

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 836**

21 Número de solicitud: 201132133

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

29.12.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.08.2013

Fecha de la concesión:

31.03.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO (100.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ DE PANCORBO GÓMEZ, María De Los
Ángeles;
ODRIOZOLA MARTÍNEZ, Adrián;
AZNAR OVIEDO, Jose María y
CELORRIO HERRERA, David**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE UN INDIVIDUO**

57 Resumen:

Método para la obtención del perfil genético de un individuo.

La invención se relaciona con un método para obtener el perfil genético de un individuo que comprende el análisis de 4 ó más loci hasta un total 21, en un extracto de ADN de dicho individuo mediante una reacción de amplificación PCR multiplex, en donde

a) al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317, y

b) al menos dos de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

La presente invención también contempla el kit que comprende las parejas de cebadores para la puesta en práctica de dicho método, siendo ambos útiles en la identificación de individuos en el área de la genética forense y de poblaciones, antropología y biomedicina.

ES 2 416 836 B1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE UN INDIVIDUO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se relaciona con un método para obtener el perfil genético de un individuo o resto biológico que comprende el análisis de 4 ó más loci STRs, hasta un total de 20 loci STRs más el locus amelogénico determinante del sexo (en total 21 loci), en un extracto de ADN de dicho individuo o resto mediante una reacción de amplificación PCR multiplex. Asimismo, la presente invención también se dirige a la producción de 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

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

Del mismo modo, a partir del análisis de dichos marcadores STRs se han ido creando bases de datos de perfiles genéticos en diferentes países del mundo. Dichas bases de datos permiten la utilización de los perfiles genéticos en investigación criminal así como la
25 utilización del conocimiento acumulado sobre los distintos loci STRs en diferentes grupos poblacionales, a la hora de cotejar los datos disponibles y estimar el poder de discriminación en cada caso cotejado.

Existe un amplio número de bases de datos de perfiles genéticos, entre ellas las más
30 relevantes son *Combined Index system* (CODIS) creada por el FBI, *Interpol Standard Set of Loci* (ISSL), *European Core loci* (ECL), *UK National Criminal Intelligence DNA Database* (NDNAD), *Extended European Standard Set* (ESS) y *German Core loci* (GCL). Todas las bases de datos incluyen un núcleo común de STRs (D18S51, D21S11, D3S1358,

D8S1179, FGA, TH01, vWA) aunque difieren en el número total y en algunos de los loci STRs incluidos en cada una de ellas (Tabla 1).

Tabla 1. Loci STRs incluidos en las principales bases de datos.

CODIS	ECL/NDNAD	ESS	GCL	ISSL
FBI	<i>European & UK</i>	<i>European Extended</i>	<i>German Core Loci</i>	<i>Interpol</i>
D18S51	D18S51	D18S51	D18S51	D18S51
D21S11	D21S11	D21S11	D21S11	D21S11
D3S1358	D3S1358	D3S1358	D3S1358	D3S1358
D8S1179	D8S1179	D8S1179	D8S1179	D8S1179
FGA	FGA	FGA	FGA	FGA
TH01	TH01	TH01	TH01	TH01
vWA	vWA	vWA	vWA	vWA
D16S539	D16S539	-	-	-
D13S317	-	-	-	-
CSF1PO	-	-	-	-
TPOX	-	-	-	-
D7S820	-	-	-	-
D5S818	-	-	-	-
-	D19S433	-	-	-
-	D2S1338	-	-	-
-	-	D10S1248	-	-
-	-	D12S391	-	-
-	-	D1S1656	-	-
-	-	D22S1045	-	-
-	-	D2S441	-	-
-	-	-	SE33	-

5

CODIS es la base de datos que más loci STRs incluye, un total de 13, además del locus amelogenina para la determinación del sexo. ECL y la base de datos del Reino Unido incluyen 10 loci STRs y amelogenina, el núcleo de 7 loci STRs junto con el D16S539 compartido con el CODIS y dos loci STRs adicionales D19S433 y D2S1338, además de recomendar el análisis de TPOX, incluido en el CODIS. ISSL incluye el núcleo universal de 7 loci STRs y considera opcional el análisis de amelogenina. Por último, GCL incluye el núcleo universal de 7 loci STRs, amelogenina y el locus SE33. Recientemente se ha recomendado el uso de 5 nuevos loci STRs (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391,

D22S1045) además del núcleo de 7 loci STRs por *la Extended European Standard Set* (ESS).

En la actualidad existen numerosas empresas que comercializan kits para la elaboración de
5 perfiles genéticos. Applied Biosystems® comercializa AmpFISTR® Identifiler® PCR
amplification kit (2004, Applied Biosystems®, Foster City, CA). Promega fabrica
PowerPlex™ 16 (2004, Promega® Corporation, USA). Mediante estos kits puede
alcanzarse una probabilidad de coincidencia entre los perfiles genéticos de dos individuos
de alrededor de uno entre un trillón, tras el análisis de 15 regiones STRs. Ambos kits
10 incluyen los 13 loci del CODIS; en el caso de Identifiler® incluye además los loci
autosómicos D2S1338 y D19433, y Powerplex™ 16 incluye los loci autosómicos Penta E
y Penta D.

Recientemente se han desarrollado otros nuevos kits comerciales AmpFISTR® NGM™
15 Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), PowerPlex® ES X y
PowerPlex® ES Y (Promega® Corporation, USA), Investigator ESSplex Kit (Qiagen,
(Valencia, California, U.S.A.) dirigidos especialmente a analizar los 5 nuevos loci
recomendados por la EDNAP (*European DNA Profiling Group*) and ENFSI (*European
Network of Forensic Science Institutes*).

20

Uno de los principales inconvenientes de éstos y otros kits actualmente disponibles en el
mercado es su falta de capacidad para amplificar la totalidad de los loci STRs que se
incluyen en el conjunto de las principales bases de datos. Este problema dificulta la
comparación de los perfiles obtenidos mediante estos kits comerciales y los registrados en
25 las diferentes bases de datos haciendo en muchos casos ineficaz dicha comparación al no
obtenerse una probabilidad de coincidencia suficiente (ver Tabla 9 de los Ejemplos).

En este contexto han surgido numerosas solicitudes de patentes relacionadas con la
obtención de perfiles genéticos mediante el análisis simultáneo de varios loci STRs, que
30 describen nuevos métodos de obtención de perfiles genéticos cada vez más discriminativos
basados en el análisis de nuevos STRs además de incluir algunos de los loci STRs
utilizados hoy día.

La solicitud de patente US6090558 describe el uso de la espectrometría de masas para detectar la variación de longitud en repeticiones de secuencias de nucleótidos, tales como microsátélites y repeticiones cortas en tándem, y cebadores de ADN para el análisis de polimorfismos en repeticiones de nucleótidos en tándem en loci específicos.

5

Tanto la solicitud de patente US6479235 como la patente ES2273367 describen la detección de loci genéticos, más específicamente, la amplificación simultánea de múltiples loci genéticos polimórficos diferentes utilizando la reacción en cadena de la polimerasa u otros sistemas de amplificación para determinar los alelos de cada locus. Los loci genéticos
10 amplificados comprenden HUMvWFA31, HUMLIPOL, HUMBFXIII, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMTH01, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D22S683, D20S481, D19S253, D17S1299, D17S1298, D16S753, D16S539, D16S490, D14S562, D14S548, D14S118, D13S317, D10S1239, D9S930, D7S820, D5S818, D4S2368, D3S1539. Aunque integra un alto número de loci STRs, incluye únicamente 8 de los 13 loci objeto del CODIS, y 3 de
15 los 10 loci incluidos en la base de datos europea, lo que disminuye su rendimiento en cuanto a comparación de los resultados obtenidos con los millones de perfiles genéticos disponibles en las bases de datos existentes.

La solicitud de patente US6479235 describe métodos y materiales para la amplificación
20 simultánea de, al menos, 13 STRs del CODIS en una reacción multiplex cuyos tamaños de amplificado exceden las 360 pb.

La solicitud de patente US2003/0186272 describe un método rápido para determinar la longitud de los fragmentos de los alelos presentes en una pluralidad de loci en una muestra
25 que contiene ADN que comprende: (a) obtener una muestra que contiene ADN, b) amplificar mediante PCR multiplex los loci FGA, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11 (la reacción PCR multiplex se lleva a cabo empleando una pluralidad de parejas de cebadores, donde al menos un cebador de cada pareja de cebadores está marcado con una etiqueta
30 detectable, y la amplificación produce una mezcla de amplicones marcados), y (c) analizar por electroforesis dicha mezcla de amplicones, para determinar la longitud de los fragmentos de los alelos en dicha pluralidad de loci de la muestra que contiene ADN.

Actualmente la obtención de perfiles genéticos mediante el análisis de loci STRs autosómicos plantea el problema técnico del escaso éxito de la mayoría de las reacciones para resolver casos de parentesco complejo en los que por falta de un progenitor, o por ser un parentesco lejano, el reducido número de STRs analizados en los diferentes kits hace
5 que la probabilidad de parentesco obtenida resulte insuficiente para determinar con seguridad el grado de parentesco. En estos casos se hace necesario un nuevo análisis de los individuos con otros kits de STRs autosómicos y STRs sexuales (STRs del cromosoma X y del cromosoma Y) con el fin de aumentar el número de STRs analizados para alcanzar una probabilidad suficiente o para descartar el parentesco.

10

Por lo tanto, el estado de la técnica revela la necesidad de desarrollar un nuevo método para obtener perfiles genéticos de loci STRs, que supere los inconvenientes de los actualmente existentes.

15 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

El establecimiento de bases de datos de perfiles genéticos basados en loci STRs proporciona una herramienta de gran relevancia para la resolución de casos forenses en el ámbito criminal o la determinación del parentesco entre individuos.

20

En la actualidad existen numerosas empresas que comercializan kits para la elaboración de perfiles genéticos, pero ninguno de ellos permite analizar la totalidad de los loci STRs incluidos en las principales bases de datos usadas en la identificación de individuos como son CODIS, NDNAD, ECL, ISSL, ESS y GCL. Para solventar este problema los
25 inventores han diseñado nuevas parejas de cebadores dirigidas a amplificar cada uno de los loci incluidos en las mencionadas bases de datos, como son CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, FGA, D22S1045 y D10S1248, con la característica técnica adicional de que, si se desea, pueden emplearse simultáneamente en
30 combinaciones de 4 o más parejas de cebadores en una reacción de amplificación multiplex para obtener un perfil genético compuesto de hasta 20 loci STRs más el locus amelogenina de determinación del sexo (lo que hacen un total de 21 loci), incluyendo entre ellos la totalidad de los loci de las bases de datos más comúnmente empleadas en la

identificación de individuos. Esta característica de las parejas de cebadores de la invención permite su empleo en casos de determinación de parentesco complejo y evita el análisis de los individuos con varios kits comerciales con el fin de analizar todos los STRs incluidos en las bases de datos de identificación de individuos, lo que disminuye el coste de la
5 identificación genética.

Tal como se muestra en el Ejemplo 1, el diseño de las parejas de cebadores de la presente invención se realizó mediante una búsqueda de las secuencias flanqueantes a cada locus STR y posteriormente se diseñaron los cebadores empleando el programa Perlprimer. Una
10 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.

15

Así, en un primer aspecto, 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 del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656,
20 TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248, en donde

- a) Al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317, y
- b) Al menos dos de los 4 loci se seleccionan del grupo formado por los loci STRs
25 D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un método según la presente invención para identificar un individuo, determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende parejas de cebadores específicas para amplificar al menos 4 loci seleccionados del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179,

D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248, en donde

- a) Al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317; y
- 5 b) Al menos dos de los 4 loci se seleccionan del grupo formado por los loci STRs D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la invención para obtener el perfil genético de un individuo, para identificar un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un conjunto de parejas de cebadores que comprende, al menos, 4 parejas de cebadores dirigidas a amplificar 4 loci del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248, en donde

- a) Al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317; y
- 15 b) Al menos dos de los 4 loci se seleccionan del grupo formado por los loci STRs D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

El uso del conjunto de cebadores de la invención para obtener el perfil genético de un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos, para identificar restos humanos, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

25

Finalmente, 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 CSF1PO,
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus D5S818,
- 30 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus D7S820,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus D21S11,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus D2S441,
- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus D1S1656,

- SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para el locus TPOX,
- SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para el locus VWA,
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para el locus D8S1179,
- SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para el locus D19S433,
- 5 - SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 para el locus D12S391,
- SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 para el locus TH01,
- SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 para el locus D16S539,
- SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para el locus D3S1358,
- SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 para el locus D18S51,
- 10 - SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 para el locus D2S1338,
- SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 para el locus D13S317,
- SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 para el locus Amelogenina,
- SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para el locus FGA,
- SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 para el locus D22S1045, y
- 15 - SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 para el locus D10S1248.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** corresponde a un gráfico llamado electroferograma que muestra el perfil genético de un individuo obtenido de los loci analizados mediante el conjunto de cebadores de la invención empleando un analizador automático de secuencias *AB3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®)*. En la Figura se pueden observar 4 paneles, cada uno correspondiente a 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-FAM™ (dirigidos a los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441 y D1S1656), el segundo panel a los marcados con VIC™ (loci TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338), el tercero a 25 NED™ (loci TPOX, VWA, D8S1179, D19S433 y D12S391) y en el cuarto panel se muestran los resultados para los loci marcados con el fluorocromo PET® (D13S317, amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248). 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.

La **Figura 2** es una representación gráfica que muestra el diseño del conjunto de parejas de cebadores (denominado I-DNAE21). 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.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10

En la actualidad existen varias empresas que comercializan kits para la elaboración de perfiles genéticos, pero ninguno de ellos permite el análisis de la totalidad de los loci STRs incluidos en las bases de datos internacionales más importantes como son CODIS, NDNAD, ECL, ISSL, ESS y GCL. Para solventar esta carencia los inventores han diseñado unas parejas de cebadores dirigidas a amplificar cada uno de los loci STRs incluidos en las mencionadas bases de datos, como son CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, FGA, D22S1045 y D10S1248, con la característica técnica adicional de que, si se desea, las parejas de cebadores pueden emplearse simultáneamente en una reacción de amplificación multiplex en combinaciones de 4 o más parejas de cebadores para obtener un perfil genético compuesto de hasta 20 loci STRs más el locus amelogenina de determinación del sexo (lo que hacen un total de 21 loci analizados), estando todos los loci amplificados incluidos en las bases de datos más comúnmente empleadas en la identificación de individuos. Esta característica de las parejas de cebadores de la invención permite su empleo en casos de determinación de identificación y parentesco complejo, evitando además el análisis de los individuos con varios kits comerciales con el fin de analizar todos los STRs incluidos en las bases de datos de identificación de individuos, lo que disminuye el coste analítico. Dicha característica permite a esta invención tener un poder de discriminación y por consiguiente una probabilidad de coincidencia al azar netamente superior a cualquier kit existente actualmente en el mercado, posibilitando el cotejo de los perfiles genéticos obtenidos mediante su análisis, con los contenidos en las principales bases de datos y la aplicación de la invención a casos de parentesco complejos.

15
20
25
30

Así, mediante las parejas de cebadores diseñadas por los inventores de la presente invención, 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.

Definiciones

10

“un”/“una”

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa junto con el término “comprender” o “comprende” en las reivindicaciones y/o en la descripción puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

15

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 en posiciones características del material genético que permiten diferenciar a un individuo de otro.

20

Loci STRs

En la presente invención, el perfil genético se obtiene a partir del análisis de loci caracterizados por la repetición en tándem de una corta secuencia de bases STRs (del inglés *Short Tandem Repeats*) cuyo número de repeticiones es altamente variable entre individuos. Así, en la presente invención se entiende por “secuencias STRs” o “loci STRs” aquellas secuencias del ADN, también llamadas microsatélites, que contienen repeticiones de 4 pb (Butler JM, *Biotechniques*. 2007).

25

30

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 cigosidad 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.

5

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 2^n del número de fragmentos de ADN objeto de la amplificación.

15

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 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

- 5 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 en el extremo 3’ de cada hebra, de manera que se amplifica la secuencia de nucleótidos acotada mediante cada pareja de
- 10 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

- 15 En el contexto de la presente invención, se entiende por “muestra biológica” cualquier materia que contenga 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.

20 *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
- 25 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,
- 30 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 vivo o muerto.

Cebadores de la invención

5

Los inventores han diseñado unas parejas de cebadores, de aquí en adelante, “parejas de cebadores de la invención” o “I-DNAE21”, que permiten obtener el perfil genético de un individuo con un alto poder de discriminación y son aplicables incluso al análisis de parentesco complejo.

10

Las parejas de cebadores han sido diseñadas de manera que su uso en una reacción de amplificación multiplex permite obtener el perfil genético de un individuo que comprende la combinación de 4 hasta 20 loci STRs de la totalidad de los STRs (a excepción del marcador SE33) que forman parte de las principales bases de datos empleadas en la
15 identificación de individuos como son CODIS, NDNAD, ECL, ISSL, ESS y GCL, más el locus amelogenina de determinación del sexo (en total 21 loci)..

Los loci analizados en la presente invención así como las parejas de cebadores diseñadas para su identificación se muestran en la Tabla 2. En el Ejemplo 1 se detalla el
20 procedimiento seguido en el diseño del conjunto de parejas de cebadores de la invención.

Tabla 2. Resumen de las secuencias de los cebadores en dirección 5’ a 3’ diseñados para la amplificación de cada loci en la combinación denominada como I-DNAE21 (columna: secuencia 5’- 3’). En esta misma tabla se detalla del alelo menor al
25 mayor de los STRs que serán considerados mediante este análisis (columna: alelos) así como el tamaño máximo y mínimo posible para cada STR.

LOCUS	ALELOS	Tamaño de los amplificados (pb)	SEQ ID NO:	SECUENCIA (5-3’)
CSF1PO	6 -15	75 - 111	1	ACTGCCTTCATAGATAGAAGAT
			2	GCCCTGTTCTAAGTACTTCCT
D5S818	7 - 17	127 - 167	3	TTAATAGCAAGTATGTGACAAGG
			4	GACATTTGTATCTTTATCTGTATCCTT
D7S820	6 - 15	183 - 219	5	GAATTATAACGATTCCACATTTATCC
			6	ATAAAGGGTATGATAGAACACTTG

ES 2 416 836 B1

D21S11	24-38	240-296	7	CCCTGATTCTTCAGCTTGTA
			8	G CAGAGACAGACTAATAGGAGG
D2S441	9 - 16	305 - 333	9	CTCTGAAGAGATTCTTAAGACCC
			10	G TTCACTCTCCTTCCCAAATG
D1S1656	9 - 21	341 - 389	11	ATCCCCATATAAGTTCAAGCC
			12	G CTTTCAGGCATTTTCAGAGATTATG
TPOX	6 - 16	61-101	13	CTTAGGGAACCCTCACTG
			14	G CAGCGTTTATTTGCCCAA
VWA	11 - 24	121-173	15	TCAGTATGTGACTTGGATTGA
			16	G TAGGTTAGATAGAGATAGGACAGA
D8S1179	8 - 20	181-229	17	TTGTATTTTCATGTGTACATTCGT
			18	G TTGTGTTTCATGAGTATAGTTTCAC
D19S433	5.2-18.2	245-297	19	CATGTTGGCACATTCCCTG
			20	AGTTCTTTAGCAGTGATTTCTG
D12S391	14 - 27	305 - 357	21	CAAATTGTGATAGTAGTTTCTTCTGG
			22	G TTAGACCTGGACTGAGCC
TH01	5 - 14	57-93	23	AACACAGACTCCATGGTG
			24	GTTCCCTCCCTTATTTCCCT
D16S539	5 - 16	105-149	25	CCTCTTCCCTAGATCAATACA
			26	ATCTGTAAGCATGTATCTATCATC
D3S1358	9 - 20	161-205	27	TGTAGTGAGCTATGATTCCC
			28	GTATTCCCTGTGCCTTTG
D18S51	7 - 27	213-293	29	GTCTCAGCTACTTGCAGG
			30	G GAGATGTCTTACAATAACAGTTG
D2S1338	15 - 28	313 - 365	31	GGAGGTGCCTAAAGACTTC
			32	G CCTACCAGAATGCCAGTC
D13S317	5 - 17	72-120	33	CGCCTATCTGTATTTACAAATACAT
			34	G GACAGAAAGATAGATAGATGATTGAT
Amelogenina	X,Y	121-127	35	CCCTGGGCTCTGTAAAGA
			36	G GGCTTGAGGCCAACCAT
FGA	16-51.2	151-293	37	CTCACAGATTAAACTGTAACCA
			38	TTGTCTGTAATTGCCAGC
D22S1045	8 - 19	294 - 327	39	TCTGCATAAGACCCACTATG
			40	ATAGTGACAGTGCCTGTG
D10S1248	8 - 18	339 - 379	41	AGCTATTATTACCAAAGCATGAAC
			42	G TTCCAGTCCAACCTAGATCCT

Así, en un aspecto, 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 del grupo formado por los loci

5 CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179,

D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248, en donde

- a) Al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317; y
- 5 b) Al menos dos de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

En una realización particular, el conjunto de parejas de cebadores de la invención comprende, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 parejas de
10 cebadores específicas para los loci del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248.

- 15 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 CSF1PO,
 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus D5S818,
 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus D7S820,
 - 20 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus D21S11,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus D2S441,
 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus D1S1656,
 - SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para el locus TPOX,
 - SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para el locus VWA,
 - 25 - SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para el locus D8S1179,
 - SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para el locus D19S433,
 - SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 para el locus D12S391,
 - SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 para el locus TH01,
 - SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 para el locus D16S539,
 - 30 - SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para el locus D3S1358,
 - SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 para el locus D18S51,
 - SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 para el locus D2S1338,

- SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 para el locus D13S317,
- SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 para el locus Amelogenina,
- SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para el locus FGA,
- SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 para el locus D22S1045, y
- 5 - SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 para el locus D10S1248.

Uso de los cebadores de la invención

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

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,
15 pruebas de cigosidad en gemelos o mellizos, seguimiento de transplantes 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, la realización de estudios
poblacionales mediante la elaboración de bases de datos de frecuencias alélicas, y la
20 estimación de las tasas de pérdida alélica o tasas de mutación .

En otro aspecto, la invención se relaciona con 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.

25

Método de la invención

Tal como se ha explicado anteriormente, la presente invención está basada en el diseño de
parejas de cebadores que permiten obtener el perfil genético de un individuo basado en una
30 combinación de 4 o más loci que forman parte de las principales bases de datos usadas en
la identificación de individuos como son CODIS, NDNAD, ECL, ISSL, ESS y GCL.

Así, en un primer aspecto, 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 del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248, en donde

- a) Al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317, y
- 10 b) Al menos dos de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los STRs loci D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

Tal como se ha indicado anteriormente, las parejas de cebadores de la presente invención dirigidas a amplificar los STRs de las principales bases de datos empleadas en la identificación de un individuo, han sido diseñadas de tal manera que es posible emplearlas en el análisis de 4 o más, hasta un total de 20 loci STRs de los STR incluidos en dichas bases de datos, más el locus Amelogenina de determinación del sexo (dando lugar a un total de 21 loci analizados). 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, 8, 9, 10 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 loci de los loci STRs incluidos en las bases de datos antes mencionadas más el locus amelogenina de determinación del sexo.

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, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 loci del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248.

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

- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus CSF1PO,
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus D5S818,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus D7S820,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus D21S11,
- 5 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus D2S441,
- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus D1S1656,
- SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para el locus TPOX,
- SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para el locus VWA,
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para el locus D8S1179,
- 10 - SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para el locus D19S433,
- SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 para el locus D12S391,
- SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 para el locus TH01,
- SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 para el locus D16S539,
- SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para el locus D3S1358,
- 15 - SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 para el locus D18S51,
- SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 para el locus D2S1338,
- SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 para el locus D13S317,
- SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 para el locus Amelogenina,
- SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para el locus FGA,
- 20 - SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 para el locus D22S1045, y
- SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 para el locus D10S1248.

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. 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 identificar. En la presente invención, el término “restos humanos” incluye cualquier muestra biológica procedente de un ser

humano vivo o muerto, pudiendo estar dicho resto humano conservado en formol, congelado, desecado, fijado en parafina, en estado de descomposición, degradación y/o putrefacción, entre otros.

- 5 Ejemplos de muestras de las que se puede obtener ADN son, sin limitar a, fluidos biológicos (sangre, saliva, orina, espermatozoides, etc); epidermis, células epiteliales, 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 un individuo o de restos humanos incluyen, entre otros, pelos con raíz, hueso compacto, 10 diente, tejidos blandos y sangre.

En una realización particular, el extracto de ADN procede de una muestra de sangre, pelo, saliva, epidermis, espermatozoides, células epiteliales, una muestra vaginal y una muestra de tejido,

- 15 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.

20

- 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.*, 25 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 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 de diatomeas o lechos de cristal, empleando kits comerciales, por ejemplo, los kits "Q-Biogene fast DNA kit" o el 30 "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 las solicitudes de patente US5.057.426, US4.923.978 y la solicitud de patente europea EP0512767A1.

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.

Tras obtener el extracto de ADN de la muestra biológica, éste es sometido 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 de la invención. 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 3.

20

Tabla 3. 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 I-DNAE21.

25

LOCUS	SEQ ID NO	Intervalo Concentración de cebadores (μM)	Concentración de cebadores (μM)	Marcaje fluorescente
CSF1PO	1	0,03 – 0,45	0,10	6-FAM
	2			
D5S818	3	0,06 – 0,3	0,11	
	4			
D7S820	5	0,07-0,3	0,14	
	6			
D21S11	7	0,07-0,24	0,14	

	8			
D2S441	9	0,15-1,05	0,41	NED
	10			
D1S1656	11	0,12-0,4	0,31	
	12			
TPOX	13	0,03-0,19	0,08	
	14			
VWA	15	0,03-0,21	0,12	
	16			
D8S1179	17	0,03-0,37	0,17	
	18			
D19S433	19	0,09-0,6	0,14	
	20			
D12S391	21	0,03-0,18	0,11	
	22			
TH01	23	0,03-0,19	0,08	VIC
	24			
D16S539	25	0,05-0,34	0,10	
	26			
D3S1358	27	0,03-0,33	0,11	
	28			
D18S51	29	0,1-1,05	0,34	
	30			
D2S1338	31	0,03-0,3	0,07	
	32			
D13S317	33	0,06-0,25	0,10	
	34			
Amelogenina	35	0,03-0,25	0,14	
	36			
FGA	37	0,1-0,9	0,30	PET
	38			
D22S1045	39	0,10-0,52	0,19	
	40			
D10S1248	41	0,12-0,33	0,22	
	42			

5 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), cloruro de magnesio (MgCl₂), tampón de reacción y aditivos opcionales, que pueden

añadirse por separado mezclándose en el laboratorio o adquirir previamente mezclados, como es el caso de Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA) o Kapa2GTMFast Multiplex PCR kit (Kapa Biosystems, Inc., USA), al que se le añaden las parejas de cebadores en las concentraciones adecuadas y el ADN molde.

5

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.

10 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: 42 (Tabla 1) es desde 57 a 63°C según lo calculado mediante el programa informático Perlprimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>).

15 La amplificación multiplex del conjunto de parejas de cebadores (Tabla 2) ofrece resultados satisfactorios en un amplio rango de temperaturas de fusión, entre 57-63°C, aunque los mejores resultados se obtienen a 60,5°C. De igual manera, los cebadores ofrecen resultados en un amplio rango de concentraciones, aunque las concentraciones óptimas para cada pareja de cebadores se recogen en la Tabla 2. Respecto al número de
20 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.

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
25 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
30 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, 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 que, 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, 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.

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del método de la invención para identificar un individuo, determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

10 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 contenidos en las principales bases de datos empleadas en la identificación de individuos.

15

Así, en otro aspecto, 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 seleccionados del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248, en donde

20

a) Al menos uno de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317; y

25

b) Al menos dos de los 4 loci se selecciona del grupo formado por los loci STRs D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 y D10S1248.

30

En una realización particular, el kit de la invención comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 parejas de cebadores específicas para los loci del grupo formado por los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248.

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 analizados es la pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias

- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus CSF1PO,
- 5 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus D5S818,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus D7S820,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus D21S11,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus D2S441,
- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus D1S1656,
- 10 - SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para el locus TPOX,
- SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para el locus VWA,
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para el locus D8S1179,
- SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para el locus D19S433,
- SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 para el locus D12S391,
- 15 - SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 para el locus TH01,
- SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 para el locus D16S539,
- SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para el locus D3S1358,
- SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 para el locus D18S51,
- SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 para el locus D2S1338,
- 20 - SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 para el locus D13S317,
- SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 para el locus Amelogenina,
- SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para el locus FGA,
- SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 para el locus D22S1045, y
- SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 para el locus D10S1248.

25

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 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

30 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 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
5 estos reactivos se encuentran previamente mezclados en el reactivo Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

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
10 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
15 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
20 necesarios para marcar las parejas de nucleótidos o, 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
25 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),
30 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, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para obtener el perfil genético de un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

5

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

EJEMPLOS

10

En los ejemplos siguientes se realiza la validación de I-DNAE21, para su uso en identificación humana y casos de parentesco y se demuestra a su vez sus ventajas frente a las técnicas actuales.

15 **Ejemplo 1.** En el primer ejemplo se detalla la optimización de los conjuntos de cebadores y de los parámetros de las reacciones de PCR, estudios de concordancia con otras STRs multiplex,

Ejemplo 2. En el segundo ejemplo, se realiza un caso práctico de de identificación, con el
20 objetivo de demostrar que la invención es adecuada para su uso en identificación humana.

Ejemplo 3. En el tercer ejemplo, se realiza un caso práctico de parentesco en ausencia de un progenitor, con el fin de demostrar la alta capacidad discriminativa de la invención y determinar la probabilidad de parentesco en casos de parentesco humano complejos.

25

EJEMPLO 1

Validación del método de la invención que comprende una reacción de amplificación multiplex empleando los conjuntos de parejas de cebadores I-DNAE21 para su uso en identificación humana

30

A continuación se describe la validación de I-DNAE21 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 con otras STRs multiplex. Los resultados obtenidos mostraron que I-DNAE21 es una herramienta adecuada para la obtención de perfiles genéticos humanos.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras control de ADN humano

Se utilizaron los ADN controles 9947A del kit AmpFISTR® YFiler (Applied Biosystems, Foster City, CA), Control DNA 007 (Applied Biosystems, Foster City, CA), K562
 10 (Promega® Corporation, USA) y Control DNA 2800M (Promega Corporation, USA) para poner a punto las condiciones de PCR y realizar ensayos de sensibilidad. Estas tres muestras se cuantificaron mediante Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con las especificaciones del fabricante
 15 y fueron diluidas a 1 ng/μl.

Muestras de la población

Se tomaron muestras de sangre periférica de 600 individuos sanos: 318 caucosoides europeos (País Vasco, España) y 282 individuos de Colombia (133 negroides y 149
 20 hispanos).

Extracción de ADN y cuantificación

Los extractos de ADN de los individuos de origen caucoside se obtuvieron mediante lisis proteolítica con proteinasa K y extracción orgánica. Los extractos de ADN procedentes de
 25 las muestras biológicas de los individuos de origen negroide e hispano se obtuvieron mediante extracción por QiAamp DNA Micro Kit (Qiagen, CA). Todos los extractos de ADN se cuantificaron con PicoGreen® (Invitrogen).

Optimización del conjunto de cebadores

30 Se utilizó el programa Perlprimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) para diseñar nuevos cebadores que amplifican 20 loci STRs (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D2S1338,

D2S441, D1S1656, D12S391, D22S1045 Y D10S1248) más amelogenina, en base a las secuencias de referencia cuyos números de acceso a Genbank se recogen en la Tabla 4.

Las regiones flanqueantes a los loci analizados se estudiaron mediante SNPblast
 5 (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 49 hasta 389 pb, para abarcar un amplio número de los alelos contenidos en STRBase website [Ruitberg, C.M., D.J. Reeder, y J.M. Butler, 2001. *Nucleic Acids Res*, **29**(1): 320-2]

10

La intensidad de los amplicones y la ausencia de inespecíficos de cada locus se evaluó mediante el análisis de los productos de PCR por DHPLC con un DNasep Cartridge (Transgenomic® WAVE® System 4500, Glasgow, UK). 10 µl de amplificado fueron migrados a 40°C en un gradiente lineal desde 38,6 a 61,1 % de tampón B (25 % de
 15 acetoniitrilo y TEAA 0,1 M) durante 10 minutos.

Para evitar la adenilación incompleta se utilizó la adición de una guanina al extremo 5' del cebador inverso, (Brownstein, M.J., J.D. Carpten, and J.R. Smith, 1996. *Biotechniques*, **20**(6): 1004-6, 1008-10; Hill CR, B.J., Valone PM, 2009. *J Forensic Sci*, **54**(5): 7; Butler,
 20 J.M., Y. Shen, and B.R. McCord, 2003. *J Forensic Sci*, **48**(5): 1054-64).

Amplificación de PCR, electroforesis y análisis de datos

Se emplearon 12,5 µl de Multiplex PCR Kit Plus de Qiagen® (Qiagen, Valencia, CA), 5 µl
 25 de la mezcla de cebadores, 6,5 µl de H₂O mQ esteril y 1 µl de ADN molde (1 ng / µl). Las concentraciones de cada pareja de cebadores se detallan en la Tabla 3. Se analizó el rendimiento de la amplificación en diferentes termocicladores: Biorad™ ICycler, C1000™ y Mycycler™ (BioRad, Hercules, CA) y GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), así como en diferentes condiciones de temperaturas de
 30 hibridación (“annealing temperature”): 57 °C, 58,9 °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 analizaron 2 µl de cada producto de amplificado mezclados con 9 µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems®, Foster City, CA) y 0,5 µl de GeneScan™ 500

LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Tras la desnaturalización de los amplificadores (6 minutos a 95 °C) se enfriaron (4 minutos a 4 °C) y se separaron en un ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Los resultados de la electroforesis fueron analizados mediante el software Genmapper versión 5 4.0 (Applied Biosystems[®], Foster City, CA).

Estudios de concordancia con otras STRs multiplex

Se compararon perfiles genéticos analizados con I-DNAE21, Identifiler[®] y NGM[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para su análisis mediante I-DNAE21 se empleó 10 ng de ADN molde de cada individuo. El análisis mediante Identifiler[®] y NGM[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA) se realizó según las condiciones óptimas sugeridas por el fabricante.

RESULTADOS

15 *Optimización de los conjuntos de cebadores*

La Tabla 4 recoge un amplio rango de alelos para cada locus incluido en I-DNAE21. Se han considerado los alelos descritos en los principales grupos poblacionales según la información recogida en STRbase [Ruitberg, C.M., D.J. Reeder, y J.M. Butler,2001. *Nucleic Acids Res*, **29**(1): 320-2].

20

Tabla 4

Locus	Nº acceso Genbank	Intervalo alelos	Fragmento de PCR (pb)	Concentración de cebadores (µM)	Marcador fluorescente
CSF1PO	X14720	6-15	75 – 111	0,10	6-FAM™
D5S818	AC008512	7-17	127 -167	0,11	
D7S820	AC004848	6-15	183 – 219	0,14	
D21S11	M84567	24 - 38	240 – 296	0,14	
D2S441	AC079112	9-16	305-333	0,41	
D1S1656	G07820	9-21	341-389	0,31	
TPOX	M68651	6-16	61-101	0,08	NED™
vWA	M25858	11-24	121 – 173	0,12	
D8S1179	AF216671	8-20	181 – 229	0,17	
D19S433	G08036	5,2 - 18,2	245 – 297	0,14	
D12S391	G08921	14-27	305-357	0,11	

TH01	D00269	5-14	57 – 93	0,08	VIC™
D16S539	AC024591	5-16	105 – 149	0,10	
D3S1358	NT_005997	9-20	161 – 205	0,11	
D18S51	AP001534	7-27	213 – 293	0,34	
D2S1338	AC010136	15-28	313-365	0,07	
D13S317	AL353628	5-17	72-120	0,10	PET®
Amelogenina	Sullivan <i>et al.</i> *	X, Y	121,127	0,14	
FGA	M64982	16 - 51,2	151 – 293	0,30	
D22S1045	AL022314	8-19	294-327	0,19	
D10S1248	AL391869	8-18	339-379	0,22	

* Sullivan KM, *et.al.* 1993. *Biotechniques*,15(4):636-8,640-1.

Se diseñaron 132 cebadores de entre los que se eligieron aquellos capaces de producir amplificados del menor tamaño posible, que en ningún caso excedieran de 400 pb, cuyas 5 temperaturas de fusión (“*melting temperature*”) estuvieran comprendidas entre 57,8°C y 62,4°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/>). En la primera fase de optimización se efectuaron 10 amplificaciones PCR singleplex de cada locus. Los productos PCR fueron analizados mediante DHPLC para evaluar la especificidad de los cebadores y la intensidad de amplificación. En la segunda fase de optimización, se ensayaron diversos conjuntos de cebadores en multiplex. Se espaciaron 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. El análisis mediante DHPLC permitió evaluar 15 la ausencia de inespecíficos y la eficacia de la amplificación para cada uno de los loci ensayados en formato multiplex.

Finalmente, se seleccionó una reacción de PCR sextaplex (sextaplex A: CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441 y D1S1656) y 3 reacciones de PCR quintuplex (quintuplex B: 20 TH01, D16S539, D3S1358, D18S51 y D2S1338; quintuplex C: TPOX, vWA, D8S1179, D19S433 y D12S391 y quintuplex D: D13S317, amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248).

Los cebadores directos de la reacción sextaplex A se marcaron con el marcador 25 fluorescente 6-FAM™, y los cebadores directos de las reacciones quintuplex B, C y D,

fueron marcados con VIC™, NED™ y PET® respectivamente (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Tabla 4). Por último, se agruparon los distintos conjuntos de cebadores en una única reacción de PCR multiplex que permite la amplificación de 20 loci STRs y amelogenina. En la **Figura 2** se representa el resultado final de la estrategia en el diseño de
 5 cebadores para I-DNAE21.

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 21 loci: 20 loci STR (CSF1PO, D10S1248, D1S1656, D12S391, D13S317,
 10 D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX y vWA) más el locus amelogenina.

Optimización de los parámetros de PCR

La optimización de los parámetros de amplificación tales como la concentración óptima de
 15 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.

En primer lugar, la concentración de cada pareja de cebadores fue testada entre 0,0375 µM
 20 y 1,5 µM, 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 y de la adenilación incompleta, como de la intensidad de los artefactos en I-DNAE21 (FAM71, FAM92, FAM165, VIC85,
 25 VIC92, VIC108, NED107, NED128, NED171, PET103 y PET154).

En este sentido, las intensidades de los loci analizados mediante I-DNAE21 se equilibró alrededor de 1000 RFUs en el análisis de 1 ng de ADN, para alcanzar un equilibrio entre la intensidad de la señal y la ausencia de solapamiento entre las señales correspondientes a
 30 diferentes fluorocromos. (**Figura 1**)

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 tanto de la adenilación incompleta, como de la altura de los picos. Los mejores resultados se obtuvieron a la temperatura de hibridación de 60,5 °C.

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, incluso mejor que la adición de *pig-tailing*. La adición de dicha guanina se representa como una **G** en la **Tabla 2**.

10

Cabe destacar también que, el empleo de los termocicladores Biorad™ ICycler, C1000™ y Mycycler™ (BioRad, Hercules, CA) y GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) no reveló variaciones significativas en cuanto a la calidad de los resultados obtenidos.

15

Tras la evaluación de todos los parámetros anteriormente mencionados, se llegó a determinar la concentración óptima de cebadores, de tal forma que se obtuvieron las siguientes intensidades medias para cada color en el análisis de 1 ng de ADN de I-DNA1 [6-FAM™ (702 ± 118 RFUs), VIC™ (725 ± 194 RFUs), NED™ (895 ± 140 RFUs) y PET® (842 ± 95 RFUs)].

20

De esta manera, I-DNAE21 ha demostrado ser una reacción multiplex balanceada y específica, capaz de amplificar 20 loci STRs, además del locus amelogenina, a partir de 1 ng de ADN molde (**Figura 1**), mediante las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 90 s a 60,5 °C y 30 s a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de extensión final de 30 minutos a 60 °C.

25

Estudios de concordancia con otras STRs multiplex

Los estudios de concordancia se llevaron a cabo mediante la comparación de 2430 *allele calls* obtenidos por I-DNAE21 e Identifiler® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la comparación de 665 *allele calls* obtenidos mediante I-DNAE21 y NGM® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se eligieron Identifiler® y NGM® (Applied Biosystems, Foster City, CA) por ser estos sistemas ampliamente utilizados [Hill, C.R., *et al.*, 2007. J

30

Forensic Sci, **52**(4): 870-3] y validados [Collins, P.J., *et al.*, 2004. J Forensic Sci, **49**(6): 1265-77]. Entre los resultados obtenidos por I-DNAE21 e Identifiler® se encontró una única discordancia lo que supone una concordancia del 99,9% entre estos sistemas. Dicha discordancia correspondió a un individuo genotipado como homocigoto (15/15) para
5 D3S1358 mediante Identifiler® y como heterocigoto (12/15) mediante I-DNAE21. La muestra fue analizada por triplicado por ambos sistemas con idénticos resultados. En la comparación de I-DNAE21 y NGM® (Applied Biosystems, Foster City, CA) no se encontraron discordancias, lo que supone una concordancia del 100% entre ambos sistemas.

10

DISCUSIÓN

A continuación se discuten los resultados relativos a la validación de I-DNAE21 en los
15 ensayos de optimización del conjunto de cebadores, optimización de parámetros de PCR, y estudios de concordancia.

I-DNAE21 ha demostrado ser una reacción multiplex balanceada y específica, capaz de amplificar 20 loci STRs además del locus amelogenina.

20

De este modo I-DNAE21 es la única reacción capaz de analizar de manera simultánea la totalidad de los loci STRs del CODIS, ECL, NDNAD y ESS, incluyendo además los 5 STRs recomendados por la EDNAP (*European DNA Profiling Group*) and ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*). Además, al ser la única reacción que
25 permite el análisis de 20 loci STRs aporta una probabilidad de discriminación superior a todas las reacciones multiplex existentes hasta la fecha.

La fiabilidad de I-DNAE21 ha sido comprobada mediante estudios de concordancia entre los perfiles genéticos determinados por este sistema y los obtenidos mediante sistemas
30 preexistentes ampliamente utilizados como son Identifiler® y NGM®(Applied Biosystems, Foster City, CA). En este sentido en primer lugar se constató una concordancia del 99,9 % entre I-DNAE21 e Identifiler® (Applied Biosystems, Foster City, CA), donde la única excepción se detectó en un individuo, genotipado como homocigoto

por Identifiler® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y como heterocigoto por I-DNAE21. Así mismo, se constató la concordancia del 100 % de I-DNAE21 respecto a NGM® (Applied Biosystems, Foster City, CA)

5 La discordancia hallada es similar a las habitualmente encontradas tras el análisis de idénticos STRs con sistemas que emplean diferentes parejas de cebadores (Hill, C.R. et al., 2007. J Forensic Sci, 2007. 52(4): 870-3). Discordancias similares reportadas en otros estudios se debieron a la presencia de mutaciones que probablemente coincidían con la región de unión del extremo 3' de uno de los cebadores mientras que las variaciones en el tamaño de alelos probablemente se debieron a la presencia de inserciones y/o deleciones en la región flanqueante a la repetición STR [Budowle, B., et al., 2008. Int J Legal Med, 122(5): 421-7; Zhai, X.D., et al., 2009., Int J Legal Med, 124(5):457-8]. Dichas mutaciones impiden la amplificación de uno de los alelos y en consecuencia originan pérdidas alélicas. En este sentido, los perfiles genéticos obtenidos mediante I-DNAE21 mostraron una alta fiabilidad.

En conclusión, la presente validación ha puesto de manifiesto que I-DNAE21 constituye un sistema de elevada robustez y fiabilidad en la obtención de perfiles genéticos, lo que lo convierte en una herramienta útil para su utilización en identificación humana. Así mismo, el reducido tamaño de sus amplificadores menores en su totalidad a 389 pb, sugiere que la presente invención posee una elevada capacidad de análisis de loci incluidos en las principales bases de datos nacionales como son CODIS, NDNAD, ECL y ESS incluso en muestras cuyo ADN pueda estar degradado

25

EJEMPLO 2

Aplicación del conjunto de cebadores de I-DNAE21 en un caso práctico de identificación humana

30

A continuación se describe la validación de I-DNAE21 para su uso en identificación humana. Dicha validación ha consistido en el análisis de una muestra mediante el conjunto de cebadores de I-DNAE21 con la finalidad de obtener su perfil de identificación genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras control de ADN humano

- 5 Se utilizó el ADN control 9947A del kit AmpFISTR[®] YFiler (Applied Biosystems, Foster City, CA) como control positivo de amplificación.

Como control negativo de amplificación se utilizó H₂O mQ estéril (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU).

10

Muestras de análisis

Se tomaron muestras de saliva mediante el frotis de la mucosa bucal con un hisopo estéril a un individuo sano de origen caucasoide.

15 *Extracción de ADN y cuantificación*

La extracción de ADN de los hisopos de saliva se realizó mediante el sistema de extracción QiAamp DNA Micro Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

Todos los extractos de ADN se cuantificaron con Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

20

Amplificación de PCR, electroforesis y análisis de datos

- La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp[®] 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para ello se emplearon 12.5µl de Multiplex PCR Kit Plus de Qiagen[®] (Qiagen, Valencia, CA), 5 µl de la mezcla de cebadores de I-DNAE21, 6.5 µl de H₂O mQ estéril y 1 µl de ADN molde (1ng / µl) mediante las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 90 s a 60,5 °C y 30 s a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de extensión final de 30 minutos a 60 °C.

- 30 Se analizaron 2 µl de cada producto de amplificado mezclados con 9 µl de Hi-Di[™] Formamide (Applied Biosystems[®], Foster City, CA) y 0,5 µl de GeneScan[™] 500 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Tras la desnaturalización de los amplificados (6 minutos a 95 °C) se enfriaron (4 minutos a 4 °C) y se separaron en un ABI

PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Los resultados de la electroforesis fueron analizados mediante el software Genmapper versión 4.0 (Applied Biosystems®, Foster City, CA).

5

Cálculos de probabilidad

Se realizó el cálculo de la probabilidad de coincidencia por azar, según la base de datos del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses ofrecidas en el ejercicio de intercomparación del 2011 del Grupo de Habla Española y Portuguesa de la *International Society for Forensic Genetics* (GHEP-ISFG).

10

RESULTADOS

15 La Tabla 5 recoge el perfil genético de un individuo obtenido mediante la amplificación con I-DNAE21, electroforesis y el análisis de datos del individuo analizado.

Tabla 5

Loci	Muestra	
	Alelo 1	Alelo 2
Amelogenina	X	X
CSF1PO	11	12
D10S1248	12	18
D12S391	16	20
D13S317	11	14
D16S539	10	11
D18S59	16	16
D19S433	14	14
D1S1656	16	17.3
D21S11	29	30
D22S1045	11	12
D2S13338	16	17
D2S441	10	14

D3S1358	15	15
D5S818	11	13
D7S820	9	11
D8S1179	14	15
FGA	18	22
TH01	6	6
TPOX	8	8
VWA	17	17

El perfil genético de la muestra analizada mediante I-DNAE21 ha mostrado una probabilidad de coincidencia por azar, según los cálculos realizados con la base de datos del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses ofrecidas en el ejercicio de intercomparación del 2011 del GHEP-ISFG de 2,8188 E-30. Este valor de coincidencia por azar indica que de ser hallado este perfil es 354753 cuatrillones de veces más probable que pertenezca al individuo analizado que a otro individuo tomado al azar en la población.

DISCUSIÓN

A continuación se discute los resultados obtenidos para la validación de I-DNAE21 en su uso en identificación humana.

Mediante el uso de I-DNAE21 se ha obtenido un valor de probabilidad de coincidencia de 2,8188 E-30, dicho valor resulta sobradamente discriminativo y demuestra por tanto la aplicabilidad de I-DNAE21 para la identificación humana.

La probabilidad de coincidencia se define como la probabilidad de que dos personas elegidas al azar en una población determinada tengan el mismo perfil genético.

La probabilidad complementaria es la probabilidad de discriminación, que a su vez se define como la probabilidad de que dos personas elegidas al azar en una población determinada tengan distinto perfil genético. La suma de la probabilidad de coincidencia y de la probabilidad de discriminación, al ser sucesos complementarios, es 1. Por tanto a menor probabilidad de coincidencia mayor poder de discriminación.

En este sentido cuanto mayor número de marcadores STR altamente polimórficos se analicen menor es la probabilidad de coincidencia y por tanto mayor su probabilidad de discriminación.

- 5 En la actualidad, y como se puede observar en la Tabla 9, I-DNAE21 es el kit que permite la amplificación simultánea de un mayor número de STR. Por ello I-DNAE21 es el kit que ofrece una menor probabilidad de coincidencia y por tanto un mayor poder de discriminación (Tabla 6).

10 **Tabla 6**

Kits STR Multiplex	Probabilidad de Coincidencia		
	Afro-americanos	Caucásicos	Hispanos
I-DNAE21	5,54E-25	5,02E-24	3,89E-24
ESSplex SE kit	8,17E-22	2,35E-21	3,15E-21
NGM Select	8,17E-22	2,35E-21	3,15E-21
Powerplex ESI-17	8,17E-22	2,35E-21	3,15E-21
Powerplex ESX-17	8,17E-22	2,35E-21	3,15E-21
Powerplex 16	7,04E-19	5,46E-18	3,40E-18
Identifiler	1,08E-18	7,94E-18	2,57E-18
Invest Idplex	1,08E-18	7,94E-18	2,57E-18
Invest Nonaplex ESS	1,27E-17	8,38E-18	2,54E-17
I-DNA1	4,77E-17	2,51E-16	8,09E-17
Invest Decaplex SE	1,59E-15	3,72E-15	2,08E-15
I-DNA2	5,03E-14	1,88E-13	1,02E-13
Bioplex-11	5,34E-13	1,01E-12	1,35E-12
Q8	2,48E-11	1,32E-11	1,68E-11
Minifiler	6,70E-11	1,36E-10	5,74E-11

Estos datos reflejan objetivamente la aplicabilidad y superioridad de I-DNAE21 frente a los kits STR multiplex actualmente existentes en el mercado, en su utilización para la
 15 identificación humana.

EJEMPLO 3

Aplicación del conjunto de cebadores de I-DNAE21 en un caso práctico de parentesco en ausencia de un progenitor

5

A continuación se describe la validación de I-DNAE21 para su uso en la determinación de relaciones de parentesco entre individuos. Dicha validación ha consistido en el análisis de dos muestras mediante el conjunto de cebadores de I-DNAE21 con la finalidad de
10 determinar la supuesta relación de maternidad biológica entre los individuos analizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras control de ADN humano

15 Se utilizó el ADN control 9947A del kit AmpFISTR[®] Yfiler (Applied Biosystems, Foster City, CA) como control positivo de amplificación.

Como control negativo de amplificación se utilizó H₂O mQ esteril (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU).

20

Muestras de análisis

Se tomaron muestras de saliva mediante el frotis de la mucosa bucal con hisopos estériles a dos individuos sanos (supuesta madre e hija) de origen caucasoide.

25 *Extracción de ADN y cuantificación*

La extracción de ADN de los hisopos de saliva se realizó mediante el sistema de extracción QiAamp DNA Micro Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

Todos los extractos de ADN se cuantificaron con Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Assay
30 Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Amplificación de PCR, electroforesis y análisis de datos

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para ello se emplearon 12,5 µl de Multiplex PCR Kit Plus de Qiagen® (Qiagen, Valencia, CA), 5 µl de la mezcla de cebadores de I-DNAE21, 6,5 µl de H2O mQ esteril y 1 µl de ADN molde (1ng / µl) mediante las siguientes condiciones de
5 amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 90 s a 60,5 °C y 30 s a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de extensión final de 30 minutos a 60 °C.

Se analizaron 2 µl de cada producto de amplificado mezclados con 9 µl de Hi-Di™
10 Formamide (Applied Biosystems®, Foster City, CA) y 0,5 µl de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Tras la desnaturalización de los amplificados (6 minutos a 95 °C) se enfriaron (4 minutos a 4 °C) y se separaron en un ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Los resultados de la electroforesis fueron analizados mediante el software Genmapper versión 4.0 (Applied
15 Biosystems®, Foster City, CA).

Cálculos de probabilidad

Se realizó el cálculo de la probabilidad de maternidad mediante el software de cálculo de
20 probabilidad Familias (J. Drábek, 2008. For *Science International: Genetics*, Volumen 3, Número 2, Páginas 112-118) según la base de datos del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses ofrecidas en el ejercicio de intercomparación del 2011 del Grupo de Habla Española y Portuguesa de la *International Society for Forensic Genetics* (GHEP-ISFG).

25

RESULTADOS

La Tabla 7 recoge los perfiles genéticos de dos individuos obtenidos mediante la
30 amplificación con I-DNAE21, electroforesis y el análisis de datos de los individuos analizados.

El análisis estadístico, teniendo en cuenta la estructura genotípica del supuesto padre y las distribuciones alélicas de los marcadores analizados, ha proporcionado una Probabilidad de Maternidad de 99,99947%.

5 **Tabla 7**

Loci	Supuesta Madre		Hija	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Amelogenina	X	X	X	X
CSF1PO	10	11	11	11
D10S1248	13	16	13	13
D12S391	19	25	19	22
D13S317	11	11	8	11
D16S539	11	12	10	12
D18S59	14	17	17	17
D19S433	13	14	13	14
D1S1656	12	17	12	14
D21S11	30	30	28	30
D22S1045	15	16	15	16
D2S13338	19	25	20	25
D2S441	10	14	14	15
D3S1358	15	18	15	17
D5S818	11	13	12	13
D7S820	9	10	9	11
D8S1179	12	14	12	13
FGA	21	21	21	27
TH01	6	9.3	6	9.3
TPOX	8	9	8	8
VWA	17	18	17	18

DISCUSIÓN

A continuación se discute los resultados obtenidos para la validación de I-DNAE21 en su uso en la determinación de relaciones de parentesco entre individuos.

Mediante el uso de I-DNAE21 se ha obtenido una Probabilidad de Maternidad de 5 99,99947%. El Índice de Maternidad obtenido indica que la maternidad biológica es 192294 veces más probable que la de otra mujer tomada al azar en la población.

Dentro del área de la investigación biológica de parentesco se establece que un valor de probabilidad de parentesco superior al 99,99% es considerado como que el parentesco 10 biológico queda demostrado "más allá de cualquier duda razonable".

En este sentido, existen ocasiones en las que resulta de gran dificultad obtener un valor de probabilidad de parentesco superior a dicho umbral mediante la aplicación de un único kit STR multiplex. Este problema es habitual cuando se quiere determinar una paternidad o 15 maternidad en ausencia de algún progenitor, en determinaciones de hermanidad o parentescos más complejos como medio-hermanos, abuelo-nieto, tío-sobrino etc. En estos casos, con el fin de alcanzar una probabilidad de parentesco que permita demostrar el parentesco, es necesario aumentar el número de STRs analizados e incluso analizar STRs ligados a cromosomas sexuales (cromosoma X e Y).

20

La probabilidad de exclusión *a priori* determina el potencial teórico de un kit, se define como la probabilidad de demostrar la exclusión del parentesco de un individuo falsamente implicado mediante el estudio de diversos marcadores genéticos. En este sentido, I-DNAE21 incluye un número de STRs mayor que cualquier kit STR multiplex 25 comercializado hasta la fecha, por ello alcanza una probabilidad de exclusión *a priori* mayor a los kits ampliamente utilizados en los laboratorios en los que se analizan relaciones de parentesco. (Tabla 8)

Tabla 8

Kits STR Multiplex	Probabilidad de exclusión <i>a priori</i>		
	Hispanos	Caucásicos	Afro-americanos
I-DNAE21	99,9999984	99,99999932	99,99999981
ESSplex SE kit	99,9999918	99,9999985	99,99999905
NGM select	99,9999918	99,9999985	99,99999905

ES 2 416 836 B1

PP ESI-17	99,999918	99,999985	99,9999905
PP ESX-17	99,999918	99,999985	99,9999905
PP 16*	99,99983	99,999940	99,999960
Identifiler	99,999902	99,99985	99,999941
Invest Idplex	99,999902	99,99985	99,999941
InvestNonaplex ESS	99,99980	99,999971	99,999971
I-DNA1	99,99962	99,99939	99,99971
Invest Decaplex SE	99,99947	99,99967	99,99970
I-DNA2	99,9972	99,9960	99,9983
Bioplex-11	99,9911	99,9944	99,9962
Q8	99,987	99,9937	99,9909
Minifiler	99,975	99,975	99,984

En este ejemplo I-DNAE21, sin necesidad de análisis adicionales, ha resultado óptimo para resolver un caso de maternidad biológica en ausencia de padre obteniendo un Índice de maternidad superior al 99,99% y por tanto demostrando "más allá de cualquier duda razonable" la maternidad.

Se ha demostrado por tanto la gran aplicabilidad y fiabilidad de I-DNAE21 para su uso en parentesco biológico, incluso en casos de parentesco complejo.

Tabla 9: Principales kits multiplex de loci STRs autosómicos comparando el número de STRs de cada kit con los incluidos en las diferentes bases de datos.

BASES DE DATOS	LOCUS	↓ DINAE21	ESSplex SE KIT	NGM SHARE	PP ESX- 17	PP ES1- 17	PP ESX- 17	PP 16	IDENTIFI- LER	INVEST Triplex	INVEST Nonplex ex ESS	LDNA1	INVEST Decaplex ex SE	HDNA2	BIOPLEX EX11	OB	MINIPL LER
CODIS	CSF1PO	CSF1PO						CSF1PO	CSF1PO	CSF1PO		CSF1PO		CSF1PO			CSF1PO
	D13S317	D13S317						D13S317	D13S317	D13S317		D13S317		D13S317			D13S317
	D5S818	D5S818						D5S818	D5S818	D5S818		D5S818		D5S818			D5S818
	D7S820	D7S820						D7S820	D7S820	D7S820		D7S820		D7S820			D7S820
CODIS+NDNAD/ ECL related	TPOX	TPOX						TPOX	TPOX	TPOX		TPOX		TPOX			
	D16S539	D16S539		D16S539		D16S539		D16S539	D16S539	D16S539		D16S539		D16S539			D16S539
	D18S51	D18S51		D18S51		D18S51		D18S51	D18S51	D18S51		D18S51		D18S51		D18S51	D18S51
	D21S11	D21S11		D21S11		D21S11		D21S11	D21S11	D21S11		D21S11		D21S11		D21S11	D21S11
CODIS + NDNAD ECL + ESS shared	D3S1358	D3S1358		D3S1358		D3S1358		D3S1358	D3S1358	D3S1358		D3S1358		D3S1358		D3S1358	D3S1358
	D8S1179	D8S1179		D8S1179		D8S1179		D8S1179	D8S1179	D8S1179		D8S1179		D8S1179		D8S1179	D8S1179
	FGA	FGA		FGA		FGA		FGA	FGA	FGA		FGA		FGA		FGA	FGA
	TH01	TH01		TH01		TH01		TH01	TH01	TH01		TH01		TH01		TH01	TH01
	VWA	VWA		VWA		VWA		VWA	VWA	VWA		VWA		VWA		VWA	VWA
	D10S1248	D10S1248		D10S1248		D10S1248		D10S1248	D10S1248	D10S1248		D10S1248		D10S1248		D10S1248	D10S1248
	D12S391	D12S391		D12S391		D12S391		D12S391	D12S391	D12S391		D12S391		D12S391		D12S391	D12S391
	D1S1656	D1S1656		D1S1656		D1S1656		D1S1656	D1S1656	D1S1656		D1S1656		D1S1656		D1S1656	D1S1656
	D22S1045	D22S1045		D22S1045		D22S1045		D22S1045	D22S1045	D22S1045		D22S1045		D22S1045		D22S1045	D22S1045
	D2S441	D2S441		D2S441		D2S441		D2S441	D2S441	D2S441		D2S441		D2S441		D2S441	D2S441
NDNAD/ECL	D19S433	D19S433		D19S433		D19S433		D19S433	D19S433	D19S433		D19S433		D19S433		D19S433	D19S433
	D2S1338	D2S1338		D2S1338		D2S1338		D2S1338	D2S1338	D2S1338		D2S1338		D2S1338		D2S1338	D2S1338
	Penta-D	Penta-D		Penta-D		Penta-D		Penta-D	Penta-D	Penta-D		Penta-D		Penta-D		Penta-D	Penta-D
	Penta-E	Penta-E		Penta-E		Penta-E		Penta-E	Penta-E	Penta-E		Penta-E		Penta-E		Penta-E	Penta-E
Otras	SE33	SE33		SE33		SE33		SE33	SE33	SE33		SE33		SE33		SE33	SE33

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL TEXTO DE LA LISTA DE SECUENCIAS

- “SEQUENCE LISTING” – Lista de secuencias
- “METHOD FOR OBTAINING THE GENE PROFILE OF AN INDIVIDUAL”:
Método para obtener el perfil genético de un individuo.
- 5 - “ARTIFICIAL SEQUENCE”: Secuencia Artificial
- “DNA”: ADN
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY CSF1PO LOCUS” – Cebador
directo diseñado para amplificar el locus CSF1PO
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY CSF1PO LOCUS” – Cebador
10 inverso diseñado para amplificar el locus CSF1PO
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D5S818 LOCUS” - Cebador
directo diseñado para amplificar el locus D5S818
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D5S818 LOCUS” - Cebador
inverso diseñado para amplificar el locus D5S818
- 15 - “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D7S820 LOCUS” - Cebador
directo diseñado para amplificar el locus D7S820
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D7S820 LOCUS” - Cebador
inverso diseñado para amplificar el locus D7S820
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D21S11 LOCUS” - Cebador
20 directo diseñado para amplificar el locus D21S11
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D21S11 LOCUS” - Cebador
inverso diseñado para amplificar el locus D21S11
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D2S441 LOCUS” - Cebador
directo diseñado para amplificar el locus D2S441
- 25 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D2S441 LOCUS” - Cebador
inverso diseñado para amplificar el locus D2S441
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D1S1656 LOCUS” - Cebador
directo diseñado para amplificar el locus D1S1656
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D1S1656 LOCUS” - Cebador
30 inverso diseñado para amplificar el locus D1S1656
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY TPOX LOCUS” - Cebador
directo diseñado para amplificar el locus TPOX

- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY TPOX LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus TPOX
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY VWA LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus VWA
- 5 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY VWA LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus VWA
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D8S1179 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D8S1179
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D8S1179 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D8S1179
- 10 - “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D19S433 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D19S433
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D19S433 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D19S433
- 15 - “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D12S391 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D12S391
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D12S391 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D12S391
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY TH01 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus TH01
- 20 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY TH01 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus TH01
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D16S539 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D16S539
- 25 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D16S539 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D16S539
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D3S1358 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D3S1358
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D3S1358 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D3S1358
- 30 - “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D18S51 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D18S51

- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D18S51 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D18S51
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D2S1338 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D2S1338
- 5 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D2S1338 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D2S1338
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D13S317 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D13S317
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D13S317 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D13S317
- 10 - “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY AMELOGENINA LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus Amelogenina
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY AMELOGENINA LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus Amelogenina
- 15 - “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY FGA LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus FGA
- “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY FGA LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus FGA
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D22S1045 LOCUS” - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D22S1045
- 20 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D22S1045 LOCUS” - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D22S1045
- “FORWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D10S1248 LOCUS - Cebador directo diseñado para amplificar el locus D10S1248
- 25 - “REWARD PRIMER DESIGNED TO AMPLIFY D10S1248 LOCUS - Cebador inverso diseñado para amplificar el locus D10S1248

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
 - 5 reacción de amplificación multiplex, de los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248.

- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde la pareja de cebadores empleada en la reacción de amplificación multiplex específica para cada uno de los loci analizados es la pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias
 - SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus CSF1PO,
 - 15 - SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus D5S818,
 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus D7S820,
 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus D21S11,
 - SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus D2S441,
 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus D1S1656,
 - 20 - SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para el locus TPOX,
 - SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para el locus VWA,
 - SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para el locus D8S1179,
 - SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para el locus D19S433,
 - SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 para el locus D12S391,
 - 25 - SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 para el locus TH01,
 - SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 para el locus D16S539,
 - SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para el locus D3S1358,
 - SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 para el locus D18S51,
 - SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 para el locus D2S1338,
 - 30 - SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 para el locus D13S317,
 - SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 para el locus Amelogenina,
 - SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para el locus FGA,
 - SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 para el locus D22S1045, y
 - SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 para el locus D10S1248.

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: 42 está comprendida entre 57 y 63°C.
- 5
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde uno de los 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
10 marcaje de los oligonucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina.
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
15 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 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, cenizas, tejidos o fluidos vaginales.
8. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para
25 identificar un individuo, determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.
9. Un kit que comprende parejas de cebadores específicas para amplificar los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179,
30 D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248.

10. Kit según la reivindicación 9, en donde la pareja de cebadores empleada en la reacción de amplificación multiplex específica para cada uno de los loci analizados es la pareja de oligonucleótidos mostrada en las secuencias

- 5 - SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para el locus CSF1PO,
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para el locus D5S818,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para el locus D7S820,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para el locus D21S11,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para el locus D2S441,
- 10 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 para el locus D1S1656,
- SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 para el locus TPOX,
- SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para el locus VWA,
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 para el locus D8S1179,
- SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para el locus D19S433,
- 15 - SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 para el locus D12S391,
- SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 para el locus TH01,
- SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 para el locus D16S539,
- SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para el locus D3S1358,
- SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 para el locus D18S51,
- 20 - SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 para el locus D2S1338,
- SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 para el locus D13S317,
- SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 para el locus Amelogenina,
- SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 para el locus FGA,
- SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 para el locus D22S1045, y
- 25 - SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 para el locus D10S1248.

11. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la pareja de cebadores comprende un oligonucleótido marcado en uno de sus extremos.

30 12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 que además, comprende, los reactivos necesarios para marcar las parejas de cebadores.

13. Kit según la reivindicación 12, 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.
- 5 14. Kit según la reivindicación 13, 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',
10 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED, Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).
15. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14 para obtener el perfil genético de un individuo, para identificar un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos, para identificar restos humanos.
- 15 16. Un conjunto de parejas de cebadores que comprende parejas de cebadores dirigidas a amplificar los loci CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, Amelogenina, FGA, D22S1045 y D10S1248.
- 20 17. Uso de un conjunto de parejas de cebadores según la reivindicación 16 para obtener el perfil genético de un individuo, para identificar un individuo, para determinar relaciones de parentesco entre individuos o para identificar restos humanos.

Figura 1

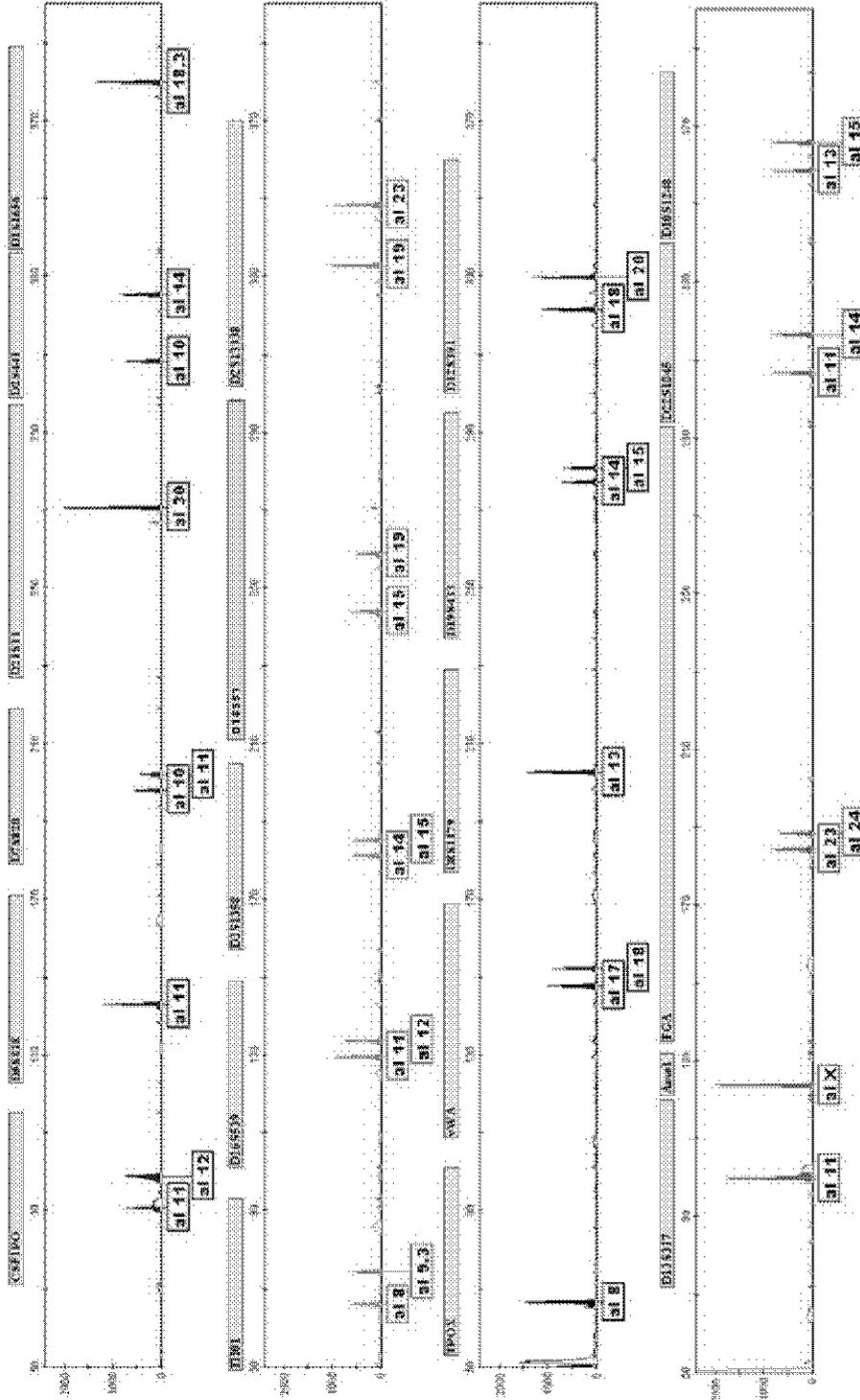
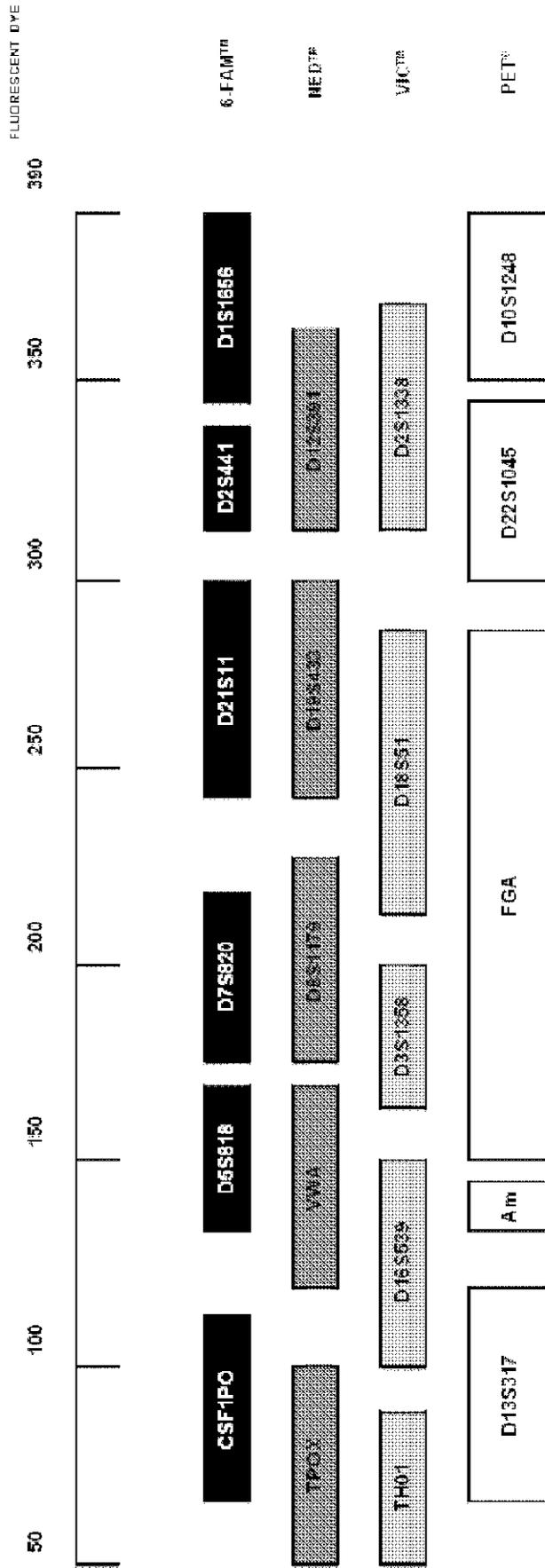


Figura 2



ES 2 416 836 B1

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO

<120> METHOD FOR OBTAINING THE GENE PROFILE OF AN INDIVIDUAL

<130> P7636ES00

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify CSF1PO locus

<400> 1
actgccttca tagatagaag at 22

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

<220>
<223> Reward primer designed to amplify CSF1PO locus

<400> 2
gccctgttct aagtacttcc t 21

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D5S818 locus

<400> 3
ttaatagcaa gtatgtgaca agg 23

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

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D5S818 locus

<400> 4
gacatttgta tctttatctg tatcctt 27

ES 2 416 836 B1

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D7S820 locus

<400> 5
gaattataac gattccacat ttatcc 26

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D7S820 locus

<400> 6
ataaagggta tgatagaaca cttg 24

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D21S11 locus

<400> 7
ccctgattct tcagcttgta 20

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D21S11 locus

<400> 8
gcagagacag actaatagga gg 22

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D2S441 locus

<400> 9
ctctgaagag attcttaaga ccc 23

ES 2 416 836 B1

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

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D2S441 locus

<400> 10
gttcactctc cttcccaaat g 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D1S1656 locus

<400> 11
atccccatat aagttcaagc c 21

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D1S1656 locus

<400> 12
gctttcaggc atttcagaga ttatg 25

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify TPOX locus

<400> 13
cttaggaac cctcactg 18

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify TPOX locus

<400> 14

ES 2 416 836 B1

gcagcgttta tttgcccaa 19

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify VWA locus

<400> 15
tcagtatgtg acttgattg a 21

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify VWA locus

<400> 16
gtaggttaga tagatatagg acaga 25

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D8S1179 locus

<400> 17
ttgtatttca tgtgtacatt cgt 23

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D8S1179 locus

<400> 18
gttgtgttca tgagtatagt ttcac 25

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D19S433 locus

ES 2 416 836 B1

<400> 19
catgttggca cattcctg 18

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D19S433 locus

<400> 20
agttccttag cagtgatttc tg 22

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D12S391 locus

<400> 21
caaattgtga tagtagtttc ttctgg 26

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D12S391 locus

<400> 22
gtagacctg gactgagcc 19

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify TH01 locus

<400> 23
aacacagact ccatggtg 18

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify TH01 locus

ES 2 416 836 B1

<400> 24
gttcctccct tatttcct 19

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D16S539 locus

<400> 25
cctcttcct agatcaatac a 21

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D16S539 locus

<400> 26
atctgtaagc atgtatctat catc 24

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D3S1358 locus

<400> 27
tgtagtgagc tatgattccc 20

<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D3S1358 locus

<400> 28
gtattccctg tgcctttg 18

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 416 836 B1

<223> Forward primer designed to amplify D18S51 locus

<400> 29
gtctcagcta cttgcagg 18

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D18S51 locus

<400> 30
ggagatgtct tacaataaca gttg 24

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D2S1338 locus

<400> 31
ggaggtgcct aaagacttc 19

<210> 32
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D2S1338 locus

<400> 32
gcctaccaga atgccagtc 19

<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D13S317 locus

<400> 33
cgcctatctg tatttataaaa tacat 25

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 416 836 B1

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D13S317 locus

<400> 34
ggacagaaag atagatagat gattgat 27

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify Amelogenina locus

<400> 35
ccctgggctc tgtaaaga 18

<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify Amelogenina locus

<400> 36
gggcttgagg ccaaccat 18

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify FGA locus

<400> 37
ctcacagatt aaactgtaac ca 22

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify FGA locus

<400> 38
ttgtctgtaa ttgccagc 18

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 416 836 B1

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D22S1045 locus

<400> 39
tctgcataag acccactatg 20

<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D22S1045 locus

<400> 40
atagtgacag tgcctgtg 18

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer designed to amplify D10S1248 locus

<400> 41
agctattatt accaaagcat gaac 24

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reward primer designed to amplify D10S1248 locus

<400> 42
gttccagtcc aactagatcc t 21



- ②① N.º solicitud: 201132133
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2011
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2009059049 A1 (APPLIED BIOSYSTEMS INC et al.) 07/05/2009, Especialmente resumen; párrafos 18, 20, 23-24, 29-39, 41, 54-58, 64-65, 69.	1-17
Y	ZÚÑIGA, J et al. Allele frequencies for 15 autosomal STR loci and admixture estimates in Puerto Rican Americans. Forensic Science International. 2006, Vol. 164, páginas 266-270, todo el documento.	1-17
Y	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.	1-17
A	US 6479235 B1 (SCHUMM JAMES W et al.) 12.11.2002, todo el documento	1-17

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 27.05.2013</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, NPL, WPI, TXTUS, XPESP, BIOSIS, MEDLINE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-17	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	WO 2009059049 A1 (APPLIED BIOSYSTEMS INC et al.)	07.05.2009
D02	ZÚÑIGA, J et al. Forensic Science International. 2006, Vol. 164, páginas 266-270.	2006
D03	BUTLER, JM et al. Journal of Forensic Sciences. 2003, Vol. 48, Núm. 5, páginas 1054-1064.	2003
D04	US 6479235 B1 (SCHUMM JAMES W et al.)	12.11.2002

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 20 loci correspondientes a secuencias STR (*Short Tandem Repeats*) y amelogenina. Los loci STR son: CSF1PO, D5S818, D7S820, D21S11, D2S441, D1S1656, TPOX, VWA, D8S1179, D19S433, D12S391, TH01, D16S539, D3S1358, D18S51, D2S1338, D13S317, FGA, D22S1045 y D10S1248. Asimismo, la solicitud incluye parejas de cebadores específicos para cada locus, kits que comprenden dichos cebadores y el uso de dichos cebadores y kits para la obtención de perfiles genéticos, identificación de individuos, determinación de relaciones de parentesco e identificación de restos humanos.

El documento D01 divulga métodos y kits para llevar a cabo reacciones de amplificación multiplex de un conjunto de loci STR autosómicos y amelogenina. Dichos métodos y kits son aplicables a la determinación de perfiles genéticos a partir de muestras de ADN humano (ver resumen; párrafos 18, 20, 23-24, 29-39, 41, 54-58, 64-65, 69).

El documento D02 divulga un estudio genético de un grupo étnico de los Estados Unidos basado en el análisis, mediante PCR multiplex, de las variantes alélicas de un conjunto de loci STR y amelogenina (ver todo el documento).

El documento D03 tiene por objeto distintas reacciones de PCR multiplex para la amplificación de ciertos loci STR, como herramienta para la obtención de perfiles genéticos en el ámbito forense (ver todo el documento).

El documento D04 divulga métodos para identificar de forma simultánea en una muestra de ADN los alelos de distintos loci STR mediante reacciones de PCR multiplex (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 los loci: D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01, VWA, Amelogenina, D10S1248, D12S391, D1S1656, D22S1045 y D2S441 (D01; resumen; párrafos 18, 20, 23-24, 69).

De lo anterior se desprende que D01 no divulga de forma idéntica el método de la reivindicación 1 ya que no incluye el análisis de cinco de los 20 loci STR definidos en la citada reivindicación, a saber: CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317.

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.- Reivindicación 8.

Dado que el método de la reivindicación 1 es nuevo, el uso de dicho método definido en la reivindicación independiente 8 ha de considerarse asimismo no comprendido en el estado de la técnica.

Así pues, el objeto de la reivindicación 8 satisface el requisito de novedad del art. 6.1 de la LP 11/1986.

1.3.- Reivindicaciones 9-17.

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de las reivindicaciones independientes 9, 15-17 es, de nuevo, D01. En particular, este documento divulga parejas de cebadores, y kits que comprenden dichos cebadores, definidos por su función (al igual que en las reivindicaciones 9 y 16 de la solicitud) como específicos para la amplificación de los loci: D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01, VWA, Amelogenina, D10S1248, D12S391, D1S1656, D22S1045 y D2S441. Además, D01 hace mención al uso de estos cebadores y kits para la identificación de individuos o la tipificación de ADN (D01; párrafos 20, 29-39, 64-65). Sin embargo, los conjuntos de parejas de cebadores y kits de D01 no incluyen los oligonucleótidos específicos para la amplificación de CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317.

En base a lo anterior, la reivindicación independiente 9 y sus reivindicaciones dependientes 10-14, así como las reivindicaciones independientes 15-17, 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).

2.1.-Reivindicaciones 1-17.

Como ya se ha indicado, la diferencia entre D01 y el objeto definido en las reivindicaciones independientes 1, 8, 9, 15-17 de la presente solicitud estriba en la no inclusión en D01 de los loci STR: CSF1PO, D5S818, D7S820, TPOX y D13S317. Sin embargo, estos cinco marcadores STR, y su uso para la obtención de perfiles genéticos aplicables en el ámbito de los análisis forenses, forman parte del estado de la técnica, tal y como queda reflejado en los documentos D02 ó D03.

A la luz de la descripción aportada, el problema técnico subyacente en la presente solicitud es el número insuficiente de marcadores STR incluidos en los kits comerciales disponibles, razón por la cual dichos kits resultan de escaso éxito en la resolución de casos de parentesco complejos y en la identificación de individuos mediante el cotejo con los perfiles de loci STR depositados en las principales bases de datos internacionales (página 5, líneas 1-6, 21-24).

La solución al problema técnico propuesta por los inventores es la inclusión, en una sola reacción PCR multiplex, de 20 loci STR que abarcan los marcadores de las bases de datos CODIS, NDNAD, ECL, ISSL, ESS y GCL, añadiendo el locus amelogenina para la determinación del sexo del individuo. Sin embargo, se considera que dicha solución resultaría obvia para un experto en la materia, que reconocería el problema planteado y, combinando lo divulgado en el documento D01 con D02 ó D03, llegaría al objeto de las reivindicaciones 1, 8, 9, 15-17 sin realizar esfuerzo inventivo.

Por lo tanto, las reivindicaciones independientes 1, 8, 9, 15-17 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 20 loci STR y el locus de amelogenina, la optimización de las condiciones de la reacción de PCR multiplex para lograr la amplificación simultánea de los 21 loci obteniendo bandas discernibles, las técnicas de marcaje para la visualización de los amplicones obtenidos, y los tipos de muestra biológica analizados, forman parte del conocimiento común en el sector técnico de la solicitud y se mencionan también en D01 (párrafos 29-39, 41, 54-58), D02 y D03. Por ello, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-7, 10-14 resultaría también obvio para el experto en la materia.

En consecuencia las reivindicaciones 2-7, 10-14 carecen de actividad inventiva de acuerdo con lo establecido en el art. 8.1 de la LP 11/1986.

El documento D04 refleja meramente el estado de la técnica y no se ha considerado relevante a los efectos de la apreciación de la novedad y actividad inventiva de la solicitud.