ejemplo, un código de barras con barras con la misma intensidad de color perceptible y/o medible; también puede ocurrir que todas las barras inicialmente perceptibles/ medibles desaparezcan por igual en el lugar en el que transcurre la reacción. Esto viene enteramente determinado por la composición de la característica. La intensidad final de las barras también puede diferir dependiendo de la composición original o por la(s) última(s) adición(es).

En la fig. 8 se muestra una realización concreta en la que la concentración de sustrato en al menos una de las barras es diferente de la de las demás (siendo la composición y las condiciones por lo demás idénticas). El resultado es al menos un cambio de señal diferente en esta barra en comparación con los de las demás barras; esta diferencia puede residir en la velocidad a la que se produce un cambio de señal y/o en el grado final del cambio de señal.

5 En la fig. 9 se muestra una realización concreta en la que se introducen diferencias en la composición entre las barras que alteran localmente la velocidad de la conversión enzimática, como la presencia/ ausencia de un inhibidor y/o un co-factor y/o una co-enzima y/o un activador. Las concentraciones de todos estos factores, si están presentes, también pueden variar para cada barra. Al mismo tiempo, y aparte de estas variaciones, también es posible variar localmente la fuerza iónica y la composición iónica.

10 En una realización concreta (fig. 10), las reacciones enzimáticas en las diversas regiones componentes se realizan en diferentes condiciones de reacción, más específicamente a diferentes valores de pH, de manera que la velocidad de conversión en las regiones componentes difiere dependiendo, entre otras cosas, de las enzimas y los sustratos usados.

15 En una realización concreta (fig. 11), el tipo de sustrato en cada barra es diferente, de manera que se puede producir una amplia variedad de cambios en la característica total. Los sustratos se pueden convertir todos mediante un tipo de enzima pero a diferentes velocidades y/o con diferentes cambios de señal, o los sustratos pueden ser (casi) idénticos (por ejemplo, en lo que a la fórmula bruta se refiere) pero se han de convertir mediante enzimas diferentes.

20 La figura 12 muestra una realización en la que la característica se realiza en formas específicas, tales como signos y/o símbolos y/o figuras. Todas las formas o partes dentro de la característica pueden presentar propiedades idénticas en lo que a las conversiones enzimáticas se refiere, pero, de la misma manera, al menos una forma o al menos una subparte puede ser diferente de las demás, y en el caso extremo todas las formas son diferentes unas de otras en lo que a la velocidad y/o el tipo de conversión enzimática se refiere.

25 La adición de cualquier reactivo/ composición iniciador se puede realizar mediante sistemas de dosificación conocidos para este propósito. También se puede aplicar un reactivo iniciador con una pluma, un tampón de timbrar o mediante impresión por chorro de tinta, por ejemplo. El simple trazado de una línea con una pluma o la aplicación de un sello puede bastar para un ensayo cualitativo.

30 Cuando en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, se usa la palabra 'concentración', ésta se puede entender como una cantidad determinada por unidad de área de superficie y/o por unidad de volumen.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la autenticación de un documento de seguridad, en el que el documento de seguridad comprende al menos uno de entre una enzima y un sustrato adecuado para la enzima, comprendiendo este procedimiento los pasos de
- a) realizar una conversión enzimática entre la enzima y el sustrato sobre el documento de seguridad,
b) valorar un cambio detectable resultante de la conversión enzimática,
- 10 en la cual la información genética para la enzima proviene de un microorganismo extremófilo.
- 15 2. Sistema de autenticación para autenticar documentos de seguridad, que comprende al menos una enzima y un sustrato adecuado para la enzima, de manera que la enzima sea capaz de efectuar una conversión enzimática en la que se produzca un cambio resultante detectable, y el documento de seguridad comprende al menos uno de entre la enzima y el sustrato, en que la información genética para la enzima proviene de un microorganismo extremófilo.
- 20 3. Documento de seguridad, tal como una escritura, billete de banco, documento de valor, carné, vale, timbre, documento de identidad, visado, tarjeta bancaria, etiqueta y envase para, en particular, las industrias farmacéutica, cosmética, electrónica y alimentaria, provisto de una característica de seguridad basada en una conversión enzimática entre una enzima y un sustrato, en el que la característica de seguridad comprende una enzima cuya información genética proviene de un microorganismo extremófilo.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o sistema de autenticación de acuerdo con la reivindicación 2 o documento de seguridad de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la información genética para la enzima proviene de un microorganismo hipertermófilo o termófilo.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o sistema de autenticación de acuerdo con la reivindicación 2 ó 4 o documento de seguridad de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en el que el documento de seguridad está provisto de la enzima, preferentemente en un recubrimiento.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5 o sistema de autenticación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 o documento de seguridad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la enzima está estabilizada.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 6 o sistema de autenticación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 6 o documento de seguridad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la enzima está presente en un reactivo iniciador, comprendiendo este reactivo preferentemente una sustancia y/o un medio para estabilizar la enzima.
- 45 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 7 o sistema de autenticación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 7 o documento de seguridad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que la enzima está unida a un soporte sólido o incorporada en una partícula sólida.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 8 o sistema de autenticación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 8 o documento de seguridad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que se usa un producto de la conversión enzimática como reactivo en una reacción de seguimiento química y/o enzimática.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 9 o sistema de autenticación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 9 o documento de seguridad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que se proporcionan al menos dos enzimas diferentes en regiones de la superficie del documento de seguridad que se solapan entre sí al menos parcialmente.

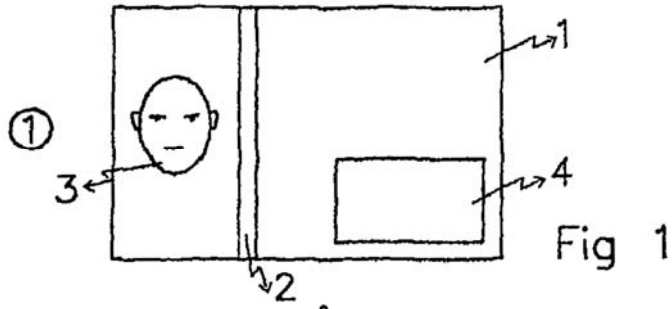


Fig 1

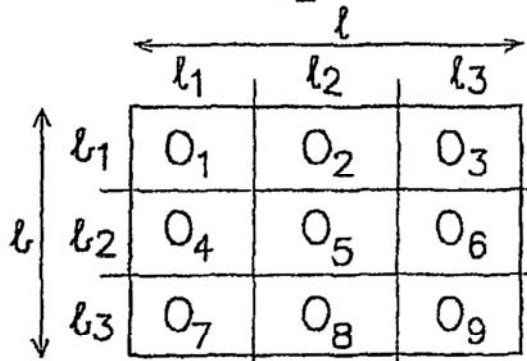


Fig 2

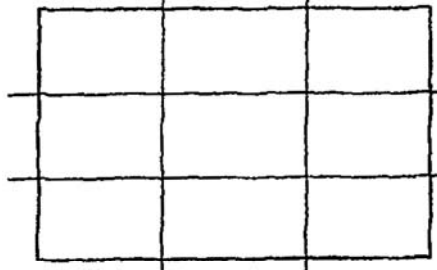
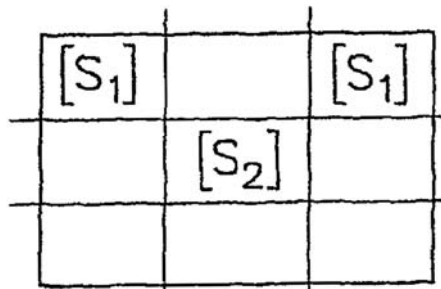
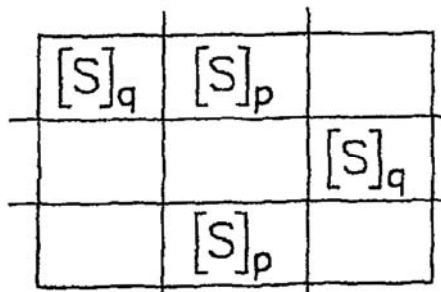


Fig 3



$[S_1] \neq [S_2]$
sustratos idénticos

Fig 4



$S_q \neq S_p$
sustratos no idénticos

Fig 5

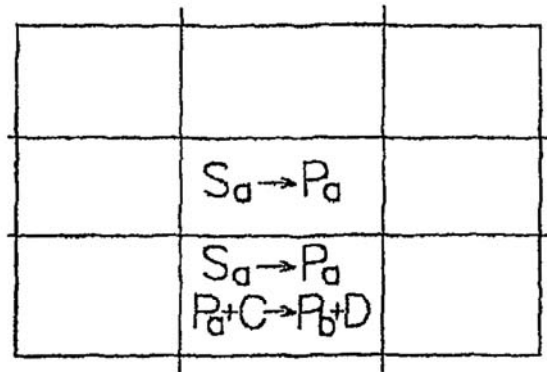
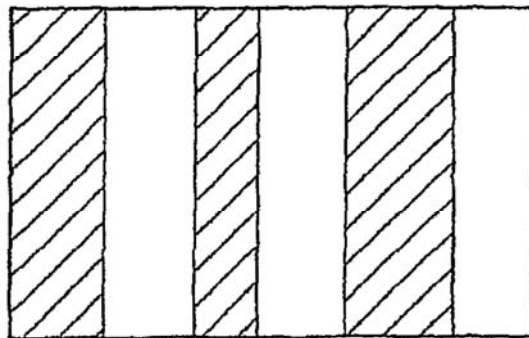
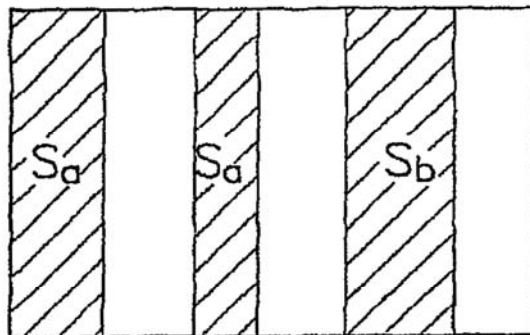


Fig 6



parte activa

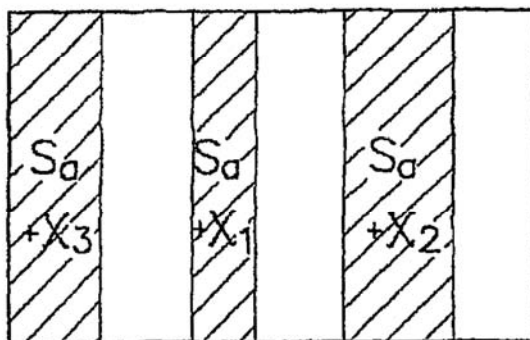
Fig 7



$$[S_a] \neq [S_b]$$

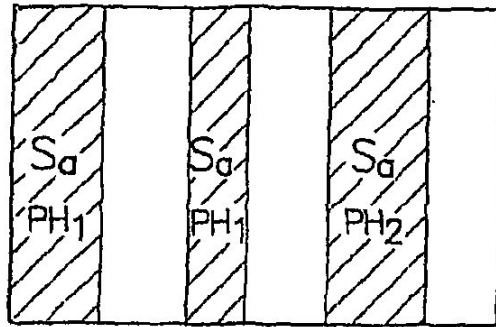
sustratos idénticos

Fig 8



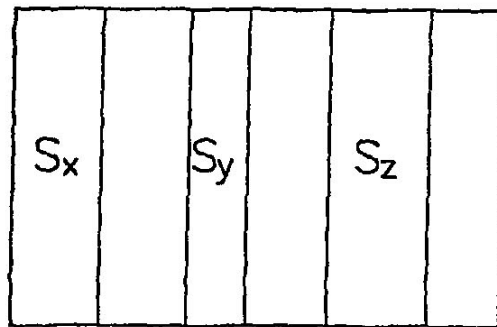
$X_1 = A$ y/o I
y/o co-factor
y/o co-enzima

Fig 9



$PH_1 \neq PH_2 \neq PH_3$

Fig 10



$S_x \neq S_y \neq S_z$

Fig 11

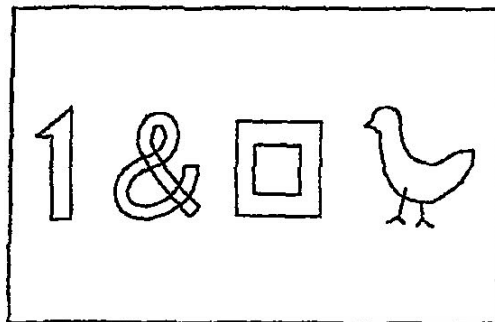


Fig 12