

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 361 800**

②1 Número de solicitud: 200901845

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **11.09.2009**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.06.2011

⑥2 Número de la solicitud inicial: **P 200502423**

⑦1 Solicitante/s: **PROGENIKA BIOPHARMA, S.A.**
Parque Tecnológico de Zamudio
Ibaizabal Bidea, Edif. 801-A - 2ª Planta
48160 Derio, Vizcaya, ES

⑦2 Inventor/es: **Tejedor Hernández, Diego;**
Martínez Martínez, Antonio y
Simón Buela, Laureano

⑦4 Agente: **González Díaz, Vicente**

⑤4 Título: **Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos.**

⑤7 Resumen:

Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos.

El método de genotipado se basa en la combinación de un diseño experimental de DNA-chips de genotipado y en el desarrollo de un sistema secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por dichos DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación, lo que garantiza unos elevados niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que dichos DNA-chips puedan ser utilizados como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico; en particular, en la detección de variaciones génicas, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones génicas asociadas al genotipado de antígenos eritrocitarios humanos de interés.

ES 2 361 800 A1

DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos.

Campo de la invención

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico *in vitro*, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante DNA-chips, para la detección de variaciones génicas, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones génicas asociadas al genotipado de antígenos eritrocitarios.

Antecedentes de la invención

DNA-chips

En el año 2001, el Consorcio para el Proyecto Genoma Humano y la empresa privada Celera presentaron un primer borrador completo del genoma humano con 30.000 genes. A partir de este momento se iniciaba la posibilidad del estudio del genoma completo o estudios a gran escala (high-throughput). Los denominados "DNA-chips", también denominados "microarrays", "DNAarrays" o "bio-chips de DNA" son herramientas que la Genómica Funcional puede usar para los estudios a gran escala que se plantean en la actualidad. La Genómica Funcional estudia los cambios en la expresión de los genes debidos al ambiente al que está sometido el individuo y a las características genéticas del mismo. Las secuencias de los genes presentan pequeñas variaciones interindividuales de un único nucleótido que reciben el nombre de SNP ("single nucleotide polymorphism") que en un pequeño tanto por ciento están implicados en cambios en la expresión de los genes que causan determinadas patologías. La mayoría de los estudios que aplican DNA-chips son de expresión génica aunque también se utilizan en la detección de SNPs.

El primer DNA-chip fue el "Southern blot" en el que moléculas de ácidos nucleicos marcadas se utilizaban para interrogar moléculas de ácidos nucleicos unidas a un soporte sólido. El soporte sobre el que se llevaba a cabo la interrogación en los primeros DNA-chips eran membranas de nylon. Aunque se partía de una buena idea, la técnica era todavía muy laboriosa.

Dos avances marcaron el arranque definitivo de los DNA-chips. Por una parte, el uso de un soporte sólido no poroso, como el vidrio, que facilitó la miniaturización y la detección basada en fluorescencia. Por otra parte, la adaptación de técnicas fotolitográficas utilizadas en la elaboración de semiconductores para la producción de DNA-chips conteniendo cada uno de ellos más de 400.000 oligonucleótidos distintos, en una región de aproximadamente 20 μm^2 , los denominados DNA-chips de alta densidad.

Concretamente un DNA-chip es un soporte sólido que contiene cientos de fragmentos de secuencias de genes diferentes representadas en forma de DNA, cDNA u oligonucleótidos inmovilizadas o unidas en su superficie en posiciones fijas. Los soportes son generalmente portaobjetos de vidrio para microscopio, membranas de nylon o "chips" de silicio. Es importante que estas secuencias o sondas estén unidas al soporte en un orden fijo ya que la localización robotizada de cada uno de ellos determina el gen cuya expresión se está midiendo. En función de la tecnología empleada para la producción de los DNA-chips se pueden clasificar en:

- DNA-chips de alta densidad: Los oligonucleótidos que se encuentran en la superficie del portaobjetos de vidrio han sido sintetizados "*in situ*", mediante una metodología denominada fotolitografía.

- DNA-chips de baja densidad: En este caso los oligonucleótidos, cDNA o fragmentos de PCR son depositados en forma de nanogotas en la superficie del cristal mediante un robot que imprime esas secuencias de DNA en el portaobjetos. Existen pocos ejemplos de DNA-chips de baja densidad y, al contrario que en los de alta densidad, son pocas las variaciones génicas detectadas: un DNA-chip para la detección de 5 mutaciones puntuales en el gen de la tirosinasa, un DNA-chip para la detección de mutaciones en p53 y k-ras, un DNA-chip para la detección de 12 mutaciones causantes de cardiomiopatía hipertrófica, un DNA-chip para el genotipado de cepas de *Escherichia coli* o DNA-chips para la detección de patógenos tales como *Cryptosporidium parvum* o rotavirus.

Según la estrategia de diseño de los oligonucleótidos se puede hablar de:

- "Standard tiling": Se diseñan 4 oligonucleótidos totalmente complementarios a la secuencia de referencia excepto en la posición central donde se interrogan las 4 posibilidades: A, C, G y T; un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para el genotipado de HIV-1 (Affymetrix). La posición central asegura máxima especificidad.

- "Alternative tiling": En este caso son 5 los oligonucleótidos diseñados, de forma que el quinto interroga una posible delección en la secuencia; un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para la detección de mutaciones en p53 (Affymetrix).

- "Block tiling": Se diseñan 4 oligonucleótidos totalmente complementarios a la secuencia normal y otros 4 totalmente complementarios a la secuencia mutante; el nucleótido que cambia se coloca en la posición central, pero 2

nucleótidos antes o después se coloca un “mismatch” que puede ser una de las cuatro bases (A, C, T o G); un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para la detección de mutaciones en el citocromo p450 (Affymetrix). Dentro de esta última estrategia [“block tiling”] Affymetrix usa el “mismatch” para aumentar la especificidad de la hibridación no sólo en una posición sino en las posiciones -4, -1, 0, +1 y +4 para identificar el cambio producido en la posición central ó 0. Esta estrategia se denomina “Alternative block tiling” y un claro ejemplo es el DNA-chip para la detección de 1.500 SNPs (Affymetrix).

En el caso de estudios de expresión génica, las sondas depositadas en el vidrio se hibridan con los cDNAs sintetizados a partir de los mRNAs extraídos del tejido que se quiere analizar. Estas moléculas de cDNA han sido marcadas con un fluoróforo al sintetizarse; cuanto mayor sea el número de moléculas que se unen a su secuencia complementaria en el DNA-chip, mayor será la cantidad de fluoróforo que se detecta y mide tras excitarlo con un láser. Esta medida es, por tanto, reflejo del número de moléculas de cada mRNA que había en el tejido analizado y, consecuentemente, reflejo del nivel de expresión de cada gen representado en el DNA-chip, lo que se denomina un patrón de expresión de la célula. Estos DNA-chips de expresión contienen también sondas que representan genes de control (“house-keeping genes”), lo que permite normalizar los resultados y comparar múltiples experimentos de forma cuantitativa. Con un DNA-chip, se pueden determinar en un solo experimento los niveles de expresión de cientos o miles de genes de una célula. El cDNA de la muestra problema y de la muestra control se pueden marcar con dos fluoróforos distintos por lo que en el mismo DNA-chip se pueden estudiar las diferencias entre la expresión de los genes en la muestra control y en la muestra problema.

Los DNA-chips para la detección de polimorfismos genéticos, cambios o mutaciones en general, variaciones génicas, en la secuencia de DNA, comprenden unas superficies sólidas, típicamente de cristal, en las que está depositado un elevado número de secuencias génicas complementarias de cada una de las variaciones génicas que se desea estudiar. Una de las estrategias utilizadas para detectar variaciones génicas consiste en la hibridación de las secuencias que reconocen específicamente al alelo normal y al mutado con fragmentos de DNA procedentes de la muestra que se va a analizar, amplificados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y marcados con una molécula fluorescente. Al iluminar el DNA-chip con el láser se identifican aquellas secuencias que se han unido a la muestra problema y así se discrimina específicamente un paciente normal de un heterocigoto o un homocigoto mutante. Otra estrategia básica de detección de variaciones génicas con DNA-chips de genotipado consiste en llevar a cabo una reacción de amplificación o extensión sobre el propio DNA-chip.

Dentro de la estrategia de hibridación se puede hacer una subclasificación en función del método de análisis de la información para el genotipado:

- Aumento de la señal de hibridación: Esta estrategia compara la señal de hibridación de las sondas complementarias a los alelos normales y a los alelos mutantes. En general, las muestras mutadas deben presentar una mayor señal de hibridación en las sondas complementarias a los alelos mutantes que en el caso de los individuos normales.

- Pérdida de la señal de hibridación: Los cambios en la secuencia entre una muestra control y una muestra a estudio se pueden identificar por una caída en la señal de hibridación de los oligonucleótidos totalmente complementarios con la secuencia de referencia. En los individuos homocigotos se produce una pérdida completa de señal mientras que en los heterocigotos se produce una pérdida del 50% de la señal. En los DNA-chips para interrogar todas las bases de una secuencia de “n” nucleótidos (“oligonucleótido”) de longitud en ambas hebras es necesario un mínimo de “2n” oligonucleótidos que solapan con el oligonucleótido anterior en toda la secuencia salvo en un nucleótido. Este diseño de los oligonucleótidos recuerda a los orígenes de los DNA-chips en membranas de nylon pero, en este caso, el tamaño de los oligonucleótidos es de 25 nucleótidos y no de 8 nucleótidos. El elevado número de oligonucleótidos empleados para reconstruir la secuencia hace que los errores derivados de la fluctuación en la señal de hibridación que se producen en la estrategia de ganancia de señal se minimicen. Por el contrario, el cambio exacto en la secuencia no se puede identificar con esta metodología; es necesario secuenciar posteriormente para conocer la mutación.

La segunda estrategia para la detección de variaciones génicas mediante el empleo de DNA-chips de genotipado, consistente en la amplificación o extensión sobre el propio DNA-chip, se aborda con tres aproximaciones:

- “Minisequencing”: Un cebador específico de la mutación es inmovilizado en el portaobjetos y, después de una reacción de extensión con didesoxinucleótidos fluorescentes, se captura la imagen del DNA-chip con un escáner.

- “Primer extensión”: Se inmovilizan dos oligonucleótidos por mutación y la reacción de extensión se lleva a cabo con un nucleótido fluorescente y los demás naturales siendo el material de partida RNA o el producto de una PCR.

- “Tag arrays”. La reacción de extensión se lleva a cabo en solución con cebadores específicos que llevan una determinada secuencia o “tag” en 5’. El uso de DNA-chips con oligonucleótidos complementarios a esas secuencias o “tags” permite la captura de los productos resultantes de la extensión. Ejemplos ilustrativos de esta aproximación incluyen el DNA-chip de alta densidad “Gene-Flex” (Affymetrix), aunque también existen DNA-chips de baja densidad.

ES 2 361 800 A1

A la hora del diseño de herramientas para el diagnóstico genético, la sencillez experimental debe ser tenida muy en cuenta. Se debe analizar, por tanto, la complejidad técnica que supone para el usuario final el análisis de DNA-chips basados en hibridación diferencial frente a los basados en la metodología de extensión. La necesidad de un mayor número de reacciones de amplificación y purificación supone una desventaja de la estrategia basada en técnicas de extensión o amplificación frente a la estrategia basada en la hibridación.

Sin embargo, en lo relativo a la especificidad y sensibilidad de los DNA-chips, la hibridación diferencial no consigue los valores tan altos asociados con la amplificación sobre el portaobjetos de vidrio. Es por ello necesario el desarrollo de algoritmos matemáticos que aumenten la especificidad y sensibilidad de la estrategia basada en el empleo de la metodología de hibridación (Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MN, Yohn CT, Tobi KP, Kashuk C, Mathews DJ, Shah N, Eichler EE, Warrington JA, Chakravarti A. *Genome Research*; 11:1913-1925 (2001). Dentro de esta tecnología y de los DNA-chips de baja densidad, la elección es sin duda el uso de oligonucleótidos diferentes para detectar al alelo normal y al mutante (“aumento de la señal de hibridación”).

La inutilidad de los DNA-chips existentes en la actualidad para detectar simultáneamente la presencia o ausencia de un número elevado de variaciones génicas, de manera sensible, específica y reproducible, ha impedido su aplicación como herramientas de uso rutinario para el diagnóstico clínico de enfermedades humanas. Los inventores han desarrollado un método secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación (algoritmo). Este método se basa en un novedoso diseño experimental, que asegura unos altos niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que los DNA-chips desarrollados en base a este método, puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico.

25 *Antígenos eritrocitarios*

La sangre de cada persona es tan característica que puede servir como medio de identificación casi tan preciso como las huellas dactilares, sólo los gemelos idénticos poseen características sanguíneas iguales. El fenotipado de individuos en base a la determinación de los grupos sanguíneos es particularmente conveniente en diferentes ámbitos de la medicina como la práctica de las transfusiones sanguíneas, la relativamente frecuente aparición de enfermedades hemolíticas en fetos y recién nacidos, las aplicaciones médico-legales y su conexión con otros genes cuya repercusión más inmediata puede estar en los trasplantes de órganos.

La mayor parte de las transfusiones pueden considerarse como seguras y alcanzan su objetivo; sin embargo, de vez en cuando se producen reacciones leves y muy rara vez reacciones graves e incluso fatales. Las reacciones más frecuentes son fiebre y alergias (hipersensibilidad), que ocurren en el 1-2% de las transfusiones, pero existen incompatibilidades más graves que ocasionan la destrucción de los glóbulos rojos que se han suministrado poco después de la transfusión (reacción hemolítica intravascular). Dentro de estas reacciones es muy conocida la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHPN) que es una afección inmunológica aloinmune, en la cual la supervivencia del hematíe fetal y del recién nacido se ve reducida debido a la acción de anticuerpos maternos que pasan a través de la placenta y que son específicos contra antígenos de origen paterno presentes en las células rojas fetales y del recién nacido. Desde entonces hasta la fecha han ocurrido grandes progresos en el conocimiento de los grupos sanguíneos que han permitido precisar que la EHPN no sólo se debe a anticuerpos contra el antígeno D, sino que también están involucrados otros antígenos del sistema Rh, el sistema ABO y de otros sistemas antigénicos.

Lo anteriormente descrito permite suponer la importancia que tiene en la medicina de la transfusión el correcto genotipado de los grupos sanguíneos (incluidos los alelos raros o poco frecuentes).

Los grupos sanguíneos están constituidos por aloantígenos presentes en la superficie de la membrana de los eritrocitos o glóbulos rojos, que se transmiten hereditariamente de padres a hijos según las leyes de la genética mendeliana. Su importancia clínica se debe a sus propiedades sensibilizantes, es decir, son capaces de provocar la formación de anticuerpos e inducir una reacción inmune.

La Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT) ha clasificado en más de 26 los grupos sanguíneos humanos. La mayoría de ellos han sido definidos a nivel genético e incluyen polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), deleciones génicas, conversiones y otros eventos que resultan de la hibridación génica. Los antígenos de los grupos sanguíneos pueden ser clasificados en dos grandes grupos:

A. Antígenos dependientes de carbohidratos

B. Antígenos dependientes de proteínas.

65

ES 2 361 800 A1

A. Antígenos dependientes de carbohidratos

Grupo ABO

5 Este grupo sanguíneo es de primordial importancia clínica en la medicina de las transfusiones y los trasplantes, ya que causa la mayoría de las reacciones de incompatibilidad en las transfusiones y rechazo en trasplantes de órganos. La base bioquímica del grupo ABO depende de la actividad de una transferasa N-acetilgalactosamina en los individuos del grupo sanguíneo A y una galactosil transferasa en el grupo sanguíneo B; mientras que los individuos pertenecientes al grupo O carecen de actividad transferasa. La base genética de los fenotipos ABO son las sustituciones de aminoácidos en el gen ABO de la glicosiltransferasa. El tamaño de este gen es de 19.514 pares de bases (pb) y codifica una enzima de unión de la membrana que utiliza GalNAc o UDP-Gal como sustrato. Cuatro cambios de aminoácido codificados por los exones 6 y 7 del gen ABO son los responsables de la especificidad de sustrato de las transferasas A y B respectivamente, entre ellos los cambios Gly235Ser y Leu266Met son cruciales. La mayoría de los individuos del grupo O presentan delección de un único nucleótido (A261G) que da lugar a un cambio en la pauta de lectura y, por tanto, a una inactivación de la transferasa. Sin embargo, existe un número creciente de alelos O (unos 20) que dan como resultado la no expresión de las transferasas A o B. Los alelos raros del subgrupo ABO, como A3, Ax, Ael, B3Bx y Bel han sido descritos mediante análisis genómico y de secuencias de transcripción. Estos alelos han surgido de recombinaciones genéticas a partir de los diferentes alelos del grupo ABO.

20

B. Antígenos dependientes de proteínas

B.1. Antígenos dependientes de proteínas expresados por moléculas de transporte eritrocitarias

25

Rh

La incompatibilidad Rh está demostrada en una amplia porción de reacciones de transfusión y es la principal causa de la enfermedad hemolítica de los recién nacidos y fetos (HDNF). Los antígenos Rh surgen de dos proteínas relacionadas entre sí (Rh CcEe y D) codificadas por el *locus* Rh (1p34-36.2) que contiene los genes RHD y RHCE (70 Kb). Posiblemente los haplotipos D positivo presentan una configuración de los genes RHD-RHCE en la misma orientación, mientras que los haplotipos D negativos presentan una orientación reversa. El fenotipo D negativo, común en las poblaciones antiguas europeas, es causado por una delección del gen RHD. Este evento parece haber sido generado por un sobrecruzamiento desigual entre los genes RHCE y RHD implicando 9 Kb altamente homólogas de los extremos del gen RHD. En población africana un pseudogen del RHD es el alelo D negativo predominante, pero su frecuencia disminuye entre los afroamericanos y afrocaribeños. Reordenamientos entre los genes RHCE y RHD causan híbridos raros que causan una expresión parcial del antígeno D. Estos antígenos poco frecuentes en algunas ocasiones se han identificado como clínicamente significativos. Algunos antígenos D parciales y todos los débiles son causados por mutaciones de pérdida de sentido en el gen RHD.

40

Las proteínas Rh CcEe y Rh D se coexpresan con una glicoproteína homóloga (36% identidad), la glicoproteína asociada Rh (RhAG). Este complejo específico eritrocitario es posiblemente un heterotetrámero implicado en el transporte bidireccional del amonio. Las mutaciones en RhAG son las causantes de la enfermedad regulatoria Rh nula, asociada con defectos del transporte de la membrana de los eritrocitos, deficiencias en CD47 y una total ausencia de ICAM-4. Estas mutaciones ocurren en el dominio de la membrana de la proteína y varía entre diferentes especies. Más aun, genes relacionados con RHAG, RHBG y RHCG, han sido localizados en las regiones 1q21.3 y 15q25 respectivamente. Estos genes se expresan de diferente forma en diferentes tejidos humanos.

45

JK (Kidd)

50

Los antígenos Kidd (JK) expresados por el transportador de urea hUT-B1 de las células rojas. La implicación del antígeno Kidd en el transporte de la urea es conocido desde hace dos décadas cuando se descubrió que las células rojas JK (a^-b^-) eran resistentes a la lisis en urea 2 M. La base molecular de la expresión del antígeno Kidd es un SNP en el nucleótido 838 (G-A) causante del cambio Asp280Asn (JK*A-JK*B). El fenotipo Kidd nulo, JK (a^-b^-) es debido a mutaciones en lugares de *splicing*, mutaciones de pérdida de sentido, de parada y delecciones parciales en el gen SLC14A1. El significado funcional del transporte de urea en los eritrocitos está pendiente de ser descrito; parece que podría proteger de la lisis a los eritrocitos en el ambiente hiperosmótico de la médula renal, o limitando la pérdida de urea en la médula donde la concentración de urea es muy alta.

60

DI (Diego)

Los antígenos del grupo sanguíneo Diego son las proteínas más abundantes de la superficie de las células rojas (1.1 millón de copias por células), y facilitan el intercambio cloro-bicarbonato, crucial para el transporte del CO₂ y la homeostasia ácido-base. A principios de los 90 se determinó que los antígenos del sistema Di varían debido a múltiples SNPs presentes en el gen SLC4A1.

65

ES 2 361 800 A1

CO (Colton)

Los antígenos CO (Coa, Cob y CO3) son expresados por la molécula de transporte AQP-1, la proteína de membrana eritrocitaria mejor caracterizada. Los antígenos (Coa-Cob) son producidos por un SNP en AQP-1 que produce el cambio en el codón 45 de alanina a valina. Los individuos nulos para Co reducen la permeabilidad osmótica del agua y el ciclo vital de las células rojas.

B.2. Antígenos dependientes de proteínas expresados en enzimas de la membrana de las células rojas

KEL (Kell)

Los antígenos del sistema Kell son muy importantes en la medicina de la transfusión, el antígeno k es la segunda mayor causa de enfermedad hemolítica en recién nacidos. La glicoproteína Kell es una proteína de membrana tipo II y funciona como una metaloproteínasa de membrana unida a zinc. La región catalítica C-terminal de la proteína procesa grandes endotelinas, que son potentes vasoconstrictores. La cisteína 72 de la glicoproteína Kell forma un puente disulfuro con la proteína Kx, lo cual podría explicar porque los eritrocitos nulos Kell (Ko) muestran activación de los niveles de antígeno Kx. El antígeno de este sistema con mayor significado clínico, K (KEL1), está asociado con el cambio Met193Thr que posibilita el motivo Asn-X-Thr N-glicosilación.

DO (Dombrock)

Las variantes Doa/Dob se deben a un SNP en el gen DOK1, que codifica una enzima ADP ribosiltransferasa que afecta al codón 265 (Asn-Asp). La ADP ribosiltransferasa de las células rojas podría servir para eliminar el NAD⁺ del suero, pero también se ha observado que participa en la modificación post-transcripcional de otras proteínas. El motivo RGD y Dob participa en la adhesión celular. Curiosamente la variante alélica DO*B es más frecuente entre la población africana y asiática y podría ser una ventaja evolutiva contra la invasión eritrocitaria de *Plasmodium falciparum* que expresa RGD proteínas en su proceso de infección.

B.3. Antígenos dependientes de proteínas expresados en receptores de la membrana de las células rojas

FY (Duffy)

La función de la glicoproteína Fy como citoquina receptora de las células rojas es acelerar la señal de citoquinas proinflamatorias. La glicoproteína Fy es el receptor eritrocitario del parásito de la malaria *Plasmodium vivax* y como consecuencia los individuos Fy negativos (Fy a-b-) son muy frecuentes en poblaciones donde este parásito habita (Oeste africano). Existen tres alelos mayoritarios del FY: FY*A, FY*B y FY*A y B que difieren por un SNP que altera el codón 42, mientras que el fenotipo FY (a⁻b⁻) en africanos es causado por un SNP (C-T) en el promotor del gen FY que da lugar a la ausencia de la glicoproteína Fy en los eritrocitos.

MNS

Los antígenos MN se generan contra la glicoproteína A, mientras que los antígenos Ss contra la glicoproteína B. Los genes GYP A y GYP B se alinean en tándem en el locus 4q28-31, pero no están relacionados con las glicoproteínas C y D. Dos cambios de aminoácido en extremo N de GPA son los responsables del grupo sanguíneo M-N y un cambio de aminoácido en GPB determina el grupo sanguíneo S-s. Existe un amplio número de alelos MNS causados por reordenamientos génicos, conversiones génicas o SNPs.

Los grupos sanguíneos humanos anteriormente descritos han sido definidos a nivel genético para la mayoría de los antígenos con significado clínico. Existen otros grupos sanguíneos, aunque éstos son los que presentan una mayor relevancia clínica y los que mejor se encuentran descritos actualmente. Sin embargo, el genotipado de las células rojas presenta aún un uso limitado principalmente a la determinación prenatal de los grupos sanguíneos en casos de enfermedad hemolítica de los recién nacidos y fetos.

Actualmente la compatibilidad de las transfusiones de sangre entre donantes y receptores es evaluada mediante técnicas serológicas (reacciones anticuerpo-antígeno). La utilización de estas técnicas puede resultar fallida, obteniéndose un fenotipo incompleto de los grupos sanguíneos, lo que puede dar lugar a una potencial reacción inmunológica adversa en el receptor (paciente). No existen tests serológicos para un elevado número de los denominados antígenos débiles y en diversas ocasiones los anticuerpos empleados no resultan lo suficientemente específicos. Las únicas vías capaces de atajar problemáticas de este tipo son aquellas basadas en el genotipado molecular completo tanto del donante, como del receptor.

Las tecnologías actuales de genotipado de SNPs permitirán tanto que estas determinaciones se hagan a gran escala, como la inclusión en el genotipado de los alelos raros de los grupos sanguíneos que con las técnicas actuales no se determinan. La aparición de nuevos alelos de ciertos grupos sanguíneos (por ejemplo, Rh) continuará y se-

rá, por tanto, necesaria una tecnología capaz de evolucionar y ser monitorizada de forma constante. De hecho el proyecto Genoma Humano ha identificado nuevos SNPs en muchas proteínas implicadas en los grupos sanguíneos, aunque falta por definir serológicamente si estos SNPs resultan en la expresión de antígenos relacionados con grupos sanguíneos.

5 Actualmente los análisis genéticos moleculares son muy habituales en la medicina de la transfusión. Por ejemplo, la detección de contaminación vírica, tal como la detección del virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o el virus de la hepatitis B (HBV), a partir de volúmenes pequeños de plasma mediante metodología basada en la PCR es una práctica habitual en la Unión Europea (UE) desde 1999. Los diagnósticos basados en PCR prácticamente han suplantado a los serológicos en la determinación del HLA (antígeno leucocitario humano); y actualmente se utiliza de forma rutinaria en los centros de transfusión implicados en la identificación para los trasplantes de médula ósea.

15 Uno de los principales descubrimientos del Proyecto Genoma Humano fue la alta frecuencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) encontrados en el DNA humano. Se localizó aproximadamente un SNP por cada kilobase. Este hallazgo ha impulsado el desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido de genotipado de SNPs, por ejemplo, mediante el empleo de DNA-chips. Estas nuevas tecnologías pueden ser aplicadas al propósito de desarrollar un método de genotipado de los grupos sanguíneos para una rápida definición de los genotipos de los grupos sanguíneos en toda la población. El uso de esta tecnología puede ser aplicado a ambos grupos, pacientes y donantes.

20 Se han descrito diversos métodos de diagnóstico para determinados grupos sanguíneos. A modo ilustrativo, la patente norteamericana US 5804379 describe un método molecular de diagnóstico y un kit para la determinación de los genotipos del grupo de sangre Kell y la patente norteamericana US 5723293 describe un método y un kit para determinar los genotipos del grupo de sangre Rh. Se ha descrito, además, un test de diagnóstico serológico para clasificar los grupos sanguíneos a partir de sangre o suero. Asimismo, se han descrito variaciones génicas nuevas del grupo de sangre Duffy así como un método para el genotipado de este grupo sanguíneo.

30 Sin embargo, no se ha descrito ningún método basado en la tecnología de DNA-chips capaz de ser una plataforma abierta de genotipado de todas las variantes alélicas de los grupos sanguíneos con mayor relevancia clínica (incluidas las variantes raras) que pueda ser utilizada como método de diagnóstico a gran escala en la población.

35 Un DNA-chip que permita la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios, podrá ser utilizado clínicamente para el genotipado de los antígenos de los eritrocitos sanguíneos a gran escala en la población y, por tanto, para la determinación de grupos sanguíneos en humanos.

Descripción de la invención

40 Los autores de la presente invención han desarrollado un método de detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas y su empleo para el desarrollo de productos para genotipado. Dicho método se basa en la combinación de un novedoso diseño experimental de DNA-chips de genotipado y en el desarrollo de un sistema secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por dichos DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación (algoritmo), lo que garantiza unos altos niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que dichos DNA-chips puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico.

Método de genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas

50 Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se incluye la definición de algunos términos:

55 El término “polimorfismo” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción igual o superior a un 1% en una población; en un caso particular, cuando dicha variación es la secuencia nucleotídica ocurre en un sólo nucleótido (A, C, T o G) se denomina SNP.

60 El término “mutación génica” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción inferior al 1% en una población.

Los términos “variante alélica” o “alelo” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un polimorfismo que ocurre en un mismo locus en una misma población.

65 El término “variación génica” o “variante génica”, tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye a las mutaciones, polimorfismos y variantes alélicas. Una variación o variante génica se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies.

ES 2 361 800 A1

Por tanto, la invención proporciona un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto, en adelante método de la invención, que comprende:

- 5 - extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
- amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
- 10 - someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
- 15 - poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;
- 20 - introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
- genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles.

35 Opcionalmente, tras el proceso de hibridación, puede llevarse a cabo sobre el propio soporte una reacción de amplificación, por ejemplo, mediante “primer extensión”, o, alternativamente, una reacción de ligación, por ejemplo, mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos (Oligonucleotide Ligation Assay u “OLA”), cuando dicho soporte es una superficie sólida, tal como un soporte de vidrio, plástico, una membrana, etc. En caso de seguir alguna de estas alternativas, el marcaje de los productos que contienen las variaciones génicas a identificar se lleva a cabo en esta etapa
40 y no durante la reacción de amplificación ni durante el proceso de fragmentación.

La extracción del ácido nucleico (DNA o RNA) a partir de una muestra biológica que lo contiene procedente de un sujeto, tal como un ser humano, se puede llevar a cabo por métodos convencionales utilizando, opcionalmente, productos comerciales útiles para extraer dicho ácido nucleico. Prácticamente cualquier muestra biológica que contiene
45 ácido nucleico puede ser utilizada para la puesta en práctica de la invención; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha muestra biológica puede ser una muestra de sangre, plasma, suero, secreciones, tejido, etc.

En una realización particular, el ácido nucleico a extraer es DNA. En otra realización particular, el ácido nucleico a extraer es RNA, típicamente, RNA total; esta última alternativa puede ser utilizada en caso de que la variación
50 génica a estudiar esté situada en la secuencia codificante de un gen; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de obtención del cDNA correspondiente. La obtención de dicho cDNA se lleva a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante retrotranscripción utilizando los cebadores apropiados el RNA y como molde para la retrotranscripción.

55 Las etapas posteriores del método de la invención se llevan a cabo sobre el DNA extraído o sobre el cDNA correspondiente al RNA extraído. El término DNA, tal como se utiliza de aquí en adelante incluye tanto DNA como cDNA.

Las regiones de DNA que contienen las variaciones génicas a identificar (regiones DNA diana) se someten a una reacción de amplificación para obtener unos productos de amplificación que contienen las variaciones génicas a identificar. Aunque puede utilizarse cualquier técnica o método que permita la amplificación de todas las secuencias de
60 DNA que contienen las variaciones génicas a identificar, en una realización particular, dichas secuencias se amplifican mediante una PCR multiplex. Para la realización de una PCR multiplex se requiere el empleo de unos pares de oligonucleótidos cebadores o iniciadores capaces de amplificar dichas regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas a identificar. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de dichas regiones DNA diana, preferentemente, pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR. De este modo, utilizando los pares de oligonucleótidos cebadores y las condiciones apropiadas, se pueden amplificar todas las regiones DNA diana necesarias para
65 el genotipado de las variaciones génicas a analizar en el DNA-chip con el mínimo número posible de reacciones.

ES 2 361 800 A1

Opcionalmente, si se desea, durante la reacción de amplificación, puede llevarse a cabo el marcaje de los productos de amplificación con el fin de poder detectar posteriormente la hibridación entre las sondas inmovilizadas en el soporte y los fragmentos de DNA diana que contienen las variaciones génicas a detectar. El marcaje de los productos de amplificación puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, incorporando un nucleótido marcado durante la reacción de amplificación o bien utilizando cebadores marcados. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, por ejemplo, ³³P, ¹²⁵I, etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho marcaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (marcador), 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 (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, digoxigenina (indicador), etc., transformándose el sustrato de la enzima en un producto luminiscente o fluorescente y, efectuándose la lectura mediante quimio-luminiscencia, fluorimetría, etc.

En una realización particular, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de un nucleótido marcado directa o indirectamente con uno o más fluoróforos. En otra realización particular, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de cebadores marcados directa o indirectamente con uno o más fluoróforos.

Los productos de amplificación, opcionalmente marcados, se someten posteriormente a una reacción de fragmentación con el fin de aumentar la eficiencia de la hibridación posterior, obteniéndose de este modo unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar. La fragmentación de los productos de amplificación puede llevarse a cabo por cualquier método convencional, por ejemplo, poniendo en contacto los productos de amplificación con una Dnasa.

En caso de que los productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente durante la reacción de amplificación, y en caso de que, tras el proceso de hibridación, no se lleve a cabo una reacción de amplificación o ligación directamente en el soporte, los productos resultantes de la reacción de fragmentación (productos de fragmentación) se someten a un marcaje bien directo utilizando, por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos, etc. o bien indirecto utilizando, por ejemplo, pares de unión específica que incorporan fluoróforos, enzimas, etc., mediante métodos convencionales. En una realización particular, los productos de amplificación no han sido marcados previamente durante la reacción de amplificación, y los productos de fragmentación se someten a un marcaje directo o indirecto con uno o varios marcadores, por ejemplo, uno o varios fluoróforos, aunque pueden utilizarse otros marcadores conocidos por los expertos en la materia.

A continuación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con las sondas capaces de detectar las variaciones génicas correspondientes bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas. Dichas sondas están depositadas en un soporte sólido siguiendo una disposición predeterminada, constituyendo un DNA-chip (DNA-chip de la invención), cuyo diseño y desarrollo debe cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizado en el método de la invención en cuanto al diseño de las sondas, el número de sondas a depositar por variación génica a detectar, el número de réplicas de sondas a depositar, la distribución de las sondas sobre el soporte, etc. Las características propias de dicho DNA-chip de la invención se describen detalladamente más adelante.

La hibridación de los productos de fragmentación con las sondas capaces de detectar las variaciones génicas correspondientes depositadas en un soporte (DNA-chip de la invención) se lleva a cabo por métodos convencionales utilizando dispositivos convencionales. En una realización particular, la hibridación se lleva a cabo en una estación automática de hibridación. Para llevar a cabo la hibridación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con dichas sondas (DNA-chip de la invención) bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas. Unas condiciones de hibridación estables permiten establecer la hebra y la longitud apropiada de las sondas con el fin de maximizar la discriminación, tal como se menciona más adelante.

Como se ha mencionado previamente, si se desea, cuando dicho soporte es un soporte sólido, tras el proceso de hibridación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación, por ejemplo, mediante "primer extensión", o, alternativamente, una reacción de ligación, por ejemplo, mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), al mismo tiempo que se realiza el marcaje de los oligonucleótidos depositados en el soporte. El marcaje de dichos oligonucleótidos puede ser un marcaje directo utilizando, por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos, etc. o indirecto utilizando, por ejemplo, pares de unión específica que incorporan fluoróforos, enzimas, etc., mediante métodos convencionales, tal como se ha mencionado previamente en relación con el marcaje de los productos de amplificación o de fragmentación.

En caso de que se desee llevar a cabo una reacción de amplificación post-hibridación utilizando, por ejemplo, la metodología "primer extensión", tras la hibridación, se lleva a cabo una reacción de extensión (amplificación) de los oligonucleótidos hibridados sobre el soporte (portaobjetos de cristal). La extensión, con nucleótidos marcados o a través de un marcaje indirecto, sólo se producirá si el extremo 3' del oligonucleótido híbrida perfectamente con el producto de amplificación.

ES 2 361 800 A1

Asimismo, en caso de que se desee realizar una reacción de ligación post-hibridación utilizando, por ejemplo, la metodología "OLA", tras la hibridación, se lleva a cabo una reacción de ligación de los oligonucleótidos hibridados sobre el soporte (portaobjetos de cristal) con los oligonucleótidos marcados diseñados para hibridar de forma adyacente. La ligación sólo se producirá si el extremo 3' de la sonda depositada sobre el soporte híbrida perfectamente con el producto de amplificación.

Finalizado el proceso de hibridación, o, en su caso, dichas reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, se procede a la captura de la imagen y a su cuantificación. Para ello, la imagen del DNA-chip hibridado y revelado es recogida con un dispositivo apropiado, por ejemplo, un escáner, procediéndose, a continuación, a cuantificar los valores absolutos de fluorescencia de cada sonda así como del ruido de fondo. Por tanto, en una realización particular, tras la hibridación, o tras las reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, el DNA-chip hibridado y revelado se introduce en un escáner donde es sometido a un escaneado para cuantificar la intensidad del marcaje en los puntos donde se ha producido la hibridación. Aunque prácticamente cualquier escáner puede ser utilizado, en una realización particular, dicho escáner es un escáner de fluorescencia confocal. En este caso, el DNA-chip se introduce en el escáner y se escanea la señal emitida por el marcaje al ser excitado por un láser, cuantificándose la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación. En una realización particular, dicho escáner es un escáner de luz blanca. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de escáneres que pueden ser utilizados según la presente invención son escáneres de Axon, Agilent, Perkin Elmer, etc.

A continuación se procede al análisis de los datos y a su interpretación, lo que se lleva a cabo mediante el empleo del software de genotipado y algoritmo desarrollado por los inventores.

El análisis de los datos y su interpretación se lleva cabo, en general, mediante el empleo de programas informáticos (software); sin embargo, no todos los programas son apropiados requiriéndose programas que mejoren la calidad de la información obtenida. Los inventores han desarrollado un método secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por los DNA-chips de la invención que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método de la invención, en base a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles, tal como se describe a continuación. El algoritmo y software informático desarrollado por los inventores permite facilitar y automatizar la aplicación del método de la invención.

La ejecución del algoritmo y software informático desarrollado por los inventores para procesar secuencialmente e interpretar los datos experimentales generados por los DNA-chips de la invención comprende la realización de serie de etapas para caracterizar cada uno de las variaciones génicas de interés, concretamente:

- en primer lugar, a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas se les resta su propio ruido de fondo;
- a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada una de las 4 sondas utilizadas para caracterizar cada variación génica;
- el valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes;
- conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas, se calcula el ratio 1 y el ratio 2, en donde

Ratio 1 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación génica A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación génica A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 2 que detecta la variación génica B y puede calcularse mediante la ecuación:

$$\text{Ratio 1} = \frac{\text{Intensidad media sonda 1}}{\text{Intensidad media sonda 1} + \text{Intensidad media sonda 2}}$$

Ratio 2 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación génica A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación génica A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 4 que detecta la variación génica B y puede calcularse mediante la ecuación:

$$\text{Ratio 2} = \frac{\text{Intensidad media sonda 3}}{\text{Intensidad media sonda 3} + \text{Intensidad media sonda 4}}$$

ES 2 361 800 A1

- dichos ratios (ratio 1 y ratio 2) se sustituyen en tres funciones lineales, que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

AB Función 2

BB Función 3

en donde

AA representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación génica A;

AB representa el genotipo de un sujeto heterocigoto para las variaciones génicas A y B;

BB representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación génica B;

Función 1 es la Función Lineal que caracteriza a los pacientes con el genotipo AA y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

Función 2 es la Función Lineal para el genotipo AB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

Función 3 es la Función Lineal para el genotipo BB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

en donde las combinaciones lineales están formadas por constantes y cofactores que acompañan a las variables ratio 1 y ratio 2; y

- la función que presente un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el paciente para la variación génica analizada.

Las tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos se corresponden con las tres combinaciones lineales de los ratios 1 y 2 que maximizan la discriminación entre un grupo de sujetos homocigotos AA, heterocigotos AB y homocigotos BB mediante el cálculo de sus correspondientes ratios 1 y 2. El número mínimo de sujetos para calcular unas funciones fiables es 5. Por tanto, en una realización particular, la obtención de dichas funciones se lleva a cabo mediante el análisis de un mínimo de 5 pacientes por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica (AA, AB, BB). Con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 pacientes. Estos ratios sirven como variables de clasificación de los tres grupos para generar las funciones lineales. Con estas tres funciones lineales se evalúa la capacidad discriminatoria de las dos parejas de sondas diseñadas. En caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, las sondas serían rediseñadas. Nuevos pacientes caracterizados para cada uno de los tres genotipos constituyen nuevos ratios 1 y 2 para perfeccionar las combinaciones lineales de los mismos que constituyen las funciones lineales y, en definitiva, mejorar la capacidad discriminatoria del algoritmo basado en estas tres funciones.

En una realización particular en la que el escáner utilizado es un escáner de fluorescencia confocal, siempre que (i) los ratios 1 y 2 se encuentren dentro del rango de los ratios usados para construir las funciones lineales, (ii) la intensidad de fluorescencia media de las $4n$ réplicas (dónde "n" es el número de réplicas de cada sonda, es decir 6, 8 ó 10), por ejemplo, 40 réplicas con respecto al ruido de fondo sea mayor de 5 y (iii) el coeficiente de variación de las réplicas esté por debajo de 0,25, el resultado clasificatorio de las funciones lineales se considera correcto. Las 3 funciones lineales para cada genotipo se construyen a partir de los 15 ratios 1 y 15 ratios 2 obtenidos del análisis con el DNA-chip de 5 pacientes (en una realización particular) por genotipo (5 AA, 5 AB y 5 BB); al analizar un nuevo paciente, se calcularán los ratios 1 y 2 y se sustituirán dichos ratios en las funciones; la función de mayor valor absoluto determina el genotipo. Además, los ratios 1 y 2 del nuevo paciente, por ejemplo AA, deben estar incluidos en los 5 ratios 1 y 2 que permitieron construir la función lineal que determina el grupo AA (se trata, pues, de una doble comprobación).

Asimismo, cuando se utiliza un escáner de fluorescencia confocal, para dar por buena una hibridación completa es necesario que (a) la relación intensidad frente a ruido de fondo de todas las sondas del DNA-chip esté por encima de 15; (b) la media de todos los ratios debe superar 0,6 como control de especificidad y sensibilidad; (c) el coeficiente de variación de todas las réplicas debe ser inferior a 0,25; (d) el ratio del control externo debe estar por encima de 0,6 y (e) el control negativo nunca debe ser superior a 3 veces el ruido de fondo. Todas las condiciones (a)-(e) deben ser cumplidas simultáneamente para dar por buena la hibridación completa utilizando un escáner de fluorescencia confocal.

Por tanto, según la invención, el genotipado de cada una de las variaciones génicas se lleva a cabo a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar

ES 2 361 800 A1

cada variación génica, en la que se eliminan los valores extremos (“outliers”); en una realización particular, dichos valores extremos eliminados constituyen entre el 10% y el 50% de los valores obtenidos. Asimismo, el algoritmo desarrollado por los inventores para el genotipado de cada una de dichas variaciones génicas sujetas a estudio permite detectar cada una de las variaciones génicas en base a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles (AA, AB y BB). Dicho algoritmo comprende una secuencia con los siguientes pasos: utilización de 4 sondas replicadas 6, 8 ó 10 veces; cálculo de la media acotada para calcular la intensidad media de las réplicas; cálculo de los ratios 1 y 2 correspondientes a las 2 parejas de sondas (para la detección de las variaciones génicas A y B); sustitución de los ratios 1 y 2 obtenidos en las ecuaciones lineales obtenidas a partir de los ratios 1 y 2 que discriminaron los “n” pacientes control con genotipo AA, los “n” pacientes control con genotipo AB y los “n” pacientes control con genotipo BB de cada variación génica (en una realización particular “n” es 5); y determinar el genotipo de cada paciente para cada variación génica incluida en el DNA-chip en base al mayor valor absoluto. Por último se comprueba que los ratios se corresponden con los ratios de los “n” pacientes control que determinan cada genotipo. Se han probado otros análisis como por ejemplo, no usar réplicas, no calcular la media acotada, agrupar las réplicas, etc. y se ha observado que no funciona, tener en cuenta sólo los ratios hace que el análisis informático sea más lento, sin embargo, las funciones agilizan el análisis y permiten discriminar más y mejor.

El método de la invención constituye, por tanto, un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo, sensible, específico y reproducible de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto. El método de la invención permite identificar cambios de nucleótidos, inserciones, duplicaciones, deleciones, etc. y determinar el genotipo de un sujeto para una variación génica dada.

Para la puesta en práctica del método de la invención se han desarrollado unos DNA-chips de genotipado útiles para detectar variaciones génicas, cuyas características se mencionan más adelante.

25

DNA-chips de genotipado

La utilización clínica del método de la invención en la detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos de interés requiere la validación previa de los DNA-chips de genotipado utilizados en la puesta en práctica del método de la invención, los cuales presentan un diseño característico.

En general, un DNA-chip de genotipado adecuado para la puesta en práctica del método de la invención, en adelante DNA-chip de la invención, comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas útiles para detectar variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes asociadas a antígenos eritrocitarios humanos, en donde, por cada variación génica, hay 4 sondas, de las cuales 2 sondas detectan una primera variación génica y las otras 2 detectan una segunda variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas y las dos sondas no tienen por qué ser iguales. Dichas sondas están depositadas siguiendo un patrón determinado y distribuidas homogéneamente entre las 2 áreas que constituyen el DNA-chip pero no agrupadas por variación génica a detectar, es decir, que están distribuidas a lo largo y ancho del chip y además no agrupadas dentro de una misma variación génica.

El DNA-chip de la invención también puede contener, si se desea, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de amplificación y/o hibridación.

45

Sondas

Diseño de las sondas

50

Con el fin de disminuir al máximo la tasa de falsos positivos y negativos se diseñan dos parejas de sondas para detectar cada variación génica. Cada pareja de sondas está constituida por una sonda específica para la detección de una variación génica (e.g., el alelo normal) y por otra sonda diseñada para la detección de otra variación génica (e.g., el alelo mutante). En el caso de mutaciones puntuales, la base que difiere entre el alelo normal y el mutante (base a interrogar) se coloca en la posición central de la sonda, lo que asegura la máxima especificidad en la hibridación. En el caso de inserciones, duplicaciones o deleciones son varias las bases que se pueden interrogar. Sin embargo, el diseño se hace completamente equivalente considerando como posición central el primer nucleótido que es diferente en la secuencia normal con respecto a la secuencia mutada.

La capacidad de las sondas específicas de variaciones génicas para discriminar entre las variaciones génicas (e.g., el alelo normal y el alelo mutante) depende de las condiciones de hibridación, de la secuencia que flanquea a la mutación y de la estructura secundaria de la secuencia en la que se quiere detectar la mutación. Unas condiciones de hibridación estables permiten establecer la hebra y la longitud apropiada de las sondas con el fin de maximizar la discriminación. Partiendo de sondas de 25 nucleótidos que detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y otra variación génica (e.g., el alelo mutante) en ambas hebras (hebra sentido y hebra antisentido), se requiere, en general, una media de 8 sondas ensayadas experimentalmente para quedarse con las dos parejas definitivas.

65

ES 2 361 800 A1

En una realización particular, para cada variación génica a detectar mediante el DNA-chip de la invención, las sondas diseñadas interrogan ambas hebras, con longitudes típicamente comprendidas entre 19 y 27 nucleótidos, y la temperatura de hibridación varía entre 75°C y 85°C.

5 En caso de que el método de la invención incluye el empleo de la metodología “primer extensión” u “OLA”, se diseñan igualmente 4 sondas, 2 de dichas sondas detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y las otras 2 sondas detectan la otra variación génica (e.g., el alelo mutante). En este caso, la base interrogada no se coloca en la posición central sino en la posición 3' de la sonda. En el caso de la metodología “OLA”, se diseñan unos oligonucleótidos marcados directa o indirectamente que hibridan a continuación de las sondas depositadas en el soporte sólido para permitir la reacción de ligación.

15 Dado que el método de la invención puede ser utilizado para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos de interés, la naturaleza de las sondas presentes en el DNA-chip de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo ya que, en cada caso, se pueden seleccionar las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar; en particular, dichas sondas son unas sondas útiles para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos. En la Tabla 1 se incluye una relación de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos; no obstante, se pueden ir incorporando en los DNA-chips de la invención sondas que permitan la identificación de otras variaciones génicas asociadas con el reconocimiento de antígenos de interés a medida que se vayan identificando.

Disposición de las sondas en el soporte

25 Según la invención, se usan 4 sondas (es decir, 2 parejas de sondas) por cada variación génica a detectar que se depositan sobre el soporte sólido siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar. Dos de dichas sondas detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y las otras dos sondas detectan otra variación génica (e.g., el alelo mutante). El número de réplicas de cada una de dichas sondas en el DNA-chip de la invención es de 10, 8 ó 6 réplicas. En una realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 10 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica; en otra realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 8 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica; y, en otra realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 6 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica.

35 La disposición (colocación) de las sondas en el soporte está predeterminada. En una realización particular, las sondas depositadas en el soporte, aunque mantienen una disposición predeterminada, no están agrupadas por variación génica sino que tienen una distribución al azar, la cual, si se desea, puede ser siempre la misma.

Controles

40 El DNA-chip de la invención también puede contener, si se desea, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de amplificación y/o hibridación.

45 En una realización particular, el DNA-chip de la invención comprende unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de hibridación. En general, cada uno de los subarrays, típicamente 16, que constituyen un DNA-chip, está flanqueado por unos controles externos de hibridación que permiten localizar fácilmente los puntos sobre el soporte. Aunque con la misma secuencia, el DNA-chip dispone de dos controles externos de hibridación marcados, por ejemplo, con un fluoróforo (e.g., Cy3, Cy5, etc.), que sirven para evaluar la calidad de la hibridación en ambos canales. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del control externo es la siguiente (5'->3'):

CEH: GTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGAGTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGA y las secuencias de los oligonucleótidos para su detección son las siguientes:

55 ON1: CTTGACGACTCCTGAACGG

ON2: CTTGACGACACCTGAACGG

Soporte

60 El soporte sobre el que están depositadas la pluralidad de sondas puede ser cualquier superficie sólida sobre la que se puedan unir oligonucleótidos. Prácticamente cualquier soporte sobre el que pueda unirse o inmovilizarse un oligonucleótido, utilizado en la producción de DNA-chips, puede ser utilizado para la puesta en práctica de esta invención. A modo ilustrativo, dicho soporte puede ser un soporte no poroso, por ejemplo, un soporte de cristal, silicio, plástico, etc., o bien un soporte poroso, por ejemplo, membranas (nylon, nitrocelulosa, etc.), micropartículas, etc. En una realización particular, dicho soporte es un portaobjetos (porta) de cristal.

Unión de las sondas al soporte

Las sondas se inmovilizan (unen) sobre el soporte utilizando técnicas convencionales de inmovilización de oligonucleótidos sobre la superficie de los soportes. Dichas técnicas dependen, entre otros factores, de la naturaleza del soporte utilizado [porosa (membranas, micropartículas, etc.) o no porosa (cristal, plástico, silicio, etc.)]. En general, las sondas pueden inmovilizarse sobre el soporte mediante el empleo de técnicas de inmovilización no covalentes o bien mediante el empleo de técnicas de inmovilización basadas en la unión covalente de las sondas a la superficie del soporte mediante procedimientos químicos.

La preparación de soportes no porosos (e.g., cristal, silicio, plástico, etc.) requiere, en general, un tratamiento previo con grupos reactivos (e.g., amino, aldehído, etc.) o bien recubrir la superficie del soporte con un miembro de un par de unión específica (e.g., avidina, estreptavidina, etc.). Asimismo, en general, resulta conveniente activar previamente las sondas a inmovilizar mediante grupos tiol, amino, etc., o biotina, etc., con el fin de conseguir una inmovilización específica de las sondas sobre el soporte.

La inmovilización de las sondas en el soporte puede llevarse a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas basadas en la síntesis *in situ* de las sondas sobre el propio soporte (e.g., fotolitografía, síntesis química directa, etc.), o mediante técnicas basadas en el empleo de brazos robotizados que depositan la sonda correspondiente presintetizada (impresión sin contacto, impresión por contacto, etc.), etc.

La disposición (colocación) de las sondas en el soporte está predeterminada. En una realización particular, las sondas depositadas en el soporte sólido, aunque mantienen una disposición predeterminada, no están agrupadas por variación génica sino que tienen una distribución al azar, la cual, si se desea, puede ser siempre la misma.

En una realización particular, el soporte es un portaobjetos de cristal, y, en este caso, las sondas, en el número de réplicas establecido (6, 8 ó 10), se imprimen en portas de cristal previamente tratados, por ejemplo, aminosilanizados, usando un equipo de producción automática de DNA-chips por deposición de los oligonucleótidos en el portaobjetos de cristal ("microarrayer") bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado (80°C), manteniendo controlada la humedad y temperatura durante el proceso de deposición, típicamente entre 40-50% de humedad relativa y 20°C de temperatura.

Las réplicas (sondas) se distribuyen en las placas de impresión, que contienen los oligonucleótidos en solución, de forma que las impriman un número de puntas distintas igual a la mitad de las réplicas. Las réplicas se distribuyen homogéneamente entre las áreas o sectores (sub-arrays) que constituyen el DNA-chip. El número de réplicas así como su homogénea distribución a lo largo y ancho del DNA-chip minimizan la variabilidad experimental proveniente de los procesos de impresión e hibridación. Asimismo, se imprimen controles positivos y negativos de hibridación. En general, cada uno de los sub-arrays que constituyen el DNA-chip está flanqueado por unos controles externos de hibridación que permiten localizar fácilmente los puntos sobre el soporte. Aunque con la misma secuencia, el DNA-chip dispone de dos controles externos de hibridación marcados, por ejemplo, con un fluoróforo (e.g., Cy3, Cy5, etc.), que sirven para evaluar la calidad de la hibridación en ambos canales. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del control externo es la identificada previamente como "CEH" y las secuencias de los oligonucleótidos para su detección son las identificadas previamente como ON1 y ON2.

Para controlar la calidad del proceso de fabricación del DNA-chip en términos de señal de hibridación, ruido de fondo, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad de cada réplica (coeficiente de variación) así como del tamaño y forma de los puntos impresos (sondas) se puede utilizar un DNA comercial. A modo ilustrativo, como control de calidad de la impresión de los DNA-chips de la invención, se lleva a cabo la hibridación con un DNA comercial (e.g., k562 DNA High Molecular Weight, Promega) de uno de cada un número determinado de soportes cargados con las sondas, por ejemplo, cada 20 soportes impresos. En primer lugar, se analiza la forma y tamaño de los puntos impresos. En esta hibridación se controlan los mismos parámetros que se han explicado previamente para aceptar un genotipado con el DNA-chip de la invención en cuanto a la relación entre la intensidad y el ruido de fondo del DNA-chip, especificidad - sensibilidad media y reproducibilidad de las réplicas (coeficiente de variación). Asimismo se comprueba el correcto genotipado de ese DNA control.

Los DNA-chips de la invención pueden ser utilizados, en combinación con el método de la invención, para detectar variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos de interés, para lo cual se utilizarán las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar. Una ventaja de los DNA-chips de la invención radica en que pueden incorporar sondas que permitan la identificación de otras variaciones génicas asociadas con el reconocimiento de antígenos eritrocitarios humanos a medida que se vayan identificando tales variaciones génicas; para ello, se deberán diseñar las sondas y los DNA-chips de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, tal como se ha mencionado previamente.

Los inventores han diseñado, producido y validado la utilización clínica del método de la invención en la detección de variaciones génicas humanas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos mediante el desarrollo (diseño y producción) del DNA-chip correspondiente. Por tanto, en una realización particular, el DNA-chip de la invención es:

ES 2 361 800 A1

- un DNA-chip que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios que pueden ser identificados se recogen en la Tabla 1; no obstante, la relación de variaciones génicas contenida en dicha tabla puede incrementarse con otras variaciones génicas que vayan identificándose posteriormente y que estén asociadas a antígenos eritrocitarios.

TABLA 1

Variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios

el polimorfismo GG87_88insG (Genotipo O4) (BC008) en el exón 2 del gen ABO,

el polimorfismo G188A+C189T (Genotipo O1v) (BC012) en el exón 4 del gen ABO,

los polimorfismos 261delG (Genotipo O1/O1v) (BC001), C322T (Genotipo O5) (BC009) en el exón 6 del gen ABO,

los polimorfismos C467T (P156L) (Genotipo A2) (BC014), G542A (Genotipo O8) (BC013), T646A (Genotipo Ax/O1v) (BC015), G703A (Genotipo G235S) (B) (BC002), C796A (Genotipo L266M) (B) (BC003), G802A (Genotipo O2) (BC004), G803C (Genotipo G268A) (B, cisAB-1) (BC005), 798-804insG (Genotipo O3, Ael) (BC007), C893T (Genotipo O6) (BC010), C927A (Genotipo O7) (BC011), 1059-1061delC (D FS354+21aa) (Genotipo A2) (BC006) en el exón 7 del gen ABO,

los polimorfismos C8G (S3C) (Genotipo weak D type 3) (BC040), G48A (W16X) (Genotipo RHD W16X) (BC046), C121T (Q41X) (Genotipo RHD Q41X) (BC047) en el exón 1 del gen RHD,

ES 2 361 800 A1

TABLA 1 (continuación)

5 los polimorfismos A178C, G203A, T307C (exon scanning) (BC016, BC017, BC018), T161C (L54P) (Genotipo DMH) (BC033), G270A (W90X) (Genotipo RHD W90X) (BC047), T329C (L110P) (Genotipo DVII) (BC028) en el exón 2 del gen RHD,

10 los polimorfismos C340T (Genotipo weak D type 17) (BC043), C410T (Genotipo DIIIIV) (BC059), C446A (A149D) (Genotipo weak D type 5) (BC041), A455C (Genotipo DIIIA, DIIIV, DIVa) (BC060), IVS3+1G>A (Genotipo alelo negativo) (BC049) en el exón 3 del gen RHD,

20 los polimorfismos 488del4 (Genotipo alelo negativo) (BC050), A497C (H166P) (Genotipo DFW) (BC030), T509C (M170T) (Genotipo DOL) (BC027), A514T (Genotipo DFR1) (BC065), T544A, G577A, A594T (Genotipo DVI-I weak D type 4) (exon scanning), (BC019, BC020, BC021) en el exón 4 del gen RHD,

25 los polimorfismos G635T (G212V) (Genotipo RHD G212V) (BC051), T667G (Genotipo DIIIA, weak D type 4, Dva, DAR, DOL, DCS) (BC061), G676C (Genotipo DCS, G686A (Genotipo DHR) (BC031), G697C (E233Q), (Genotipo G712A (M238V) (DVI I, weak D type 4, DV, DCS) (BC022, BC023), A712G (genotipo alelo negativo) (BC023) en el exón 5 del gen RHD,

35 los polimorfismos T807G (Genotipo pseudogene) (BC044), T809G (Genotipo weak D type 1) (BC038), G845A (G282D) (Genotipo weak D type 15, DIM) (BC037), C848T (T283I) (Genotipo DHMI) (BC029), G854A (C285Y) (Genotipo DIM) (BC032), G885T (M295I) (Genotipo alelo negativo M295I) (BC053), 906insGGCT (Genotipo alelo negativo) (BC054), G916A, A932G (consenso exon scanning consenso exon scanning exon scanning) (BC062, BC063), IVS6+1del4 (Genotipo alelo negativo) (BC055) en el exón 6 del gen RHD,

45 polimorfismos G941T (G314V) (Genotipo alelo negativo) (BC056), C990G (Y330X) (Genotipo alelo negativo) (BC057), G1016A (G339E) (Genotipo weak D type 7) (BC042), T1025C (I342T) (exon scanning) (BC024), G1048C (Genotipo DIVa, DIVb) (BC094), G1057A (G353R) (Genotipo DNU) (BC034), C1061A (A354N) (Genotipo DII) (BC036), G1063A (G355S) (Genotipo DNB) (BC026), T1073C (Genotipo DWI) (BC035) en el exón 7 del gen RHD,

50 el polimorfismo IV8+1G>A (Genotipo alelo negativo) (BC058) en el exón 8 del gen RHD,

55 los polimorfismos G1154C (G385A) (Genotipo weak D type 2) (BC039), A1193T (Genotipo DIVb) (BC064), G1227A (K409K) (Genotipo K409K) (BC045) en el exón 9 del gen RHD,

ES 2 361 800 A1

TABLA 1 (continuación)

5 los polimorfismos G106A (A36T) (Genotipo Cx) (BC068), A122G (Q41R)
(Genotipo Cw) (BC067) en el exón 1 del gen RHCE,
el polimorfismo T307C (S103P) (Genotipo Rhc) (BC066) en el exón 2 del gen
10 RHCE,
el polimorfismo C410T (A137V) (BC059) en el exón 3 del gen RHCE,
los polimorfismos C676G (P226A) (Genotipo Ee) (BC025, BC069), C733G
15 (L245V) (Genotipo VS) (BC070) en el exón 5 del gen RHCE,
el polimorfismo G1006T (G336C) (Genotipo VS-/VS+) (BC071) en el exón 7 del
gen RHCE,
20 los polimorfismos A697T (Genotipo Kk) (BC073), C698T (T193M) (Genotipo
Kk) (BC072) en el exón 6 del gen KELL,
los polimorfismos T961C (R281W) (Genotipo KpaKpb) (BC074), G962A
25 (R281Q) (Genotipo KpbKpc) (BC075) en el exón 8 del gen KELL,
el polimorfismo G1208A (S363N) (Genotipo Kmod-1) (BC077) en el exón 10 del
gen KELL,
30 el polimorfismo C1910T (L597P) (Genotipo JsaJsb) (BC076) en el exón 17 del
gen KELL,
35 el polimorfismo I5AG>AA (Genotipo Jknull) (BC079) en el exón 6 del gen
SLC14A1 (grupo sanguíneo KIDD),
los polimorfismos G838A (D280N) (Genotipo JkaJkb) (BC078), T871C (S291P)
40 (Genotipo Jknull) (BC080) en el exón 9 del gen SLC14A1 (grupo sanguíneo
KIDD),
45 los polimorfismos T-33C (Genotipo FyGATA) (BC082), G125A (D42G)
(Genotipo FyaFyb) (BC081), C265T (R89C) (Genotipo Fyx) (BC083) en el gen
DARC (grupo sanguíneo DUFFY),
50 los polimorfismos C59T, G71A, T72G (S20L, G42E, G42E) (Genotipo MN)
(BC084, BC085) en el exón 2 del gen GYPA,
el polimorfismo T143C (M48T) (Genotipo Ss) (BC086) en el exón 4 del gen
55 GYPB,
los polimorfismos C790A (Genotipo GpMUR MilII) (BC089), C850G (Genotipo
GpMUR MilII) (BC090) en el exón 3 del gen GYPE,
60 los polimorfismos C230T (Genotipo U) (BC087), I5+5GT (Genotipo U) (BC088)
en el exón 5 del gen GYPB,
65 el polimorfismo T2561C (P854L) (Genotipo DiaDib) (BC091) en el exón 19 del
gen SLC4A1 (grupo sanguíneo DIEGO),

ES 2 361 800 A1

TABLA 1 (continuación)

5 el polimorfismo A793G (Genotipo DoaDob) (BC092) en el exón 2 del gen
DOMBROCK,
10 el polimorfismo C134T (A45V) (Genotipo CoaCob) (BC093) en el exón 1 del
gen COLTON.

15 Las secuencias de todos los genes mencionados en la Tabla 1 son conocidas y están recogidas, entre otras, en las siguientes páginas webs: GeneBank (NCBI), GeneCard (Weizmann Institute of Sciences) y Snpper.chip.org (Innate Immunity PGA).

20 *Kits*

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la puesta en práctica del método de la invención, en adelante kit de la invención, que comprende:

- 25 - un DNA-chip de la invención que comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas que permiten la detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos presentes en uno o más genes;
- un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método de la invención que comprende el empleo de un algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método; y, opcionalmente,
- 30 - un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación del método de la invención.

35 El kit de la invención puede contener, además, si se desea, unos controles positivos y negativos de la reacción de hibridación.

40 Las características del DNA-chip de la invención, método de la invención y algoritmo proporcionado por esta invención ya han sido descritas previamente.

45 El kit de la invención puede ser utilizado para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos de interés, para lo cual se seleccionarán las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la identificación *in vitro* de grupos sanguíneos humanos, o el genotipado *in vitro* de grupos sanguíneos humanos, que comprende:

- 50 - un DNA-chip de la invención que comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas que permiten la detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos;
- un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método de la invención que comprende el empleo de un algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método; y, opcionalmente,
- 55 - un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación del método de la invención para detectar variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos.

60 En una realización concreta, el kit de la invención comprende un DNA-chip de la invención que comprende, depositadas sobre un soporte siguiendo un patrón determinado, unas sondas que permiten la detección de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos, en donde dichas variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos se seleccionan del grupo de variaciones génicas mencionadas en la Tabla 1 y combinaciones de las mismas.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos, utilizando un DNA-chip, para la identificación de grupos sanguíneos humanos

1.1 Diseño del DNA-chip para genotipado de grupos sanguíneos

Se diseñó y fabricó un DNA-chip para detectar variaciones génicas humanas asociadas a algunos antígenos eritrocitarios que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos. Ejemplos ilustrativos de dichas variaciones génicas humanas asociados a antígenos eritrocitarios humanos que pueden ser determinados utilizando este DNA-chip se mencionan en la Tabla 1.

En este caso concreto, el DNA-chip diseñado y fabricado consta de un soporte (portaobjetos de cristal) que contiene sobre su superficie una pluralidad de sondas que permiten la detección de las variaciones génicas mencionadas anteriormente. Estas sondas son capaces de hibridar con las secuencias diana amplificadas de los genes que codifican los antígenos eritrocitarios cuya variación génica se desea estudiar. Las secuencias de DNA de cada una de las sondas utilizadas son las siguientes [en general, se indica el nombre del gen, la mutación (cambio de nucleótido, "ins": inserción, "del": deleción), el genotipo y el exón].

ABO G261delG GENOTIPO: ABO O1/O1v [sondas para detectar el polimorfismo G261delG (Genotipo ABO O1/O1v) en el exón 6 del gen ABO]

EXON 6

BC001OV01	CAGCCAAGGGGTCACCACGAGGACA	25
BC001OV02	CCAGCCAAGGGGTACCACGAGGACA	25
BC001OV03	CCAGCCAAGGGGTCACCACGAGGACAT	27
BC001OV04	GCCAGCCAAGGGGTACCACGAGGACAT	27

ABO G703A GENOTIPO: ABO B

EXON 7

BC002OV01	ACCCTGCACCCCGGCTTCTACGGAA	25
BC002OV02	ACCCTGCACCCCAGCTTCTACGGAA	25
BC002OV03	CACCCTGCACCCCGGCTTCTACGGAAG	27
BC002OV04	CACCCTGCACCCCAGCTTCTACGGAAG	27

ABO C796A GENOTIPO: ABO B

EXON7

BC003OV01	AGAACCCCCCAGGTAGTAGAAATC	25
BC003OV02	AGAACCCCCCATGTAGTAGAAATC	25
BC003OV03	AAGAACCCCCCAGGTAGTAGAAATCG	27
BC003OV04	AAGAACCCCCCATGTAGTAGAAATCG	27

ES 2 361 800 A1

ABO G802A GENOTIPO: ABO O2

EXON7

5

BC004OV01	CCCCGAAGAACCCCCCAGGTAGTA	25
BC004OV02	CCCCGAAGAACCTCCCCAGGTAGTA	25
BC004OV03	CCCGAAGAACCCCCCAGGTAGT	23
BC004OV04	CCCGAAGAACCTCCCCAGGTAGT	23

10

15

ABO G803C GENOTIPO: ABO B2,cisAB-1

EXON7

20

BC005OV01	CCCCCGAAGAACCCCCCAGGTAGT	25
BC005OV02	CCCCCGAAGAACGCCCCCAGGTAGT	25
BC005OV03	ACCCCCGAAGAACCCCCCAGGTAGTA	27
BC005OV04	ACCCCCGAAGAACGCCCCCAGGTAGTA	27

25

30

ABO CCC1059-1061 GENOTIPO: ABO A2

EXON7

35

BC006OV01	CGGTCCGGAACCCGTGAGCGGCTGC	25
BC006OV02	CGGTCCGGAACCCGTGAGCGGCTGCC	25
BC006OV03	GCGGTCCGGAACCCGTGAGCGGCTGCC	27
BC006OV04	GCGGTCCGGAACCCGTGAGCGGCTGCCA	27

40

45

ABO GGGGGG G798_804insG GENOTIPO: ABO O3,Ael

EXON7

50

BC007OV01	CCCCGAAGAACCCCCCAG	19
BC007OV02	CCCGAAGAACCCCCCAG	19
BC007OV03	CCCCCGAAGAACCCCCCAGG	21
BC007OV04	CCCCGAAGAACCCCCCAGG	21

55

60

65

ES 2 361 800 A1

ABO GG87_88insG GENOTIPO: ABO O4

EXON2

5	BC008OV01	TGCTTGTCTTGGTCTTGTTGGGTA	25
	BC008OV02	TGCTTGTCTTGGGTCTTGTTGGGT	25
	BC008OV03	GCTTGTCTTGGTCTTGTTGGGT	23
10	BC008OV04	GCTTGTCTTGGGTCTTGTTGGG	23

15

ABO C322T GENOTIPO: ABO O5

EXON6

20	BC009OV01	GGAGCCTGAACTGCTCGTTGAGGAT	25
	BC009OV02	GGAGCCTGAACTACTCGTTGAGGAT	25
25	BC009OV03	TGGAGCCTGAACTGCTCGTTGAGGATG	27
	BC009OV04	TGGAGCCTGAACTACTCGTTGAGGATG	27

30

ABO C893T GENOTIPO: ABO O6

EXON7

35	BC010OV01	TCGTGCCACACGGCCTCGATGCCGT	25
40	BC010OV02	TCGTGCCACACGACCTCGATGCCGT	25
	BC010OV03	CGTGCCACACGGCCTCGATGCCG	23
45	BC010OV04	CGTGCCACACGACCTCGATGCCG	23

50

ABO C927A GENOTIPO: ABO O7

EXON7

55	BC011OV01	CCTGAACAAGTACCTGCTGCGCCAC	25
	BC011OV02	CCTGAACAAGTAACTGCTGCGCCAC	25
60	BC011OV03	ACCTGAACAAGTACCTGCTGCGCCACA	27
	BC011OV04	ACCTGAACAAGTAACTGCTGCGCCACA	27

65

ES 2 361 800 A1

ABO G188A/C189T GENOTIPO: ABO O1v

EXON4

5	BC012OV01	ACCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGCC	25
	BC012OV02	ACCATCTGCAGCATGTCTCGTTGCC	25
	BC012OV03	CCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGC	23
10	BC012OV04	CCATCTGCAGCATGTCTCGTTGC	23

15

ABO G542A GENOTIPO: ABO O8

EXON7

	BC013OV01	GACACGTCCTGCCAGCGCTTGTAGG	25
	BC013OV02	GACACGTCCTGCTAGCGCTTGTAGG	25
25	BC013OV03	ACACGTCCTGCCAGCGCTTGTAG	23
	BC013OV04	ACACGTCCTGCTAGCGCTTGTAG	23

30

ABO C467T GENOTIPO: ABO A2

EXON7

	BC014OV01	GGCACCGCGGCCGGCTGGTCGGTGA	25
40	BC014OV02	GGCACCGCGGCCAGCTGGTCGGTGA	25
	BC014OV03	GGGCACCGCGGCCGGCTGGTCGGTGAA	27
45	BC014OV04	GGGCACCGCGGCCAGCTGGTCGGTGAA	27

50

ABO T646A GENOTIPO: ABO Ax /O1v

EXON7

55	BC015OV01	GTGGACATGGAGTTCCGCGACCACG	25
	BC015OV02	GTGGACATGGAGATCCGCGACCACG	25
	BC015OV03	CGTGGACATGGAGTTCCGCGACCACGT	27
60	BC015OV04	CGTGGACATGGAGATCCGCGACCACGT	27

65

ES 2 361 800 A1

RHD A178C GENOTIPO: RHD DIIIb

EXON2

5	BC016OV01	GTGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCT	25
	BC016OV02	GTGATGGCGGCCCTTGGCTTGGGCT	25
	BC016OV03	TGATGGCGGCCATTGGCTTGGGC	23
10	BC016OV04	TGATGGCGGCCCTTGGCTTGGGC	23

15

RHD G203A GENOTIPO: RHD DIIIb

EXON2

20	BC017OV01	TCCTCACCTCGAGTTTCCGGAGACA	25
	BC017OV02	TCCTCACCTCGAATTTCCGGAGACA	25
25	BC017OV03	TTCCTCACCTCGAGTTTCCGGAGACAC	27
	BC017OV04	TTCCTCACCTCGAATTTCCGGAGACAC	27

30

RHD T307C GENOTIPO: RHD DIIIb

EXON2

35	BC018OV01	AGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGG	25
40	BC018OV02	AGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGG	25
	BC018OV03	GAGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGGT	27
45	BC018OV04	GAGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGGT	27

50

RHD T544A GENOTIPO: RHD EXON SCANNING

EXON4

55	BC019OV01	TATTTGGGCTGTCTGTGGCCTGGT	25
	BC019OV02	TATTTGGGCTGACTGTGGCCTGGT	25
60	BC019OV03	TTTTGGGCTGTCTGTGGCCTG	21
	BC019OV04	TTTTGGGCTGACTGTGGCCTG	21

65

ES 2 361 800 A1

RHD G577A GENOTIPO: RHD EXON SCANNING
EXON4

5	BC020OV01	AGCCTCTACCCGAGGGAACGGAG	23
	BC020OV02	AGCCTCTACCCAAGGGAACGGAG	23
	BC020OV03	GCCTCTACCCGAGGGAACGGA	21
10	BC020OV04	GCCTCTACCCAAGGGAACGGA	21

15

RHD A594T GENOTIPO: RHD EXON SCANNING
EXON4

20	BC021OV01	ACGGAGGATAAAGATCAGACAGC	23
	BC021OV02	ACGGAGGATAATGATCAGACAGC	23
25	BC021OV03	CGGAGGATAAAGATCAGACAG	21
	BC021OV04	CGGAGGATAATGATCAGACAG	21

30

RHD G697C GENOTIPO: RHD Dva(kou,to,yh,sm)
EXON5

35	BC022OV01	AGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAATG	25
	BC022OV02	AGAAGTCCAATCCAAAGGAAGAATG	25
40	BC022OV03	GAAGTCCAATCGAAAGGAAGAAT	23
45	BC022OV04	GAAGTCCAATCCAAAGGAAGAAT	23

50

RHD G712A GENOTIPO: RHD Dva(to,yh)
EXON5

55	BC023OV01	GGAAGAATGCCGTGTTCAACACC	23
	BC023OV02	GGAAGAATGCCATGTTCAACACC	23
60	BC023OV03	GAAGAATGCCGTGTTCAACAC	21
	BC023OV04	GAAGAATGCCATGTTCAACAC	21

65

ES 2 361 800 A1

RHD T1025C GENOTIPO: RHD DAR(weakDtype4.2)

EXON7

5	BC024OV01	TGGAGAGATCATCTACATTGTGC	23
	BC024OV02	TGGAGAGATCACCTACATTGTGC	23
10	BC024OV03	GGAGAGATCATCTACATTGTG	21
	BC024OV04	GGAGAGATCACCTACATTGTG	21

15

RHD G676C GENOTIPO: RHD DCS,Dva(kou,yh)

EXON5

20	BC025OV01	AGTTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAA	25
	BC025OV02	AGTTTCAACTCTCCTCTGCTGAGAA	25
25	BC025OV03	AATTTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAG	27
	BC025OV04	AAGTTTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAG	27

30

RHD G1063A GENOTIPO: RHD DNB

EXON7

35	BC026OV01	ACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGT	25
40	BC026OV02	ACCGTCGGAGCCAGCAATGGCATGT	25
	BC026OV03	TACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGTG	27
45	BC026OV04	TACCGTCGGAGCCAGCAATGGCATGTG	27

50

RHD T509C GENOTIPO: RHD DFRI,DOL

EXON4

55	BC027OV01	ACATGAACATGATGCACATCTACGT	25
	BC027OV02	ACATGAACATGACGCACATCTACGT	25
60	BC027OV03	CACATGAACATGATGCACATCTACGTG	27
	BC027OV04	CACATGAACATGACGCACATCTACGTG	27

65

ES 2 361 800 A1

RHD T329C GENOTIPO: RHD DVII

EXON2

5

BC028OV01	TGGTCATCACACTGTTTCAGGTATTG	25
BC028OV02	TGGTCATCACACCGTTTCAGGTATTG	25
BC028OV03	GGTCATCACACTGTTTCAGGTATT	23
BC028OV04	GGTCATCACACCGTTTCAGGTATT	23

10

15

RHD C848T GENOTIPO: RHD DHMI

EXON6

20

BC029OV01	GCTGTGGGTACCTCGTGTCAC	21
BC029OV02	GCTGTGGGTATCTCGTGTCAC	21
BC029OV03	GGCTGTGGGTACCTCGTGTCACC	23
BC029OV04	GGCTGTGGGTATCTCGTGTCACC	23

25

30

RHD A497C GENOTIPO: RHD DFW

EXON4

35

BC030OV01	AGACAGACTACCACATGAACATGAT	25
BC030OV02	AGACAGACTACCCCATGAACATGAT	25
BC030OV03	GACAGACTACCACATGAACATGA	23
BC030OV04	GACAGACTACCCCATGAACATGA	23

40

45

50

RHD G686A GENOTIPO: RHD DHR

EXON5

55

BC031OV01	CTGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCGA	25
BC031OV02	CTGCTCTGCTGAAAAGTCCAATCGA	25
BC031OV03	TGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCG	23
BC031OV04	TGCTCTGCTGAAAAGTCCAATCG	23

60

65

ES 2 361 800 A1

RHD G854A GENOTIPO: RHD DIM

EXON6

5	BC032OV01	TGGGTACCTCGTGTCACCTGATCCC	25
	BC032OV02	TGGGTACCTCGTATCACCTGATCCC	25
	BC032OV03	GGGTACCTCGTGTCACCTGATCC	23
10	BC032OV04	GGGTACCTCGTATCACCTGATCC	23

15

RHD T161C GENOTIPO: RHD DMH

EXON2

	BC033OV01	TTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGC	25
	BC033OV02	TTGGCCAAGATCCGACCGTGATGGC	25
25	BC033OV03	GTTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGCG	27
	BC033OV04	GTTGGCCAAGATCCGACCGTGATGGCG	27

30

RHD G1057A GENOTIPO: RHD DNU

EXON7

	BC034OV01	CTTGATACCGTCGGAGCCGGCAATG	25
40	BC034OV02	CTTGATACCGTCAGAGCCGGCAATG	25
	BC034OV03	GCTTGATACCGTCGGAGCCGGCAATGG	27
45	BC034OV04	GCTTGATACCGTCAGAGCCGGCAATGG	27

50

RHD T1073C GENOTIPO: RHD DWI

EXON7

55	BC035OV01	CCGGCAATGGCATGTGGGTCACTGG	25
	BC035OV02	CCGGCAATGGCACGTGGGTCACTGG	25
	BC035OV03	CGGCAATGGCATGTGGGTCACTG	23
60	BC035OV04	CGGCAATGGCACGTGGGTCACTG	23

65

ES 2 361 800 A1

RHD C1061A GENOTIPO: RHD DII, DIV IV

EXON7

5

BC036OV01	ATACCGTCCGAGCCGGCAATGGCAT	25
BC036OV02	ATACCGTCCGAGACGGCAATGGCAT	25
BC036OV03	GCCGGCAATGGCATGTGGGTCACTGGG	27
BC036OV04	GCCGGCAATGGCACGTGGGTCACTGGG	27

10

15

RHD G845A GENOTIPO: RHD weak D type 15

EXON6

20

BC037OV01	GCGTGGCTGTGGGTACCTCGTGTCA	25
BC037OV02	GCGTGGCTGTGGATACCTCGTGTCA	25
BC037OV03	GATACCGTCCGAGCCGGCAATGGCATG	27
BC037OV04	GATACCGTCCGAGACGGCAATGGCATG	27

25

30

RHD T809G GENOTIPO: RHD weak D type 1,psi

EXON6

35

BC038OV01	TGCAGACTTATGTGCACAGTGCGGT	25
BC038OV02	TGCAGACTTATGGGCACAGTGCGGT	25
BC038OV03	GCAGACTTATGTGCACAGTGCGG	23
BC038OV04	GCAGACTTATGGGCACAGTGCGG	23

40

45

RHD G1154C GENOTIPO: RHD weak D type 2

EXON9

50

BC039OV01	GCATTTAAACAGGTTTGCTCCTAAA	25
BC039OV02	GCATTTAAACAGCTTTGCTCCTAAA	25
BC039OV03	TGCATTTAAACAGGTTTGCTCCTAAAT	27
BC039OV04	TGCATTTAAACAGCTTTGCTCCTAAAT	27

55

60

65

ES 2 361 800 A1

RHD C8G GENOTIPO: RHD weak D type 3

EXON1

5

BC040OV01	ACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCG	25
BC040OV02	ACAGGATGAGCTGTAAGTACCCGCG	25
BC040OV03	CACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCGG	27
BC040OV04	CACAGGATGAGCTGTAAGTACCCGCGG	27

10

15

RHD C446A GENOTIPO: RHD weak D type 5

EXON3

20

BC041OV01	TGGAGGTGACAGCTTTAGGCAACCT	25
BC041OV02	TGGAGGTGACAGATTTAGGCAACCT	25
BC041OV03	GGAGGTGACAGCTTTAGGCAACC	23
BC041OV04	GGAGGTGACAGATTTAGGCAACC	23

25

30

RHD G1016A GENOTIPO: RHD weak D type 7

EXON7

35

BC042OV01	TGGGTCTGCTTGGAGAGATCATCTA	25
BC042OV02	TGGGTCTGCTTGAAGAGATCATCTA	25
BC042OV03	GGGTCTGCTTGGAGAGATCATCT	23
BC042OV04	GGGTCTGCTTGAAGAGATCATCT	23

40

45

50

RHD C340T GENOTIPO: RHD weak D type 17

EXON3

55

BC043OV01	TCCCCCAGTATTCGGCTGGCCACCA	25
BC043OV02	TCCCCCAGTATTTGGCTGGCCACCA	25
BC043OV03	CTCCCCCAGTATTCGGCTGGCCACCAT	27
BC043OV04	CTCCCCCAGTATTTGGCTGGCCACCAT	27

60

65

ES 2 361 800 A1

RHD T807G GENOTIPO: RHD PSI

EXON6

5

BC044OV01	TTTGCAGACTTATGTGCACAGTGCG	25
BC044OV02	TTTGCAGACTTAGGTGCACAGTGCG	25
BC044OV03	TTGCAGACTTATGTGCACAGTGC	23
BC044OV04	TTGCAGACTTAGGTGCACAGTGC	23

10

15

RHD G1227A GENOTIPO: RHD K409K Dnull

EXON9

20

BC045OV01	AGTTTTCTGGAAGGTAAGATTTTTC	25
BC045OV02	AGTTTTCTGGAAAGTAAGATTTTTC	25
BC045OV03	AAGTTTTCTGGAAGGTAAGATTTTCA	27
BC045OV04	AAGTTTTCTGGAAAGTAAGATTTTCA	27

25

30

RHD G48A GENOTIPO: RHD W16X Dnull

EXON1

35

BC046OV01	CCTGCCCTCTGGGCCCTAACACTG	25
BC046OV02	CCTGCCCTCTGAGCCCTAACACTG	25
BC046OV03	CTGCCCTCTGGGCCCTAACACT	23
BC046OV04	CTGCCCTCTGAGCCCTAACACT	23

40

45

50

RHD C121T GENOTIPO: RHD Q41X Dnull

EXON1

55

BC047OV01	TCCTTAGAGGATCAAAGGGGCTCG	25
BC047OV02	TCCTTAGAGGATTAAGGGGCTCG	25
BC047OV03	CCTTAGAGGATCAAAGGGGCTC	23
BC047OV04	CCTTAGAGGATTAAGGGGCTC	23

60

65

ES 2 361 800 A1

RHD G270A GENOTIPO: RHD W90X Dnull

EXON2

5	BC048OV01	TGGTGTGCAGTGGGCAATCCTGCTG	25
	BC048OV02	TGGTGTGCAGTGAGCAATCCTGCTG	25
10	BC048OV03	GGTGTGCAGTGGGCAATCCTGCT	23
	BC048OV04	GGTGTGCAGTGAGCAATCCTGCT	23

15

RHD IVS3+1G>A GENOTIPO: RHD IVS3+1G>A Dneg

EXON3

20	BC049OV01	AATATCTTCAACGTGAGTCATGGTG	25
	BC049OV02	AATATCTTCAACATGAGTCATGGTG	25
25	BC049OV03	ATATCTTCAACGTGAGTCATGGT	23
	BC049OV04	ATATCTTCAACATGAGTCATGGT	23

30

RHD 488del4 GENOTIPO: RHD 488del4 Dnull

EXON4

35	BC050OV01	TTTATTGCAGACAGACTACCACATG	25
	BC050OV02	TTTATTGCAGACTACCACATGAACA	25
40	BC050OV03	TTATTGCAGACAGACTACCACAT	23
	BC050OV04	TTATTGCAGACTACCACATGAAC	23

45

50

RHD G635T GENOTIPO: RHD G212V Dnull

EXON5

55	BC051OV01	CTGGCCCCCAGGCGCCCTCTTCT	23
	BC051OV02	CTGGCCCCCAGTCGCCCTCTTCT	23
60	BC051OV03	TGGCCCCCAGGCGCCCTCTTC	21
	BC051OV04	TGGCCCCCAGTCGCCCTCTTC	21

65

ES 2 361 800 A1

RHD del711 GENOTIPO: RHD del711 Dnull

EXON5

5	BC052OV01	AAGGAAGAATGCCGTGTTCAACACC	25
	BC052OV02	AAGGAAGAATGCGTGTTCAACACCT	25
10	BC052OV03	AGGAAGAATGCCGTGTTCAACAC	23
	BC052OV04	AGGAAGAATGCGTGTTCAACACC	23

15

RHD G885T GENOTIPO: RHD M295I Dnull, weak D type11

EXON5

20	BC053OV01	GCTTGCCATGGTGCTGGGT	19
	BC053OV02	GCTTGCCATTGTGCTGGGT	19
25	BC053OV03	GGCTTGCCATGGTGCTGGGTC	21
	BC053OV04	GGCTTGCCATTGTGCTGGGTC	21

30

RHD 906insTGGCT GENOTIPO: RHD 906insTGGCT Dnull

EXON6

35	BC054OV01	CTTGTGGCTGGGCTGATCTCCGTCG	25
40	BC054OV02	CTTGTGGCTGGGGGCTCTGATCTCC	25
	BC054OV03	TTGTGGCTGGGCTGATCTCCGTC	23
45	BC054OV04	TTGTGGCTGGGGGCTCTGATCTC	23

50

RHD IVS6+1del4 GENOTIPO: RHD IVS6+1del4 Dnull

EXON6

55	BC055OV01	AGTACCTGCCGGTAAGAACTAGAC	25
	BC055OV02	AGTACCTGCCGGAACTAGACAACT	25
60	BC055OV03	GTACCTGCCGGTAAGAACTAGA	23
	BC055OV04	GTACCTGCCGGAACTAGACAAC	23

65

ES 2 361 800 A1

RHD G941T GENOTIPO: RHD G314V Dnull

EXON7

5

BC056OV01	CTTGTCCACAGGGGTGTTGTAACCG	25
BC056OV02	CTTGTCCACAGGTGTGTTGTAACCG	25
BC056OV03	TTGTCCACAGGGGTGTTGTAACC	23
BC056OV04	TTGTCCACAGGTGTGTTGTAACC	23

10

15

RHD C990G GENOTIPO: RHD Y330X Dnull

EXON7

20

BC057OV01	CATCATGGGCTACAACCTTCAGCTTG	25
BC057OV02	CATCATGGGCTAGAACTTCAGCTTG	25
BC057OV03	ATCATGGGCTACAACCTTCAGCTT	23
BC057OV04	ATCATGGGCTAGAACTTCAGCTT	23

25

30

RHD IVS8+1G>A GENOTIPO: RHD IVS8+1G>A Dnull

EXON8

35

BC058OV01	GTCTCCTGACAGGTCAGTGTGAGGC	25
BC058OV02	GTCTCCTGACAGATCAGTGTGAGGC	25
BC058OV03	TCTCCTGACAGGTCAGTGTGAGG	23
BC058OV04	TCTCCTGACAGATCAGTGTGAGG	23

40

45

50

RHD C410T GENOTIPO: RHD DIII IV

EXON3

55

BC059OV01	GGTCAACTTGGCGCAGTTGGTGG	23
BC059OV02	GGTCAACTTGGTGCAGTTGGTGG	23
BC059OV03	GTCAACTTGGCGCAGTTGGTG	21
BC059OV04	GTCAACTTGGTGCAGTTGGTG	21

60

65

ES 2 361 800 A1

RHD A455C **GENOTIPO: RHD DIIIa,DIIIc,DIII IV,DIVa**
EXON3

5	BC060OV01	CAGCTTTAGGCAACCTGAGGATGGT	25
	BC060OV02	CAGCTTTAGGCACCCTGAGGATGGT	25
	BC060OV03	ACAGCTTTAGGCAACCTGAGGATGGTC	27
10	BC060OV04	ACAGCTTTAGGCACCCTGAGGATGGTC	27

15

RHD T667G **GENOTIPO: RHD DIIIa,DVa(kou,yh), DCS,DAR**
(weakDtype4.2), weakDtype4,weakDtype4.1,weakDtype29,DIII V,DOL
EXON5

25	BC061OV01	CTGGCCAAGTTTCAACTCTGC	21
	BC061OV02	CTGGCCAAGTGTCACACTCTGC	21
	BC061OV03	TGGCCAAGTTTCAACTCTG	19
30	BC061OV04	TGGCCAAGTGTCACACTCTG	19

35

RHD G916A **RHD sonda consenso exon scanning**
EXON6

40	BC062OV01	GGCTGATCTCCGTCGGGGGAGCC	23
	BC062OV02	GGCTGATCTCCATCGGGGAGCC	23
	BC062OV03	GCTGATCTCCGTCGGGGGAGC	21
45	BC062OV04	GCTGATCTCCATCGGGGAGC	21

50

RHD A932G **RHD sonda consenso exon scanning**
EXON6

55	BC063OV01	GGGAGCCAAGTACCTGCCGGTAAG	25
	BC063OV02	GGGAGCCAAGTGCCTGCCGGTAAG	25
60	BC063OV03	GGGAGCCAAGTACCTGCCGGTAA	23
	BC063OV04	GGGAGCCAAGTGCCTGCCGGTAA	23

65

ES 2 361 800 A1

RHD A1193T GENOTIPO: RHD DIVb

EXON9

5	BC064OV01	GCACCTCATGAGGCTAAATAT	21
	BC064OV02	GCACCTCATGTGGCTAAATAT	21
	BC064OV03	AGCACCTCATGAGGCTAAATATT	23
10	BC064OV04	AGCACCTCATGTGGCTAAATATT	23

15

RHD A514T GENOTIPO: RHD DFRI

EXON4

20	BC065OV01	AACATGATGCACATCTACGTGTTTCG	25
	BC065OV02	AACCTGAGGCACTTCTACGTGTTTCG	25
25	BC065OV03	ACATGATGCACATCTACGTGTTC	23
	BC065OV04	ACCTGAGGCACTTCTACGTGTTC	23

30

RHCE T307C GENOTIPO: RHCE Rhc

EXON2

35	BC066OV01	AGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGG	25
	BC066OV02	AGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGG	25
40	BC066OV03	GAGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGGT	27
	BC066OV04	GAGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGGT	27

45

50

RHCE A122G GENOTIPO: RHCE Cw

EXON1

55	BC067OV01	CTTAGAGGATCAAAAGGGGCTCG	23
	BC067OV02	CTTAGAGGATCGAAAGGGGCTCG	23
	BC067OV03	TTAGAGGATCAAAAGGGGCTC	21
60	BC067OV04	TTAGAGGATCGAAAGGGGCTC	21

65

ES 2 361 800 A1

RHCE G106A GENOTIPO: RHCE Cx

EXON1

5

BC068OV01	ACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGG	25
BC068OV02	ACCCACTATGACACTTCCTTAGAGG	25
BC068OV03	TACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGGA	27
BC068OV04	TACCCACTATGACACTTCCTTAGAGGA	27

10

15

RHCE C676G GENOTIPO: RHCE E/e

EXON5

20

BC069OV01	AGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAA	25
BC069OV02	AGTGTCAACTCTGCTCTGCTGAGAA	25
BC069OV03	AAGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAG	27
BC069OV04	AAGTGTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAG	27

25

30

RHCE C733G GENOTIPO: RHCE VS

EXON5

35

BC070OV01	ACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTG	25
BC070OV02	ACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGTG	25
BC070OV03	CACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTGT	27
BC070OV04	CACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGTGT	27

40

45

50

RHCE G1006T GENOTIPO: RHCE VS/V-

EXON7

55

BC071OV01	TTCAGCTTGCTGGGTCTTGCTTGGGA	25
BC071OV02	TTCAGCTTGCTGTGTCTTGCTTGGGA	25
BC071OV03	CTTCAGCTTGCTGGGTCTTGCTTGGAG	27
BC071OV04	CTTCAGCTTGCTGTGTCTTGCTTGGAG	27

60

65

ES 2 361 800 A1

KELL T698C GENOTIPO: KELL K/k

EXON6

5

BC072OV01	AGAAGTCTCAGCATTTCGGTTAAAGT	25
BC072OV02	AGAAGTCTCAGCGTTTCGGTTAAAGT	25
BC072OV03	CAGAAGTCTCAGCATTTCGGTTAAAGTT	27
BC072OV04	CAGAAGTCTCAGCGTTTCGGTTAAAGTT	27

10

15

KELL A697T GENOTIPO: KELL K

EXON6

20

BC073OV01	AACTTTAACCGAACGCTGAGACTTC	25
BC073OV02	AACTTTAACCGATCGCTGAGACTTC	25
BC073OV03	AACTTTAACCGAACGCTGAGACTTCT	27
BC073OV04	AACTTTAACCGATCGCTGAGACTTCT	27

25

30

KELL T961C GENOTIPO: KELL Kpa/Kpb

EXON8

35

BC074OV01	ACTGGAACAGCCATGAAGTGATGGA	25
BC074OV02	ACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGA	25
BC074OV03	AACTGGAACAGCCATGAAGTGATGGAG	27
BC074OV04	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGAG	27

40

45

50

KELL G962A GENOTIPO: KELL Kpc

EXON8

55

BC075OV01	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGG	25
BC075OV02	AACTGGAACAGCTGTGAAGTGATGG	25
BC075OV03	AAACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGA	27
BC075OV04	AAACTGGAACAGCTGTGAAGTGATGGA	27

60

65

ES 2 361 800 A1

KELL C1910T GENOTIPO: KELL Jsa/Jsb

EXON17

5

BC076OV01	TGGGGGCTGCCCCGCCTGTGACA	23
BC076OV02	TGGGGGCTGCCTCGCCTGTGACA	23
BC076OV03	GGGGGCTGCCCCGCCTGTGAC	21
BC076OV04	GGGGGCTGCCTCGCCTGTGAC	21

10

15

KELL G1208A GENOTIPO: KELL Kmod-1

EXON10

20

BC077OV01	AAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGT	25
BC077OV02	AAGATCATGTGGTTCTGCAGAAAGT	25
BC077OV03	TAAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGTC	27
BC077OV04	TAAGATCATGTGGTTCTGCAGAAAGTC	27

25

30

KIDD G838A GENOTIPO: KIDD Jka/Jkb

EXON9

35

BC078OV01	GCCCCATTTGAGGACATCTACTTTG	25
BC078OV02	GCCCCATTTGAGAACATCTACTTTG	25
BC078OV03	CCCCATTTGAGGACATCTACTTT	23
BC078OV04	CCCCATTTGAGAACATCTACTTT	23

40

45

50

KIDD Intron5G>A GENOTIPO: KIDD Jknull

EXON6

55

BC079OV01	TCTTGCCCCACAGGTCATTAATAGC	25
BC079OV02	TCTTGCCCCACAAGTCATTAATAGC	25
BC079OV03	GCTATTAATGACCTGTGGGGCAAGA	25
BC079OV04	GCTATTAATGACTTGTGGGGCAAGA	25

60

65

ES 2 361 800 A1

KIDD T871C GENOTIPO: KIDD Jknull
EXON9

5	BC080OV01	GGTTTCAACAGCTCTCTGGCCTGCA	25
	BC080OV02	GGTTTCAACAGCCCTCTGGCCTGCA	25
	BC080OV03	GGGTTTCAACAGCTCTCTGGCCTGCAT	27
10	BC080OV04	GGGTTTCAACAGCCCTCTGGCCTGCAT	27

15

DUFFY G125A GENOTIPO: DUFFY Fya/Fyb

20	BC081OV01	ATGGAGACTATGGTGCCAACCTGGA	25
	BC081OV02	ATGGAGACTATGATGCCAACCTGGA	25
	BC081OV03	GATGGAGACTATGGTGCCAACCTGGAA	27
25	BC081OV04	GATGGAGACTATGATGCCAACCTGGAA	27

30

DUFFY T-33C GENOTIPO: DUFFY FyGATA-1
PROMOTER

35	BC082OV01	CCTTGGCTCTTATCTTGAAGCACA	25
	BC082OV02	CCTTGGCTCTTACCTTGAAGCACA	25
40	BC082OV03	CTTGGCTCTTATCTTGAAGCAC	23
	BC082OV04	CTTGGCTCTTACCTTGAAGCAC	23

45

DUFFY C265T GENOTIPO: DUFFY Fyx

50	BC083OV01	CCTCTCTTCCGCTGGCAGC	19
	BC083OV02	CCTCTCTTCCGCTGGCAGC	19
55	BC083OV03	ACCTCTCTTCCGCTGGCAGCT	21
	BC083OV04	ACCTCTCTTCCGCTGGCAGCT	21

60

65

ES 2 361 800 A1

MNS C59T GENOTIPO: MNS MN

EXON2GYPA

5

BC084OV01	GCATATCAGCATCAAGTACCACTGG	25
BC084OV02	GCATATCAGCATTAAAGTACCACTGA	25
BC084OV03	CATATCAGCATCAAGTACCACTG	23
BC084OV04	CATATCAGCATTAAAGTACCACTG	23

10

15

MNS G71A T72G GENOTIPO: MNS MN

EXON2GYPA

20

BC085OV01	CAAGTACCACTGGTGTGGCAATGCA	25
BC085OV02	TAAGTACCACTGAGGTGGCAATGCA	25
BC085OV03	TCAAGTACCACTGGTGTGGCAATGCAC	27
BC085OV04	TTAAGTACCACTGAGGTGGCAATGCAC	27

25

30

MNS T143C GENOTIPO: MNS S/s

EXON4GYPB

35

BC086OV01	TTATAGGAGAAATGGGACAACCTTGT	25
BC086OV02	TTATAGGAGAAACGGGACAACCTTGT	25
BC086OV03	TTTATAGGAGAAATGGGACAACCTTGTC	27
BC086OV04	TTTATAGGAGAAACGGGACAACCTTGTC	27

40

45

50

MNS C230T GENOTIPO: MNS U

EXON5GYPB

55

BC087OV01	GTATTATTGGAACGATCCTCTTAAT	25
BC087OV02	GTATTATTGGAATGATCCTCTTAAT	25
BC087OV03	GGTATTATTGGAACGATCCTCTTAATT	27
BC087OV04	GGTATTATTGGAATGATCCTCTTAATT	27

60

65

ES 2 361 800 A1

MNS INTRON5+5GT GENOTIPO: MNS U

EXON5GYPB

5

BC088OV01	TGATAAAGGTGAGAATTCAGTTTTT	25
BC088OV02	TGATAAAGGTGATAATTCAGTTTTT	25
BC088OV03	AAAAACTGAATTCTCACCTTTATCA	25
BC088OV04	AAAAACTGAATTATCACCTTTATCA	25

10

15

MNS C790A GENOTIPO: MNS GP.Mur(Mi.III)

EXON3

20

BC089OV01	TATATGCAGATACGCACAAACGGGA	25
BC089OV02	TATATGCAGATAAGCACAAACGGGA	25
BC089OV03	TTATATGCAGATACGCACAAACGGGAC	27
BC089OV04	TTATATGCAGATAAGCACAAACGGGAC	27

25

30

MNS C850G GENOTIPO: MNS MNS GP.Mur(Mi.III)

EXON3

35

BC090OV01	GGGGAAACAGTTGTAACAGAAATTT	25
BC090OV02	GGGCAAACAGTTCTAACAGAAATTT	25
BC090OV03	AGGGGAAACAGTTGTAACAGAAATTC	27
BC090OV04	AGGGCAAACAGTTCTAACAGAAATTC	27

40

45

50

DIEGO T2561C GENOTIPO: DIEGO Dia/Dib

EXON19

55

BC091OV01	GCCAGGGAGGCCAGCGTGGACTTCA	25
BC091OV02	GCCAGGGAGGCCGGCGTGGACTTCA	25
BC091OV03	CCAGGGAGGCCAGCGTGGACTTC	23
BC091OV04	CCAGGGAGGCCGGCGTGGACTTC	23

60

65

DOMBROCK A793G**GENOTIPO: DOMBROCK Doa/Dob****EXON2**

5

BC092OV01	ACTGCAACCAGTTTCCTCTTGGGTG	25
BC092OV02	ACTGCAACCAGTCTCCTCTTGGGTG	25
BC092OV03	AACTGCAACCAGTTTCCTCTTGGGTGG	27
BC092OV04	AACTGCAACCAGTCTCCTCTTGGGTGG	27

10

15

COLTON C134T**GENOTIPO: COLTON Coa/Cob****EXON1**

20

BC093OV01	TTGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTGT	25
BC093OV02	TTGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTGT	25
BC093OV03	TGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTG	23
BC093OV04	TGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTG	23

25

30

RHD G1048C**GENOTIPO: RHD DIVa/DIVb****EXON7**

35

BC094OV01	GCTGGTGCTTGATACCGTCGG	21
BC094OV02	GCTGGTGCTTCATACCGTCGG	21
BC094OV03	TGCTGGTGCTTGATACCGTCGGA	23
BC094OV04	TGCTGGTGCTTCATACCGTCGGA	23

40

45

1.2 Producción del DNA-chip para genotipado de grupos sanguíneos: Impresión y procesamiento de los portaobjetos de vidrio

50

Las sondas capaces de detectar las distintas variaciones génicas identificadas previamente se imprimen en el soporte (portaobjetos de cristal) aminosilanzado empleando DMSO como tampón de impresión. La impresión se lleva a cabo con un spotter o impresor de oligonucleótidos (sondas) controlando la temperatura y la humedad relativa.

55

La unión de las sondas al soporte (portaobjetos de cristal) se lleva a cabo mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado tal y como se describe en la documentación aportada por el fabricante (Por ejemplo, Corning Lifesciences <http://www.corning.com>). La humedad relativa durante el proceso de deposición se mantiene entre el 40-50% y la temperatura en torno a 20°C.

60

1.3 Validación de la utilidad clínica del DNA-chip para la identificación de grupos sanguíneos humanos: Detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios

1.3.1 Preparación de la muestra a hibridar

65

Se extrae DNA del individuo a partir de una muestra de sangre mediante un protocolo estándar de filtración (Por ejemplo, kits comerciales de Macherey Nagel, Quiagen, etc).

ES 2 361 800 A1

Se amplifican todos los exones e intrones de interés mediante PCR multiplex utilizando las parejas de oligonucleótidos cebadores apropiadas. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de fragmentos génicos en los que pueda existir la variación génica a detectar, ventajosamente, aquellos pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR; en particular, se seleccionaron unos oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar, en tan sólo 3 reacciones de PCR multiplex, los 36 fragmentos necesarios para el genotipado de las 94 variaciones génicas previamente mencionadas analizadas utilizando el DNA-chip de la invención para la detección de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios.

Los oligonucleótidos cebadores útiles para llevar a cabo la PCR multiplex para la detección de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos pueden ser diseñados por los expertos en la materia utilizando las secuencias de los genes correspondientes tal y como se describen en GenBank usando por ejemplo los softwares:

Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi) o

Web Primer (<http://seg.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>).

Las PCR multiplex se llevan a cabo simultáneamente bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que permiten la amplificación específica de los fragmentos de los genes en los que pueda existir la variación génica a detectar. Finalizada la PCR multiplex se comprueba, en gel de agarosa, que ha tenido lugar reacción de amplificación.

A continuación, la muestra a hibridar (producto de la amplificación) se somete a fragmentación con una Dnasa y los productos resultantes del proceso de fragmentación se someten a una reacción de marcaje indirecto. Una transferasa terminal incorpora un nucleótido unido a un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, biotina, al final de estos pequeños fragmentos.

Antes de aplicar la muestra sobre el DNA-chip se procede a desnaturalizar la muestra mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos y, posteriormente, se añade el tampón de hibridación “ChipMap Kit Hybridization Buffer” (Ventana Medical System).

1.3.2 Hibridación

La hibridación se lleva a cabo de forma automática en la estación de hibridación Ventana Discovery (Ventana Medical Systems), desarrollada para tal fin.

Se realiza una prehibridación o bloqueo del portaobjetos con BSA. A continuación, se aplica la muestra junto con la solución de hibridación [ChipMap Kit Hybridization Buffer (Ventana Medical System)] y se mantiene durante 1 hora a 45°C siguiendo el protocolo Ventana 9.0 Europe (Ventana Medical System). Finalmente, el portaobjetos se somete a la acción de diferentes soluciones de lavado [ChipMap hybridisation Kit Buffers (Ventana Medical System)]. Una vez finalizado el proceso de hibridación se procede al lavado final y secado del portaobjetos.

Finalizada la hibridación, el revelado con estreptavidina-Cy3 marca los puntos (sondas) en los que se ha producido la hibridación.

1.3.3. Escaneado del portaobjetos

Se introduce el portaobjetos en el escáner de fluorescencia confocal, por ejemplo Axon escáner 4100A, y se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

1.3.4 Cuantificación de la imagen

El software del propio escáner permite la cuantificación en la imagen obtenida de la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.

1.3.5 Interpretación de los resultados: Determinación del genotipo del individuo, respecto a las variaciones génicas humanas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos analizados, e identificación del grupo sanguíneo del individuo

A partir de la señal que se obtiene con las sondas que detectan las diferentes variaciones génicas se establece el genotipo del individuo. Para ello, brevemente, en primer lugar, a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas se les resta su propio ruido de fondo; a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada uno de las 4 sondas que se usan para caracterizar cada variación génica. El valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes. Conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas se calculan dos ratios (ratio 1 y ratio 2):

ES 2 361 800 A1

$$\text{Ratio 1} = \frac{\text{Intensidad media sonda 1}}{\text{Intensidad media sonda 1} + \text{Intensidad media sonda 2}}$$

5

$$\text{Ratio 2} = \frac{\text{Intensidad media sonda 3}}{\text{Intensidad media sonda 3} + \text{Intensidad media sonda 4}}$$

10 Estos ratios se sustituyen en tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

15 AB Función 2

BB Función 3

20 La función que presente un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el paciente.

25 En este caso, la obtención de dichas funciones lineales se lleva a cabo mediante el análisis de 5 sujetos por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica (AA, AB, BB). Con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 sujetos. Estos ratios sirven como variables de clasificación de los tres grupos para generar las funciones lineales. Con estas tres funciones lineales se evalúa la capacidad discriminatoria de las dos parejas de sondas diseñadas. En caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, las sondas serían rediseñadas. Nuevos sujetos caracterizados para cada uno de los tres genotipos constituyen nuevos ratios 1 y 2 para perfeccionar las combinaciones lineales de los mismos que constituyen las funciones lineales y, en definitiva, para mejorar la capacidad discriminatoria del algoritmo basado en estas tres funciones.

30 Siempre que los ratios 1 y 2 se encuentren dentro del rango de los ratios usados para construir los grupos, la intensidad de fluorescencia media de las 40 réplicas con respecto al ruido de fondo sea mayor de 5 y el coeficiente de variación de todas las réplicas del DNA-chip esté por debajo de 0,25 (utilizando un escáner de fluorescencia confocal) el resultado de las funciones lineales se considera correcto.

35 Para dar por buena una hibridación completa es necesario que la relación intensidad frente a ruido de fondo de todas las sondas del DNA chip esté por encima de 15. Asimismo, la media de todos los ratios debe superar 0,6 como control de especificidad y sensibilidad. El ratio del control externo debe estar por encima de 0,6 y el control negativo nunca debe ser superior a 3 veces el ruido de fondo. Estos parámetros son consistentes con la realización particular de un escáner de fluorescencia confocal.

40 Resumiendo, cada mutación presenta en el portaobjetos 4 sondas (repetidas 10 veces) para su detección. Dos de dichas sondas detectan una variación génica y las otras dos la otra variación génica. La base interrogada se localiza siempre en la posición central.

45 En el caso de un sujeto homocigoto para la variación génica A, este no presentará variación génica B; por consiguiente, en la imagen que se obtiene del soporte de cristal las sondas que detectan la variación génica B presentan una señal de hibridación notablemente inferior a la presentada por la variación génica A y viceversa; en este caso, los ratios 1 y 2 tenderán a 1 y los sujetos serán asignados como homocigotos AA por el software de análisis.

50 Por otro lado, un sujeto heterocigoto para una variación génica determinada presenta ambas la variaciones génicas; por tanto, las sondas que los detectan presentan una señal de hibridación equivalente. Los ratios 1 y 2 tenderán a 0,5 y los sujetos serán asignados como heterocigotos AB por el software de análisis.

55 Ejemplo 2

Identificación del grupo sanguíneo de 15 individuos donantes de sangre, utilizando el DNA-chip para el genotipado de grupos sanguíneos

60 *Extracción de DNA*

65 Se llevó a cabo la extracción del DNA por métodos convencionales de 15 donantes de sangre que respondían a los grupos serológicos A y 0. El análisis genético mediante secuenciación de la región de interés corroboró que 5 de los donantes presentaban genotipo 188G189C (determinación serológica A), otros 5 donantes presentaban genotipo 188GA189CT (determinación serológica 0) y los restantes 5 donantes presentaban genotipo 188A189T (determinación serológica 0).

ES 2 361 800 A1

Diseño de las sondas

Se diseñaron 4 sondas para la detección del polimorfismo ABO G188A/C189T genotipo ABO O1v, tal y como se ha descrito previamente en la descripción de la invención, cuyas secuencias se recogen a continuación (Ejemplo 1):

BC012OV01	ACCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGCC	25
BC012OV02	ACCATCTGCAGCATGTCTCGTTGCC	25
BC012OV03	CCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGC	23
BC012OV04	CCATCTGCAGCATGTCTCGTTGC	23

Producción del DNA-chip para la detección de las variaciones génicas humanas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos

Las sondas diseñadas se imprimieron en el portaobjetos de cristal con un microarrayer tal y como se describe en el Ejemplo 1.2.

PCR y marcaje de la muestra

Se amplificó, mediante PCR multiplex utilizando cebadores específicos, la región del gen ABO que permitía el análisis de la variación génica de interés (ABO G188A/C189T genotipo ABO O1v). El producto de la amplificación fue fragmentado y marcado tal y como se indica en el Ejemplo 1.3.1.

Hibridación de las muestras

La hibridación se llevó a cabo en una estación automática de hibridación, tal y como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1.3.2.

Análisis de los resultados

El portaobjetos se introdujo en el escáner y se procedió a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser (Ejemplo 1.3.3) y a cuantificar la imagen obtenida de la señal de los puntos donde se ha producido hibridación (Ejemplo 1.3.4).

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el algoritmo previamente descrito en el Ejemplo 1.3.5. El empleo de dicho algoritmo permitió caracterizar esta variación génica para los 15 sujetos con una coincidencia del 100% con respecto a los métodos serológicos y de secuenciación.

La Figura 1 muestra la representación de los ratios 1 y 2 y permite caracterizar a los 15 pacientes.

Las funciones lineales para los tres grupos se exponen en la Tabla 2, en donde el número de réplicas de las 4 sondas usadas fue 10; "X" es el ratio 1; "Y" es el ratio 2; "0" se corresponde con el genotipo 188A189T; "1" se corresponde con el genotipo 188GA189CT; y "2" se corresponde con el genotipo 188G189C.

TABLA 2

Coefficientes de la función de clasificación			
CLASE	0	1	2
X	7,338994	101,6024	176,7265
Y	1227,301	603,8602	81,12664
(Constante)	-499,132	-163,927	-27,3071

ES 2 361 800 A1

Un donante con genotipo 188G189C presentó unos ratios 1 y 2 de 0,77 y 0,82, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los donantes para 10 réplicas de cada una de las 4 sondas.

5 Las funciones lineales obtenidas para 8 réplicas de cada una de las 4 sondas, se recogen en la Tabla 3.

TABLA 3

Coefficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	178,1139	272,6293	417,9721
Y	-42,2919	59,0597	132,0375
(Constante)	-16,0985	-82,5103	-225,228

25 El mismo donante con genotipo 188G189C presentó igualmente unos ratios 1 y 2 de 0,77 y 0,82, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 8 réplicas de cada una de las 4 sondas.

30 Las funciones lineales obtenidas para 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, se recogen en la Tabla 4.

TABLA 4

Coefficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	181,8305	307,0291	477,2833
Y	-51,0987	15,33189	57,86783
(Constante)	-15,1285	-79,8083	-218,298

50 El mismo donante con genotipo 188G189C presentó igualmente unos ratios 1 y 2 de 0,77 y 0,82, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 6 réplicas de cada una de las 4 sondas.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un DNA-chip adecuado para la puesta en práctica de un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a antígenos eritrocitarios humanos,

comprendiendo dicho método:

- extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
- amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
- someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
- poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;
- introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
- genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles,

comprendiendo dicho DNA-chip un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas útiles para detectar variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes asociadas a antígenos eritrocitarios humanos, en donde, por cada variación génica a detectar, hay 4 sondas, de las cuales 2 sondas detectan una primera variación génica y las otras 2 detectan una segunda variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas, depositadas siguiendo una patrón determinado y distribuidas homogéneamente entre las 2 áreas que constituyen el DNA-chip pero no agrupadas por variación génica a detectar, y, opcionalmente, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de hibridación, y

en donde dichas variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios se seleccionan del grupo formado por el polimorfismo GG87_88insG (Genotipo O4) (BC008) en el exón 2 del gen ABO, el polimorfismo G188A+C189T (Genotipo O1v) (BC012) en el exón 4 del gen ABO, los polimorfismos 261delG (Genotipo O1/O1v) (BC001), C322T (Genotipo O5) (BC009) en el exón 6 del gen ABO, los polimorfismos C467T (P156L) (Genotipo A2) (BC014), G542A (Genotipo O8) (BC013), T646A (Genotipo Ax/O1v) (BC015), G703A (Genotipo G235S) (B) (BC002), C796A (Genotipo L266M) (B) (BC003), G802A (Genotipo O2) (BC004), G803C (Genotipo G268A) (B, cisAB-1) (BC005), 798-804insG (Genotipo O3, Ael) (BC007), C893T (Genotipo O6) (BC010), C927A (Genotipo O7) (BC011), 1059-1061delC (D FS354+21aa) (Genotipo A2) (BC006) en el exón 7 del gen ABO, los polimorfismos C8G (S3C) (Genotipo weak D type 3) (BC040), G48A (W16X) (Genotipo RHD W16X) (BC046), C121T (Q41X) (Genotipo RHD Q41X) (BC047) en el exón 1 del gen RHD, los polimorfismos A178C, G203A, T307C (exon scanning) (BC016, BC017, BC018), T161C (L54P) (Genotipo DMH) (BC033), G270A (W90X) (Genotipo RHD W90X) (BC047), T329C (L110P) (Genotipo DVII) (BC028) en el exón 2 del gen RHD, los polimorfismos C340T (Genotipo weak D type 17) (BC043), C410T (Genotipo DIIIiv) (BC059), C446A (A149D) (Genotipo weak D type 5) (BC041), A455C (Genotipo DIIIa, DIIIiv, DIVa) (BC060), IVS3+1G>A (Genotipo alelo negativo) (BC049) en el exón 3 del gen RHD, los polimorfismos 488del4 (Genotipo alelo negativo) (BC050), A497C (H166P) (Genotipo DFW) (BC030), T509C (M170T) (Genotipo DOL) (BC027), A514T (Genotipo DFRI) (BC065), T544A, G577A, A594T (Genotipo DVI-I weak D type 4) (exon scanning), (BC019, BC020, BC021) en el exón 4 del gen RHD, polimorfismos G635T (G212V) (Genotipo RHD G212V) (BC051), T667G (Genotipo DIIIa, weak D type 4, Dva, DAR, DOL, DCS) (BC061), G676C (Genotipo DCS, G686A (Genotipo DHR) (BC031), G697C (E233Q), (Genotipo G712A (M238V) (DVI I, weak D type 4, DV, DCS) (BC022, BC023), A712G (genotipo alelo negativo) (BC023) en el exón 5 del gen RHD, polimorfismos T807G (Genotipo pseudogene) (BC044), T809G (Genotipo weak D type 1) (BC038), G845A (G282D) (Genotipo weak D type 15, DIM) (BC037), C848T (T283I) (Genotipo DHMI) (BC029), G854A (C285Y) (Genotipo

ES 2 361 800 A1

DIM) (BC032), G885T (M295I) (Genotipo alelo negativo M295I) (BC053), 906insGGCT (Genotipo alelo negativo) (BC054), G916A, A932G (consenso exon scanning) (BC062, BC063), IVS6+1del4 (Genotipo alelo negativo) (BC055) en el exón 6 del gen RHD, polimorfismos G941T (G314V) (Genotipo alelo negativo) (BC056), C990G (Y330X) (Genotipo alelo negativo) (BC057), G1016A (G339E) (Genotipo weak D type 7) (BC042), T1025C (I342T) (exon scanning) (BC024), G1048C (Genotipo DIVa, DIVb) (BC094), G1057A (G353R) (Genotipo DNU) (BC034), C1061A (A354N) (Genotipo DII) (BC036), G1063A (G355S) (Genotipo DNB) (BC026), T1073C (Genotipo DWI) (BC035) en el exón 7 del gen RHD, polimorfismo IV8+1G>A (Genotipo alelo negativo) (BC058) en el exón 8 del gen RHD, G1154C (G385A) (Genotipo weak D type 2) (BC039), A1193T (Genotipo DIVb) (BC064), G1227A (K409K) (Genotipo K409K) (BC045) polimorfismos en el exón 9 del gen RHD, los polimorfismos G106A (A36T) (Genotipo Cx) (BC068), A122G (Q41R) (Genotipo Cw) (BC067) en el exón 1 del gen RHCE, el polimorfismo T307C (S103P) (Genotipo Rhc) (BC066) en el exón 2 del gen RHCE, el polimorfismo C410T (A137V) (BC059) en el exón 3 del gen RHCE, los polimorfismos C676G (P226A) (Genotipo Ee) (BC025, BC069), C733G (L245V) (Genotipo VS) (BC070) en el exón 5 del gen RHCE, el polimorfismo G1006T (G336C) (Genotipo VS-/VS+) (BC071) en el exón 7 del gen RHCE, los polimorfismos A697T (Genotipo Kk) (BC073), C698T (T193M) (Genotipo Kk) (BC072) en el exón 6 del gen KELL, los polimorfismos T961C (R281W) (Genotipo KpaKpb) (BC074), G962A (R281Q) (Genotipo KpbKpc) (BC075) en el exón 8 del gen KELL, el polimorfismo G1208A (S363N) (Genotipo Kmod-1) (BC077) en el exón 10 del gen KELL, el polimorfismo C1910T (L597P) (Genotipo JsaJsb) (BC076) en el exón 17 del gen KELL, el polimorfismo I5AG>AA (Genotipo Jknull) (BC079) en el exón 6 del gen SLC14A1 (grupo sanguíneo KIDD), los polimorfismos G838A (D280N) (Genotipo JkaJkb) (BC078), T871C (S291P) (Genotipo Jknull) (BC082) en el exón 9 del gen SLC14A1 (grupo sanguíneo KIDD), los polimorfismos T-33C (Genotipo FyGATA) (BC082), G125A (D42G) (Genotipo FyaFyb) (BC081), C265T (R89C) (Genotipo Fyx) (BC083) en el gen DARC (grupo sanguíneo DUFFY), los polimorfismos C59T, G71A, T72G (S20L, G42E, G42E) (Genotipo MN) (BC084, BC085) en el exón 2 del gen GYPA, el polimorfismo T143C (M48T) (Genotipo Ss) (BC086) en el exón 4 del gen GYPB, los polimorfismos C790A (Genotipo GpMUR MilII) (BC089), C850G (Genotipo GpMUR MilIII) (BC090) en el exón 3 del gen GYPE, los polimorfismos C230T (Genotipo U) (BC087), I5+5GT (Genotipo U) (BC088) en el exón 5 del gen GYPB, el polimorfismo T2561C (P854L) (Genotipo DiaDib) (BC091) en el exón 19 del gen SLC4A1 (grupo sanguíneo DIEGO), el polimorfismo A793G (Genotipo DoaDob) (BC092) en el exón 2 del gen DOMBROCK, el polimorfismo C134T (A45V) (Genotipo CoaCob) (BC093) en el exón 1 del gen COLTON y combinaciones de los mismos.

30

2. DNA-chip según la reivindicación 1, en el que cada una de dichas 4 sondas para la detección de cada variación génica presentan la base a interrogar en la posición central y tiene una longitud comprendida entre 19 y 27 nucleótidos.

35 3. Uso de un DNA-chip según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el genotipado simultáneo, sensible, específico y reproducible de múltiples variaciones génicas humanas asociadas con antígenos eritrocitarios humanos.

40 4. Un kit adecuado para la puesta en práctica de un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a antígenos eritrocitarios humanos que comprende:

- un DNA-chip según las reivindicaciones 1 ó 2;

45 - un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en un método que comprende:

a) extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;

50 b) amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;

55 c) someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;

60 d) poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, 65 en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;

ES 2 361 800 A1

e) introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y

5 f) genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles; y, opcionalmente,

10 - un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método.

15 5. Uso de un kit según la reivindicación 4 para la identificación *in vitro* de grupos sanguíneos humanos, o el genotipado *in vitro* de grupos sanguíneos humanos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º solicitud: 200901845

② Fecha de presentación de la solicitud: **11.09.2009**

③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HASHMI G. et al. "A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing". Transfusion. May. 2005. Vol. 45, N.º. 5, paginas 680-688. ISSN 0041-1132 (print).	1-5

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 n.º:

Fecha de realización del informe
31.08.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL.XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.08.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	_____	SÍ
	Reivindicaciones _____		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones _____	_____	SÍ
	Reivindicaciones 1-5		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 ha sido publicada.

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	Hashmi G. et al. "A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing". Transfusion. May. 2005. Vol. 45, Nº. 5, paginas 680-688. ISSN 0041-1132 (print)	May- 2005

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 divulga un chip de DNA para la puesta en práctica de un método in vitro para el genotipado simultaneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a antígenos eritrocitarios humanos.

La reivindicación 1 y 2 caracterizan el método por comprender las siguientes etapas: extracción del ácido nucleico, amplificación de regiones de dicho ácido que contienen las variaciones génicas a identificar, fragmentación de dichos productos de amplificación, hibridación de los productos de fragmentación con 4 sondas, por variación, apropiadas fijadas en un soporte, escaneado y cuantificación de la hibridación producida. Las variaciones génicas se seleccionan entre distintos antígenos eritrocitarios. Las sondas presentan la base a interrogar en la posición central y tienen una longitud comprendida entre 19 y 27 nucleótidos. La reivindicación 3 reivindica el uso del chip de DNA. La reivindicación 4 y 5 se refieren a un kit para la puesta en práctica del método desarrollado por el chip.

D01, como documento más cercano del estado de la técnica, divulga el uso de un microarray para el tipaje de los grupos sanguíneos como alternativa a los métodos tradicionales basados en la hemoaglutinación. Ese microarray permite la identificación de distintos SNPs (tabla 1) escogidos entre aquellos alelos que representan una variedad de genes que codifican antígenos eritrocitarios clínicamente relevantes. Para llevar a cabo dicho método se procedió a la extracción del DNA genómico, amplificación de aquellas regiones conteniendo los SNPs a analizar (tabla 2), hibridación con sondas especialmente diseñadas al efecto y detección espectroscópica de las zonas de hibridación.

Las reivindicaciones objeto de la solicitud no aparecen divulgadas en el estado de la técnica tal y como aparecen en la presente solicitud, por lo que cumplirían con el requisito de novedad. Sin embargo, el DNA chip reivindicado no parece ser más que una mera alternativa al microarray divulgado en el estado de la técnica anterior, ya que la diferencia entre ambos, a saber las disposición de las sondas por cada variante génica a detectar y los polimorfismos seleccionados, no parece ser la responsable de efecto técnico alguno sorprendente, por lo que no cumpliría con el requisito de actividad inventiva.