



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 195**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08839669 .2**

96 Fecha de presentación : **16.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2203567**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

54 Título: **Genotipado HLA de alta resolución y alto rendimiento mediante secuenciación clonal.**

30 Prioridad: **16.10.2007 US 980393 P**
03.10.2008 US 245666

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Higuchi, Russell, Gene;**
Erlich, Henry A. y
Bentley, Gordon

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 365 195 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genotipado HLA de alta resolución y alto rendimiento mediante secuenciación clonal

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los locus HLA de clase I y II son los genes más polimórficos del genoma humano, con un patrón complejo de polimorfismo en mosaico localizado fundamentalmente en el exón 2 en los genes de clase II y en los exones 2 y 3 en los genes de clase I. En los métodos actuales de tipado HLA, la resolución a nivel de alelo de los alelos HLA, elemento clínicamente importante en el caso del trasplante de células madre hematopoyéticas, es técnicamente complejo. Diversos estudios a gran escala han demostrado que una compatibilidad HLA precisa a nivel de alelo entre el donante y el paciente mejora significativamente la supervivencia global del trasplante al reducir la incidencia y gravedad tanto de la enfermedad del injerto contra el huésped aguda como crónica y mejorar las tasas de éxito del injerto. Cuando, por ejemplo, son compatibles 8 de 8 locus HLA de los más significativos en comparación con 6 de 8, se incrementa la supervivencia tras el trasplante un 60% a los 12 meses.

Es una práctica habitual mantener registros de donantes de médula ósea en los que se tipifica en millones de donantes potenciales el HLA con una resolución baja-media de los locus A, B, y en muchos casos DRB1. En base a este tipado inicial, se seleccionan múltiples donantes no relacionados y potencialmente compatibles y a continuación se procede al tipado con resolución a nivel de alelo de estos locus y otros locus adicionales para identificar el donante más compatible con el receptor.

Hasta la fecha, la máxima resolución del tipado HLA se obtiene mediante la secuenciación del ADN basada en el método de Sanger mediante fluorescencia con la utilización de electroforesis capilar. Sin embargo, pueden persistir ambigüedades en los datos del tipado HLA debidas a la existencia de múltiples polimorfismos entre alelos y las resultantes ambigüedades de fase cuando ambos alelos se amplifican y secuencian a la vez. Resolver estas ambigüedades requiere de procedimientos de larga duración tales como amplificar y luego analizar los dos alelos por separado.

Los métodos de secuenciación de nueva generación propagan clonalmente en paralelo millones de moléculas individuales de ADN las cuales a continuación son secuenciadas en paralelo. Recientemente, las longitudes de lectura obtenibles mediante uno de estos métodos de secuenciación mediante pirosecuenciación de nueva generación (454 Life Sciences, Inc.) ha aumentado a más de 250 nucleótidos. La presente invención da a conocer métodos de genotipado HLA mejorados basados en el descubrimiento de que la secuenciación clonal puede utilizarse para fijar la fase de los polimorfismos asociados con un exón y hace posible la determinación inequívoca de la secuencia de cada alelo HLA.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el genotipado HLA de 8 locus puede realizarse en muestras obtenidas de múltiples individuos en un solo ciclo de secuenciación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un método para la determinación de los genotipos de los genes HLA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 para más de un individuo en paralelo, comprendiendo dicho método:

(a) amplificar para cada individuo los exones de los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 que comprenden sitios polimórficos obteniendo amplicones HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de cada individuo, de forma que cada reacción de amplificación se realiza con un cebador directo y un cebador inverso para amplificar un exón de gen HLA, de manera que:

(i) el cebador directo comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia de adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia HLA; y

(ii) el cebador inverso comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia de adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia HLA;

(b) agrupar los amplicones HLA de más de un individuo y realizar una PCR en emulsión;

(c) determinar la secuencia de los amplicones HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de cada individuo utilizando una pirosecuenciación en paralelo; y

(d) asignar los alelos HLA de cada individuo mediante la comparación de la secuencia de los amplicones HLA con la secuencia conocida del HLA para determinar qué alelos HLA están presentes en el individuo. En realizaciones preferentes, según la presente invención, el cebador directo o inverso para amplificar el amplicón HLA posee la secuencia de la región que se hibrida con el HLA de uno de los cebadores que se

muestran en la Tabla 1. Dicho cebador puede contener adicionalmente la secuencia de una región adaptador de uno de los cebadores que se muestran en la Tabla 1. En realizaciones preferentes adicionales, el cebador también puede contener una etiqueta de identificación individual de uno de los cebadores de la Tabla 1. En realizaciones especialmente preferentes, el cebador posee la secuencia de uno de los cebadores de la Tabla 1.

Además, la invención da a conocer un kit que comprende pares de cebadores para obtener amplicones HLA para determinar los genotipos HLA de los genes HLA HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de más de un individuo en paralelo, en el que los pares de cebadores comprenden un cebador directo y un cebador inverso para amplificar un exón de gen HLA, de manera que: (i) el cebador directo comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia de adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia HLA; y (ii) el cebador inverso comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia de adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia HLA. En las realizaciones preferentes el kit comprende uno o más de los cebadores directos e inversos mostrados en la Tabla 1. En otras realizaciones preferentes, el kit comprende pares de cebadores para amplificar exones para genotipar los genes HLA HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1, en el que cada par de cebadores se selecciona entre los cebadores mostrados en la Tabla 1.

La presente invención da a conocer adicionalmente un kit que comprende uno o más pares de cebadores, en el que cada par de cebadores comprende un cebador directo para obtener un amplicón HLA que posee la secuencia de una región de hibridación a HLA de uno de los cebadores mostrados en la Tabla 1; y un cebador inverso para obtener un amplicón HLA que posee la secuencia de una región de hibridación a HLA de uno de los cebadores mostrados en la Tabla 1. Dicho cebador comprende adicionalmente una región adaptador que posee una de las secuencias mostradas en la Tabla 1. En realizaciones preferentes adicionales, el cebador posee una etiqueta de identificación individual de uno de los cebadores mostrados en la Tabla 1. En realizaciones especialmente preferentes, el cebador directo posee la secuencia de uno de los cebadores mostrados en la Tabla 1 y el cebador inverso posee la secuencia de uno de los cebadores mostrados en la Tabla 1.

Además, la invención da a conocer un kit, que comprende quince pares de cebadores HLA, de manera que los pares de cebadores amplifican el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-A; el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-B; el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-C; el exón 2 DRB1, el exón 2 DPB1, el exón 2 DPA1, el exón 2 DQA1; y el exón 2 y el exón 3 de DQB1. En realizaciones preferentes, la invención da a conocer un kit que comprende al menos seis pares de cebadores, o al menos ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce pares de cebadores. Preferentemente, los pares de cebadores se seleccionan de los cebadores mostrados en la Tabla 1.

Además, la presente invención da a conocer un kit, que comprende pares de cebadores múltiples para cada par de cebadores que amplifica el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-A; el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-B; el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-C; el exón 2 DRB1, el exón 2 DPB1, el exón 2 DPA1, el exón 2 DQA1; y el exón 2 y el exón 3 de DQB1, en el que los pares de cebadores múltiples que amplifican una región exónica individual de interés posee la misma región de hibridación con el HLA y la misma región adaptador, pero etiquetas de identificación diferentes. En realizaciones preferentes, existen 12 o más pares de cebadores múltiples para cada región exónica de interés, teniendo los pares de cebadores etiquetas de identificación múltiple diferentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una descripción esquemática de un cebador de fusión directo e inverso de la presente invención.

La figura 2 es un histograma de la longitud de lectura.

La figura 3 muestra la profundidad de lectura del total de lecturas directas e inversas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "alelo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia variante de un gen. Un alelo puede estar formado por una o más diferencias genéticas. En el caso de los alelos HLA, un alelo está formado típicamente por múltiples diferencias genéticas. Se muestran ejemplos de secuencias de alelos HLA en Mason y Parham (1998) Tissue Antigens 51: 417-66, donde se muestra un listado de alelos de HLA-A, HLA-B, y HLA-C y en Marsh y otros (1992) Hum. Immunol. 35:1, donde se muestra un listado de alelos de DRA, DRB, DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1.

Los términos "polimórfico" y "polimorfismo", tal como se utilizan en la presente invención, se refieren a la situación en la cual pueden hallarse en una población dos o más variantes de una secuencia genómica específica, o de la secuencia de aminoácidos codificada. Una posición polimórfica hace referencia a un sitio en el ácido nucleico en el cual se produce una diferencia de nucleótidos que distinga las variantes. Tal como se utiliza en la presente

invención, un “polimorfismo de nucleótido simple”, o SNP, hace referencia a un sitio polimórfico formado por una sola posición de nucleótido.

El término “genotipo” se refiere a una descripción de los alelos de un gen o genes contenidos en un individuo o una muestra. Tal como se utiliza en la presente invención, no se hace ninguna distinción entre el genotipo de un individuo y el genotipo de una muestra obtenida de dicho individuo.

Tal como se utiliza en la presente invención, “determinar el genotipo” de un gen HLA se refiere a determinar los polimorfismos del HLA presentes en los alelos individuales de un individuo. En la presente invención, “determinar el genotipo de un gen HLA-A” se refiere a identificar los residuos polimórficos presentes en al menos el exón 2 y el exón 3, y típicamente el exón 4, en las posiciones que son determinantes alélicos de un alelo del gen HLA-A. En la presente invención, “determinar el genotipo de un gen HLA-B” se refiere a identificar los residuos polimórficos presentes en al menos el exón 2 y el exón 3, y típicamente el exón 4, en las posiciones que son determinantes alélicos de un alelo del gen HLA-B; y “determinar el genotipo de un gen HLA-C” se refiere a identificar los residuos polimórficos presentes en al menos el exón 2 y el exón 3, y típicamente el exón 4, en las posiciones que son determinantes alélicos de un alelo del gen HLA-C. Igualmente, en la presente invención, “determinar el genotipo” de los genes DRB1, DPB1, DPA1 o DQA1 se refiere a identificar los residuos polimórficos presentes en el exón 2 en las posiciones que son determinantes alélicos de dichos genes y se refiere a identificar los residuos polimórficos presentes en el exón 2 y el exón 3 en las posiciones que son determinantes alélicos de un alelo DQB1.

Tal como se utiliza en la presente invención, un “determinante alélico” se refiere a un sitio polimórfico en el cual la presencia de una variación da lugar a una variación en el antígeno HLA.

El término “región diana” se refiere a una región de un ácido nucleico, en la presente invención, un gen HLA, en la que se quiere analizar la presencia de sitios polimórficos.

Por “oligonucleótido” se entiende un polímero de nucleótidos de una sola cadena formado por más de 2 subunidades de nucleótido unidas entre sí de forma covalente. Un cebador oligonucleótido, tal como se utiliza en la presente invención, tiene de forma característica aproximadamente entre 10 y 100 nucleótidos de longitud, habitualmente entre 20 y 60 nucleótidos de longitud. Los grupos azúcar de las subunidades de nucleótido pueden ser ribosa, deoxiribosa, o derivados modificados de las mismas tales como o-metil ribosa. Las subunidades de nucleótido de un oligonucleótido pueden estar unidas por enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metil fosfonato u otros, incluyendo, pero sin carácter limitante, enlaces raros o no naturales, que no impidan la hibridación del oligonucleótido. Además un oligonucleótido puede tener nucleótidos poco comunes o grupos no nucleótido. Un oligonucleótido, tal como se describe en la presente invención, es un ácido nucleico, preferentemente ADN, pero puede ser ARN o poseer una combinación de ribonucleótidos y deoxiribonucleótidos unidos covalentemente. Los oligonucleótidos con una secuencia definida pueden producirse mediante técnicas conocidas por aquellos con un conocimiento normal de la técnica, por ejemplo mediante síntesis química o bioquímica, y mediante expresión *in vitro* o *in vivo* de moléculas de ácido nucleico.

El término “cebador” se refiere a un oligonucleótido que actúa como punto de iniciación de la síntesis de ADN bajo condiciones en las cuales se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador complementario con respecto a una cadena de ácido nucleico en un tampón adecuado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferentemente un oligodeoxiribonucleótido de cadena única. En la presente invención, un cebador incluye una “región de unión a HLA” o una “región de hibridación a HLA” exacta o substancialmente complementaria a la secuencia HLA de interés. Esta región del cebador tiene característicamente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25, 30, 35 ó 40 nucleótidos de longitud.

Tal como se utiliza en la presente invención, una “región adaptador” de un cebador se refiere a la región de una secuencia de cebador en el extremo 5' que es universal para los amplicones HLA obtenida según los procedimientos descritos en la presente invención y que proporciona secuencias que se hibridan a un oligonucleótido presente en una macropartícula u otra superficie sólida para realizar la PCR de emulsión. La “región adaptador” puede servir además de sitio al cual se une un cebador de secuenciación. La región adaptador posee característicamente aproximadamente entre 15 y 30 nucleótidos de longitud.

Los términos “etiqueta de identificadora individual”, “código de barras”, “etiqueta de identificación”, “etiqueta de identificación múltiple”, “etiqueta de identificación molecular” o “MID” se utilizan de forma intercambiable en la presente invención para referirse a una secuencia de nucleótidos presente en un cebador que sirve como marcador del ADN obtenido de un individuo en concreto.

Tal como se utilizan en la presente invención, los términos “ácido nucleico”, “polinucleótido” y “oligonucleótido” se refieren a cebadores y fragmentos de oligómeros. Los términos no quedan limitados por la longitud y son genéricos para polímeros lineales de polideoxiribonucleótidos (que contienen 2-deoxi-D-ribosa), poliribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro N-glicósido de una base purina o pirimidina, o de bases purina o pirimidina modificadas. Estos términos incluyen ADN de cadena única o doble, así como ARN de cadena única o doble.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede contener enlaces fosfodiéster o enlaces modificados que incluyen, pero no sin carácter limitante, enlaces fosfotriéster, fosforamidoato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidoato, carbamato, tioéter, fosforamidoato puente, metileno fosfonato puente, fosforotioato, metilfosfonato, fósforoditioato, metilfosfonato, fósforoditioato puente, fósforotioato puente o sulfona y combinaciones de los mismos.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede contener las cinco bases naturales (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/u otras bases diferentes de las naturales. Estas bases pueden tener diversos objetivos como por ejemplo estabilizar o desestabilizar la hibridación; promover o inhibir la degeneración de las sondas; o como puntos de unión para grupos detectables o grupos inhibidores de la fluorescencia. Por ejemplo, un polinucleótido de la presente invención puede contener uno o más grupos base modificados, no estándar o derivatizados, incluyendo, pero sin carácter limitante, N6-metiladenina, N6-tert-butilbencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5 bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5 (carboxihidroximetil)uracilo, 5 carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5 carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6 isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metilo del ácido uracilo-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6- diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Pueden hallarse otros ejemplos de grupos base modificados, no estándar o derivatizados en las patentes U.S.A. nº 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede contener uno o más grupos azúcar modificados incluyendo, sin carácter limitante, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

El término "condiciones de amplificación" se refiere a las condiciones utilizadas en una reacción de amplificación (por ejemplo una amplificación PCR) que permiten la hibridación de un polinucleótido extensible (por ejemplo un cebador) con un nucleótido diana, y la extensión dependiente del molde del polinucleótido extensible. Tal como se utiliza en la presente invención, las "condiciones de amplificación" o las condiciones suficientes para amplificar un ácido nucleico diana son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual ("Cebadores para PCR. Un manual de laboratorio, de Dieffenbach y Dveksler, editores., 2003, Cold Spring Harbor Press; y PCR Protocols ("Protocolos de PCR"), Bartlett y Stirling, editores., 2003, Humana Press.

El término "amplificación", tal como se utiliza en la presente invención, en el contexto de una reacción de amplificación de un ácido nucleico se refiere a una reacción que incrementa las copias de un molde de ácido nucleico, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana.

Introducción

La presente invención da a conocer métodos para el genotipado HLA basados en el descubrimiento de que puede utilizarse un análisis de secuenciación clonal, en paralelo, múltiplex, para genotipar al menos 3, típicamente al menos 6 y preferentemente al menos 8 locus HLA en múltiples individuos al mismo tiempo. Los métodos de secuenciación de nueva generación propagan clonalmente en paralelo millones de moléculas de ADN individuales, las cuales son a continuación secuenciadas en paralelo. Recientemente, las longitudes de lectura obtenibles con uno de dichos métodos de secuenciación de nueva generación (454 Life Sciences, Inc.) ha aumentado a más de 250 nucleótidos. Estas longitudes de lectura clonal hacen posible fijar la fase de los polimorfismos asociados con un exón y por lo tanto la determinación inequívoca de la secuencia de cada alelo HLA. En la presente invención, el sistema tiene un rendimiento lo suficientemente elevado como para permitir el tipado completo de 8 locus HLA de múltiples individuos, por ejemplo 24 o 48 individuos, en un solo ciclo de secuenciación utilizando una plataforma de pirosecuenciación, tal como se describe en esta memoria.

La secuenciación de amplicones altamente multiplexada de la presente invención utiliza secuencias etiqueta internas específicas de la muestra (etiquetas con código de barras o MIDs) en los cebadores para permitir el agrupamiento de muestras manteniendo, sin embargo, la capacidad de asignar las secuencia a un individuo concreto. En la presente invención, pueden obtenerse los genotipos HLA de al menos ocho locus (HLA-A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1), así como DRB3, 4 y 5 a partir de los datos generados por la secuenciación. Este sistema de secuenciación HLA también puede detectar mezclas químicas, por ejemplo, la detección de alelos maternos no transmitidos raros presentes en la sangre de los pacientes con SCID (Inmunodeficiencia combinada severa).

Genes HLA

El complejo del sistema antígeno leucocitario humano (HLA) abarca aproximadamente 3,5 millones de pares de bases en el brazo corto del cromosoma 6. Las regiones principales son las regiones de clase I y clase II. Los antígenos principales de Clase I son HLA-A, HLA-B, y HLA-C y los principales antígenos de Clase II son HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Los locus HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR codifican las cadenas α y β de los antígenos HLA-DR,

DP y DQ. Los genes HLA se encuentran entre los genes más polimórficos. Los polimorfismos que se expresan en el antígeno HLA (y que por lo tanto son de gran interés en la tipificación para el trasplante) se localizan fundamentalmente en el exón 2 de los genes de clase II y en los exones 2 y 3 de los genes de clase I.

Tal como se describe en la presente invención, el genotipo de un gen HLA, se refiere a determinar los polimorfismos presentes en dicho gen HLA. Para HLA-A, los polimorfismos presentes en el exón 2 y el exón 3 se determinan mediante la secuenciación de amplicones generados mediante PCR a partir de un individuo. En las realizaciones típicas, también se determina la secuencia del exón 4. Para obtener amplicones, se amplifican en reacciones de PCR individuales tanto el exón 2, como el exón 3, y el exón 4 o regiones de los mismos que contienen los determinantes alélicos. De forma similar se obtienen amplicones del exón 2 y el exón 3, y en algunas realizaciones del exón 4 de los alelos HLA-B y HLA-C de un individuo. Para genotipar los alelos de clase II, se obtienen amplicones del exón 2 de DRB1, DPB1, DPA1 y DQA1 y de los exones 2 y 3 de DQB1. Al poder secuenciar completamente cada exón, mediante la secuenciación de ambas cadenas con una superposición suficiente entre las lecturas desde cualquier extremo, pueden asignarse alelos HLA específicos de forma inequívoca.

Se amplifica individualmente cada exón de cada muestra de un individuo utilizando cebadores dirigidos específicamente al exón de interés, o a la región polimórfica del exón de interés para su amplificación. Los cebadores utilizados en la reacción de amplificación incluyen secuencias adicionales: secuencias adaptador para la PCR en emulsión y una secuencia de identificación que sirve como marcador del ADN de cada individuo en concreto.

Cebadores de amplificación

La presente invención utiliza cebadores de amplificación que amplifican los exones de interés de los genes HLA. Típicamente, los cebadores se diseñan para garantizar que se obtiene toda la parte polimórfica del exón.

En la presente invención, las secuencias de los cebadores para la amplificación múltiple de la invención están diseñadas de manera que incluyen secuencias que pueden ser utilizadas para facilitar la secuenciación clonal y el análisis. Los cebadores de amplificación de la presente invención (también denominados en la misma "cebadores de fusión") incluyen por lo tanto los siguientes componentes: un adaptador, una etiqueta de identificación exclusiva y una secuencia que se hibrida con un gen HLA de interés para ser utilizado en una reacción de amplificación para obtener un amplicón. La figura 1 muestra una representación esquemática de un cebador de fusión de la presente invención.

Las partes adaptador de las secuencias de cebador se hallan en el extremo 5' de los cebadores de fusión de los amplicones. Las regiones adaptador comprenden secuencias que sirven de lugar de hibridación de los cebadores para la reacción de secuenciación y también se corresponden con las secuencias presentes en las perlas, o en una superficie sólida de manera que el amplicón puede hibridarse a la superficie para realizar la PCR de emulsión. El cebador directo para amplificar un exón HLA incluye una secuencia adaptador en el extremo 5', denominada en la presente invención como región adaptador A. El cebador inverso comprende una región que contiene una secuencia adaptador en el extremo 5', denominada en la presente invención como región adaptador B. Tal como se ha señalado, las secuencias presentes en la región adaptador y sus complementarias permiten la hibridación de los amplicones a las perlas para llevar a cabo la PCR en emulsión. Opcionalmente, el adaptador puede incluir además una secuencia clave discriminadora exclusiva compuesta por una secuencia de nucleótidos no repetidos (es decir, ACGT, CAGT, etc.). Esta secuencia clave se incorpora típicamente para distinguir los amplicones del genotipado HLA de las secuencias control que se incluyen en la reacción. Dichas secuencias se describen, por ejemplo, en WO/2004/069849 y WO 2005/073410. En, por ejemplo, WO/2006/110855 se proporcionan consejos adicionales para la configuración de cebadores con adaptador.

En algunas realizaciones, las secuencias adaptador a utilizar en la presente invención son las secuencias del cebador A y del cebador B para el sistema de secuenciación 454 GS-FLX 454 (Roche Diagnostics). La secuencia del cebador A es 5' GCCTCCCTCGCGCCA 3' (identificador de secuencia nº: 1). La secuencia del cebador B es 5' GCCTTGCCAGCCCGC 3' (identificador de secuencia nº: 2). Tal como se ha señalado anteriormente, los cebadores contienen típicamente secuencias "clave" adicionales que proporcionan identificación a la secuenciación para distinguir los amplicones de las secuencias control.

Los cebadores de PCR para ser utilizados en los métodos de genotipado HLA de la presente invención comprenden además etiquetas identificadoras individuales. Estas etiquetas identificadoras individuales se utilizan para marcar los amplicones HLA de cada individuo que se está analizando. Las secuencias HLA de interés se amplifican a partir de una muestra de ácido nucleico de un individuo que se quiere genotipar. Tal como se ha explicado anteriormente, los exones HLA, o regiones de los exones, que contienen los polimorfismos que actúan como determinantes alélicos se amplifican de forma individual. Los amplicones obtenidos de un individuo se marcan con la misma etiqueta de identificación. La etiqueta se incluye en los cebadores de fusión que se utilizan para amplificar cada amplicón de cada individuo. En consecuencia, las etiquetas de identificación también se secuencian en la reacción de secuenciación. Las etiquetas ID se presentan en los cebadores de fusión utilizados para obtener los amplicones HLA

entre la región adaptador y la región de cebado HLA del cebador de fusión.

Las etiquetas de identificación pueden tener longitudes diferentes. Típicamente, la etiqueta tiene una longitud de al menos 4 ó 5 nucleótidos. En algunas realizaciones, puede ser deseable tener secuencias de identificación más largas, por ejemplo de 6, 8 ó 10 o más nucleótidos de longitud. La utilización de dichas secuencias es bien conocida en la técnica (ver por ejemplo Thomas, y otros Nat. Med., 12:852-855, 2006; Parameswaran y otros, Nucl. Acids Res., 35:e130, 2007; Hofmann y otros, Nucl. Acids Res. 35:e91, 2007). En la mayoría de realizaciones de la presente invención, la etiqueta de identificación tiene una longitud entre 4 y 10 nucleótidos.

Las secuencias identificadoras individuales pueden diseñarse teniendo en cuenta ciertos parámetros. Por ejemplo, al diseñar una etiqueta ID de 4 residuos, es deseable escoger 4 bases que tengan en cuenta el ciclo de flujo de los nucleótidos en la reacción de secuenciación. Por ejemplo, si los nucleótidos se añaden el orden T, A, C, y G, es típicamente deseable diseñar la secuencia etiqueta de manera que un residuo positivo sea seguido de un residuo que sea negativo. En consecuencia, en este ejemplo, si una secuencia etiqueta empieza por un residuo "A" de manera que el nucleótido incorporado en la reacción de secuenciación es T, el segundo nucleótido en la secuencia etiqueta sería un nucleótido tal que no se incorpore A. Además, es deseable evitar la formación de homopolímeros, ya sea dentro de la secuencia etiqueta o generándolos debido a la última base de la región adaptador o la primera base de la región HLA-específica del cebador de fusión.

La región de cebado HLA (también denominada en la presente invención región de unión a HLA, o región de hibridación a HLA) de los cebadores de fusión es la región del cebador que se hibrida con la secuencia HLA de interés para amplificar el exón deseado (o en algunas realizaciones, región del exón). Típicamente, la región HLA del cebador de fusión se hibrida a una secuencia intrónica adyacente al exón que se desea amplificar para obtener la secuencia completa del exón. Las secuencias HLA se seleccionan preferentemente para amplificar selectivamente el exón HLA de interés, aunque en algunas realizaciones, un par de cebadores también puede amplificar una región altamente similar de un gen HLA relacionado. Por ejemplo, los cebadores para el exón 2 de DRB 1 descritos en la sección de ejemplos siguiente también amplifican los locus DRB3, DRB4, y DRB5. Los cebadores se seleccionan de manera que el exón se amplifica con especificidad suficiente para permitir la determinación inequívoca del genotipo HLA a partir de la secuencia.

Las secuencias de los alelos y genes HLA son conocidas y están disponibles en varias bases de datos, incluyendo GenBank y otras bases de datos de genes y han sido publicadas (ver, por ejemplo Mason y Parham (1998) Tissue Antigens 51: 417-66, que ofrece un listado de los alelos HLA-A, HLA-B, y HLA-C; Marsh y otros (1992) Hum. Immunol. 35:1, que ofrece un listado de los alelos HLA de Clase II DRA, DRB, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1).

Los cebadores para la PCR pueden diseñarse en base a los principios conocidos en la técnica. En la literatura científica pueden hallarse diversas estrategias para el diseño de cebadores, por ejemplo, en Rubin, E. y A. A. Levy, Nucleic Acids Res, 1996.24 (18):p. 3538-45; y Buck y otros, Biotechniques, 1999.27 (3): p. 528-36. Por ejemplo, la región HLA-específica del cebador tiene típicamente una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos o más, por ejemplo entre 20 y 35 nucleótidos. Otros parámetros que se tienen en cuenta son el contenido G/C, características de diseño para evitar una estructura secundaria interna y evitar la formación de dímeros de cebador, así como las temperaturas de fusión (T_m).

En la tabla 1 se muestran ejemplos de cebadores para ser utilizados en la presente invención. En la tabla 1, los cebadores directos tienen la secuencia del cebador "A" del sistema de secuenciación 454 en el extremo 5', seguida de una clave de cuatro nucleótidos (TCAG), que forman conjuntamente la región adaptador; seguida de la etiqueta identificadora (4 nucleótidos, si no se menciona lo contrario); que se continúa con la región que se hibrida con el gen HLA indicado. Los cebadores inversos poseen la secuencia del cebador "B" del sistema de secuenciación 454 en el extremo 5', seguida de la clave de cuatro nucleótidos TCAG, que forman conjuntamente la región adaptador, seguida de la región de etiqueta identificadora, seguida de la región HLA-específica.

Los cebadores utilizados en los métodos de la presente invención pueden comprender una región de hibridación a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1. En otras realizaciones, dichos cebadores pueden comprender una parte que es substancialmente idéntica a la secuencia de las regiones de hibridación a HLA mostradas en la tabla 1. Por lo tanto, por ejemplo, un cebador de la invención puede comprender al menos 10, 15, 20 ó más nucleótidos contiguos de la región de hibridación a HLA de los cebadores mostrados en la tabla 1.

Las amplificaciones HLA de cada individuo del que se quiere genotipar el HLA se realizan por separado. A continuación se agrupan los amplicones de cada individuo para la PCR en emulsión y el análisis de secuencia subsiguientes.

El molde de ácido nucleico utilizado para amplificar el amplicón HLA de interés se obtiene típicamente de ADN genómico aislado del individuo que quiere genotiparse. En el presente método, se genotipa el HLA de más de un individuo en reacciones paralelas. En la presente invención se genotipa el HLA de al menos 12 individuos, y típicamente al menos 16, 20, 24, 30, 36, o 48 individuos.

Los amplicones HLA pueden obtenerse utilizando cualquier tipo de reacción de amplificación. En la presente invención se generan amplicones múltiplex mediante PCR utilizando pares de cebadores, tal como se describen en la presente invención. Típicamente, es deseable utilizar una polimerasa con una tasa de errores baja, por ejemplo, la polimerasa Taq de alta fidelidad (Roche Diagnostics).

Pueden optimizarse las condiciones de PCR para determinar las condiciones adecuadas para obtener amplicones HLA a partir de un individuo. Cada amplicón HLA puede amplificarse individualmente en reacciones PCR independientes. En algunas realizaciones, pueden obtenerse los amplicones HLA de un individuo en una o más reacciones múltiplex que comprenden pares de cebadores para amplificar amplicones individuales.

PCR en emulsión

Los amplicones HLA se unen a perlas y se someten a una PCR en emulsión. La PCR en emulsión es conocida en la técnica (ver, por ejemplo, WO/2004/060849, WO 2005/073410, Publicación de solicitud de patente US nº 20050130173, WO2007/086935 y WO/2008/076842). En la PCR en emulsión, la amplificación se realiza uniendo un molde a amplificar, en la presente invención, un amplicón HLA, a un soporte sólido, preferentemente en forma de una perla de forma general esférica.

El amplicón HLA se une a la perla mediante la hibridación del amplicón, a través de la región adaptador, a un cebador unido a la perla. Por lo tanto, la perla se une a un gran número de una sola especie de cebador que es complementaria al amplicón HLA en la parte adaptador. Las perlas se suspenden en una mezcla de reacción acuosa y a continuación se encapsula en una emulsión agua en aceite. La emulsión está compuesta de una fase de microgotas acuosas discretas, por ejemplo de un diámetro de aproximadamente entre 60 y 200 µm, encapsuladas por una fase aceite termoestable. Se añade el aceite y se forman las gotitas de la emulsión de manera que, en promedio, la emulsión contiene solamente un ácido nucleico diana y una perla. Cada microgota contiene, preferentemente, solución de reacción de amplificación (es decir los reactivos necesarios para la amplificación del ácido nucleico, tales como polimerasa, sales, y los cebadores adecuados, por ejemplo, los que se corresponden con la región adaptador).

En la presente invención, la PCR en emulsión se realiza típicamente con dos poblaciones de perlas, dado que los amplicones HLA se secuencian en ambas direcciones. En una población de perlas, se une a la perla un primer cebador, correspondiente a la secuencia adaptador presente en el cebador inverso. En la segunda población, se une a la perla un segundo cebador correspondiente a la secuencia adaptador presente en el cebador directo. Por lo tanto, los cebadores para ser utilizados en la reacción en emulsión poseen típicamente la secuencia de la región adaptador, sin las secuencias adicionales tales como las secuencias "clave". La reacción de amplificación en emulsión se realiza típicamente de forma asimétrica. Para realizar una PCR asimétrica, los cebadores de PCR pueden estar presentes, por ejemplo, en una relación 8:1 ó 16:1 (es decir 8 o 16 de un cebador frente a 1 del segundo cebador).

Tras la amplificación en emulsión, se aíslan las perlas que poseen el molde amplicón HLA de cadena única, por ejemplo a través de un grupo como la biotina presente en un cebador de amplificación durante la PCR en emulsión, y el molde se secuencia utilizando tecnología de secuenciación del ADN, basada en la detección de la incorporación de bases mediante la liberación de pirofosfato y la degradación enzimática simultánea de nucleótidos (descrita, por ejemplo, en las patentes US nº 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

Los amplicones clonales se secuencian utilizando un cebador de secuenciación (por ejemplo, cebador A o cebador B) y añadiendo cuatro dNTPs o ddNTPs diferentes sometidos a una reacción polimerasa. Como cada dNTP o ddNTP se añade al producto de extensión del cebador, se libera una molécula de pirofosfato. La liberación de pirofosfato puede detectarse enzimáticamente, por ejemplo, por la generación de luz en una reacción luciferasa-luciferina. Adicionalmente, durante la reacción puede estar presente una enzima degradadora de nucleótidos, como la apirasa, para degradar los nucleótidos no incorporados (ver, por ejemplo la patente USA nº 6258568). En otras realizaciones, la reacción puede llevarse a cabo en presencia de un cebador de secuenciación, una polimerasa, una enzima degradadora de nucleótidos, deoxinculeótidos trifosfato, y un sistema de detección de pirofosfato que contiene ATP sulfurilasa y luciferasa (ver, por ejemplo, la patente USA nº 6258568).

Una vez se obtienen los datos de secuenciación de la secuencia de las moléculas de ADN individuales, puede determinarse la secuencia inequívoca del exón comparando estos archivos de secuencia con una base de datos de secuencias de HLA de dos alelos HLA. Las longitudes de lectura conseguidas con el sistema GSFLX (454 Life Sciences) (promedio = 250 bp) permite la superposición suficiente para esta determinación de cada exón. La asignación de los genotipos de cada locus basada en los archivos de datos de secuencias de exones puede realizarse, por ejemplo, con el programa informático desarrollado por Conexio Genomics. Un aspecto importante del programa es su capacidad para filtrar las lecturas de secuencias (pseudogenes y otros genes HLA no deseados) amplificadas por los cebadores junto con la secuencia diana.

Kits

Las composiciones y reactivos descritos en la presente invención pueden empaquetarse en kits. Un kit de la invención comprende típicamente pares de cebadores, tal como los descritos en la presente invención que son adecuados para amplificar las regiones de interés de un alelo HLA. Los pares de cebadores comprenden un cebador directo que comprende una región adaptador, una etiqueta de identificación individual y una región de hibridación a HLA; y un cebador inverso que comprende una región adaptador, una etiqueta de identificación individual y una región de hibridación a HLA. Los kits de la invención comprenden frecuentemente pares de cebadores para amplificar amplicones para determinar el genotipo de al menos HLA-A, HLA-B, y DRB1 de múltiples individuos. Habitualmente, el kit de la invención comprende pares de cebadores suficientes para determinar el genotipo de los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de múltiples individuos, por ejemplo 12 o más individuos.

En algunas realizaciones, un kit puede contener adicionalmente una o más poblaciones de perlas que poseen un cebador unido que se corresponde con una de las regiones adaptador que pueden utilizarse en una PCR en emulsión. En algunas realizaciones, un kit puede contener uno o más compartimientos que comprenden reactivos adecuados para realizar una reacción seleccionada a discreción de un facultativo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un kit puede contener uno o más compartimientos de reacción que comprenden uno o más reactivos de secuenciación.

Los diversos componentes incluidos en el kit están típicamente contenidos en contenedores independientes, sin embargo, en algunas realizaciones, uno o más de los componentes pueden estar presentes en el mismo contenedor. Adicionalmente, los kits pueden comprender cualquier combinación de las composiciones y reactivos descritos en la presente invención. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender reactivos adicionales que pueden ser necesarios u opcionales para realizar los métodos dados a conocer. Dichos reactivos incluyen, sin carácter limitante, tampones, polinucleótidos control y similares.

En la presente solicitud, la utilización del singular incluye el plural a no ser que se especifique lo contrario. Los encabezamientos de las secciones utilizados en la presente invención tienen un carácter meramente organizativo y no deben interpretarse como limitantes en modo alguno de la materia descrita. Aunque las enseñanzas de la presente invención se describen de forma conjunta con diversos ejemplos, no se pretende que las enseñanzas de la presente invención queden limitadas por tales realizaciones.

EJEMPLOS

Pirosecuenciación múltiplex

El análisis de múltiples locus HLA de múltiples muestras en un solo ciclo 454 se facilita por la incorporación de etiquetas ID moleculares (MID) en los cebadores de PCR. La tabla 1 muestra las secuencias de cebadores de fusión 454 específicos de HLA con la secuencia adaptador (para la captura de perlas) y una etiqueta MID de 4 bases. Se proporcionan secuencias adicionales que dan lugar a etiquetas MID de 5 bases.

En un experimento inicial se analizaron 24 líneas celulares con genotipos HLA conocidos (tabla 2). En un experimento subsiguiente, se analizaron 48 muestras.

Se diseñaron quince pares de cebadores para los exones 2, 3 y 4 de los locus HLA-A, B y C, el exón 2 de DRB1, DPB1, DPA1 y DQA1 y los exones 2 y 3 de DQB1. Se diseñaron cebadores con doce etiquetas MID diferentes para cada secuencia diana dando un total de 180 (15 x 12). Los cebadores del exón 2 de DRB1 también amplifican los locus DRB3, DRB4 y DRB5, genes que están presentes en haplotipos DRB1 específicos. Tras la amplificación de varias muestras, se cuantificaron los productos de la PCR mediante un análisis con BioAnalyzer, se diluyeron los productos a una concentración adecuada, y se agruparon para la realización de la PCR en emulsión. Se consiguieron ciclos de pirosecuenciación de 24 y 48 individuos utilizando 2 o 4 regiones de placas de picotitulación, respectivamente. En la figura 2 se muestra la distribución de longitudes de lectura de todos los amplicones. La longitud media fue de 250 bp. Esta longitud es suficiente para que se superpongan las lecturas directas en inversas, permitiendo la asignación inequívoca de las secuencias de cada exón, y en última instancia de cada alelo. El número de lecturas de cada exón por individuo se muestran en la figura 3.

Programa informático de genotipificación

Para facilitar la asignación de genotipos a partir de estos archivos de datos de secuencias complejos, se desarrolló un programa informático (Conexio, Genomics) que compara las lecturas de secuencia directas e inversas derivadas de cada exón con una base de datos HLA. La base de datos también contiene la secuencia de pseudogenes HLA y de genes relacionados, permitiendo el filtrado de las secuencias generadas a partir de pseudogenes o a partir de genes HLA de clase I no clásicos (por ejemplo, HLA-E, F, G, y H).

Se secuenciaron los 8 locus (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, DPA1, DPB1) de veinticuatro muestras de ADN derivadas de líneas celulares de las que se conoce el tipo de HLA en base a la tipificación de HLA por hibridación de sondas y la secuenciación según el método de Sanger. Con los amplicones generados por el par de cebadores DRB1 también se identificaron las secuencias del exón 2 de DRB3, DRB4 y DRB5. A continuación, se secuenciaron los mismos locus en un ciclo de 48 muestras (24 ADNs de líneas celulares y 24 ADNs extraídos de muestras sanguíneas) y se generaron las asignaciones de genotipo a partir de los datos de secuencias con el programa Conexio ATF. La concordancia entre las propuestas de genotipo del programa y los tipos HLA previamente determinados fue del 99,4%.

10 **Análisis de mezclas quiméricas (detección de variantes raras)**

El elevado número de lecturas de secuencias ($n = 300\text{--}350\text{K}$) generadas en un ciclo GSFLX típico hace posible la detección de secuencias variantes raras presentes en la muestra. Para estimar la sensibilidad para detectar dichas secuencias, se prepararon mezclas de productos de PCR de los exones 2 y 3 de HLA-A y HLA-B y del exón 2 de DRB de dos muestras homocigotas para HLA en varias proporciones (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000). La variante rara presente en las mezclas 1/100 pudo detectarse de forma reproducible.

La sangre de algunos individuos es quimérica, con células maternas residuales en cantidades muy pequeñas en la circulación del niño o células fetales raras mantenidas en la circulación materna (ref.) Los pacientes con SCID retienen frecuentemente células maternas a muy bajas concentraciones. Cuando estos individuos son receptores de un trasplante de células madre hematopoyéticas, caracterizar el nivel de este quimerismo potencial es clínicamente importante. Para simular la situación de los pacientes con SCID, en la que puede haber células maternas en un niño, se prepararon mezclas de dos muestras heterocigotas, que compartían un alelo, en varias proporciones. En este experimento pudo detectarse la variante rara.

También se analizaron dos pacientes con SCID receptores de trasplantes HST, junto con sus padres. En ambos casos pudo detectarse la presencia de material alélico no transmitido.

La secuenciación clonal, el análisis de los amplicones generados a partir de moléculas individuales de ADN amplificadas a su vez de exones HLA permite la determinación inequívoca de la secuencia del exón y, mediante la comparación de estos archivos de secuencias con una base de secuencias HLA, la determinación de los dos alelos HLA. Las longitudes de lectura conseguidas con el sistema GSFLX (454 Life Sciences) (promedio = 250 bp) permite una superposición suficiente para esta determinación de cada exón. En los presentes ejemplos, la asignación de genotipos de cada locus basada en los archivos de datos de secuencias de exones se realizó mediante el programa (ATF) desarrollado por Conexio Genomics. Un aspecto importante de este programa es su capacidad para filtrar las lecturas de secuencias relacionadas (pseudogenes y otros genes HLA no deseados) que son amplificadas por los cebadores junto con la secuencia diana. El programa también filtra las lecturas de secuencias muy raras generadas por un error en la amplificación PCR inicial de la secuencia diana a partir del ADN genómico, errores en la PCR en emulsión o errores en la pirosecuenciación. Una categoría bien documentada de errores de la pirosecuenciación es en la determinación de la longitud de los homopolímeros. Por ejemplo, se han observado lecturas de secuencias raras que contenían un ciclo de Gs cuando la mayoría de lecturas de secuencias contienen el ciclo correcto de – Gs.

El coste de un solo ciclo GSFLX es considerable. Para hacer que este sistema sea rentable para el tipado HLA clínico de alta resolución, se analizan múltiples locus de múltiples muestras en un solo ciclo. La utilización de etiquetas MID y de múltiples regiones de la placa de picotitulación hace posible analizar 8 locus de 24 o 48 muestras, tal como se describe en estos ejemplos.

Es el gran número de lecturas de secuencias generado en paralelo lo que permite este análisis múltiple de múltiples locus de múltiples individuos. También proporciona la capacidad de detectar secuencias variantes raras. En mezclas de productos PCR de dos muestras diferentes de ADN genómico, se detectaron de forma fiable las secuencias de exones HLA presentes en una proporción 1/100. También pueden filtrarse las secuencias relacionadas pero no deseadas así como las secuencias raras que contienen errores. (La mayoría de alelos HLA difieren entre sí por múltiples polimorfismos mientras que las secuencias que contienen errores típicamente difieren de la secuencia correcta en un solo nucleótido.)

Exón 1-2 HLA-A directo	designación ADN	secuencia	SEQ ID NO:	n_mer
	PM1216TCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	3	46
	PM1216TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	4	46
	PM1216TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	5	46
	PM1216TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	6	46
	PM1216CAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	7	46
	PM1216CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	8	46
	PM1216CTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	9	46
	PM1216CTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	10	46
	PM1216ATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	11	46
	PM1216ATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	12	46
	PM1216ATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	13	46
	PM1216AGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCTCCCCAGACSCCGAGGATGGCC	14	46
	PM1219TCAT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	15	48
	PM1219TGAT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	16	48
Exón 1-2 HLA-A inverso	PM1219TGCT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	17	48
	PM1219TGCA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	18	48
	PM1219CAGA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	19	48
	PM1219CTCT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	20	48
	PM1219CTCA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	21	48
	PM1219CTGA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	22	48
	PM1219ATCA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	23	48
	PM1219ATCT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	24	48
	PM1219ATGA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	25	48
	PM1219AGCA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCATGGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	26	48
	PM1230TCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	27	43
	PM1230TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	28	43
	PM1230TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	29	43
	PM1230TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	30	43
	PM1230CAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	31	43
	PM1230CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	32	43
Exón 3 HLA-A directo	PM1230CTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	33	43
	PM1230CTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	34	43
	PM1230ATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	35	43
	PM1230ATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	36	43
	PM1230ATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGACTGGGCTGACCGTGGGGT	37	43

Exón 3 HLA-A inverso	PM1230AGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCAGACTGGGCTGACCGTGGGGT	SEQ ID NO: 38	43
	PS102TCAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 39	45
	PS102TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 40	45
	PS102TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 41	45
	PS102TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 42	45
	PS102CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 43	45
	PS102CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 44	45
	PS102CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 45	45
	PS102CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 46	45
	PS102ATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 47	45
	PS102ATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 48	45
	PS102ATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 49	45
	PS102AGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCCCTGGTACCCVGTGGCTGCA	SEQ ID NO: 50	45
	PB1001TCTC	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 51	53
	PB1001TCTG	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 52	53
Exón 4 HLA-A directo	PB1001TGAG	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 53	53
	PB1001TGCA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 54	53
	PB1001CAGA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 55	53
	PB1001CATG	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 56	53
	PB1001CTCA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 57	53
	PB1001CTGA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 58	53
	PB1001ATCA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 59	53
	PB1001CTGC	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 60	53
	PB1001ATGA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 61	53
	PB1001AGCA	GCCTCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCCCTGAATGWTCTGACTCTTCCCGTMAGA	SEQ ID NO: 62	53
	PM1226TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 63	47
	PM1226TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 64	47
	PM1226TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 65	47
	PM1226TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 66	47
	PM1226TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 67	47
	PM1226CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 68	47
Exón 4 HLA-A inverso	PM1226CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 69	47
	PM1226CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 70	47
	PM1226CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 71	47
	PM1226CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 72	47
	PM1226CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 73	47

Exón 4 HLA-A inverso	PM1226CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCTGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	SEQ ID NO: 74	47
	PM1228TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGTCGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 75	44
	PM1228TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 76	44
	PM1228TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGTGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 77	44
	PM1228TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGTCAGCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 78	44
	PM1228TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 79	44
	PM1228CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 80	44
	PM1228CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCTGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 81	44
	PM1228CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 82	44
	PM1228CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGTGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 83	44
	PM1228CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCATGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 84	44
	PM1228CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 85	44
	PM1228CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCTGACCCCTGCTAAAGGTCTCAGAG	SEQ ID NO: 86	44
	FJCC148TCAG	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTCAGAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 87	52
	FJCC148TCAT	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTCATAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 88	52
	FJCC148TCTC	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTCTCAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 89	52
	FJCC148TCTG	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTCTGAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 90	52
	FJCC148TGAT	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTATAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 91	52
	FJCC148TGAG	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTGAGAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 92	52
	FJCC148TGCT	GCCTCCCTCGGCCCATCAGTGCTAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 93	52
	FJCC148CAGC	GCCTCCCTCGGCCCATCAGCAGCAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 94	52
	FJCC148CATC	GCCTCCCTCGGCCCATCAGCATCAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 95	52
	FJCC148CATG	GCCTCCCTCGGCCCATCAGCATGAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 96	52
	FJCC148CTCT	GCCTCCCTCGGCCCATCAGCTCTAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 97	52
Exón 2 HLA-B inverso	FJCC148CTGC	GCCTCCCTCGGCCCATCAGCTGCAGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCCSCAG	SEQ ID NO: 98	52
	RRAP423TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGACTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 99	50
	RRAP423TCAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 100	50
	RRAP423TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCAGTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 101	50
	RRAP423TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGACTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 102	50
	RRAP423TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATCTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 103	50
	RRAP423TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGTCTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 104	50
	RRAP423TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTACTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 105	50
	RRAP423CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCAGTCTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 106	50
	RRAP423CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 107	50
	RRAP423CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGCTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 108	50
	RRAP423CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCTACTCGAGGCCCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 109	50

Exón 3 HLA-B directo	RRAP423CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCAGCTCGAGGGCTCGCTCTGGTTGTAGTA	SEQ ID NO: 110	50
	FJCC146TCAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 111	46
	FJCC146TCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 112	46
	FJCC146TCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 113	46
	FJCC146TCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 114	46
	FJCC146TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 115	46
	FJCC146TGAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 116	46
	FJCC146TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 117	46
	FJCC146CAGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 118	46
	FJCC146CATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 119	46
	FJCC146CATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 120	46
	FJCC146CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 121	46
	FJCC146CTGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGCAGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA	SEQ ID NO: 122	46
	RJCC149TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGACTCGAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 123	53
	RJCC149TCAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 124	53
	RJCC149TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCAGTCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 125	53
	RJCC149TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCAGTCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 126	53
	RJCC149TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 127	53
	RJCC149TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGACTCGAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 128	53
	RJCC149TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTACTCGAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 129	53
	RJCC149CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCAGCTCGAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 130	53
	RJCC149CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCAGTCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 131	53
	RJCC149CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGAGTCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 132	53
	RJCC149CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCTACTCGAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 133	53
	RJCC149CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCAGTCTCAGGGAGGCCATCCCGGCGACCTAT	SEQ ID NO: 134	53
Exón 4 HLA-B directo	FJCC126TCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 135	49
	FJCC126TCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 136	49
	FJCC126TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 137	49
	FJCC126TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 138	49
	FJCC126TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCAGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 139	49
	FJCC126CAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGAGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 140	49
	FJCC126CAGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 141	49
	FJCC126CATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 142	49
	FJCC126CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTCGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 143	49
	FJCC126CTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 144	49
	FJCC126CTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGAGCGCCCTGAATTTCTGACTCTTCCCA	SEQ ID NO: 145	49

Exón 3 HLA-B inverso

Exón 2 HLA-C inverso	RBA414AGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGATGAAAATGAAACCGGGTAAAGGYGA	SEQ ID NO: 182	47
	RDB1313TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 183	47
	RDB1313TCAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATATACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 184	47
	RDB1313CTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 185	47
	RDB1313CTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 186	47
	RDB1313TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 187	47
	RDB1313TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 188	47
	RDB1313TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 189	47
	RDB1313CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 190	47
	RDB1313CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 191	47
	RDB1313CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 192	47
	RDB1313CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 193	47
	RDB1313CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 194	47
Exón 3 HLA-C directo	FDB1180TCAG	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 195	47
	FDB1180TCAT	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 196	47
	FDB1180TCTC	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 197	47
	FDB1180TCTG	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 198	47
	FDB1180TGAT	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 199	47
	FDB1180TGAG	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 200	47
	FDB1180TGCT	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 201	47
	FDB1180CAGC	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 202	47
	FDB1180CATC	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 203	47
	FDB1180CATG	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 204	47
	FDB1180CTCT	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 205	47
	FDB1180CTGC	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 206	47
Exón 3 HLA-C inverso	RDB1053TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 207	49
	RDB1053TCAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 208	49
	RDB1053CTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 209	49
	RDB1053TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 210	49
	RDB1053TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 211	49
	RDB1053TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 212	49
	RDB1053CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 213	49
	RDB1053CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 214	49
	RDB1053ATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 215	49
	RDB1053ATGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 216	49
	RDB1053AGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTCGAGGGGCGYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 217	49

Exón 4 HLA-C directo	RDB1053AGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGATACCTCGAGGTCAGCAGCCTGACCACA	SEQ ID NO: 218	49
	FBNH277TCAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 219	52
	FBNH277TCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 220	52
	FBNH277TCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 221	52
	FBNH277TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 222	52
	FBNH277TGAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAGCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 223	52
	FBNH277TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 224	52
	FBNH277CATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 225	52
	FBNH277CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 226	52
	FBNH277ATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCTCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 227	52
	FBNH277AGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 228	52
	FBNH277AGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCTCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 229	52
	FBNH277AGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAAAGTGCTGAATTTCTGACTCTTCCC	SEQ ID NO: 230	52
	RBNH287TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 231	44
	RBNH287TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 232	44
	RBNH287TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 233	44
	RBNH287TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 234	44
	RBNH287TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCATGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 235	44
	RBNH287CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGATGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 236	44
	RBNH287CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 237	44
	RBNH287CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 238	44
	RBNH287CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 239	44
	RBNH287CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCATGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 240	44
	RBNH287CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGATGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 241	44
	RBNH287CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCTGAAGGGCTCCAGAAGGACTT	SEQ ID NO: 242	44
Exón 4 HLA-C inverso	RBNH288TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 243	41
	RBNH288TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 244	41
	RBNH288TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 245	41
	RBNH288TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 246	41
	RBNH288TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 247	41
	RBNH288CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGATGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 248	41
	RBNH288CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 249	41
	RBNH288CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 250	41
	RBNH288CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 251	41
	RBNH288CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCATGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 252	41
	RBNH288CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGATGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 253	41

Exón 2 DQB1 directo	RBNH288CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCTGAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 254	41
	FBA400TCAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 255	52
	FBA400TCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 256	52
	FBA400TCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 257	52
	FBA400TGAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 258	52
	FBA400CAGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 259	52
	FBA400CATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 260	52
	FBA400CATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 261	52
	FBA400CTGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGCAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 262	52
	FBA400ATGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 263	52
	FBA400AGAC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 264	52
	FBA400CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 265	52
	FBA400ATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCTAGGATCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 266	52
	RDB380TCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 267	52
	RDB380TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 268	52
	RDB380TCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 269	52
	RDB380TGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 270	52
	RDB380CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 271	52
	RDB380CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 272	52
	RDB380CATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 273	52
	RDB380CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 274	52
Exón 3 DQB1 directo	RDB380ATGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGCTCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 275	52
	RDB380AGAC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACTCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 276	52
	RDB380CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCATCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 277	52
	RDB380ATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGATCTCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 278	52
	FBNH86TCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 279	46
	FBNH86TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCATGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 280	46
	FBNH86CAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGATGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 281	46
	FBNH86CAGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCTGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 282	46
	FBNH86CATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCTGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 283	46
	FBNH86CTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCATGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 284	46
	FBNH86CTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGATGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 285	46
	FBNH86CTGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGCTGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 286	46
	FBNH86ATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCATGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 287	46
	FBNH86ATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGATGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 288	46
	FBNH86ATGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTGGAGCCCAACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 289	46

Exón 3 DQB1 inverso	FBNH86AGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCATGGAGCCACAGTGACCATCTCC	SEQ ID NO: 290	46
	RBA411TCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 291	44
	RBA411TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 292	44
	RBA411CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 293	44
	RBA411CAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 294	44
	RBA411CATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 295	44
	RBA411CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 296	44
	RBA411CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 297	44
	RBA411CTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGCGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 298	44
	RBA411ATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 299	44
	RBA411ATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 300	44
	RBA411ATGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGCGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 301	44
	RBA411AGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCAGCTGGGTGCTCCACGTGGCA	SEQ ID NO: 302	44
Exón 2 DPA1 directo	FPM058BTCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 303	47
	FPM058BTGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATCGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 304	47
	FPM058BTGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTCGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 305	47
	FPM058BTGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGACGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 306	47
	FPM058BCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGACGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 307	47
	FPM058BCTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTCGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 308	47
	FPM058BCTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 309	47
	FPM058BCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGACGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 310	47
	FPM058BATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 311	47
	FPM058BATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCTCGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 312	47
	FPM058BATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGACGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 313	47
	FPM058BAGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCAGGATCCATGTGTCAACTTATGCC	SEQ ID NO: 314	47
Exón 2 DPA1 inverso	RPM059BTCAT	GCCTGCCAGCCCGCTCAGTCCATGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 315	50
	RPM059BTGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 316	50
	RPM059BTGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 317	50
	RPM059BTGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 318	50
	RPM059BCAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 319	50
	RPM059BCTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCTGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 320	50
	RPM059BCTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 321	50
	RPM059BCTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 322	50
	RPM059BATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 323	50
	RPM059BATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCTGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 324	50
	RPM059BATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 325	50

Exón 2 DPB1 directo	RPM059BAGCA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGAGCAGGCTACAGAGGAAGAGGCAAGATAGG	SEQ ID NO: 326	50
	FUG19BTGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 327	51
	FUG19BTGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 328	51
	FUG19BTGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 329	51
	FUG19BCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 330	51
	FUG19BCTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 331	51
	FUG19BCTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 332	51
	FUG19BCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 333	51
	FUG19BATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 334	51
	FUG19BATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 335	51
	FUG19BATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 336	51
	FUG19BAGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCAGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 337	51
	FUG19BAGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCTGCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT	SEQ ID NO: 338	51
	RUG1BTGAT	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGTGATCGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 339	48
	RUG1BTGCT	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGTGCACGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 340	48
	RUG1BTGCA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGTGCACGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 341	48
	RUG1BCAGA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGCAGACGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 342	48
	RUG1BCTCT	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGCTCTGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 343	48
	RUG1BCTCA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGCTCAGCTCAGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 344	48
	RUG1BCTGA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGCTCAGCTCAGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 345	48
	RUG1BATCA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGATCAGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 346	48
	RUG1BATCT	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGATCTGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 347	48
	RUG1BATGA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGATGACGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 348	48
	RUG1BAGCA	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGAGCAGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 349	48
	RUG1BAGCT	GCCTTGCCAGCCCCGCTCAGAGCTGGATCCGGCCCAAGGCCCTCACTC	SEQ ID NO: 350	48
Exón 2 DQA1 directo	FPM066BTGAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 351	52
	FPM066BTGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCTGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 352	52
	FPM066BTGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 353	52
	FPM066BCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCIGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 354	52
	FPM066BCATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 355	52
	FPM066BCTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 356	52
	FPM066BCTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 357	52
	FPM066BCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 358	52
	FPM066BATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGCGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 359	52
	FPM066BATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 360	52
	FPM066BATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCTGTTCTTCCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 361	52

Exón 2 DQA1 inverso	FPM068BAGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCGGTTCTTCCATCATTTTGTGATTAAGGT	SEQ ID NO: 362	52
	RRR060BTGAG2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 363	43
	RRR060BTGCT2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 364	43
	RRR060BTGCA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGACCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 365	43
	RRR060BCAGA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 366	43
	RRR060BCATG2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 367	43
	RRR060BCTCT2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCTCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 368	43
	RRR060BCTCA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 369	43
	RRR060BCTGA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 370	43
	RRR060BATCA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 371	43
	RRR060BATCT2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCTCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 372	43
	RRR060BATGA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 373	43
	RRR060BAGCA2	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 374	43
	F5AIN1.46TCAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 375	49
	F5AIN1.46TGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGATGAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 376	49
	F5AIN1.46TGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGCTGAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 377	49
	F5AIN1.46TGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGCAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 378	49
	F5AIN1.46CAGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGCAGAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 379	49
	F5AIN1.46CTCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGCTTGAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 380	49
	F5AIN1.46CTCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGCTCAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 381	49
	F5AIN1.46CTGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 382	49
	F5AIN1.46ATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGATCAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 383	49
	F5AIN1.46ATCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGATCTGAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 384	49
	F5AIN1.46ATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGATGAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 385	49
	F5AIN1.46AGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGAGCAGAAACGGCCTCTGTGGGAGAGCAA	SEQ ID NO: 386	49
Exón 2 HLA-A directo se empareja con el exón 2 HLA-C inverso (PM1219)	FDB1215TCAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCAGTACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 387	47
	FDB1215TCTC	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCTCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 388	47
	FDB1215TGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGATAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 389	47
	FDB1215TGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 390	47
	FDB1215CAGC	GCCTCCCTCGGCCATCAGCAGCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 391	47
	FDB1215CATC	GCCTCCCTCGGCCATCAGCATCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 392	47
	FDB1215CTCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGCTCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 393	47
	FDB1215CTGC	GCCTCCCTCGGCCATCAGCTGCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 394	47
	FDB1215ATCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGATCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 395	47
	FDB1215ATGC	GCCTCCCTCGGCCATCAGATGCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 396	47
	FDB1215AGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGAGCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 397	47
Exón 2 HLA-C directo se empareja con el exón 2 HLA-A inverso (DB1313)	FDB1215TCAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCAGTACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 387	47
	FDB1215TCTC	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCTCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 388	47
	FDB1215TGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGATAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 389	47
	FDB1215TGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTGCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 390	47
	FDB1215CAGC	GCCTCCCTCGGCCATCAGCAGCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 391	47
	FDB1215CATC	GCCTCCCTCGGCCATCAGCATCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 392	47
	FDB1215CTCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGCTCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 393	47
	FDB1215CTGC	GCCTCCCTCGGCCATCAGCTGCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 394	47
	FDB1215ATCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGATCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 395	47
	FDB1215ATGC	GCCTCCCTCGGCCATCAGATGCAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 396	47
	FDB1215AGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAGAGCTAGTCGACGAADCGGCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 397	47

Exón 2 DRB1 directo	FDB1215AGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGATAGTCGACGAADCGGCCCTCTGSGGA	SEQ ID NO: 398	47
	FCRX28TCAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 399	50
	FCRX28TCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 400	50
	FCRX28TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTATCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 401	50
	FCRX28TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 402	50
	FCRX28CAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGACCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 403	50
	FCRX28CATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 404	50
	FCRX28CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 405	50
	FCRX28CTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTACCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 406	50
	FCRX28ATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCACCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 407	50
	FCRX28ATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGACCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 408	50
	FCRX28AGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 409	50
	FCRX28AGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGATCCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	SEQ ID NO: 410	50
	Exón 2 DRB1 inverso	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTCAGCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 411	51
	RAB60TCAG	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 412	51
	RAB60TCTG	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 413	51
	RAB60TGAT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 414	51
	RAB60TGCT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 415	51
	RAB60CAGA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 416	51
	RAB60CATG	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 417	51
	RAB60CTCT	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 418	51
	RAB60CTGA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 419	51
	RAB60ATCA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 420	51
	RAB60ATGA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGTGTCCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 421	51
	RAB60AGCA	GCCTTGGCAGCCCGCTCAGAGCACCGAATCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	SEQ ID NO: 422	51
	RAB60AGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 423	47
Exón 2 DPA1 inverso pares con exón 2 DPA1 inverso (PM159B)	FDPA1E2_TCAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 424	47
	FDPA1E2_TCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 425	47
	FDPA1E2_TCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 426	47
	FDPA1E2_TCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 427	47
	FDPA1E2_TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 428	47
	FDPA1E2_TGAG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 429	47
	FDPA1E2_TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 430	47
	FDPA1E2_CAGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 431	47
	FDPA1E2_CATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 432	47
	FDPA1E2_CATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 433	47
	FDPA1E2_CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTATGTTTGAATTTGATGAAGATGAG		

Exón 2 DQA1 directo	FDPA1E2_CTGC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGCATGTTGAATTTGATGAAGATGAG	SEQ ID NO: 434	47
	FPM12408TCAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 435	52
	FPM12408TGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 436	52
	FPM12408TGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 437	52
	FPM12408CTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCTGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 438	52
	FPM12408CTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 439	52
	FPM12408ATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 440	52
	FPM12408ATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATCTGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 441	52
	FPM12408TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCGAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 442	52
	FPM12408CAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 443	52
	FPM12408CTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 444	52
	FPM12408ATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGATGAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 445	52
	FPM12408AGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCAGTTCTTCATCATTTTGTGTTAAGGT	SEQ ID NO: 446	52
Exón 2 DQA1 inverso	RRR0608TCAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 447	43
	RRR0608TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 448	43
	RRR0608TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCCTCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 449	43
	RRR0608CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCCTCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 450	43
	RRR0608CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCAGCTCAGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 451	43
	RRR0608ATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 452	43
	RRR0608ATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCTCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 453	43
	RRR0608TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 454	43
	RRR0608CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 455	43
	RRR0608CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 456	43
	RRR0608ATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGACGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 457	43
	RRR0608AGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCAGGTAGAGTTGTAGCGTTTA	SEQ ID NO: 458	43
	RHLACE3TGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATCTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 459	43
	RHLACE3TGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTCTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 460	43
	RHLACE3TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 461	43
Exón 3 HLA-C cebador inverso para la reamplificación de los amplicones DB1180, DB1053	RHLACE3CAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 462	43
	RHLACE3CTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCTCTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 463	43
	RHLACE3CTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 464	43
	RHLACE3CTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 465	43
	RHLACE3ATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 466	43
	RHLACE3ATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCTCTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 467	43
	RHLACE3ATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 468	43
	RHLACE3AGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 469	43

Exón 2, 3, 4 HLA-A segundos cebadores con MIDs de 5 bases	RHLACE3AGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCTCTCCCACTGCCCCCTGGTAC	SEQ ID NO: 470	43
	FPM1231TCAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 471	51
	FPM1231TCATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 472	51
	FPM1231TCTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 473	51
	FPM1231TCTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 474	51
	FPM1231TGATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 475	51
	FPM1231TGAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 476	51
	FPM1231TGCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTCGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 477	51
	FPM1231TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCAATGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 478	51
	FPM1231CAGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGATGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 479	51
	FPM1231CAGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 480	51
	FPM1231CATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 481	51
	FPM1231CATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGAGGGAACGGCCTCTGTGGGAGAAGCA	SEQ ID NO: 482	51
	FPM1229TCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 483	44
	FPM1229TCATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 484	44
	FPM1229TCTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 485	44
	FPM1229TCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 486	44
	FPM1229TGATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATCGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 487	44
	FPM1229TGAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAGAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 488	44
	FPM1229TGCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 489	44
	FPM1229TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 490	44
	FPM1229CAGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGATGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 491	44
	FPM1229CAGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 492	44
	FPM1229CATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 493	44
	FPM1229CATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGAGACTGGGCTGACCKYGGGGT	SEQ ID NO: 494	44
	RPB1003TCAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 495	52
	RPB1003TCATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATCAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 496	52
	RPB1003TCTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 497	52
	RPB1003TCTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 498	52
	RPB1003TGATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATCGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 499	52
	RPB1003TGAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 500	52
	RPB1003TGCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTCGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 501	52
	RPB1003TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCAATGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 502	52
	RPB1003CAGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGATGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 503	52
	RPB1003CAGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 504	52
	RPB1003CATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCAGAGGGTGATATTCTAGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 505	52

RPM103CATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGAGAGGGTGATATCTAGTGTGGTCCCAA	SEQ ID NO: 506	52
FPM1252TCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGACTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 507	49
FPM1252TCATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 508	49
FPM1252TCTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 509	49
FPM1252TCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGACTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 510	49
FPM1252TGATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 511	49
FPM1252TGAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGACTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 512	49
FPM1252TGCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 513	49
FPM1252TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 514	49
FPM1252CAGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGATCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 515	49
FPM1252CAGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCTCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 516	49
FPM1252CATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCTCTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 517	49
FPM1252CATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGACTGGGTTCTGTGCTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO: 518	49
RPM1248TCAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGACTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 519	50
RPM1248TCATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 520	50
RPM1248TCTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 521	50
RPM1248TCTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGACTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 522	50
RPM1248TGATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 523	50
RPM1248TGAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGACTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 524	50
RPM1248TGCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGCTGCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 525	50
RPM1248TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGCTGCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 526	50
RPM1248CAGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGATCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 527	50
RPM1248CAGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCTCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 528	50
RPM1248CATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTCTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 529	50
RPM1248CATGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGACTCCAGAGAGGCTCCTGCTTCCSTA	SEQ ID NO: 530	50
FCM141TCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGACTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 531	43
FCM141TCATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 532	43
FCM141TCTCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTGCTGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 533	43
FCM141TCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGACTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 534	43
FCM141TGATG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATGCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 535	43
FCM141TGAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAGACTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 536	43
FCM141TGCTG	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 537	43
FCM141TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 538	43
FCM141CAGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGATCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 539	43
FCM141CAGCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCTCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 540	43
FCM141CATCT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCTCTGGTCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 541	43

Exón 4 HLA-B
segundos cebadores con MIDs de 5 bases

FCM141CATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGACTGGTCCACATGGGTGGTCC	SEQ ID NO: 542	43
RCM142TCAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 543	43
RCM142TCATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 544	43
RCM142TCTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCTAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 545	43
RCM142TCTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCGACATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 546	43
RCM142TGATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 547	43
RCM142TGAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 548	43
RCM142TGCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 549	43
RCM142TGCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 550	43
RCM142CAGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 551	43
RCM142CAGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 552	43
RCM142CATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 553	43
RCM142CATGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGTCAGATATGACCCCTCATCCC	SEQ ID NO: 554	43
FBA765TCAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGAGTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 555	49
FBA765TCATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 556	49
FBA765TCTCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 557	49
FBA765TCTGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 558	49
FBA765TGATC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 559	49
FBA765TGAGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 560	49
FBA765TGCTC	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 561	49
FBA765TGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 562	49
FBA765CAGAT	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 563	49
FBA765CAGCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 564	49
FBA765CATCA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 565	49
FBA765CATGA	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGTCTGTGCGAAGAGAGATGCAAAAGTGT	SEQ ID NO: 566	49
RBA767TCAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 567	43
RBA767TCATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 568	43
RBA767TCTCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 569	43
RBA767TCTGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 570	43
RBA767TGATC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 571	43
RBA767TGAGA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 572	43
RBA767TGCTC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 573	43
RBA767TGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 574	43
RBA767CAGAT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 575	43
RBA767CAGCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 576	43
RBA767CATCA	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 577	43

Exón 4 HLA-C
segundos cebadores con MIDs de 5 bases

Exón 3 DQB1 segundos cebadores con MIDs de 5 bases	RBA767CATGA	GCC TTGCCAGCCCGCTCAGCATGAGAGGGGAAGGTGAGGGGCC	SEQ ID NO: 578	43
	RBA762TCAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGCAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 579	51
	RBA762TCATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCATGAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 580	51
	RBA762TCTCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 581	51
	RBA762TCTGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGCAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 582	51
	RBA762TGATG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 583	51
	RBA762TGAGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAGCAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 584	51
	RBA762TGCTG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCTGAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 585	51
	RBA762TGCAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCAGAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 586	51
	RBA762CAGAG	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGAGAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 587	51
	RBA762CAGCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGCTAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 588	51
	RBA762CATCT	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATCTAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 589	51
	RBA762CATGC	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATGCAGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA	SEQ ID NO: 590	51

Tabla 2

CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2
JWS	DRB1	0103	03	FH6	DRB1	190101	1001	E4181324	DRB1	150301	150301	H3001	DRB1	1302	1302
JWS	DRB3	0101	0101	FH6	DRB5	0102	02	E4181324	DRB5	0102	0102	H3001	DOA1	0102 (1.2)	0102 (1.2)
JWS	DOA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)	FH6	DOA1	0101 (1.1)	0102 (1.2)	E4181324	DOA1	0103 (1.3)	0103 (1.3)	H3001	DOB1	0609	0609
JWS	DOB1	020102	0601	FH6	DOB1	0501	0502	E4181324	DOB1	060101	060101	H3001	OPA1	020101	020101
JWS	OPA1	010301	020102	FH6	OPA1	010301	010301	E4181324	OPA1	010301	010301	H3001	OPB1	0301	0301
JWS	OPB1	010101	020102	FH6	OPB1	020102	0401	E4181324	OPB1	020102	0401	H3001	HLA-A	0301	0301
JWS	HLA-A	0101	0201	FH6	HLA-A	24	2301	E4181324	HLA-A	0101	0101	H3001	HLA-B	0102	0102
JWS	HLA-B	030104	0101	FH6	HLA-B	02056	0202	E4181324	HLA-B	020101	020101	H3001	HLA-C	0602	0602
JWS	HLA-C	05	07					E4181324	HLA-C	1202	1202				
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2
RAJ	DRB1	0301	100101	JY	DRB3	0101	0	SAVC	DRB1	0401	0401	OOS	DOA1	0101 (1.1)	0101 (1.1)
RAJ	DRB3	02	02	JY	DRB4	01	0	SAVC	DRB4	0101	0101	OOS	DOB1	0601	0601
RAJ	DOA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)	JY	DOA1	0103 (1.3)	0301 (3)	SAVC	DOA1	0301 (3)	0301 (3)	OOS	OPA1	010301	010301
RAJ	DOB1	030102	0601	JY	DOB1	0302	0603	SAVC	DOB1	0302	0302	OOS	OPB1	020102	020102
RAJ	OPA1	020102	020202	JY	OPA1	010301	010301	SAVC	OPA1	020101	020101	OOS	HLA-A	0601	0601/11H
RAJ	OPB1	010101	010101	JY	OPB1	020102	0401	SAVC	OPB1	0101	0101	OOS	HLA-B	0601	0601
RAJ	HLA-A	03	03	JY	HLA-A	020101	020101	SAVC	HLA-A	0301	0301	OOS	HLA-C	0102	0102
RAJ	HLA-B	0510	0510	JY	HLA-B	070201	070201	SAVC	HLA-B	0702	0702				
RAJ	HLA-C	030102	04	JY	HLA-C	0702	0702	SAVC	HLA-C	0702	0702				
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2
NAMALWA	DRB1	0405	1503	Z222	DRB1	010201	1001	LADA	DRB1	060102	110106	SSTO	DRB1	0403	0403
NAMALWA	DRB4	01	0	Z222	DOA1	0101 (1.1)	0101 (1.1)	LADA	DRB3	02	0	SSTO	DOA1	0301 (2)	0301 (2)
NAMALWA	DRB5	0101	0	Z222	DOB1	0501	0501	LADA	DRB4	0102	0	SSTO	DOB1	0305	0305
NAMALWA	DOA1	0102 (1.2)	0301 (3)	Z222	OPA1	010301	010301	LADA	DOA1	0101 (1.1)	0301 (3)	SSTO	OPA1	010301	010301
NAMALWA	DOB1	0302	0602	Z222	OPB1	020102	0101	LADA	DOB1	020102	0601	SSTO	OPB1	0401	0401
NAMALWA	OPA1	010301	020202	Z222	HLA-A	2302	3002	LADA	OPA1	010301	020101	SSTO	HLA-A	0201	0201
NAMALWA	OPB1	0201	0201	Z222	HLA-B	5702	0701/2	LADA	OPB1	0301	0701	SSTO	HLA-B	0402	0402
NAMALWA	HLA-A	03	0602	Z222	HLA-C	1601	1801/2	LADA	HLA-A	0201	0601	SSTO	HLA-C	0501	0501
NAMALWA	HLA-B	0702	0401					LADA	HLA-B	0702	0702				
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2
NAMALWA	HLA-C	0701/6	0702/3	UH	DRB1	0301	0404	LADA	HLA-C	0702/3	0802	BM40/BN40	DRB1	0404	0404
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	UH	DRB3	01	0	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	BM40/BN40	DRB4	0102	0102
APA	DRB1	1405	150101/102	UH	DRB4	01	0	DBUG	DRB1	0701	1105	BM40/BN40	DOA1	0301 (3)	0301 (3)
APA	DRB3	02/0302	0	UH	DOA1	0301 (3)	0501 (4.1)	DBUG	DRB3	0202	0	BM40/BN40	DOB1	0302	0302
APA	DRB5	01	0	UH	DOB1	0201	0402	DBUG	DRB4	0101	0	BM40/BN40	OPA1	010301	010301
APA	DOA1	0101 (1.1)	0102 (1.2)	UH	OPA1	020101	020102	DBUG	DOA1	0101 (1.1)	0201 (2)	BM40/BN40	OPB1	0301	0301
APA	DOB1	050301	0501	UH	OPB1	010101	0501	DBUG	DOB1	030302	0502	BM40/BN40	HLA-A	02	010102
APA	OPA1	020202	020202	UH	HLA-A	2402	2402	DBUG	OPA1	010301	020202	BM40/BN40	HLA-B	1401	1401
APA	OPB1	0501	0501	UH	HLA-B	0802	0701/6	DBUG	OPB1	040101	0501	BM40/BN40	HLA-C	03	0802
APA	HLA-A	2403	1101	UH	HLA-C	0102	0701/6	DBUG	HLA-A	1101	2501				
APA	HLA-B	1502	0502					DBUG	HLA-B	0705/6	05				
APA	HLA-C	05	1203/6	VOD	DRB1	0101	030101	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	VOD	DRB3	01	01	AMAVANAL	DRB1	1503	1503	APD	DRB1	1301	1301
MG	DRB1	0401/15	1001	VOD	DOA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)	AMAVANAL	DRB5	0101	0101	APD	DRB3	02	02
MG	DRB4	01	01	VOD	DOB1	030102	0501	AMAVANAL	DOA1	0102 (1.2)	0102 (1.2)	APD	DOA1	0103 (1.3)	0103 (1.3)
MG	DOA1	0101 (1.1)	0301 (3)	VOD	OPA1	010301	010301	AMAVANAL	DOB1	0602	0602	APD	DOB1	0603	0603
MG	DOB1	030202	0601	VOD	OPB1	020102	0401	AMAVANAL	OPA1	0101	0301	APD	OPA1	010301	010301
MG	OPA1	010301	010301	VOD	HLA-A	0101	0301	AMAVANAL	OPB1	0301	0301	APD	OPB1	0402	0402
MG	OPB1	0401	0601	VOD	HLA-B	0601	0601	AMAVANAL	HLA-A	0402	0402	APD	HLA-A	0301	0301
MG	HLA-A	0101	0201	VOD	HLA-C	0102	0701/05/15	AMAVANAL	HLA-B	0602	0602	APD	HLA-B	0401	0401
MG	HLA-B	05	0701					AMAVANAL	HLA-C	0301	0301	APD	HLA-C	0602	0602
MG	HLA-C	03	0602	AMALA	DRB1	1402	1402	CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	HAR	DRB1	0301	0301
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2	AMALA	DRB3	0101	0101	AMAVANAL	HLA-C	0401	0401	HAR	DRB3	0101	0101
TTL	DRB1	1301	1501	AMALA	DOA1	0501 (4.1)	0501 (4.1)	CRK	DRB1	0701	0701	HAR	DOA1	0501 (4.1)	0501 (4.1)
TTL	DOA1	0102 (1.2)	0103 (1.3)	AMALA	DOB1	0301	0301	CRK	DOA1	0201 (2)	0201 (2)	HAR	DOB1	0201	0201
TTL	DOB1	0602	0603	AMALA	OPA1	010301	010301	CRK	DOB1	0201	0201	HAR	OPA1	010301	010301
TTL	OPA1	010301	020101	AMALA	OPB1	0402	0402	CRK	OPA1	020101	020202	HAR	OPB1	040101	0401
TTL	OPB1	0201	0301	AMALA	HLA-A	021701	021701	CRK	OPB1	010101	010101	HAR	HLA-A	0101	0101
TTL	HLA-A	0102	0303	AMALA	HLA-B	1501	1501	CRK	HLA-A	2502/4	2502/4	HAR	HLA-B	0801	0801/5
TTL	HLA-B	01	0401	AMALA	HLA-C	0303	0303	CRK	HLA-B	0403	0403	HAR	HLA-C	0701/6	0701/6
TTL	HLA-C	0102	0302					CRK	HLA-C	1601	1601				

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar los genotipos HLA de los genes HLA A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1 de más de un individuo en paralelo, comprendiendo dicho método:

(a). en cada individuo, amplificar los exones de los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1 que comprenden sitios polimórficos para obtener amplicones HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de cada individuo, realizándose cada reacción de amplificación con un cebador directo y un cebador inverso para amplificar un exón de gen HLA, de forma que:

(i).el cebador directo comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia de hibridación a HLA, poseyendo dicha secuencia de hibridación a HLA una longitud entre 15 y 40 nucleótidos y siendo exacta o substancialmente complementaria a la secuencia al exón del gen HLA de interés; y

(ii).el cebador inverso comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3':

una secuencia adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia de hibridación a HLA, poseyendo dicha secuencia de hibridación a HLA una longitud entre 15 y 40 nucleótidos y siendo exacta o substancialmente complementaria a la secuencia al exón del gen HLA de interés;

(b). agrupar los amplicones HLA de más de un individuo y realizar una PCR en emulsión;

(c). determinar la secuencia de los amplicones HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de cada individuo utilizando una pirosecuenciación en paralelo; y

(d). asignar los alelos HLA de cada individuo comparando la secuencia de los amplicones HLA con secuencias HLA conocidas para determina qué alelos están presentes en el individuo.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que el cebador directo para obtener un amplicón HLA posee la secuencia de la región de unión a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

3. Método, según la reivindicación 2, en el que el cebador directo posee una secuencia de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

4. Método, según la reivindicación 1, en el que el cebador inverso para obtener un amplicón HLA posee la secuencia de la región de unión a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

5. Método, según la reivindicación 4, en el que el cebador inverso posee una secuencia de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

6. Método, según la reivindicación 1, en el que el cebador directo para obtener un amplicón HLA posee la secuencia de la región de unión a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1; y el cebador inverso para obtener un amplicón HLA posee la secuencia de la región de unión a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

7. Método, según la reivindicación 6, en el que el cebador directo posee la región adaptador de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1; y el cebador inverso posee la región adaptador de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

8. Método, según la reivindicación 1, en el que el cebador directo posee la etiqueta de identificación individual de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1, y el cebador inverso posee la etiqueta de identificación individual de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.

9. Método, según la reivindicación 1, en el que la PCR en emulsión se realiza asimétricamente.

10. Kit que comprende pares de cebadores para obtener amplicones HLA para determinar genotipos de los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, y DPB1 de más de un individuo en paralelo, en el que los pares de cebadores comprenden un cebador directo y un cebador inverso para amplificar un exón de gen HLA, en el que: (i) el cebador directo comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia de hibridación a HLA, poseyendo dicha secuencia de hibridación a HLA una longitud entre 15 y 40 nucleótidos y siendo exacta o substancialmente complementaria a la secuencia al exón del gen HLA de interés; y (ii) el cebador inverso comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3': una secuencia adaptador, una secuencia de identificación molecular, y una secuencia de hibridación a HLA, poseyendo dicha secuencia de hibridación a HLA una longitud entre 15 y

40 nucleótidos y siendo exacta o substancialmente complementaria a la secuencia al exón del gen HLA de interés.

- 5 **11.** Kit, según la reivindicación 10, en el que los pares de cebadores comprenden cebadores directos e inversos de los mostrados en la tabla 1.
- 10 **12.** Kit que comprende uno o más pares de cebadores, en el que cada par de cebadores comprende un cebador directo para obtener un amplicón HLA que posee la secuencia de unión a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1; y el cebador inverso para obtener un amplicón HLA que posee la secuencia de unión a HLA de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.
- 15 **13.** Kit, según la reivindicación 12, en el que el cebador directo posee una secuencia de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1; y el cebador inverso posee una secuencia de uno de los cebadores mostrados en la tabla 1.
- 14.** Kit, según la reivindicación 12, en el que el kit comprende quince pares de cebadores HLA, en el que los pares de cebadores amplifican el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-A, el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-B; el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-C, el exón 2 de DRB1, el exón 2 de DPB1, el exón 2 de DPA1, el exón 2 de DQA1; y el exón 2 y el exón 3 de DQB1.

Fig. 1

Cebador de fusión con etiquetas MID

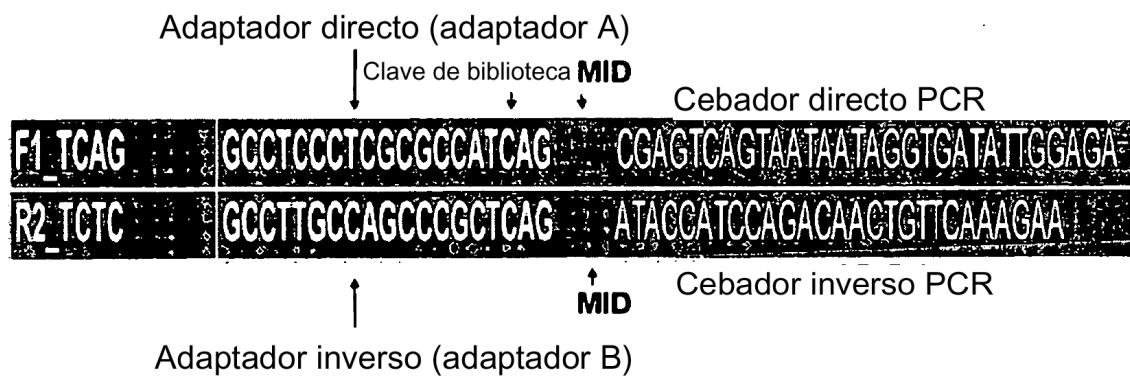
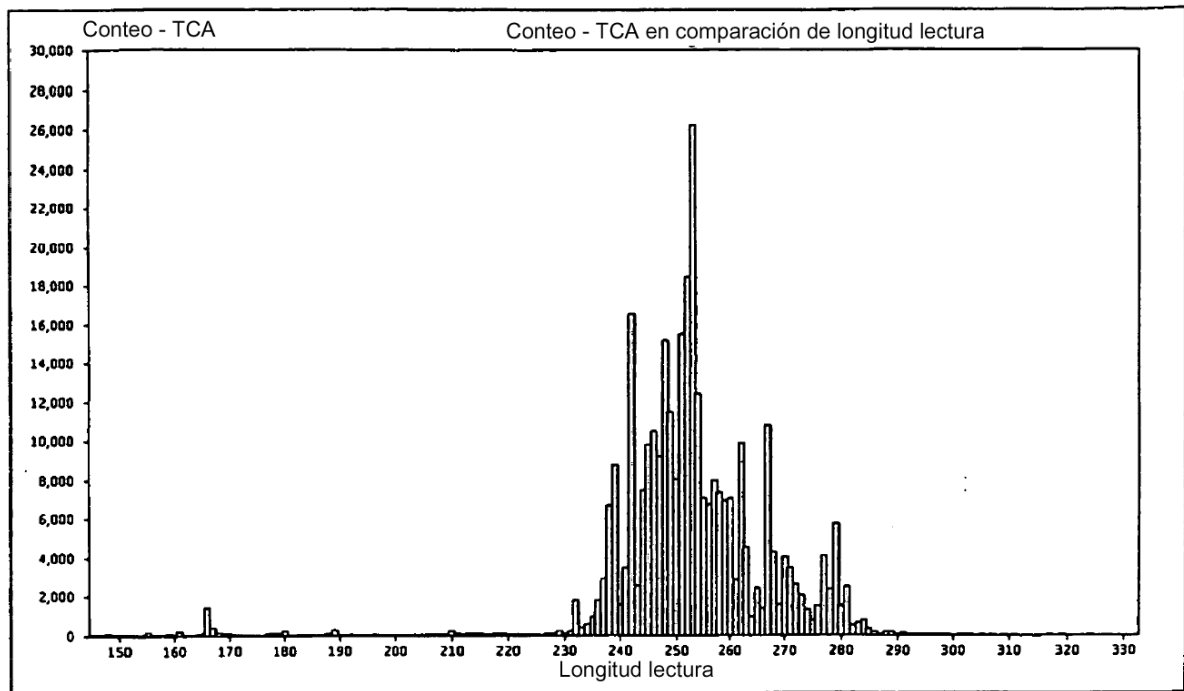


Fig. 2



33