

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 226**

21 Número de solicitud: 201200729

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (50.0%)
Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n
39005 Santander (Cantabria) ES y
FUNDACION MARQUES DE VALDECILLA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CASTAÑEDA FERNÁNDEZ, María;
ODRIOZOLA MARTINEZ, Adrián y
ZARRABEITIA CIMIANO, Maria Teresa**

54 Título: **Método para la obtención del perfil genético de un individuo mediante el análisis de loci de cromosoma X**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis, en un extracto de ADN procedente de dicho individuo, mediante una reacción de amplificación multiplex, de al menos 4 loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS 10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, en donde a) al menos uno de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809, y b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079. Asimismo, se contempla un kit para la realización de dicho método. Finalmente, la invención contempla el conjunto de parejas de cebadores, de secuencias SEQ ID NO I-SEQ ID NO 17, empleado para llevar a cabo el método de la presente invención.

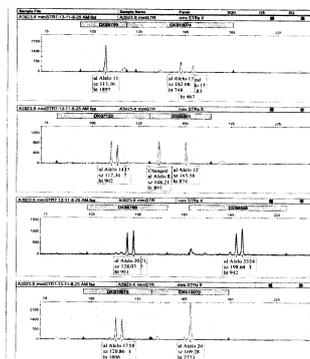


FIGURA 1

ES 2 442 226 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE UN INDIVIDUO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LOCI DE CROMOSOMA X

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La invención se relaciona con un método para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis de 4 o más loci STRs, hasta un total de 8 loci, todos ellos localizados en el cromosoma X, en un extracto de ADN de dicho individuo mediante una reacción de amplificación multiplex. Asimismo, la presente invención también se dirige a un kit que

10 comprende las parejas de cebadores para la puesta en práctica del método de la invención. Tanto el método como el kit aquí descritos son de aplicación en la identificación de individuos en el área de la genética forense, así como en genética de poblaciones, antropología y biomedicina.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Actualmente la obtención de perfiles genéticos mediante el análisis de loci STRs (Short Tandem Repeats) autosómicos plantea en ocasiones problemas técnicos que se traducen en no poder ofertar un resultado concluyente de probabilidad de paternidad o parentesco que es

20 solicitado por los Tribunales de Justicia. Ello acontece fundamentalmente en la determinación de casos complejos: la falta de algún progenitor o de ambos existiendo abuelos/tíos. En estos casos se hace necesario el análisis nuevamente de los individuos con otros kits de STRs de cromosomas autosómicos y STRs de cromosomas sexuales (STRs del cromosoma X y del Cromosoma Y) con el fin de aumentar el número de STRs analizados y alcanzar una

25 probabilidad suficiente.

En numerosas ocasiones a lo anteriormente expuesto se añade otra circunstancia que dificulta el análisis de individualización con los STRs convencionales y es la degradación del ADN de la muestra objeto de estudio.

30

Por todo lo anterior resulta prioritario desarrollar nuevas metodologías de obtención de perfiles genéticos alternativos a los ya existentes en el estado de la técnica y que superen los inconvenientes actuales.

El cromosoma X comprende 155 Mb y representa el 5% del total del material genético de las células. Contiene aproximadamente del orden de 1100 genes. Tan solo un 1.7% de este cromosoma codifica proteínas funcionales, presentando un elevado contenido de ADN no codificante repetitivo (Ross et al., 2005 Nature 434: 325- 337). Parte de esta fracción son regiones cortas repetidas en tándem o “short tándem repeats” (STR). Hasta la fecha, se han descrito más de cincuenta STRs en el cromosoma X cuyo análisis es fundamentalmente de interés entre otras, en Genética Forense y en las disciplinas anteriormente mencionadas (Gusmão et al., 2012 Methods Mol. Biol. 830: 57-71).

10 El análisis de marcadores microsatélites denominados STRs (Short Tandem Repeats) es hoy en día la técnica de referencia para la obtención de perfiles genéticos destinados a identificación de individuos, determinación de parentesco o criminalística.

Sin embargo, la eficacia de los STR autosómicos se ve reducida en la resolución de determinados casos de parentesco, tales como aquellos en las que la muestra de alguno de los miembros familiares no está disponible y la descendencia es femenina (Szibor et al., 2007 Forensic Sci. Int. Genet. 1:93-97; Szibor et al., 2003 Int. J. Legal Med. 117: 67-74).

En dichos casos, el análisis de STRs del cromosoma X constituye una herramienta complementaria de elevado interés (Zarrabeitia et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2):85-89; Szibor et al., 2003 Int. J. Legal Med. 117: 67-74; Liu et al., 2008 Int. J. Legal Med. 122: 261-265). Así mismo, ha demostrado gran utilidad en la identificación de individuos.

Herencia del cromosoma X

25 Ello se debe al particular modo de herencia del cromosoma X. Los hombres poseen un único cromosoma X y un único cromosoma Y, transmitiendo una copia exacta del Cromosoma X a todas sus hijas, tal como lo heredó de su madre y una copia exacta del cromosoma Y a todos sus hijos (Wakefield et al., 2006 Encyclopedia of life sciences; Burgoyne et al., 1982 Hum. Genet. 61: 85-90).

30 Por lo que, el haplotipo del cromosoma X e Y paterno puede ser detectado respectivamente en la descendencia femenina y masculina.

Las mujeres por su parte, contienen dos cromosomas X. Trasmiten uno de ellos a cada descendiente independientemente del sexo. Este cromosoma X que transmite la madre puede ser una copia exacta de cualquiera de sus cromosomas o puede haber sufrido una recombinación entre los dos cromosomas X y ser distinto de la copia inicial que posee la
5 mujer (Wakefield et al., 2006 Encyclopedia of life sciences).

Teniendo en cuenta que los padres van a transmitir una copia entera del Cromosoma X en ausencia de recombinación a todos sus descendientes femeninos, podemos determinar su haplotipo directamente.

10

Aplicaciones del cromosoma X en diagnóstico de parentesco.

Esta característica del cromosoma X del varón permite estudios de paternidad de descendencia femenina, aún en ausencia del presunto padre constituyendo la principal ventaja del análisis de microsatélites del cromosoma X frente a sus homólogos autosómicos. El
15 haplotipo del cromosoma X del padre será idéntico a uno de los cromosomas de la abuela paterna, por lo que si al menos un alelo de cada marcador analizado de la abuela no coincide con el de la nieta podrá descartarse la paternidad biológica. Estos análisis presentan una elevada probabilidad de exclusión. A su vez, en aquellos casos en los que la abuela tampoco esté disponible, puede reconstruirse su genotipo a través del estudio de los hermanos/as del
20 presunto padre (Szibor et al., 2007 Forensic Sci. Int: Genet. 1:93-97; Szibor et al., 2003 Int. J. Legal Med. 117: 67-74). De un modo general, puede afirmarse que el estudio de STRs del cromosoma X de hermanos revela gran parte del genotipo materno (Szibor et al., 2003 Int. Congr. Ser. 1239: 815- 820).

25 Por lo tanto, el análisis del cromosoma X también es de utilidad en el estudio de parentescos más distantes como el previamente mencionado abuela-nieta (Liu et al., 2008 Int. J. Legal Med. 122: 261- 265), e incluso en el estudio de grandes pedigríes familiares siempre que en cada generación exista al menos un descendiente femenino. La potencia de su análisis en este sentido, reside en la existencia de loci que por su proximidad física y sus características
30 específicas constituyen bloques haplotípicos que se heredan juntos y se mantienen estables a través de las generaciones (Szibor et al., 2003 Int. Congr. Ser. 1239: 815- 820).

Por otro lado, el análisis de STRs del cromosoma X es de gran interés en el estudio de presuntas hermanas o medio-hermanas por parte de padre. Estas deberán compartir un alelo de cada marcador del cromosoma X estudiado, que provienen del padre (Zarrabeitia et al., 2002 *Forensic Sci. Int.* 129: 85- 89; Liu et al. *Int. J. Legal Med.* 122:261- 265; Zarrabeitia et al., 2006 *Int. J. Legal Med.* 120:147- 150; Gomes et al., 2008 *Int. J. Legal Med.* 123 (2):143- 149; Zarrabeitia et al., 2007 *Int. J. Legal Med.* 121: 433- 437; Becker et al., 2008 *Forensic Sci. Int. Genet.* 2(1):69-74).

En el caso particular de incestos padre-hija, los microsatélites del cromosoma X complementan el análisis de STR autosómicos, ya que si la hija se queda embarazada, en su descendencia femenina no existirá ningún alelo distinto a los presentes en dicha progenitora. Su utilidad destacaría en cuanto a excluir un supuesto incesto. Mientras que debido a las limitaciones de inclusión de los STRs del cromosoma X, es necesario considerar que el haplotipo del cromosoma X puede ser compartido por otros miembros de la misma familia (Szibor et al., 2007 *Forensic Sci. Int. Genet.* 1:93-97; Szibor et al., 2003 *Int. J. Legal Med.* 117: 67-74).

Aplicación del cromosoma X en identificación.

En lo que se refiere al análisis de indicios biológicos, los estudios de microsatélites del Cromosoma X, resultan especialmente útiles en la identificación de un perfil femenino en una evidencia que contenga una mezcla de ADN masculino y femenino. En este caso, los alelos de la muestra femenina pueden ser completamente enmascarados por los alelos de la muestra masculina, solamente si la mujer es homocigótica y coincidente en todos los loci con el hombre, suceso muy poco probable. Por lo que, dichos análisis resultan de utilidad en la resolución de casos criminales en los que pongamos como ejemplo, sea necesaria la demostración de la presencia de células epiteliales ó vaginales femeninas, en el cuerpo del supuesto agresor o en objetos con los que esté haya estado en contacto.

Creciente desarrollo de reacciones para el análisis de STRs del cromosoma X.

Debido a las aplicaciones descritas en los epígrafes anteriores, el desarrollo de reacciones que permitan el análisis simultáneo de diferentes loci STRs ha suscitado un interés creciente.

La primera de estas reacciones fue desarrollada en el año 2002 por el grupo de Zarrabeitia et al., y está constituida por los STRs (DXS7423 y DXS8377) (Zarrabeitia et al., 2002 Int. J. Legal Med. 116:368- 371). En ese mismo año, el mismo grupo de investigación desarrolló una segunda reacción multiplex formada por los microsátélites (HPRTB, DXS101, ARA, DXS7423 y DXS8377) (Zarrabeitia et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129: 85- 89). Desde ese momento, se ha descrito un número creciente de STRs del cromosoma X con utilidad en Genética Forense entre otras áreas (**tabla 1**). Paralelamente, se han ido desarrollado numerosas reacciones multiplex para el análisis simultáneo de varios de estos loci del cromosoma X, tal y como se recoge en la **tabla 2**.

10

Tabla 1. Características principales de los loci STRs del cromosoma X utilizados en Genética Forense hasta la fecha.

LOCUS	ESTRUCTURA	RANGO ALELOS	REF.
DXS6807	(GATA)1 - GTAATGA - (GATA)2 - GAC - (GATA)8-14-TGT	11-17	Edelmann et al., 1999 Electrophoresis 20 (14) 2844-2846.
DXS9895	(AGAT) 9-14-A- (AGAT)3	11-18	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129: 99-103.
	(AGAT)3-AT-(AGAT) 9-11-A- (AGAT)3		
DXS10135	[AAGA]3 GAAAG [GAAA]13-22	16-25	Becker., 2008 Forensic Sci. Int. Genet. 2(1) 69-74.
	[AAGA]3 GAAAG [GAAA]17-21	19.1-23.1	
	[AAGA]3 GAAAG [GAAA]14-16 [GGAA] [GAAA]	19-24	
	[AAGA]3 GAAAG [GAAA]18 [GGAA] [GAAA]3 [GGAA] [GAAA]	25.1	
	[AAGA]3 GAAAG [GAAA]16-26 [GGAA] [GAAA]3 [GGAA] [GAAA]	25-35	
DXS8378	(CTAT)8-14	8-14	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 26: 99-103
DXS9902	(TAGA)9-14	9-14	Gomes et al., 2009 Int. J Legal Med. 123 (5): 403-412
DXS6795	(AAT)n	9-15	Son et al., 2002 Int. J. Legal Med. 116 (6): 317-321.
DXS9907	(CTAT)8-15	8-15	Hering et al., 2011 Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 3: e321-e322
DXS6810	(CTGT)1-(CTAT)2-(CTGT)2-(CTAT)11-14 -CAT-(CTAT)1	17-20	Shin et al., 2005 Forensic Sci. Int. 147 (1): 35-41

DXS10161	(TATC)2-TATT-(TATC)7-13-(ATCT)5-ATG-(TATC)5-(ATCT)3	22-28	Edelmann et al., 2010 Int. J. Legal Med. 124: 83- 87
DXS10160	(CTTT)3 T° CTTT TT (CTTT)2 C (CTTT)9-12	15.3	Hering et al., 2008 Rechtsmedizin 18: 333
	(CTTT)3 T° CTTT TT CTTT TT (CTTT)2 C (CTTT)9-16	17-24	
	(CTTT)3 T° CTTT TT (CTTT)2 C (CTTT)7 TTTT (CTTT)3	17.3*	
	(CTTT)3 T° CTTT TT (CTTT)2 C (CTTT)8 TTTT (CTTT)3	18.3*	
	(CTTT)3 T° CTTT TT (CTTT)2 C (CTTT)14	20.3	
	(CTTT)3 T° CTTT TT CTTT TT (CTTT)2 C (CTTC) (CTTT)16	25*	
	(CTTT)3 T° CTTT TT CTTT TT (CTTT)2 C (CTTT)18 (CTTT)17	26	
DXS10159	(AAAG)4-(AGAA)2-AG-(AGAA)5-G-(AAAG)10-17	21-29	Edelmann et al., 2010 Int. J. Legal Med. 124 (1): 83- 87
DXS10162	(TCTT)-TT-(TCTT)3-T-(TCTT)10-18	14-23	
DXS10163	(AAATA)11-20-A-(AAATA)2	L13-L23	
	(AAATA)14-19-A-(AAATA)2	S16-S22	
DXS10164	(ATTCT)8-13	8-13	
DXS10165	(AAGA)6-AAA-(AAAG)11-18	17-24	
DXS7132	(TCTA)11-17	11-17	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2): 99- 103
DXS10079	(AGAA)10-21 AGAG (AGAA)3	14-25	Hering et al., 2010 Int. J. Legal Med. 120: 337- 345
	(AGAA)5 AGA (AGAA)10 AGAG (AGAA)3	19.3	
DXS10074	(AAGA)7-10	7-10	
	(AAGA)10-18 AAGG (AAGA)2	13-21	
	AA (AAGA)13 AAGG (AAGA)2	16.2	
DXS10075	(TAGA)5 TGA (TAGA)7	12	
	(TAGA)4 TGA (TAGA)9-11	13-15	
	(TAGA)5 TGA (TAGA)11-16	16-21	
	(TAGA)5 TGA TAGA TA (TAGA)10	16.2	
	(TAGA)5 TGA (TAGA)9 TGA (TAGA)2	16.3	
	(TAGA)5 TGA (TAGA)3 TGA (TAGA)12-13	20.3, 21.3	
DXS981 (STRX1)	D(TT)-N81-(TATC)11-(ATC)-(TATC)	12,23	Shin et al., 2005 Forensic Sci. Int. 147 (1): 35-41
	TT-N81- (TATC)13-14	13-14	
	D(TT)-N81- (TATC)12-(ATC)-(TATC)	13.3	
	D(TT)-N81- (TATC)14-(ATC)-(TATC)	15.3	
	-TT-N81-(TATC)16-17	16-17	
DXS6800	(TAGA)5-CA-(GATA)1-GAT-(GATA)4-GG-(TAGA)3-TC-(GATA)3	16	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2): 99- 103.
	(TAGA)7-CA-(GATA)1-GAT-(GATA)3-4-GG-(TAGA)3-TC-(GATA)3	17-18	
	(TAGA)8-11-CA-(GATA)1-GAT-(GATA)4-GG-(TAGA)3-TC-(GATA)3	19-22	
DXS6803	(TCTA)10-14	10-14	Edelmann et al., 2003 Forensic Sci. Int. 136 (1- 3): 73-75.
	(TCTA)11-13-(TCA)-(TCTA)1	12.3-14.3	
DXS9898	(TATC)2-(ATC)-(TATC)8-13	10- 15	Hering et al., 2000 J. Forensic Sci. 45 (4): 929- 931
	(TATC)2-(ATC)-(TATC)-(ATC)-(TATC)5	8.3	

DXS6801	(ATCT)6-12-N7-(ATCT)2	8-14	Edelmann et al., 2005 Forensic Sci Int. 148 (2-3): 219- 220
DXS6809	(CTAT)7(ATCT)3-N9-(TATC)3 (ATCT)3 -N10-(ATCT)11-13	27-29	Edelmann et al., 2003 Int. J. Legal. Med. 117 (4): 241- 244
	(CTAT)8-9(ATCT)3-N9-(TATC)3 (ATCT)5 -N10-(ATCT)11	30-31	
	(CTAT)8-9(ATCT)3-N9-(TATC)3 (ATCT)5 -N10-(ATCT)13	32-33	
	(CTAT)9(ATCT)3-N9-(TATC)3 (ATCT)5 -N10-(ATCT)14-17	34-37	
DXS6809	(CTAT)10(ATCT)3-N9-(TATC)3 (ATCT)5 -N10-(ATCT)17	38	Edelmann et al., 2003 Int. J. Legal. Med. 117 (4): 241- 244
DXS6789	(TATG) ₈ (TATC) ₆	14	Hering et al., 2001 Forensic Sci. Int. 119 (1): 42- 46
	(TATG)9-11 (TATC)6	15-17	
	(TATC) (TATG) ₇ (TATC) ₉	17v	
	(TATC) (TATG)10(TATC)7	18	
	(TATC) (TATG)9(TATC)9	19	
	(TATC) (TATG)10(TATC)9-13	20-24	
DXS6799	(TATC)8-14	8-14	Yu et al., 2005 Forensic Sci. Int. 153 (2-3): 269- 271
DXS7424	(TAA)9-18	9-18	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2): 99- 103.
DXS101	(CTT)6-(ATT)9	15	Edelmann et al., 2001 Int. J. Legal Med. 114 (4-5): 301- 304
	(CTT)6-(ATT)10	16	
	(CTT)8-(ATT)10	18	
	(CTT)17-(ATT)4	21	
	(CTT)16-(ATT)6	22	
	(CTT)15-(ATT)7	23	
	(CTT)15-(ATT)9	24	
	(CTT)13-(ATT)12	25	
	(CTT)14-(ATT)12	26	
	(CTT)17-(ATT)11	28	
DXS7133	(ATAG)7-14	7-14	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2): 99- 103
GATA172D 05	(TAGA)5-12	5-12	Edelmann et al., 2003 Forensic Sci. Int. 136 (1-3): 73-75
DXS7130	(TCTA)10-14	10-14	Edelmann et al., 2003 Forensic Sci. Int. 136 (1-3): 73-75
	(TCTA)11-13(CTA)-(TCTA)1	12.3-14.3	
GATA165B 12	(AGAT)8-14	8- 14	Shin et al., 2005 Forensic Sci. Int. 147 (1): 35-41
HPRTB	(TCTA)n	9-17	Mertens et al., 1999 Int. J. Legal Med. 112 (3): 192- 194
DXS10101	AAAAAGAA [AAAG]9 AA		Becker et al., 2008 Forensic
	A [GAAA]4 AAGA [AAAG]5		

	[AAAG]3 GAAAGAAG [GAAA]3	24.2	Sci. Int. Genet. 2 (1) 69- 74.
GATA31E08	(AGAT)8-12	8-12	Shin et al., 2005 Forensic Sci. Int. 147 (1): 35-41
DXS9908 (DXS7127)	[TATC]N13-[TATC TA]3-[TATC]-TG[TATC]-CA-[TATC]10-15-ATC-[TATC]-TCTC[TATC]-[TA]5-6	18-23	Edelmann et al., 2006 Int. Congr. Ser. 1288: 298 – 300
	[TA-TATC]4-5-TG-[TATC]1-CA-[TATC]10-11-[ATAC]2-C-[TCTA]2-[TA]4-5	23-27.2	
DXS8377	(AGA)19-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	38	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2): 99- 103
	(AGA)22-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	41	
	(AGA)21-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6, (AGA)23-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	42	
	(AGA)22-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6	43	
	(AGA)25-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	44	
	(AGA)24-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6	45	
	(AGA)26-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	45	
	(AGA)25-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6	46	
	(AGA)26-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6,(AGA)28-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	47	
	(AGA)27-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6, (AGA)25-(GGA-AGA)7-(AGA)2-GGA-(AGA)6	48	
	(AGA)28-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6,(AGA)30-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	49	
	(AGA)29-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6	50	
	(AGA)28-(GGA-AGA)7-(AGA)2-GGA-(AGA)6, (AGA)30-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6, (AGA)32-(GGA-AGA)5-(AGA)2-GGA-(AGA)6	51	
(AGA)31-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6	52		
(AGA)32-(GGA-AGA)6-(AGA)2-GGA-(AGA)6	53		
DXS10146	(TTCC)3 (CTTT)11-19	24-32	Edelmann et al., 2008 Forensic Sci. Int. Genet. 2(1): 41- 46.
	(TTCC)3 (CTTT)15-16 CT (CTTT)4	32.3, 33.2	
	(TTCC)6 (CTTT)18	34	
	(TTCC)13 (CTTT)6 TT (CTTT)10	39.2	
	(TTCC)12 (CTTT)7 TT (CTTT)11-12	40.2, 41.2	
	(TTCC)11-12 (CTTT)9 TT (CTTT)12	42.2, 43.2	
	(TTCC)12 (CTTT)10 TT (CTTT)12	44.2	
	(TTCC)13 (CTTT)11 TT (CTTT)11	45.2	
DXS10134	[(GAAA)4-AAA]1 (GAAA) 12-17	32-37	
	[(GAAA)4-AAA]1 (GAAA)17 + 2 bp	37.2	
	[(GAAA)4-AAA]1 (GAAA)18-19	38-39	
	[(GAAA)4-AAA]2 (GAAA)15-20	39.3-44.3	
DXS10147	(AAAC)6-10	6-10	
DXS7423	(TCCA)3TCTGTCCT(TCCA)9-15	12-18	Edelmann et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129 (2): 99- 103
DXS10011	GAAA GA (GAAA)6 GAGA (GAAA)12 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	29.2	Watanabe et al., 2000 Int. J. Legal Med. 113 (4): 249- 250
	(GAAA)21-31 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	30-40	
	GAAA GA (GAAA)6 GAGA (GAAA)13-16 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	30.2-33.2	
	GAAA GA (GAAA)7 GAGA (GAAA)14-15 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	32.2*- 33.2*	
	GAAA GA (GAAA)7 GAGA (GAAA)16 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	34.2	
	GAAA GA (GAAA)8 GAGA (GAAA)15 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	34.2*	
	GAAA GA (GAAA)6 GAGA (GAAA)18-19 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	35.2-36.2	
(GAAA)33 (GGAA)5 (AGAA)2	40*		

	(GAAA)32-34 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	41-43	
	(GAAA)31 GAA (GAAA)3 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	43.3	
	(GAAA)35 - 41 GAAG GAAA (GGAA)4 (AGAA)3	44-50	

Tabla 2. Principales reacciones multiplex para el análisis de loci del cromosoma X. Las reacciones señaladas en sombreado gris corresponden a aquellas explotadas comercialmente.

AÑO	Nº STR	MARCADORES DEL MULTIPLEX	REFERENCIA
2002	2	DXS7423, DXS8377	Zarrabeitia et al., 2002 Int. J. Legal Med. 116: 368- 371
2002	5	HPRTB, DXS101, ARA, DXS7423, DXS8377	Zarrabeitia et al., 2002 Forensic Sci. Int. 129: 85-89
2003	4	Mentype Argus X-UL kit (DXS7132, DXS7423, DXS8378, HPRTB)	*
2003	3	DXS6800, DXS101, DXS8377	Wiegand et al., 2003 Int. J. Legal Med. 117: 62-65
2003	4	DXS101, DXS8377, HPRTB, STRX	Athanasiadou et al., 2003 Int. Congr. Ser. 1239: 311- 314
2004	4	GATA172D05, HPRTB, DXS8377, DXS101	Shin et al. ,2004 Int. J. Legal Med. 118 (2004) 37- 40
2005	7	DXS6789, HUMARA, DXS10011, DXS7423, HPRTB, DXS6807, DXS101	Bini et al., 2005 Forensic Sci. Int. 153 (2-3): 231-236.
2005	3	DXS6801, DXS6809, DXS6789	Szibor et al., 2005 Int. J. Legal Med. 119: 363- 369
2005	2 de 5	DXS9898, DXS6807, HPRTB, DXS101, ARA; DXS7133, DXS10011, DXS7424, DXS8377, DXS8378	Poetsch et al., 2005 Forensic Sci. Int. 155: 71- 76
2006	3	DXS10079, DXS10074, DXS10075	Hering et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120: 337- 345
2006	2 de 3	DXS7130, DXS7132, DXS6789; DXS9895, DXS9898, GATA172D05	Zarrabeitia et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120: 147- 150
2006	3	DXS10076, DXS10077, DXS10078	Augustin et al., 2006 Int. Congr. Ser. 1288: 277- 279
2006	2 de 3	DXS10079, DXS10074, DXS10075; DXS7132, HumARA, DXS981	Hering et al., 2006 Int. Congr. Ser. 1288: 289-291
2006	2 de 4	DXS10011, DXS9898, DXS8377, HPRTB DXS7132, DXS6797, GATA172D05, DXS6807	Asamura et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120: 303- 309
2006	2 de 6	DXS6789, DXS6809, GATA172D05, DXS101, DXS8378, DXS8377; DXS7132, DXS6800, DXS6801, DXS7424, HPRTB, DXS10011	Robino et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120: 315- 318
2006	5	DXS9905, DXS8076, DXS8114, DXS1002, DXS1050	Pereira et al., 2006 Genet. 126: 243- 250
2007	12	DXS7132, DXS8378, DXS6809, DXS7133, DXS6789, DXS7424, GAT172D05, HPRTB, DXS7423, GATA31E08, DXS101, DXS6807	Turrina et al., 2007 Forensic Sci. Int. Genet. 1: 201-204
2008	5	DXS6789, DXS6800, DXS101, HPRTB, DXS8377	Tabbada et al., 2008 Forensic Sci. Int. 154: 173- 180
2008	8	Mentype Argus X-8 (DXS10135, DXS8378, DXS7132, DXS10074, HPRTB, DXS10101, DXS10134, DXS7423)	Becker et al., 2008 Forensic Sci. Int. Genet. 2: 69-74
2008	5	DXS7132, DXS981, DXS6803, DXS6809, DXS6789	Liu et al., 2008 Int. J. Legal Med. 122: 261- 265
2008	10	Decaplex (DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809,	Gusmão et al., 2009 Int. J.

		DXS7132, DXS9902, DXS6789)	Legal Med. 123 (3): 227- 234
2008	5	DXS8378, DXS6800, DXS101, HPRTB, DXS8377	Fracasso et al., 2005 Int. J. Legal Med. 122: 353- 356
2008	3	DXS10146, DXS10134, DXS10147	Edelmann et al., 2008 Forensic Sci. Int. Genet. 2: 41- 46
2008	1 de 5 1 de 3	DXS6789, DXS7423, DXS6807, DXS101, DXS8377 DXS10074, DXS10075, DXS10079	Masseti et al., 2008 Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1: 157- 159
2009	6	DXS8378, DXS6807, DXS7424, DXS7133, DXS8377, DXS7423	Aquino et al., 2009 Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 2: 45-46.
2009	4	DXS9902, DXS6800, DXS6799, DXS7132	Liu et al., 2009 Legal Med. 11: 248- 250
2010	6	DXS10161, DXS10159, DXS10162, DXS10163, DXS10164, DXS10165	Edelmann et al., 2010 Int. J. Legal Med. 124: 83-87.
2010	5	DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424, DXS101	Ferreira da Silva et al., 2010 Forensic Sci. Int. Genet. 4: e95- e100
2010	7	DXS1010101, DXS10102, DXS10103, DXS10104, DXS10105, DXS10106, DXS10107	Rodig et al., 2010 Forensic Sci. Int. Genet. 4(3): 194- 199
2010	4	DXS10079, DXS10103, DXS10146, DXS10148	Sim et al., 2010 Mol. Biol. Rep. 37: 337- 337.
2011	12	Argus X-12 PCR Amplification Kit (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, HPRTB)	Tomas et al. 2012 Int. J. Legal Med. 126: 121-128
2012	6	DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6789, DXS6809	Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1): 192-195

*Mentype Argus X-UL kit. User's manual. Biotype (2004).

Problema del análisis de ADN degradado.

Uno de los principales inconvenientes de las reacciones desarrolladas hasta la fecha es el limitado número de STRs que se pueden analizar a partir de extractos de ADN altamente degradados, lo que disminuye su rendimiento tanto en diagnóstico de parentesco como en la resolución de identificaciones.

La degradación del ADN se caracteriza por una fragmentación general del material genético, donde los fragmentos de ADN pueden rondar los 240 pb precisando estas reacciones fragmentos de mayor tamaño (**tabla 2**), para el análisis de todos los loci STRs que incluyen los kits comerciales. El ADN altamente degradado es una característica de la mayoría de las muestras que se analizan en los laboratorios de genética criminalística, en diagnósticos de parentesco y también de aquellas obtenidas a partir de muestras biológicas contenidas en parafina en los centros sanitarios. En estos casos se produce la ausencia de resultados o

incluso la obtención de resultados erróneos, con las graves repercusiones judiciales y/o personales que ello puede conllevar.

5 Con el fin de corregir este inconveniente se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar reacciones que posibiliten la obtención de perfiles genéticos suficientemente discriminativos a partir de extractos de ADN altamente degradado (Lygo et al., 1994 *Int. J. Legal Med.* 107:77-89; Whitaker et al., 1995 *BioTechniques* 18(4):670-677).

10 En este contexto han surgido numerosas solicitudes de patentes, relacionadas con la obtención de perfiles genéticos mediante el análisis simultáneo de varios loci STRs (US6090558, US6479235, ES2273367, US6479235, US2003/0186272). Sin embargo, hasta la fecha la mayoría de estas iniciativas se han limitado al análisis de STR localizados en los cromosomas autosómicos, habiéndose desarrollado un número netamente inferior de reacciones que permitan analizar STRs del cromosoma X a partir de extractos de ADN altamente degradados.

15 Concretamente, en lo referente a loci del cromosoma X cabe destacar las dos reacciones multiplex desarrolladas por Asamura et al., 2006 *Int. J. Legal Med.* 120:174-181 (tabla 3 Reacciones a y b). La primera de estas reacciones ha sido específicamente diseñada para analizar los loci DXS7423, GATA31E08, DXS6789 y DXS101, a partir de fragmentos que superen las 169 pb pares de bases. Mientras que la segunda reacción permite el análisis de los

20 loci DXS7133, DXS7424, GATA165B12 y DXS8378, incluso a partir de fragmentos que superen las 111pb.

Así mismo, las dos reacciones desarrolladas por Diegoli et Coble., 2010 *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(5)415- 421 (tabla 3 reacciones c y d), permiten por un lado el análisis de los loci

25 GATA165B12, DXS7130, GATA31E08, DXS6789, DXS101, DXS7424 y DXS9902; y por otro, de los loci DXS7423, DXS6795, DXS8378, DXS6803 y GATA172D05, HPRTB, DXS7132, DXS10147, DXS9902, ambas a partir de fragmentos de ADN superiores a 191 pb en tamaño. Asimismo en la tabla 4 se observa un estudio comparativo de los tamaños en pares de bases de los amplicones correspondientes a loci miniSTRs del cromosoma X en las

30 principales reacciones multiplex del estado de la técnica. Los miniSTRs son los productos resultantes del rediseño de cebadores, los cuales se unen a regiones lo más cercanas posible a la estructura del STR, con el propósito de obtener amplicones de reducido tamaño. Se incluye también los tamaños correspondientes a la reacción decaplex desarrollada por Gusmão et. al.,

2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227- 234 ya que si bien no incluye únicamente miniSTRs, posibilita el análisis de los loci STRs DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA172D05, DXS7423, DXS7132 y DXS9902, a partir de fragmentos de un tamaño superior a las 213 pb.

5 Tabla 3. Reacciones multiplex expresamente diseñadas para el análisis de loci del cromosoma X en formato miniSTR.

AÑO	MARCADOR MINIPLEX	MULTIPL EX	RANGO DE ALELOS	RANGO TAMAÑOS AMPLICON	REFERENCIA
2006	DXS7423	A	12-16	99-115	[1] (incluye las reacciones a y b).
	GATA31E08		7-15	101-133	
	DXS6789		14-24	122-162	
	DXS101		21-30	142-169	
	DXS7133	B	6-12	76-100	
	DXS7424		11-18	79-100	
	GATA165B12		8- 13	90-110	
	DXS8378		9-13	95-111	
2011	GATA165B12	C	8-13	92-112	[2] (incluye las reacciones C y D).
	DXS7130		9-14, 16, 13.3-18.3	93-136	
	GATA31E08		7-16	95-131	
	DXS6789		14-25	124-168	
	DXS101		14- 31, 33	126- 177	
	DXS7424		9- 20	146- 185	
	DXS9902		7-14, 10.1-12.1	167-191	
	DXS7423	D	8, 12-17	85- 125	
	DXS6795		6, 8-17	90- 111	
	DXS8378		8- 15	94- 118	
	DXS6803		7-14, 16, 10.3-14.3	102- 130	
	GATA172D05		6- 13	122-150	
	HPRTB		7- 16	148- 176	
	DXS7132		10- 18, 16.3	149- 177	
	DXS10147		5-11	165- 185	
	DXS9902		7- 14, 10.1-12.1	167- 191	

10 Tabla 4 Relación de los principales loci miniSTRs del estado de la técnica. Se detalla el tamaño en pares de bases de cada amplicón al ser analizado por las principales reacciones multiplex.

LOCUS	ESTRUCTURA	RANGO ALELOS	TAMAÑO Asamura et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120:174- 181	TAMAÑO Diegoli et al., 2011 Forensic Sci. Int. Genet. 5(5)415- 421	TAMAÑO Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227- 234
DXS7423	(TCCA)3 TCTGTCCT (TCCA)9-15	8,12-18	83-123	85-125	159-199
GATA31E08	(AGAT)7-16	7-16	101-137	95-131	224-260
DXS6789	(TATG) ₈ (TATC) ₆		122-166	124-168	249-293
	(TATG)9-11 (TATC)6				

	(TATC) (TATG) ₇ (TATC) ₉	14-25			
	(TATC) (TATG) ₁₀ (TATC) ₇				
	(TATC) (TATG) ₉ (TATC) ₉				
	(TATC) (TATG) ₁₀ (TATC) ₉₋₁₃				
	(TATC) (TATG) ₁₁ (TATC) ₁₃				
DXS101	(CTT) ₆ -(ATT) ₉₋₁₀	14, 31-33	121-172	126- 177	
	(CTT) ₈ -(ATT) ₁₀				
	(CTT) ₁₇ -(ATT) ₄				
	(CTT) ₁₆ -(ATT) ₆				
	(CTT) ₁₅ -(ATT) ₇				
	(CTT) ₁₅ -(ATT) ₉				
	(CTT) ₁₃ -(ATT) ₁₂				
	(CTT) ₁₄ -(ATT) ₁₂				
	(CTT) ₁₇ -(ATT) ₁₁				
	(CTT) ₁₉ -(ATT) ₁₁				
DXS7133	(ATAG) ₆₋₁₄	6-14	76-108		181-213
DXS7424	(TAA) ₉₋₂₀	9-20	73-112	146- 185	
GATA165B1 2	(AGAT) ₈₋₁₃	8- 13	90-110	92-112	
DXS8378	(CTAT) ₈₋₁₅	8-15	91-119	94-122	106-134
DXS7130	(TCTA) _{9-14,16}	9-14, 16, 13.3- 18.3		93-136	
	(TCTA) ₁₁₋₁₇ (CTA)-(TCTA) ₁				
DXS9902	(TAGA) ₇₋₁₄ ; (TAGA) ₉₋₁₆	7-14; 10-16		167-191	178-202
DXS6795	(AAT) _n	6, 8-17		90-111	
DXS6803	(TCTA) ₇₋₁₄	7-14, 16, 10.3- 14.3		102- 130	
	(TCTA) ₉₋₁₃ (TCA)-(TCTA) ₁				
GATA172D0 5	(TAGA) ₅₋₁₃	5- 13		118-150	104-136
HPRTB	(TCTA) _n	7- 16		148- 176	
DXS7132	(TCTA) ₁₀₋₁₈	10-18		149- 181	120-152
DXS10147	(AAAC) ₅₋₁₁	5-11		165- 185	
DXS9898	(TATC) ₂ -(ATC)-(TATC) ₈₋₁₃	10-15			151.9-177
	(TATC) ₂ -(ATC)-(TATC)- (ATC)-(TATC) ₅	8.3			

Así pues, no existen en la actualidad reacciones multiplex que proporcionen la posibilidad de analizar la totalidad de los loci del cromosoma X descritos hasta la fecha a partir de extractos de ADN que no superen las 150-200 pb, tamaño habitualmente considerado para loci miniSTRs, ni tampoco las 240 pb, tamaño característico en el ADN altamente degradado al ser el correspondiente a una unidad nucleosómica.

Por lo tanto, a pesar de los hitos detallados anteriormente, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar métodos para obtener perfiles genéticos, alternativos a los ya existentes, que superen los inconvenientes antes citados y que permitan obtener perfiles genéticos fiables de loci localizados en el cromosoma X, incluso a partir de extractos de ADN altamente degradados.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En la actualidad existen numerosas empresas que comercializan kits para la elaboración de perfiles genéticos, pero ninguno de ellos, ni su combinación, permite analizar los loci STRs del cromosoma X a partir de fragmentos de ADN de 240 pb. Para solventar este problema los inventores han diseñado unas parejas de cebadores dirigidas a amplificar los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079 a partir de fragmentos de ADN que superen las 220 pb. Además proporciona la característica técnica adicional de que, si se desea, pueden emplearse simultáneamente en combinaciones de 4 o más parejas de cebadores en una reacción de amplificación multiplex para obtener un perfil genético compuesto de hasta 8 loci STRs. Esta característica de las parejas de cebadores diseñadas en la invención permite su empleo en casos de determinación de parentesco en los que las muestras de uno de los progenitores no están disponibles para el análisis, aún cuando las muestras disponibles presenten un grado elevado de degradación.

Así, un aspecto principal de la invención se relaciona con un método para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis, en un extracto de ADN procedente de dicho individuo, mediante una reacción de amplificación multiplex, de al menos 4 loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079 en donde

- a) al menos uno de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809; y
- b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

Por otro lado, la invención proporciona un kit que comprende parejas de cebadores específicas para amplificar al menos 4 loci STRs seleccionados del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, en donde

- a) al menos 1 de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809; y
- b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079

Asimismo, la invención se relaciona con un conjunto de parejas de cebadores que comprende, al menos, 4 parejas de cebadores dirigidas a amplificar 4 loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079 en donde

- 5 a) al menos uno de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809; y
- b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

Por otra parte se contempla el uso del conjunto de parejas de cebadores de la invención para 10 obtener el perfil genético de un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos,

Finalmente, en otro aspecto, la invención se relaciona con una pareja de cebadores seleccionada del grupo que consiste en las siguientes parejas de oligonucleótidos

- 15 - SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
 20 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
 - SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus DXS10075, y
 - SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La **Figura 1** corresponde a un gráfico llamado electroferograma que muestra el perfil genético de un individuo para los STRs analizados mediante el conjunto de cebadores de la invención empleando un analizador automático de secuencias *AB310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®)*. En la Figura se pueden observar 4 paneles, cada uno correspondiente a 30 aquellas parejas de cebadores marcadas con el mismo locus fluorescente. En cada panel se muestra la intensidad de la señal detectada en Relative Fluorescence Units (RFU, unidad relativa de fluorescencia.) en el eje Y; el eje X corresponde al tamaño en pares de bases. Así,

el primer panel corresponde a los resultados obtenidos para los productos de STRs amplificados con cebadores marcados con 6-FAMTM (dirigidos a los loci DXS6799 y DXS10074, el segundo panel a los marcados con VICTM (DXS7132 y DXS6801), el tercero a NEDTM (loci DXS6789 y DXS6809) y en el cuarto panel se muestran los resultados para los loci STRs marcados con el fluorocromo PET[®] (DXS10075 y DXS10079). Las barras situadas en la parte superior de cada panel corresponden al nombre de los loci. Los rectángulos situados bajos los picos del electroferograma muestran el nombre del alelo, indicado por un número.

10 La **Figura 2** es una representación gráfica que muestra el diseño del conjunto de parejas de cebadores denominada miniX. Las cajas representan los tamaños de amplificado para cada locus. Los loci marcados con diferente color se presentan en diferentes escalas de grises. Los respectivos marcajes se señalan en la parte derecha de la figura.

15 La **Figura 3** es una comparación del rendimiento obtenido mediante miniX y Decaplex, en el análisis de los loci compartidos por ambas reacciones, a partir de 24 muestras de parafina.

La **Figura 4** es una comparación del rendimiento obtenido mediante miniX y Sextaplex, en el análisis de los loci compartidos por ambas reacciones, a partir de 24 muestras de parafina.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la actualidad existen numerosas empresas que comercializan kits para la elaboración de perfiles genéticos, pero ninguno de ellos, ni su combinación permite analizar los loci STRs del cromosoma X hasta la fecha a partir de fragmentos de ADN de 240 pb. Para solventar este problema los inventores han diseñado unas parejas de cebadores dirigidas a amplificar los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079 a partir de fragmentos de ADN que superen las 220 pb, con la característica técnica adicional de que, si se desea, pueden emplearse simultáneamente en combinaciones de 4 o más parejas de cebadores en una reacción de amplificación multiplex para obtener un perfil genético compuesto de hasta 8 loci STRs.

Dicha característica permite la aplicación de esta invención en la resolución de casos de paternidad complejos a partir de muestras de ADN altamente degradadas con mayor eficacia que los kits comerciales desarrollados hasta la fecha para el análisis de los loci del cromosoma X mencionados.

5

Así, en base a estas parejas de cebadores, se han desarrollado los distintos aspectos inventivos que forman parte de la presente invención y que serán descritos en detalle a continuación. Previamente a la descripción de dichos aspectos inventivos, se incluye un listado de definiciones donde se explica el significado de los términos empleados en el contexto de la presente invención para ayudar en la comprensión de la misma.

10

Definiciones

Perfil Genético

En el contexto de la presente invención, los términos “perfil genético” y “huella genética” tienen el mismo significado por lo que pueden emplearse indistintamente a lo largo de la descripción. El “perfil genético” es un conjunto de secuencias de bases características del material genético que permiten diferenciar a un individuo de otro.

Loci STRs

En la presente invención, el perfil genético se obtiene a partir del análisis de secuencias de bases cortas repetidas en tandem o STRs (del inglés *Short Tandem Repeats*) que se caracterizan por su alta variabilidad entre individuos. Así, en la presente invención se entiende por “secuencias STRs” o “loci STRs” aquellas secuencias del ADN, también llamadas microsátélites, que contienen repeticiones de 4 pb (Butler JM, Biotechniques. 2007).

25

El análisis de los loci STRs en el genoma presenta múltiples aplicaciones que incluyen, aunque no se limitan a, obtención de perfiles genéticos, diagnósticos de parentesco, determinación del origen de una muestra o tejido, identificación de cadáveres, estudios de genética de poblaciones, pruebas de zigosidad en mellizos, seguimiento de transplantes de médula ósea, evaluación de la trazabilidad de muestras biológicas de origen humano, identificación de mezclas presentes en una muestra y determinación del número de contribuyentes de origen humano a una mezcla y su aportación relativa a la mezcla.

30

PCR

PCR corresponde a las siglas de reacción en cadena de la polimerasa mediante la cual se pueden obtener millones de copias de las regiones de ADN deseadas. Se caracteriza por el empleo de parejas de cebadores que acotan la región de la que se realizarán millones de copias, lo que también se conoce como “amplificar ADN” durante la PCR. La PCR está compuesta por un número determinado de ciclos, compuestos a su vez por tres fases en las que las hebras de ADN se separan, se unen los cebadores y se elongan las nuevas hebras de ADN. En cada ciclo, si la eficiencia de la reacción es del 100% se produce un crecimiento exponencial de los fragmentos de ADN objeto de la amplificación.

Reacción de amplificación multiplex

En la presente invención se entiende por “Reacción de amplificación multiplex” a la reacción PCR en la cual se amplifica más de una secuencia de ADN en una misma reacción, mediante el empleo de dos o más parejas de cebadores en único tubo junto con el resto de los reactivos de la reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples secuencias de ADN.

Oligonucleótido

El término “oligonucleótido” hace referencia a la secuencia de bases de nucleótidos unidos por enlaces fosfo-diéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

Cebador

En la presente invención se entiende por “cebador” o “primer” u “oligonucleótido” (“oligo”) a la secuencia de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN. Los cebadores son secuencias nucleotídicas cortas, aproximadamente de 15-24 nucleótidos de longitud que se pueden alinear con una hebra de ADN diana gracias a la complementariedad de bases para formar un híbrido entre el cebador y la hebra diana de ADN. Después, el enzima ADN polimerasa puede extender el cebador a lo largo de la hebra diana de ADN. Los métodos para preparar y usar cebadores se describen, por ejemplo en Sambrook et al., 2001 y Ausubel et al., 1999.

Pareja de cebadores

En el contexto de la presente invención se entiende por “pareja de cebadores” o “primer pair”, al conjunto de dos cebadores que, empleados en una misma reacción de amplificación o PCR, permiten obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN. Cada uno de los cebadores hibrida con la secuencia diana, de manera que se amplifica la secuencia de nucleótidos acotada mediante cada pareja de cebadores. La extensión de los cebadores durante los ciclos de PCR determina la multiplicación exponencial 2^N de la secuencia de nucleótidos acotada por los cebadores, siendo N el número de ciclos de la reacción PCR.

Muestra biológica

10 En el contexto de la presente invención, se entiende por “muestra biológica” cualquier materia que contenga un ácido nucleico, por ejemplo, ADN. En la presente invención se entiende por “ADN” o “ADN genómico” al material genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células.

15 *Extracto de ADN*

En el contexto de la presente invención se entiende “extracto de ADN”, cuando tras someter la muestra biológica a un procedimiento de extracción, separación, purificación o clonación de ADN, entre otros, se obtiene como resultado ya sea en seco, en solución, unido o no a otras moléculas, adherido o no a diversas sustancias o lechos, materia en la que el ADN se encuentra en mayor proporción relativa respecto al resto de moléculas presentes, en comparación con la muestra biológica de partida.

Así “extracto de ADN” se refiere al ADN extraído de cualquier muestra biológica que contenga ADN humano, ya sea procedente de un individuo vivo o muerto, feto, órganos, tejidos ó células.

Individuo

El término “individuo” se refiere a ser humano de cualquier edad o raza, que en el contexto de la presente invención puede estar viva o muerta.

30

Cebadores de la invención

Los inventores han diseñado unas parejas de cebadores, de aquí en adelante, “parejas de cebadores de la invención” o “miniX”, que permite obtener el perfil genético de los loci STRs (DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079) de un individuo, incluso a partir de muestras de ADN altamente degradadas, y es aplicable incluso al análisis de parentesco complejo.

Así, MiniX se caracteriza por permitir analizar un alto número de loci STR mediante amplificadores de reducido tamaño. De modo que, ha sido específicamente diseñada para posibilitar la amplificación de 8 loci STRs, a partir de fragmentos de ADN que superen las 220 pb. Destaca por ser el único sistema disponible en la actualidad que permite analizar la totalidad de los loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, en una única reacción multiplex. Además, incluye amplificadores de menor tamaño que los disponibles en el estado de la técnica en 6 de los 8 loci STRs incluidos. La excepción la constituyen el locus DXS10074 y el DXS6801 que dan lugar a amplificadores 27 y 37 pb mayores que los obtenidos mediante las reacciones desarrolladas por Becker et. al., 2008 *Forensic. Sci. Int. Genet.* 2(1): 69-74 y Castañeda et al., 2012 *J. Forensic Sci.* 57(1):192-195, respectivamente (Tabla 10).

Las parejas de cebadores han sido diseñadas de manera que su aplicación permite obtener el perfil genético de un individuo que comprende la combinación de al menos 4 hasta 8 loci STR. Además, la parejas de cebadores diseñadas presentan la característica técnica adicional de que, si se desea, pueden emplearse simultáneamente en combinaciones de 4 o hasta 8 parejas de cebadores en una reacción de amplificación multiplex para obtener un perfil genético compuesto de 4 o más loci STRs hasta un total de 8 loci STRs cuyo análisis de elevado interés en Genética Forense y de Genética de Poblaciones, sin estar limitado dicho interés a estas áreas.

Los loci STRs analizados en la presente invención así como las parejas de cebadores diseñadas para su identificación se muestran en la Tabla 5. En esta misma tabla se detalla del alelo menor al mayor del STR que será considerado mediante este análisis (columna: alelos) así como el tamaño máximo y mínimo posible para cada STR. En el Ejemplo 1 se detalla el procedimiento seguido en el diseño del conjunto de parejas de cebadores de la invención.

Tal como se muestra en el Ejemplo 1, el diseño de las parejas de cebadores de la presente invención se llevó a cabo mediante una búsqueda de las secuencias flanqueantes a cada locus STR. Posteriormente se empleó el programa Perlprimer. Una vez obtenidas las parejas de cebadores, se procedió a realizar una reacción de amplificación de la polimerasa sobre un extracto de ADN empleando dichas parejas de cebadores tras lo cual, se obtuvo el perfil genético del individuo al que pertenecía el extracto de ADN con fiabilidad, precisión y con un poder de discriminación superior a los perfiles genéticos obtenidos por otros métodos a partir de muestras de ADN altamente degradadas, tal y como se ilustra en el ejemplo 2.

10 **Tabla 5.** Resumen de las secuencia de los cebadores en dirección 5' a 3' diseñados para la amplificación de cada STR en la combinación denominada como miniX (columna: secuencia 5'- 3'). La variación (rs945048 A/T) de la secuencia de los cebadores degenerados (*degenerate primers*) aparece subrayado y la base G añadida a la secuencia aparece en negrita para el locus DXS10075.

LOCUS	ALELOS	Tamaño de los amplificados (pb)	SEQ ID NO:	SECUENCIA(5-3')
DXS6799	8-14	101-125	1	ACTAGCAA A CTGAATTTAGTAATGT G
			2	TA A CTACTTGCACATGGGATG
DXS10074	7-21	137-193	3	TACATGGACTT C CTACTGC
			4	ATACTGAATATAAGCTGATTTGTTC TA
DXS6789	14-25	106-150	5	AAGTTGGTACTTAATAAAC C CTC
			6	AGA A CCAATAGGAGATAGATGG
DXS6809	27-38	175-219	7	CATGACTAGATTATGTAGGAATTT GG
			8	TGTGAGGAAGAGATAGAGGA
DXS7132	11-17	106-130	9	CCCTCTCATCTATCTGACTG
			10	CTCTATTAGTCAACGTTCTCC
DXS6801	8-14	150-174	11	CATAATCACATGAGT C ATTTCT
			12	ATCTGTATTAGTTATGAGTTTCCAG
DXS10075	12-21.3	101-140	13	AG T TATTGCAGAGAAGAATCATAT C
			14	AG A TATTGCAGAGAAGAATCATAT C
			15	G ACTACCTCTGCTCCCTT
DXS10079	14-25	147-191	16	GTGACCAAGTGAGACCAA
			17	TTGTTGAGAACTTTTGCATCA

15 Así, un aspecto principal de la invención se relaciona con un conjunto de parejas de cebadores, de aquí en adelante “conjunto de parejas de cebadores de la invención”, que comprende, al menos, 4 parejas de cebadores dirigidas a amplificar 4 loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801,
20 DXS10075 y DXS10079, en donde

- a) al menos uno de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809; y
- b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.
- 5 En una realización particular, el conjunto de parejas de cebadores de la invención comprende, al menos 5, 6, 7 u 8 parejas de cebadores específicas para los loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.
- 10 De forma particular, las parejas de cebadores se seleccionan del grupo que consiste en las siguientes parejas de oligonucleótidos:
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
 - 15 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
 - SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus DXS10075, y
 - 20 - SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pareja de cebadores seleccionada del grupo que consiste en las siguientes parejas de oligonucleótidos:

- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
- 25 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
- 30 - SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO 15 para el locus DXS10075, y
- SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

Uso de los cebadores de la invención

Los diferentes usos que tienen los cebadores de la invención, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

5

Así, los usos del conjunto de parejas de cebadores de la invención incluyen, sin limitarse a, la obtención de perfiles genéticos, diagnósticos de parentesco, determinación del origen de una muestra o tejido, identificación de cadáveres, estudios de genética de poblaciones, pruebas de zigosis en mellizos, seguimiento de trasplantes de médula ósea, evaluación de la trazabilidad de muestras biológicas de origen humano, identificación de mezclas presentes en una muestra, determinación del número de contribuyentes de origen humano a una mezcla y su aportación relativa a la mezcla.

Así, en otro aspecto principal de la invención se contempla el uso del conjunto de parejas de cebadores de la invención para obtener el perfil genético de un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

Método de la invención

20 Tal como se ha explicado anteriormente, la presente invención está basada en el diseño de unas parejas de cebadores que permiten obtener el perfil genético de un individuo basado en una combinación de al menos 4 STRs.

Así, otro aspecto principal de la invención se relaciona con un método, de aquí en adelante “método de la invención”, para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis, en un extracto de ADN procedente de dicho individuo, mediante una reacción de amplificación multiplex, de al menos 4 loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, en donde

a) al menos uno de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809; y

b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

Adicionalmente, las parejas de cebadores han sido diseñadas de tal manera que es posible emplearlas en el análisis de 4 o más, hasta un total de 8 loci STRs, (DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079). Así, mediante el empleo de las parejas de cebadores de la invención, es posible obtener el perfil genético de un individuo formado por 5, 6, 7 u 8 loci de los STRs.

Por lo tanto, en una realización particular del método de la invención, el conjunto de parejas de cebadores dirigido a obtener el perfil genético de un individuo está dirigido al análisis de al menos 5, 6, 7 u 8 loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

En otra realización todavía más particular, la pareja de cebadores empleada en la reacción de amplificación multiplex específica para cada uno de los loci STR analizados es la pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias

15

- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
- SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus DXS10075, y
- SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

20

25 La puesta en práctica del método de la invención requiere la obtención de un extracto de ADN que procederá, en última instancia, de una muestra biológica que será tratada de forma adecuada para obtener dicho extracto de ADN.

Como entiende el experto en la materia, si el método de la invención está dirigido a obtener el perfil genético de un individuo o la relación de parentesco entre individuos, el extracto de ADN procederá del individuo cuyo perfil genético quiere obtenerse, o de los individuos cuya relación de parentesco quiere determinarse. Aunque como se ha mencionado anteriormente, la

30

presente invención está especialmente indicada para resolver aquellas relaciones de parentesco en las que las muestras biológicas de algunos de las personas implicadas no están disponibles. Sin embargo, si el método de la invención está dirigido a la identificación de restos humanos, el extracto de ADN procederá de los restos humanos que se quieren
5 identificar. En la presente invención, el término “restos humanos” incluye cualquier muestra biológica procedente de un ser humano, pudiendo estar dicho resto humano conservado en formol, congelado, desecado, fijado en parafina, en estado de descomposición, degradación y/o putrefacción, entre otros.

10 Ejemplos de muestras de las que se puede obtener ADN son, sin limitar a, fluidos biológicos (sangre, saliva, orina, esperma, etc); epidermis, caspa, pelo, heces, una muestra vaginal, una muestra de tejido, tejidos quemados, etc. Las muestras más adecuadas para la obtención de extractos de ADN útiles en la identificación de restos humanos incluyen, entre otros, pelos con raíz, hueso compacto, diente, tejidos blandos y sangre.

15

En una realización particular, el extracto de ADN procede de una muestra de sangre, pelo, saliva, epidermis, esperma, caspa, cenizas, una muestra vaginal y una muestra de tejido,

20 La obtención de la muestra biológica debe realizarse en las condiciones y con el material adecuado, tales como torundas, pinzas, etc. y cada muestra debe almacenarse independientemente en frascos o bolsas plásticas separadas y estériles, sin ningún tipo de conservante, en congelación y debidamente rotulados, evitando la contaminación por material biológico foráneo.

25 Una vez que se ha obtenido la muestra del individuo/s o del resto humano, ésta debe ser procesada para obtener el extracto de ADN. La fracción de ADN adecuada para la puesta en práctica de la invención es el ADN nuclear. La extracción del ADN puede ser llevado a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia (Sambrock *et al.*, 2001 “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,
30 N.Y., Vol. 1-3) que incluyen sin limitación, centrifugaciones en gradientes de densidad, extracción en dos fases usando fenol acuoso o cloroformo con etanol, cromatografía en columna, métodos basados en la capacidad del ADN para unirse en superficies de cristal y/o silicatos, como preparaciones de tierra diatomeas o lechos de cristal, empleando kits

comerciales, por ejemplo, los kits “Q-Biogene fast DNA kit” o el “QIAamp(R) DNA Blood Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania) el “G-Spin IIp” (Intron Biotechnology, Corea) o el “Fast Prep System Bio 101” (Qbiogene, Madrid, España) o los métodos descritos en US5.057.426, US4.923.978 y la solicitud de patente europea EP0512767A1.

5

El extracto de ADN es cuantificado y normalizado para obtener cantidades iguales de ADN en cada muestra en el caso de que la cantidad de ADN sea suficiente para ello. En el caso de muestras altamente degradadas con ADN escaso y/o degradado es habitual añadir la mayor cantidad de ADN posible en la subsiguiente reacción de PCR multiplex.

10

Tras obtener el extracto de ADN de la muestra biológica, éste es sometido, al menos, a una reacción de amplificación multiplex empleando el conjunto de parejas de cebadores de la invención. La amplificación de los diferentes loci STRs requiere condiciones y procedimientos de reacción específicos para cada una de las parejas de cebadores empleadas, las cuales pueden conseguirse mediante variación sistemática de cada parámetro. El número de ciclos y la temperatura de alineamiento empleada en la reacción de PCR deben de ser adecuados para la obtención de resultados mediante cada una de las parejas de cebadores del primer conjunto. Parámetros como la concentración de cebadores son específicos para cada cebador y se han ajustado en la validación del conjunto de cebadores. Los cebadores ofrecen resultados en un amplio rango de concentraciones, aunque las concentraciones óptimas para cada pareja de cebadores se recogen en la Tabla 6.

15

Tabla 6. Resumen de las concentraciones a las que se emplea cada uno de los cebadores y el fluorocromo con el que se ha marcado el extremo 5' del cebador directo o *forward* (en negrita) de cada pareja de cebadores en el conjunto denominado miniX.

20

LOCUS	SEQ ID NO	Intervalo Concentración de cebadores (μM)	Concentración de cebadores (μM)	Marcaje Fluorescente
DXS6799	1	0.04-0.14	0.08	6-FAM
	2			
DXS10074	3	0.30-0.40	0.32	
	4			
DXS6789	5	0.08-0.16	0.08	NED
	6			
DXS6809	7	0.26-0.60	0.60	
	8			
DXS7132	9	0.06-0.12	0.06	VIC

	10			
DXS6801	11	0.10-0.20	0.12	PET
	12			
DXS10075	13	0.08-0.60	0.16	
	14			
	15			
DXS10079	16	0.08-0.42	0.16	
	17			

Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación multiplex requiere una serie de reactivos, entre los que se incluyen, sin limitar a, el ADN molde, la enzima ADN polimerasa, al menos, dos parejas de cebadores (siendo cada cebador de cada pareja complementario a una de las dos hebras del ADN), desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 5 cloruro de magnesio (MgCl₂), buffer de reacción y aditivos opcionales, que pueden añadirse por separado mezclándose en el laboratorio o adquirir previamente mezclados, como es el caso de Multiplex PCR master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), o Kapa2GTMFast Multiplex PCR kit (Kapa Biosystems, Inc., USA), al que se le añaden las parejas de cebadores en las 10 concentraciones adecuadas y el ADN molde.

La PCR se lleva a cabo en un termociclador que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta, tales como la temperatura de hibridación o la temperatura de fusión.

15 En una realización particular del método de la invención, la temperatura de fusión de la reacción de amplificación multiplex que comprende los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 17 (Tabla 4) es desde 57 a 63°C según lo calculado mediante el programa informático Perlprimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>).

20 La amplificación multiplex del conjunto de parejas de cebadores (Tabla 6) ofrece resultados satisfactorios en un amplio rango de temperaturas de fusión, entre 57-63°C, aunque los mejores resultados se obtienen a 58 °C. De igual manera, los cebadores ofrecen resultados en un amplio rango de concentraciones, aunque las concentraciones óptimas para cada pareja de 25 cebadores se recogen en la Tabla 6. Respecto al número de ciclos empleado en la reacción de PCR se obtienen resultados satisfactorios entre 28-32 ciclos, aunque el número de ciclos óptimo es de 30 ciclos.

Opcionalmente, si se desea, previamente a la reacción de amplificación multiplex, puede llevarse a cabo el marcaje de los cebadores que participan en dicha reacción de amplificación multiplex con el fin de poder detectar posteriormente los fragmentos amplificados. El marcaje de los productos de amplificación puede realizarse por métodos convencionales. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, por ejemplo, ³³P, ¹²⁵I, etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho marcaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (locus), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, biotina (indicador), efectuándose la lectura mediante fluorimetría, etc., o bien, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima (locus), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, digoxigenina (indicador), etc., transformándose el sustrato de la enzima en un producto luminiscente o fluorescente y , efectuándose la lectura mediante quimio-luminiscencia, fluorimetría, etc.

Así, en una realización particular, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el marcaje, en uno de sus extremos, de uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores. En otra realización todavía más particular, el marcaje de los oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina. Ejemplos de materiales fluorescentes que se pueden emplear en el marcaje de oligonucleótidos incluyen, sin limitar a, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED (ABI), Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

Tras finalizar la reacción de amplificación multiplex, si se desea, se puede proceder a separar los productos de amplificación o amplicones. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para separar los productos de

amplificación. Las técnicas para separar los productos de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *ad supra*). Técnicas para separar los productos de amplificación son, por ejemplo, electroforesis sumergida con geles de Methafor, electroforesis en geles de poliacrilamida, electroforesis capilar, etc.

Seguidamente a la separación de los productos de amplificación, se procede a identificar el tamaño de los fragmentos separados, para lo cual puede emplearse cualquiera de los procedimientos de identificación de fragmentos de amplificación conocidos del estado de la técnica, tales como hibridación con sondas marcadas (por ejemplo con un fluoróforo) que serán detectadas por un detector y procesadas mediante un sistema informático, tinción, por ejemplo, con bromuro de etidio, tinción de plata, etc. Tal como entiende el experto en la materia, si todo este proceso es integrado en un sistema informático, se puede generar una gráfica denominada electroferograma donde puede identificarse el tamaño de los fragmentos amplificados.

Kit de la invención

Por otro lado, la invención se relaciona con un kit útil para la puesta en práctica del método de la invención, que comprende el conjunto de parejas de cebadores de la invención que comprende 4 o más parejas de cebadores dirigidas a amplificar los loci STRs (DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079).

Así, otro aspecto principal de la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante kit de la invención, que comprende parejas de cebadores específicas para amplificar al menos 4 loci STRs seleccionados del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, en donde

- a) al menos 1 de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789 y DXS6809; y
- b) al menos dos de los 4 loci STRs se selecciona del grupo formado por los loci DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

En una realización particular, el kit de la invención comprende al menos 5, 6, 7 u 8, parejas de cebadores específicas para los loci STRs del grupo formado por los loci DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

- 5 En otra realización todavía más particular del kit de la invención, la pareja de cebadores empleada en la reacción de amplificación multiplex específica para cada uno de los loci STR analizados es la pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
 - 10 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
 - SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus
 - 15 DXS10075, y
 - SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

Como entiende el experto en la materia, el kit de la invención además de comprender el conjunto de parejas de cebadores de la invención, puede incluir, opcionalmente, los reactivos

20 necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación multiplex, entre los que se incluyen, sin limitar a, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), iones divalentes y/o monovalentes, una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas, etc. No obstante, si el kit de la invención no comprende los reactivos necesarios para poner en práctica el método de la

25 invención, éstos están disponibles comercialmente y pueden encontrarse formando parte de un kit. Cualquier kit de los disponibles comercialmente que contenga los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, puede emplearse con éxito en la puesta en práctica del método de la invención. Tal como se muestra en los ejemplos, en el caso de la presente invención estos reactivos se encuentran previamente mezclados en el reactivo

30 Multiplex PCR master Mix (Qiagen, Hilden, Germany).

Tal como se ha descrito en párrafos anteriores, previamente a la reacción de amplificación multiplex del método de la invención, si se desea puede llevarse a cabo el marcaje de los cebadores con el fin de poder detectar posteriormente los fragmentos amplificados. De forma análoga, como entiende el experto en la materia, el kit de la invención puede comprender el primer conjunto de parejas de cebadores de la invención en donde uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores está marcado en uno de sus extremos o, alternativamente, puede comprender los reactivos necesarios para llevar a cabo el marcaje de los cebadores. Los distintos métodos que existen en el estado de la técnica para realizar el marcaje de los cebadores, así como los tipos de marcadores que se puede emplear han sido explicados previamente en la presente memoria.

Así, en una realización particular, el kit de la invención comprende, además, los reactivos necesarios para marcar las parejas de nucleótidos. En otra realización particular uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores está marcado en uno de sus extremos.

En una realización todavía más particular del kit de la invención, los marcadores empleados en el marcaje de los oligonucleótidos seleccionan del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina. En otra realización aún más particular, el material fluorescente se selecciona del grupo que consiste en 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED (ABI), Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

Tal como se ha mencionado previamente, el kit de la invención es útil en la puesta en práctica del método de invención. Por lo tanto, su empleo permitirá obtener el perfil genético de un individuo, determinar relaciones de parentesco entre individuos o identificar restos humanos.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitativos de la misma.

EJEMPLOS

En los ejemplos siguientes se realiza la validación de miniX, para su uso en identificación humana.

5 **Ejemplo 1.** En el primer ejemplo se detalla la optimización de los conjuntos de cebadores y de los parámetros de las reacciones de PCR, así como los estudios de cociente entre la altura de heterocigotos (PHR, peak height ratio), bandas tartamudas (stutter bands) y sensibilidad.

Ejemplo 2. En el segundo ejemplo, se muestra la validación del método de la invención que
10 comprende la reacción de amplificación multiplex para su uso en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas, con el objetivo de demostrar que la invención es adecuada para su uso en este tipo de muestras.

15 **EJEMPLO 1**

Validación del método de la invención que comprende una reacción de amplificación multiplex empleando los conjuntos de parejas de cebadores miniX para su uso en identificación humana

20 A continuación se describe la validación de miniX para su uso en identificación humana. Dicha validación ha consistido en ensayos de optimización de los conjuntos de cebadores, optimización de los parámetros de la PCR y estudios de concordancia.

Los resultados obtenidos mostraron que miniX es una herramienta adecuada para la
25 obtención de perfiles genéticos humanos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras control de ADN humano

30 Se utilizaron los ADN controles 9947A del kit AmpF1STR[®] YFiler (Applied Biosystems, Foster City, CA) y K562 (Promega[®] Corporation, USA) para poner a punto las condiciones de PCR. Estas dos muestras se cuantificaron mediante Quant-iT[™] dsDNA HS Assay Kit

(Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las especificaciones del fabricante y fueron diluidas a 0,5 ng/μl.

Muestras de la población

5 Se tomaron muestras de saliva de 439 individuos sanos: 365 residentes en Santander (Cantabria, España) agrupados en 116 familias y 74 habitantes de la Vega de Pas (Cantabria, España) agrupados en 22 familias. En todos los casos las familias estaban constituidas al menos por abuelo paterno, madre e hijo.

10 *Extracción de ADN y cuantificación*

Los extractos de ADN procedentes de las muestras poblacionales se obtuvieron mediante extracción por Prep Mini Spin kit (GE Healthcare Spain, Barcelona, Spain). La cuantificación de los extractos de ADN se realizó mediante Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

15

Optimización del conjunto de cebadores

Se utilizó el programa Perlprimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) para diseñar nuevos cebadores que amplifiquen 8 loci STRs (DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079), en base a las secuencias de referencia cuyos
20 números de acceso a GeneBank se recogen en la Tabla 7.

Las regiones flanqueantes a los STR analizados se estudiaron mediante SNPblast (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snpblastByChr.html) con el fin de evitar posiciones variables en la región de unión de todos los cebadores diseñados. Los amplificadores se extienden desde 101
25 hasta 219 pb, para abarcar un amplio número de los alelos contenidos en las publicaciones de referencia detalladas en la tabla 1, confeccionada en base a la información recogida en ChrX-STR.org 2.0 [<http://www.chrx-str.org>].

Para evitar la adenilación incompleta se utilizó la adición de una guanina al extremo 5' del
30 cebador inverso (secuencia 15 de la tabla 5) para el locus DXS10075 (Brownstein et al., 1996 Biotechniques 20(6): 1004-1006; Hill et al., 2009 J. Forensic Sci. 54(5): 7; Butler et al., 2003J. Forensic Sci. 48(5): 1054-1064).

Tabla 7. Número de acceso a GenBank, Rango de alelos, tamaño del producto (bp), concentración del cebador y marcaje fluorescente para cada locus de MiniX.

Locus	Acceso a Genbank	Rango de alelos	Tamaño del producto (pb)(bp)	Concentración del cebador μM	Marcaje Fluorescente
DXS6799	L30412.1	8-14	101-125	0.08	6-FAM
DXS10074	AL356358.19	7-21	137-193	0.32	
DXS6789	G08105.1	14-25	106-150	0.08	NED
DXS6809	G08112.1	27-38	175-219	0.60	
DXS7132	G08111.1	11-17	106-130	0.06	VIC
DXS6801	G09742.1	8-14	150-174	0.12	
DXS10075	Hering S, et al.*	12-21.3	101-140	0.16	PET
DXS10079	Hering S, et al.*	14-25	147-191	0.16	

*Hering S, et al. 2007. EXCLI Journal, 6: 177-182.

5

Amplificación de PCR, electroforesis y análisis de datos

Se emplearon 5 μl de Multiplex PCR master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 1,58 μl del mix de cebadores, 2,42 μl de H₂O mQ esteril y 1 μl de ADN molde (0,5ng / μl). Las concentraciones de cada pareja de cebadores se detallan en la Tabla 7. Se analizó el rendimiento de la amplificación en un termociclador GeneAmp[®] 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), en diferentes condiciones de temperaturas de hibridación (“annealing temperature”): 57 °C, 58 °C, 60,5 °C, 61,8 °C y 63 °C, a distintos números de ciclos: 28, 29, 30, 31 y 32 ciclos y a tiempos de extensión final de 30, 45, 60 y 90 minutos. Se analizó 2 μl de cada producto de amplificado mezclados con 9 μl de Hi-Di[™] Formamide (Applied Biosystems[®], Foster City, CA) y 0,3 μl de GeneScan[™] 500 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Tras la desnaturalización de los amplificados (5 minutos a 95 °C) se enfriaron (5 minutos a 4 °C) y se separaron en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Los resultados de la electroforesis fueron analizados mediante el software Genmapper versión 3.2 (Applied Biosystems[®], Foster City, CA).

Estudios de concordancia

Se compararon perfiles genéticos analizados con miniX, Sextaplex (Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1):192-195) y Decaplex (Gusmão et. al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227- 234). Para su análisis mediante miniX se empleó 0,5 ng de ADN molde de cada individuo. El análisis mediante Sextaplex y Decaplex se realizó según las condiciones óptimas previamente descritas por los respectivos autores (Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1):192-195; Gusmão et. al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227- 234).

RESULTADOS

5 Optimización de los conjuntos de cebadores

La Tabla 7 recoge un amplio rango de alelos para cada locus incluido en miniX. Se han considerado los alelos descritos en los principales grupos poblacionales según la información recogida en ChrX-STR.org 2.0 [<http://www.chrx-str.org>].

- 10 Se diseñaron 37 cebadores de entre los que se eligieron aquellos capaces de producir amplificados del menor tamaño posible, que en ningún caso excedieran de 220 pb, cuyas temperaturas de fusión (“melting temperature”) estuvieran comprendidas entre 57,5 y 60,5 °C y que hibridaran en regiones carentes de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e INDELS (Inserciones/delecciones) descrito hasta la fecha en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).
- 15 El diseño de los cebadores degenerados (*degenerate primers*) para el locus DXS10075 fue necesario para permitir la hibridación al sitio de unión del cebador, debido a que se encontró un SNP (rs945048 A/T) cercano a la unidad de repetición de dicho STR. En la primera fase de optimización se efectuaron amplificaciones PCR singleplex de cada locus. En la segunda fase de optimización, se ensayaron diversos conjuntos de cebadores en multiplex. Se espaciaron
- 20 los rangos de alelos de los loci adyacentes en tamaño con el fin de evitar solapamientos entre alelos correspondientes a loci diferentes para asegurar así un correcto genotipado.

Finalmente, se seleccionaron 4 reacciones de PCR dúplex (dúplex A:DXS6799 y DXS10074 ; dúplex B: DXS6789 y DXS6809 ; dúplex C: DXS7132 y DXS6801 y dúplex D: DXS100075 y DXS10079).

Los cebadores directos de la reacciones dúplex A, B, C y D se marcaron respectivamente con los marcadores fluorescentes 6-FAMTM, NEDTM, VICTM y PET[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA), tal y como se detalla en la Tabla 7. La única excepción la constituye DXS10075

30 donde se marcó el cebador reverso con PET[®]. Por último, se agruparon los distintos conjuntos de cebadores en una única reacción de PCR multiplex que permite la amplificación de 8 loci STRs. En la **Figura 2** se representa el resultado final de la estrategia en el diseño de cebadores para miniX.

En conclusión, para posibilitar la obtención del perfil genético completo se diseñaron los cebadores de tal modo que pudiesen ser analizados en una única reacción multiplex un total de 8 loci STRs: (DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079).

Optimización de los parámetros de PCR

10 La optimización de los parámetros de amplificación tales como la concentración óptima de cebadores, temperatura de hibridación, número de ciclos y tiempo de extensión, se realizó mediante el estudio de los electroferogramas en los que se evaluó la altura de los picos, el balance en heterocigosis de los mismos y la adenilación incompleta.

15 En primer lugar, la concentración de cada pareja de cebadores fue testada entre 0,04 μ M y 0,6 μ M, de tal forma que en cada caso, por debajo de la concentración óptima se observó un aumento en la altura de los picos a medida que se aumentaba la concentración de cebadores. Mientras que a su vez, en concentraciones superiores a la considerada óptima se detectó un aumento tanto del desbalance en heterocigosis como de la adenilación incompleta.

20 En este sentido, las intensidades de los loci analizados mediante miniX se equilibró alrededor de de 2500 RFUs en homocigóticos, y 1500 en heterocigóticos, en el análisis de 0,5 ng de ADN, para alcanzar un equilibrio entre la intensidad de la señal y la ausencia de solapamiento entre las señales correspondientes a diferentes fluorocromos. (**Figura 1**).

25 A continuación se procedió a la optimización de la temperatura de hibridación de la reacción PCR multiplex. El aumento de temperatura de hibridación produjo una disminución gradual de la adenilación incompleta, pero también de la altura de los picos. Los mejores resultados se obtuvieron a la temperatura de hibridación de 58 °C.

30 Por otro lado, el aumento en el número de ciclos incrementó de forma generalizada la altura de los picos y la adenilación incompleta. En este sentido, los resultados más equilibrados correspondieron a 30 ciclos. Así mismo la adición de una guanina al extremo 5' del primer

reverse eliminó el efecto de la adenilación incompleta. La adición de dicha guanina se representa como una **G** en la **Tabla 5**.

De esta manera, miniX ha demostrado ser una reacción multiplex balanceada y específica, capaz de amplificar 8 loci STRs, a partir de 0,5 ng de ADN molde (**Figura 1**), mediante la siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial durante 15 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 58 °C y 60 s a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de extensión final de 60 minutos a 60 °C.

10 *Estudios de concordancia*

Los estudios de concordancia se llevaron a cabo mediante la comparación del genotipado de 1670 alelos obtenidos por miniX y Decaplex (Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3):227- 234) y la comparación de genotipado de 3343 *alelos* obtenidos mediante miniX y Sextaplex (Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1):192-195). Se eligió Decaplex ser una reacción de análisis de STRs del cromosoma X ampliamente utilizados y validados (Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3):227- 234). Sextaplex, se eligió por tratarse igualmente de una reacción validada, así como porque mediante miniX se analiza la totalidad de los loci STRs incluidos en dicha reacción (Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1):192-195). Entre los resultados obtenidos no se encontraron discordancias, lo que supone una concordancia del 100% entre las tres reacciones multiplex.

25 **DISCUSION**

A continuación se discuten los resultados relativos a la validación de miniX en los ensayos de optimización del conjunto de cebadores, optimización de parámetros de PCR, y estudios de concordancia.

30 MiniX ha demostrado ser una reacción multiplex balanceada y específica, capaz de amplificar 8 loci STRs. De este modo miniX es la única reacción capaz de analizar de manera simultánea

los loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

La fiabilidad de miniX ha sido comprobada mediante estudios de concordancia entre los
 5 perfiles genéticos determinados por este sistema y los obtenidos mediante sistemas
 preexistentes ampliamente utilizados y validados como son Decaplex y Sextaplex (Gusmão et
 al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3):227- 234 ; Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci.
 57(1):192-195). En este sentido se constató la concordancia del 100 % entre los resultados de
 las tres reacciones comparadas. Sextaplex comparte 6 de los loci STRs incluidos en miniX
 10 (DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS6801, DXS10075 y DXS10079). Mientras que
 Decaplex comparte 3 de los loci STRs incluidos en miniX (DXS6789, DXS6809 y
 DXS7132). De modo que mediante la comparación con ambas reacciones se realizaron
 estudios de concordancia de 7 de los 8 loci STRs incluidos en miniX, con la excepción del
 locus DXS6799, que previo a este estudio ha sido incluido en la reacción multiplex de 4 loci
 15 STRs de Liu et al., 2009 Legal Medicine 11(5):248-250 en la muestra poblacional de 400
 individuos (200 hombres y 200 mujeres procedentes del grupo étnico Han de Beijing, China)
 (en la base de datos ChrX-STR.org 2.0 [<http://www.chrx-str.org/>] no aparece ningún dato
 poblacional).

20 Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en los estudios de concordancia los perfiles
 genéticos obtenidos mediante miniX mostraron una alta fiabilidad.

En conclusión, la presente validación ha puesto de manifiesto que miniX constituye un
 sistema de elevada robustez y fiabilidad en la obtención de perfiles genéticos, lo que las
 25 convierte en una herramienta útil para su utilización en identificación humana. Así mismo, el
 reducido tamaño de sus amplificadores menores en su totalidad a 219 pb, sugiere que la
 presente invención posee una elevada capacidad de análisis de los loci DXS6799, DXS10074,
 DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

30 EJEMPLO 2

**Validación del método de la invención que comprende una reacción de amplificación
 multiplex empleando los conjuntos de parejas de cebadores miniX para su uso en el
 análisis de muestras de ADN altamente degradadas**

A continuación se describe la validación de miniX y la combinación de ambas reacciones de acuerdo con *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SGWDAM) (Ellegren., 2004 Nat. Rev. Genet. 5(6): 435-45) en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas.

5 Dicha validación ha consistido en ensayos de determinación de porcentaje de alelos tartamudos, intensidad relativa entre picos, y sensibilidad. Así mismo, se realizan dos estudios comparativos de: 1) entre las estrategias de diseño del método objeto de invención y los de los métodos del estado de la técnica y 2) entre la capacidad de análisis a partir de muestras de ADN altamente degradadas del método de la invención por un lado, y por otro la capacidad
10 de análisis de Decaplex (Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3):227- 234) y Sextaplex (Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1):192-195), por ser los métodos del estado de la técnica que mayor rendimiento han demostrado en el estudio de los loci STRs incluidos en el método objeto de invención.

15 Los resultados obtenidos indican que la presente invención supera al resto de métodos de la técnica en capacidad de análisis del conjunto de los loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, a partir de muestras de ADN altamente degradadas.

20 **MATERIALES Y METODOS**

Muestras control de ADN humano

Se utilizó el ADN control K562 (Promega® Corporation, USA) para realizar ensayos de sensibilidad. Esta muestra se cuantificó mediante Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit
25 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y fue diluida a 0,5 ng/μl.

Muestras de la población

Se tomaron muestras de saliva de 439 individuos sanos: 365 residentes en Santander
30 (Cantabria, España) agrupados en 116 familias y 74 habitantes de la Vega de Pas (Cantabria, España) agrupados en 22 familias. En todos los casos las familias estaban constituidas al menos por abuelo paterno, madre e hijo.

Muestras de ADN altamente degradadas.

Se tomaron 24 muestras de ADN procedentes de tejidos incluidos en parafina, originarios de autopsias en las que el tejido permaneció 72-96 horas en formol antes de su inclusión en parafina.

5

Extracción de ADN y cuantificación

Los extractos de ADN procedentes de las muestras poblacionales se obtuvieron mediante extracción por Prep Mini Spin kit (GE Healthcare Spain, Barcelona, Spain) y los procedentes de parafina por cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche Roche Diagnostics SL, 10 Barcelona, Spain). La cuantificación de los extractos de ADN se realizó mediante QuantiT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Amplificación de PCR, electroforesis y análisis de datos

Se emplearon 5 µl de Multiplex PCR master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 1,58 µl del mix de cebadores y 2,42 µl de H₂O mQ esteril. Para la amplificación de las muestras de ADN 15 procedentes de muestras poblacionales se utilizó 1 µl de ADN molde (0,5ng / µl), mientras que para la amplificación de las muestras de ADN procedentes de tejidos incluidos en parafina se empleó 1 µl de ADN molde (3 ng / µl). Las concentraciones de cada pareja de cebadores se detallan en la Tabla 7.

20

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial durante 15 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 58 °C y 60 s a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de extensión final de 60 minutos a 60 °C.

25

Se analizaron 2 µl de cada producto de amplificado mezclados con 9 µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems®, Foster City, CA) y 0,3 µl de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Tras la desnaturalización de los 30 amplificados (5 minutos a 95 °C) se enfriaron (4 minutos a 4 °C) y se separaron en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Los resultados de la electroforesis fueron analizados mediante el software Genmapper versión 3.2 (Applied Biosystems®, Foster City, CA).

Determinación del porcentaje de alelos tartamudos y de la intensidad relativa de picos heterocigotos.

Durante el proceso de PCR, se va a producir el deslizamiento de la ADN polimerasa (en inglés, strand slippage) que va a generar lo que se denominan bandas tartamudas, que son productos alélicos que se diferencian del alelo verdadero tan solo en una unidad de repetición. La determinación de alelos tartamudos tanto en individuos homocigotos como heterocigotos que diferían en tamaño en más de 4 pb se efectuó calculando el porcentaje de la altura del pico del alelo tartamudo respecto a la altura del pico real. El cálculo de la intensidad relativa de picos heterocigotos (del inglés “Peak Height Ratio” ó PHR) se realizó dividiendo la altura del menor de los picos entre la altura del mayor de los heterocigotos de cada locus.

Sensibilidad

Con el fin de determinar la sensibilidad de miniX, se analizó por duplicado el ADN control K562 (Promega® Corporation, USA). Se utilizaron concentraciones de ADN de 1 ng, 500 pg, 200 pg, 100 pg, 75pg, 62,5 pg, 50 pg, 25 pg, 20 pg, 10 pg y 5pg.

RESULTADOS

Determinación del porcentaje de alelos tartamudos y de la intensidad relativa de picos heterocigotos.

Los picos correspondientes a alelos tartamudos, resultado del deslizamiento de la polimerasa habitualmente se traducen en un pico 4 pb menor que el alelo real. Los resultados para cada locus tras el análisis de 439 individuos de origen caucasoide correspondientes a miniX, se recogen en la Tabla 8. El valor medio de porcentaje más bajo fue observado en el locus DXS6801 (4.95 ± 1.82), y el valor más alto en DXS6809 (11.64 ± 2.70).

En todos los loci se observó que cuanto mayor era el número de repeticiones de sus alelos mayor era el porcentaje de alelos tartamudos.

Tabla 8: Porcentaje de alelos tartamudos (%) de loci STRs analizados con miniX

	Tamaño muestral	Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DXS6799	405	6,31	5,89	2,30	1,94	18,33
DXS10074	494	5,16	4,82	2,74	0,49	18,18
DXS6789	416	10,52	10,15	2,24	2,44	18,50
DXS6809	436	11,64	11,21	2,70	4,55	22,10
DXS7132	423	7,98	7,88	2,55	1,22	17,91
DXS6801	408	4,95	4,65	1,82	0,49	13,36

DXS10075	396	8,19	7,69	2,99	2,02	17,87
DXS10079	465	7,20	6,82	2,48	0,61	19,81

El cálculo de la Altura Relativa entre Picos (PHR) ofreció bajos valores de desviación estándar así como valores de mediana cercanos a la media en cada uno de los loci analizados mediante miniX en 439 individuos (Tabla 9). De modo que los valores registrados se encuentran en un rango comprendido entre 77-83%, los valores más bajos y más altos fueron observados en el locus DXS6809 (77.59 ± 13.79) y en el locus DXS10075 (83.08 ± 10.14) respectivamente. Por lo que se puede concluir que en general, miniX presenta un buen balance de los alelos en heterocigosis.

10

Tabla 9: Intensidad relativa entre picos para cada locus STR analizado con miniX

	Tamaño muestral	Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DXS6799	25	81,97	84,85	11,03	56,39	99,69
DXS10074	91	78,36	79,72	13,04	42,86	99,79
DXS6789	48	82,40	83,67	10,89	59,42	99,76
DXS6809	58	77,59	77,44	13,79	48,02	99,62
DXS7132	50	81,47	82,28	12,64	55,73	98,75
DXS6801	29	81,48	81,66	11,63	58,93	97,87
DXS10075	29	83,08	85,65	10,14	57,94	94,72
DXS10079	77	81,75	82,41	12,97	53,18	99,86

15

Sensibilidad

La menor cantidad de ADN que permitió obtener perfiles completos mediante el análisis de miniX por duplicado fue 20 pg. Incluso cantidades de ADN en el rango de 10 a 20 pg, permitieron el análisis de 5 loci STR (un núcleo fijo de 4 loci STRs: DXS6799, DXS6789, DXS6809 y DXS10079; y DXS10075 ó DXS10074, en función de la réplica) mediante alelos cuya intensidad estuvo comprendida en el rango 42-466 RFUs. Mientras que los 2 loci STR restantes (DXS7132, DXS6801) presentaron pérdidas alélicas por efectos estocásticos o bien no ofrecieron resultados a más de 40 RFUs en ninguno de los duplicados.

25 *Estudio comparativo de las estrategias de diseño de los conjuntos de cebadores de la presente invención respecto a los métodos del estado de la técnica*

Como ya se ha explicado en el apartado dedicado a los antecedentes de la invención, el tamaño de los amplicones de un sistema STR multiplex, es crítico para la obtención de

perfiles genéticos a partir de muestras biológicas altamente degradadas (Butler et al., 2003 J. Forensic Sci. 48(5): 1054-64; Coble., 2005. J. Forensic Sci. 50(1): 43-53).

A este respecto, en la tabla 10, se comparan las estrategias de diseño de las principales reacciones multiplex del estado de la técnica y de la reacción objeto de invención (miniX), mediante loci STRs incluidos en el siguiente conjunto: DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079. Se incluyen los rangos alélicos de las principales muestras poblacionales analizadas hasta la fecha.

10

Tabla 10. Comparación del tamaño en pares de bases de loci incluidos en miniX con las reacciones multiplex del estado de la técnica.

MARCADOR MINIPLEX	RANGO TAMAÑOS AMPLICON						REFERENCIAS
	miniX	sextaplex	decaplex	Otras multiplex			
DXS6799	101-125			228–255			Liu et al., 2009 Legal Med. 11: 248-250.
DXS10074	137-193	171-227		110-166			Becker et al., 2008 Forensic Sci. Int. Genet. 2(1): 69- 74.
DXS6789	106-150	249-293	249-293	122-166	124-168	154-198	Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1): 192-195. ; Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227-234; Asamura et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120: 174-181. ; Diegoli et al., 2011 Forensic Sci. Int. Genet. 5(5): 415-421; Liu et al., 2008 Int. J. Legal Med. 122: 261- 265.
DXS6809	175-219	230-274	230-274				Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1): 192-195; Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227- 234
DXS7132	106-130		124-148	153-177	120-144		Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3): 227- 234; Diegoli et al., 2011 Forensic Sci. Int. Genet. 5(5): 415-421; Turrina et al., 2007

						Forensic Sci. Int. Genet. 1 (2007) 201- 204.
DXS6801	150-174	113-137				Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1): 192-195
DXS10075	101-140	218-257				
DXS10079	147-191	271-315				

Por otro lado, en la tabla 11 se detalla el poder de discriminación obtenido mediante miniX, Decaplex y Sextaplex, tras el análisis de los loci compartidos entre miniX y dichas reacciones, a partir de fragmentos de ADN altamente degradados: miniX vs. Decaplex (DXS6789, DXS6809 y DXS7132); y miniX vs. sextaplex (DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS6801, DXS10075 y DXS10079). Los valores obtenidos corresponden al análisis de fragmentos de ADN de 220 pb.

10 Los resultados muestran que, a partir de extractos de ADN altamente fragmentados (<220pb) miniX alcanza un mayor PD en el análisis de los loci compartidos con Decaplex (DXS6789, DXS6809 y DXS7132) y aquellos compartidos con Sextaplex (DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS6801, DXS10075 y DXS10079), tanto en hombres como en mujeres.

15 **Tabla 11.** Comparación del Poder de discriminación (PD) obtenido mediante: la reacción multiplex objeto de la invención (miniX), así como mediante Decaplex (Gusmão et al., 2009) y Sextaplex (Castañeda et al., 2012), principales reacciones del estado de la técnica que analizan loci STRs del conjunto DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079. Los resultados corresponden al PD calculado en hombres y mujeres, tras el análisis de los loci STRs cuyo tamaño no sea superior a las 220 pb,

PD COMBINADO	220 pb				STRs incluidos en miniX+Decaplex
	miniX vs. Decaplex		miniX vs. Sextaplex		
	miniX	Decaplex	miniX	Sextaplex	
MUJERES	0,999	0,893	0,999	0,991	0,999
HOMBRES	0,984	0,753	0,999	0,939	0,999

25 *Estudio comparativo de la capacidad de análisis de muestras de ADN altamente degradadas de los conjuntos de cebadores de la presente invención respecto a los métodos del estado de la técnica.*

La comparación de la capacidad de análisis de muestras altamente degradadas del sistema objeto de la invención respecto a las principales reacciones del estado de la técnica, Decaplex (**Figura 3**) y Sextaplex (**Figura 4**), se realizó mediante el análisis por las 3 reacciones multiplexes, de 24 muestras de ADN procedentes de tejidos incluidos en parafina. Este tipo de muestras se caracteriza por una fragmentación generalizada del ADN.

La intensidad de la señal de un alelo se relaciona con la fiabilidad de la misma, de modo que habitualmente no se realizan genotipados basados en alelos cuya altura no supere las 50-100 RFUs (Relative Units of Fluorescence). Es por ello que se ha evaluado el rendimiento en el análisis de muestras de ADN altamente fragmentadas en base a dos variables: A) el porcentaje de muestras en el que se ha logrado genotipar cada STR, descartando aquellos alelos de altura inferior a 50 RFUs; y B) el porcentaje de muestras en el que el genotipado corresponde a alelos de altura superior a 200 RFUs, indicando una fiabilidad extra del resultado.

Sólo se han considerado como STRs analizados con éxito, aquellos en los que se lograba genotipar la totalidad de los alelos presentes en esa muestra. Al no disponer de muestras de referencia se ha tomado como análisis completo de un STR aquellos casos en los que se ha logrado obtener dos alelos para una misma muestra o cuando en todos los resultados obtenidos mediante las diferentes reacciones se ha detectado un único alelo.

Tal y como se observa en la **figura 3**, miniX presenta un mayor rendimiento global que Decaplex en 2 de los 3 loci compartidos, con la excepción del locus DXS7132, que ha sido genotipado mediante Decaplex en el 92% de las muestras respecto a un 88% en el caso de miniX. Si bien, en este locus, dicho 4% de diferencia corresponde a alelos cuya altura no supera las 200 RFUs. Por otro lado, miniX muestra un rendimiento global superior a Sextaplex en los 6 loci STR compartidos y un mayor porcentaje de alelos por encima de las 200 RFUs (**Figura 4**).

DISCUSION

A continuación se discuten los resultados relativos a la validación de miniX, en los ensayos de determinación del porcentaje de alelos tartamudos, intensidad relativa de picos heterocigotos (PHR) y sensibilidad. Así mismo se discuten los resultados obtenidos en los estudios comparativos del método de la invención y de los métodos del estado de la técnica, tanto
5 respecto a la estrategia de diseño como respecto a la capacidad de análisis de los loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079 a partir de muestras de ADN altamente degradadas.

La estimación de la capacidad analítica de un sistema multiplex requiere valorar su
10 sensibilidad. Del mismo modo, es necesario evaluar los resultados obtenidos para porcentaje de alelos tartamudos y PHR (Budowle et al., 2009 J. Forensic Sci. 54(4): 810-821). Esto es debido a que un porcentaje de alelos tartamudos elevado puede conducir a equívocos en la interpretación de alelos de intensidad reducida (Walsh et al., 1996 Nucleic Acids. Re. 24(14): 2807-2812). Los valores porcentaje de alelos tartamudos de media, mediana, desviación
15 estándar, valores mínimos y máximos del método de la invención, se ajustan a los obtenidos por otros grupos de investigación en la validación de otros sistemas de análisis de loci STRs del Cromosoma X (Asamura et al., 2006 Int. J. Legal Med. 120:174-181, en la validación de otras reacciones multiplex de STRs autosómicos tales como I-DNA-1 (Odriozola et al., 2011 Int. J. Legal Med. 125(5):685-94), I-DNA-2 (Odriozola et al., 2012 Int. J. Legal Med.
20 126(1):167-72) y *genRESMPX-3* (Schlenk *et al.*, 2004. Int J Legal Med, 118(1): 55-61). En conjunto, los bajos porcentajes de alelos tartamudos obtenidos para miniX favorecen el correcto genotipado de las muestras.

Por otro lado los valores de PHR definen el balance existente en la amplificación de
25 heterocigotos. Para miniX se observa una PHR media inferior a la reportada para otros sistemas de identificación tales como I-DNA-1 (Odriozola et al., 2011 Int. J. Legal Med. 125(5):685-94), I-DNA-2 (Odriozola et al., 2012 Int. J. Legal Med. 126(1):167-72), *genRESMPX-3* (Schlenk *et al.*, 2004. Int J Legal Med, 118(1): 55-61), MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Mulero et al., 2008. J. Forensic Sci. 53 (4): 838-852) e Identifiler® Direct
30 PCR Amplification Kit (Wang et al., 2011 J. Forensic. Sci. 56 (4) 835: 845). . Esta diferencia podría deberse a que miniX analiza loci STRs diferentes a las otras dos reacciones, cuya estructura repetitiva difiere. En cualquier caso, para miniX se observa una PHR media superior al 80 %, lo que supone un elevado balance entre heterocigotos. En cuanto a la

homogeneidad de PHR en los diferentes loci, miniX muestra una menor desviación media estándar que la reportada para Minifiler™ Kit PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) (12,02 frente a 33,47) (Mulero et al., 2008 J. Forensic Sci. 53(4): 838-52). No ha sido posible la comparación del porcentaje de alelos tartamudos y PHR con reacciones que incluyan los loci STRs de la reacción objeto de invención, tales como Decaplex (Gusmão et al., 2009 Int. J. Legal Med. 123 (3):227- 234) y Sextaplex (Castañeda et al., 2012 J. Forensic Sci. 57(1):192-195) debido a la ausencia en el estado de la técnica de estudios que revelen estos datos.

10 La sensibilidad de una STR multiplex es determinante en la obtención de perfiles de STRs con suficiente poder de discriminación (Budowle et al., 2009. Croat. Med. J. 50(3): 207-17). Por ello en la presente invención, se han perseguido aquellas condiciones experimentales en las que miniX ofrece una alta sensibilidad, permitiendo el análisis de los 8 loci STRs incluidos a partir de cantidades de 20 pg. MiniX incluso posibilita el análisis de 5 loci STR
15 (un núcleo fijo de 4 loci STRs: DXS6799, DXS6789, DXS6809 y DXS10079; y DXS10075 ó DXS10074, en función de la réplica) en muestras con cantidades de ADN en el rango de 10 a 20 pg.

Se ha comparado la sensibilidad de miniX con la reportada para otros sistemas de análisis de
20 loci STRs y más específicamente para aquellos que incluyen miniSTR del cromosoma X.

PowerPlex16 system y PowerPlex® 16 HS system (Promega® Corporation, USA), así como Identifiler® (Applied Biosystems, Foster City, CA), requieren cantidades mayores de ADN molde que miniX, (respectivamente 250, 62,5 y 250 pg) (Collins et al., 2004. J. Forensic Sci.
25 49(6): 1265-1277; Krenke et al., 2002 J. Forensic Sci. 47(4): 773-785).

Otros sistemas multiplex de amplia utilización son *genRESMPX-3* (Serac, Homburg, Germany), AmpFISTR Profiler Plus y AmpFISTR Cofiler multiplex Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA), que también requieren de cantidades mayores de ADN molde
30 que miniX , 120 pg el primero (Schlenk *et al.*, 2004 Int. J. Legal Med 118(1): 55-61) y 160 pg el segundo y el tercero (LaFountain et al., 2001. J. Forensic Sci. 46: 49).

- En cuanto a la comparación de la sensibilidad de miniX con reacciones que analicen miniSTRs del cromosoma X, si bien estas reacciones permite el estudio de diferentes loci a los incluidos en miniX (Tabla 3), cabe señalar que la sensibilidad de Mini X y reacciones a, y b (Asamura et al., 2006 *Int. J. Legal Med.* 120:174-181) es similar, habiéndose amplificado la totalidad de los loci incluidos en cada una de las reacciones a partir de cantidades superiores a 20 pg. En cambio, las reacciones c y d (Diegoli et Coble., 2010, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(5) 415- 421) requiere cantidades superiores a MiniX, al menos 200 pg de ADN molde para obtener perfiles completos, y 100 pg para perfiles con pérdida de 1-2 marcadores.
- 10 Los extractos de ADN analizados en laboratorios forenses se caracterizan frecuentemente por contener cantidades muy reducidas de ADN, lo que dificulta la obtención de perfiles genéticos de elevado poder de discriminación tras su análisis mediante un sistema STR multiplex.
- 15 El tamaño de los amplicones de un sistema STR multiplex es crítico para la obtención de perfiles genéticos a partir de muestras biológicas altamente degradadas (Budowle et al.,2009 *Croat. Med. J.* 50(3): 207-17). MiniX, destaca por ser el único sistema disponible en la actualidad que permite analizar la totalidad de los loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, en una única reacción multiplex, incluyendo además, amplificados de menor tamaño que los disponibles en el estado de la técnica en 6 de los 8 loci STRs incluidos (Tabla 10). La excepción la constituyen los locus DXS10074 y DXS6801 que da lugar a amplificados 27 y 37 pb mayores que los obtenidos mediante las reacciones desarrolladas por Becker et. al., 2008 *Forensic. Sci. Int. Genet.* 2(1): 69-74 y Castañeda et al., 2012 *J. Forensic Sci.* 57(1):192-195, respectivamente.
- 25 También cabe señalar que, mediante miniX se producen los amplificados de menor tamaño posible para el locus DXS6809 (175-219 pb), al haber sido diseñados en la zona directamente adyacente a la región repetitiva de dicho locus. El resto de loci STRs dan lugar a amplificados menores de 200 pb.
- 30 Así mismo, miniX representa la única alternativa en formato miniSTR para la amplificación de los loci DXS6799, DXS10075 y DXS10079.

Por otro lado, el mayor poder de discriminación obtenido mediante miniX respecto a decaplex y sextaplex, a partir de fragmentos de ADN que no excedan las 220 pb, pone de manifiesto la superioridad de su diseño de miniX (Tabla 11).

- 5 El análisis comparativo de la capacidad de análisis de muestras de ADN altamente degradadas, consistió en el análisis de muestras de parafina caracterizadas por la elevada fragmentación de su ADN, mediante: miniX, Decaplex y Sextaplex. miniX alcanzó un rendimiento mayor que Decaplex en dos de los 3 loci compartidos. Mientras que en el locus DXS7132, ambas reacciones obtuvieron un rendimiento del 88 % mediante señales que
10 superaron las 200 RFUs y Decaplex obtuvo un 4% adicional mediante señales que no alcanzaron dicha intensidad. Por otro lado, miniX superó el rendimiento obtenido mediante Sextaplex en los 6 loci STRs compartidos por ambas reacciones.

En síntesis, la presente validación incluye tanto los ensayos de alelos tartamudos, PHR y
15 sensibilidad, como estudios comparativos de estrategias de diseño y de análisis de muestras de ADN altamente degradadas. Los resultados obtenidos demuestran que el rendimiento de la presente invención en el análisis a partir de muestras de ADN altamente degradadas y/o escasas de los loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079, es superior al de los métodos del estado de la técnica.

20

REIVINDICACIONES

- 1) Un método para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis,
en un extracto de ADN procedente de dicho individuo mediante una reacción de
5 amplificación multiplex, de la combinación de 8 loci STRs del cromosoma X
constituidos por DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801,
DXS10075 y DXS10079.
- 10 2) Método según la reivindicación 1 donde la pareja de cebadores empleada en la reacción
de amplificación multiplex específica para cada uno de los 8 loci STR analizados es la
pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
 - 15 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
 - 20 - SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus DXS10075,
y
 - SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.
- 25 3) Método según la reivindicación 2, en donde la temperatura de fusión de la reacción de
amplificación multiplex que comprende los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID
NO: 17 está comprendida entre 57,5 y 63 °C.
- 4) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde uno de los
30 oligonucleótidos de cada pareja de cebadores está marcado en uno de sus extremos.

- 5) Método según la reivindicación 4, en donde los compuestos empleados en el marcaje de los oligonucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina.
- 5 6) Método según la reivindicación 5, en donde el material fluorescente se selecciona del grupo que consiste en 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED (), Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-
10 isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).
- 7) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el extracto de ADN procede de una muestra de sangre, pelo, saliva, epidermis, esperma, caspa, cenizas, una muestra vaginal o una muestra de tejido.
15
- 8) Un kit, para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-7, que comprende parejas de cebadores específicas para amplificar en una única reacción multiplex los 8 loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.
20
- 9) Kit según la reivindicación 8, en donde la pareja de cebadores empleada en la reacción de amplificación multiplex específica para cada uno de los 8 loci STR analizados es la pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias
25
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
 - 30 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,
 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,

- SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus DXS10075, y
- SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

5 10) Kit según la reivindicación 8 ó 9, en el que la pareja de cebadores comprende un oligonucleótido marcado en uno de sus extremos.

11) Kit según la reivindicación 8 ó 9 que comprende adicionalmente los reactivos necesarios para marcar las parejas de cebadores.

10

12) Kit según la reivindicación 11, en donde los reactivos empleados para marcar las parejas de cebadores se seleccionan del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina.

15

13) Kit según la reivindicación 12, en donde el material fluorescente se selecciona del grupo que consiste en 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED (), Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

20

14) Conjunto de parejas de cebadores que comprende, 8 parejas de cebadores dirigidas a amplificar en una reacción multiplex los 8 loci STRs DXS6799, DXS10074, DXS6789, 25 DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079.

25

15) Conjunto, según la reivindicación 14, donde las parejas de cebadores son las siguientes:

- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus DXS6799,
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus DXS10074,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus DXS6789,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus DXS6809,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus DXS7132,

30

- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus DXS6801,
- SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO: 15 para el locus DXS10075, y
- SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el locus DXS10079.

5

16) Uso de un conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 14 ó 15 para obtener el perfil genético de un individuo, para identificar un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

10

15

20

25

30

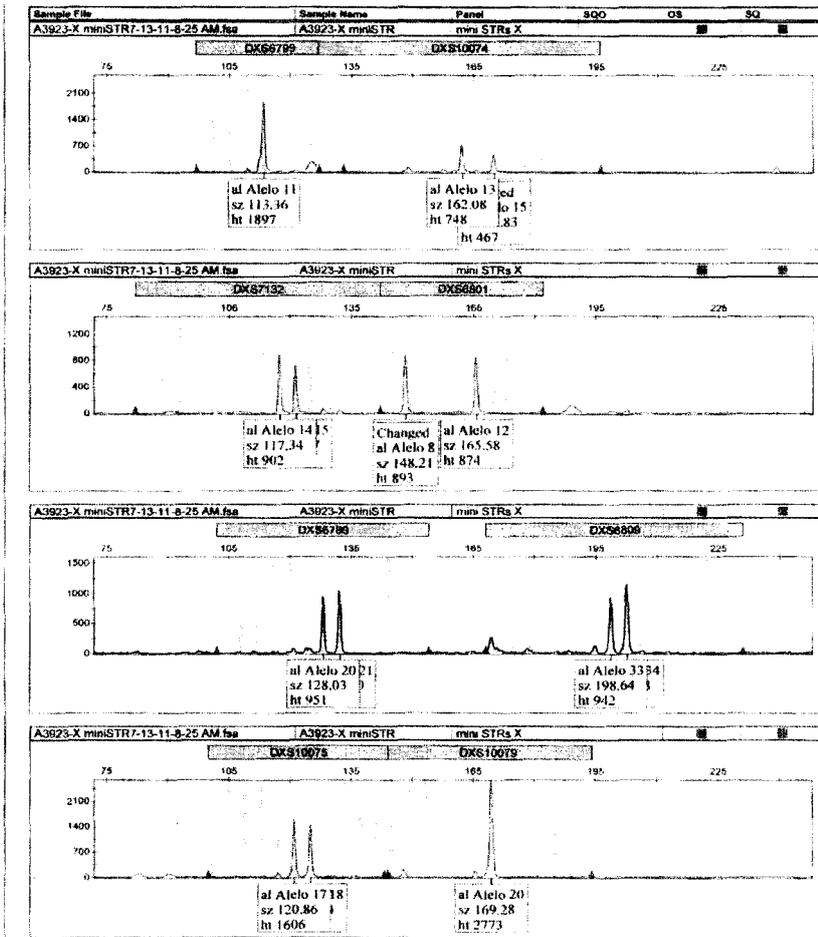


FIGURA 1

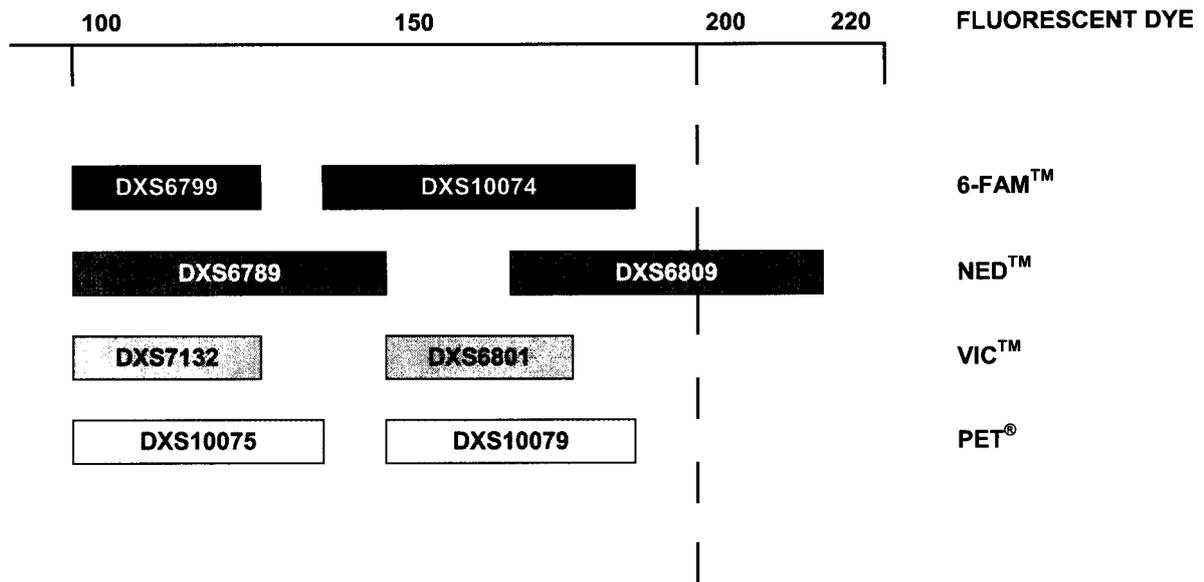


FIGURA 2

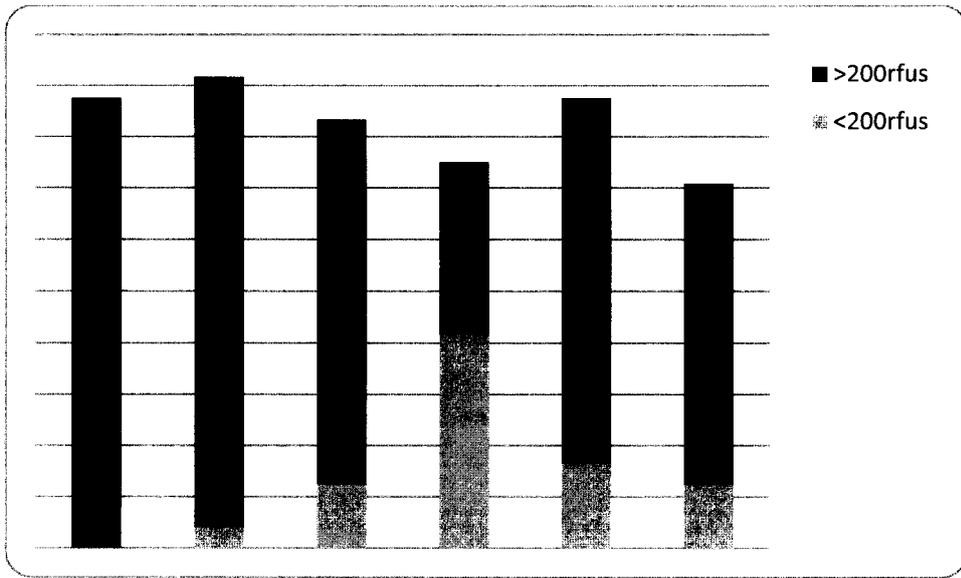


FIGURA 3

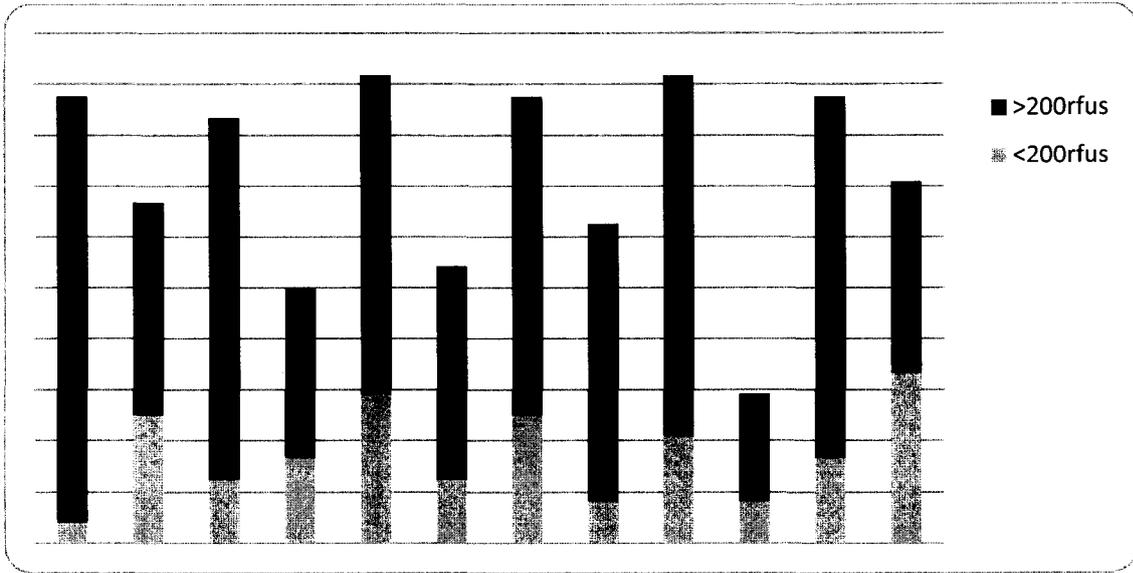


FIGURA 4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

<120> MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE UN INDIVIDUO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LOCI DE CROMOSOMA X

<130> UC 2012-002

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS6799

<400> 1
 actagcaaac tgaatttagt aatgtg 26

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS6799

<400> 2
 taactacttg cacatgggat g 21

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS10074

<400> 3
 tacatggact tcctactgc 19

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS10074

<400> 4
 atactgaata taagctgatt tgttcta 27

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS6789

<400> 5
aagttggtac ttaataaacc ctc 23

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador 5'-3' para el locus DXS6789

<400> 6
agaaccaata ggagatagat gg 22

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador 5'-3' para el locus DXS6809

<400> 7
catgactaga ttatgtagga atttgg 26

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador 5'-3' para el locus DXS6809

<400> 8
tgtgaggaag agatagagga 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador 5'-3' para el locus DXS7132

<400> 9
ccctctcatc tatctgactg 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador 5'-3' para el locus DXS7132

<400> 10
ctctattagt caacgttctc c 21

<210> 11
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS6801
 <400> 11
 cataatcaca tgagtcattt cct 23

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS6801
 <400> 12
 atctgtatta gttatgagtt tccag 25

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS10075
 <400> 13
 agttattgca gagaagaatc atac 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS10075
 <400> 14
 agatattgca gagaagaatc atac 25

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS10075
 <400> 15
 gactacctct gctccctt 18

<210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 5'-3' para el locus DXS10079
 <400> 16
 gtgaccaagt gagaccaa 18

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador 5'-3' para el locus DXS10079

<400> 17
ttggtgagaa cttttgcatc a

21



- ②¹ N.º solicitud: 201200729
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 10.07.2012
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	CASTAÑEDA, M et al. Haplotypic blocks of X-linked STRs for forensic cases: study of recombination and mutation rates. Journal of Forensic Sciences. Enero 2012, VOL: 57 Núm. 1, págs.192-195, todo el documento.	1-16
Y	SAMEJIMA, M et al. Population genetic study of six closely linked groups of X-STRs in a Japanese population. International Journal of Legal Medicine. Noviembre 2011, VOL: 125 Núm. 6 [online] [recuperado el 27/5/2013]. Recuperado de Internet: <URL: http://ir.tdc.ac.jp/irucaa/bitstream/10130/2934/1/s00414-011-0618-x.pdf >, págs. 1-15, especialmente resumen; páginas 3, 4, 9; tabla 1.	1-16
Y	LI, H et al. A multiplex PCR for 4 X chromosome STR markers and population data from Beijing Han ethnic group. Legal Medicine. Septiembre 2009, VOL: 11, Núm. 5, págs. 248-250, todo el documento	1-16
A	WO 2011133947 A2 (LIFE TECHNOLOGIES CORP ET AL.) 27/10/2011, todo el documento	1-16
A	BUTLER, JM et al. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of Forensic Sciences. 2003, Vol. 48, Núm. 5, páginas 1054-1064, todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 30.05.2013</p>	<p>Examinador J. Collado Martínez</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, NPL, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CASTAÑEDA, M et al. Journal of Forensic Sciences. Enero 2012, VOL: 57 Núm. 1, págs.192-195	Enero 2012
D02	SAMEJIMA, M et al. International Journal of Legal Medicine. Noviembre 2011, VOL: 125 Núm. 6	Noviembre 2011
D03	LI, H et al. Legal Medicine. Septiembre 2009, VOL 11, Núm. 5, págs. 248-250	Septiembre 2009
D04	WO 2011133947 A2 (LIFE TECHNOLOGIES CORP et al.)	27.10.2011
D05	BUTLER, JM et al. Journal of Forensic Sciences. 2003, Vol. 48, Núm. 5, páginas 1054-1064	2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un método de obtención del perfil genético de un individuo por medio de la determinación, mediante una PCR multiplex, de variantes alélicas de ocho loci correspondientes a secuencias STR (Short Tandem Repeats) del cromosoma X. Los loci son: DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075, DXS10079. Además, la solicitud se refiere a un conjunto de parejas de cebadores específicos para amplificar los ocho loci anteriores, así como a kits que los contienen, y su uso para la obtención de perfiles genéticos, identificación de individuos, determinación de relaciones de parentesco e identificación de restos humanos.

El documento D01 divulga un método para llevar a cabo un análisis de variantes alélicas de un conjunto de seis loci STR del cromosoma X, empleando para ello una reacción de PCR multiplex para los seis marcadores. El método se aplica la resolución de casos de parentesco complejos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un estudio de seis grupos de loci STR del cromosoma X en los que los loci de cada grupo se localizan muy próximos en el cromosoma (ver resumen; páginas 3, 4, 9; tabla 1).

El documento D03 se refiere a un sistema multiplex que permite el análisis simultáneo de cuatro marcadores STR del cromosoma X en análisis genéticos de poblaciones (ver todo el documento).

El documento D04 tiene por objeto métodos y kits para análisis forenses y genealógicos basados en reacciones PCR multiplex dirigidas a amplificar un conjunto de 20 loci STR del cromosoma X (ver todo el documento).

El documento D05 tiene por objeto reacciones de PCR multiplex para la amplificación de ciertos loci STR que permiten obtener amplicones de pequeño tamaño. Las reacciones empleadas proporcionan perfiles genéticos en el ámbito forense a partir de muestras de ADN degradado (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1, LP 11/1986).

1.1.- Reivindicaciones 1-7.

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1 es D01. Dicho documento se refiere a un método para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis, en un extracto de ADN procedente de dicho individuo, mediante una reacción de amplificación multiplex, de la combinación de los siguientes seis loci STR del cromosoma X: DXS6801, DXS6809, DXS6789, DXS10079, DXS10074, y DXS10075. Asimismo, los autores de D01 hacen mención al uso adicional del marcador DXS7132 para detectar posibles fenómenos de mutación o recombinación.

De lo anterior se desprende que D01 no divulga de forma idéntica el método de la reivindicación 1 ya que no incluye el análisis del locus DXS6799. Por lo tanto, tanto el objeto de la reivindicación 1, como el de sus reivindicaciones dependientes 2-7, cumplen con el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la LP 11/1986.

1.2.- Reivindicaciones 8-13.

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 8 es también D01. Dicho documento no incluye un kit para la amplificación de los ocho marcadores STR del cromosoma X de la reivindicación 8.

En consecuencia, el objeto de la reivindicación 8, y el de sus reivindicaciones dependientes 9-13, satisface el requisito de novedad del art. 6.1 de la LP 11/1986.

1.3.- Reivindicaciones 14-16.

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de las reivindicaciones independientes 14 y 16 es, de nuevo, D01. En particular, este documento divulga un conjunto de parejas de cebadores dirigidos a amplificar en una reacción multiplex seis de los ocho loci de la presente solicitud, a saber: DXS6801, DXS6809, DXS6789, DXS10079, DXS10074 y DXS10075. Por lo tanto, D01 no incluye todas las características del conjunto de cebadores de la reivindicación 14, y lógicamente tampoco anticipa el uso de dicho conjunto de cebadores objeto de la reivindicación 16.

En base a lo anterior, la reivindicación independiente 14 y, por extensión, su reivindicación dependiente 15, así como la reivindicación independiente 16, cumplen todas ellas el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986).

Reivindicaciones 1-16.

Como ya se ha indicado, la diferencia entre D01 y el objeto definido en las reivindicaciones independientes 1, 8, 14 y 16 de la presente solicitud se basa en la no inclusión en D01 del locus DXS6799. Sin embargo, este marcador STR, y su uso para la obtención de perfiles genéticos aplicables en el ámbito de los análisis forenses o de genética de poblaciones, forman parte del estado de la técnica, tal y como queda reflejado en los documentos D02 ó D03. En particular, D02 se refiere al análisis de los polimorfismos de los loci DXS6799 y DXS7132 mediante PCR multiplex para obtener datos útiles en estudios forenses y de genética de poblaciones. Además, este documento menciona la proximidad existente entre los siguientes loci que formarían tentativamente dos bloques haplotípicos, a saber: DXS7132-DXS10074-DXS10075-DXS-10079 y DXS6809-DXS6789-DXS6799 (el estudio de D02 no incluye DXS 6801). Por su parte, D03 anticipa también el uso de DXS6799 y DXS7132 en reacciones de PCR multiplex, indicando que dichos marcadores son adecuados para llevar a cabo estudios genéticos de poblaciones gracias a sus polimorfismos y alta probabilidad de discriminación.

En base a lo anteriormente expuesto, se considera que, a la vista de la combinación, bien de los documentos D01 y D02, o D01 y D03, resultaría obvio para un experto en la materia poner en práctica el método de la reivindicación 1, así como llegar al diseño del kit y del conjunto de cebadores de las reivindicaciones 8 y 14 y al uso de dichos cebadores objeto de la reivindicación 16.

Por lo tanto, las reivindicaciones independientes 1, 8, 14 y 16 carecen de actividad inventiva en los términos del artículo 8.1 de la LP 11/1986.

Por otra parte, el diseño de cebadores específicos para los ocho loci STR, la optimización de las condiciones de la reacción de PCR multiplex para lograr la amplificación simultanea de los ocho marcadores obteniendo bandas discernibles correspondientes a amplicones de un tamaño máximo de 150-200 pares de bases, las técnicas de marcaje para la visualización de los productos de reacción, y los tipos de muestra biológica analizados, forman parte del conocimiento común en el sector técnico de la solicitud. Por ello, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-7, 9-13, 15 resultaría también obvio para el experto en la materia.

En consecuencia las reivindicaciones 2-7, 9-13, 15 carecen de actividad inventiva de acuerdo con lo establecido en el art. 8.1 de la LP 11/1986.

Los documentos D04 y D05 reflejan meramente el estado de la técnica y no se comentan a los efectos de la apreciación de la novedad y actividad inventiva de la solicitud.