



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

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2011

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

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

(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 INVENCIÓN

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, 10 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 15 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 20 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 25 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.

30 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 35 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

40 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:

45 (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:

50 (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
 55 (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;

60 (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

65 (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

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 35 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

40 45 La figura 1 es una descripción esquemática de un cebador de fusión directo e inverso de la presente invención.
50 La figura 2 es un histograma de la longitud de lectura.
55 La figura 3 muestra la profundidad de lectura del total de lecturas directas e inversas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

60 55 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.

65 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 distingue 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.

5 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.

10 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.

20 20 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.

25 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.

30 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.

40 40 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 oligodeoxirribonucleótido 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 características entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25, 30, 35 ó 40 nucleótidos de longitud.

50 50 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 características aproximadamente entre 15 y 30 nucleótidos de longitud.

55 55 Los términos “etiqueta de identificadora individual”, “código de barras”, “etiqueta de identificación”, “etiqueta de identificación múltiplex”, “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.

60 60 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 polideoxirribonucleótidos (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, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato puente, metileno fosfonato puente, fosforotioato, metilfosfonato, fósforoditioato, metilfosfonato, fósforoditioato puente, fósforotioato sulfona y combinaciones de los mismos.
- 5 Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede contener las cinco bases naturales (adenina, guanina, timina, cistosina 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 10 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, 15 dihidrouracilo, 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'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouracilo, queosina, 2 tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metilo del ácido uracilo-5-oxiacético, 20 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, 25 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.
- 25 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 30 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.
- 35 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

- 40 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 45 250 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.

50 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 55 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 químéricas, por ejemplo, la detección de alelos maternos no transmitidos raros presentes en la sangre de los pacientes con SCID (Inmunodeficiencia combinada severa).

60 Genes HLA

65 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 transplante) 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.

- 5 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.
- 10
- 15 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.
- 20

Cebadores de amplificación

- 25 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.
- 30
- 35 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.
- 40
- 45
- 50 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' GCCTTGCCAGCCCCGC 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.
- 55

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 múltiple 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).

5 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 10 reacciones múltiple que comprenden pares de cebadores para amplificar amplicones individuales.

PCR en emulsión

15 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.

20 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 25 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).

30 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 35 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).

40 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).

45 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 sulfurlasa y luciferasa (ver, por ejemplo, la patente USA nº 6258568).

55 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.

- 5 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.
- 10 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.

- 15 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.

- 20 25 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.

- 30 35 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**35 Pirosecuenciación multiplex**

- 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 40 454 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.

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

- 50 55 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

- 60 65 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 5 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 químéricas (detección de variantes raras)**
- El elevado número de lecturas de secuencias ($n = 300\text{-}350K$) 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 homozigotas para HLA en varias proporciones (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000). La variante rara 15 presente en las mezclas 1/100 pudo detectarse de forma reproducible.
- La sangre de algunos individuos es químérica, 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 20 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 heterozigotas, que compartían un alelo, en varias proporciones. En este 25 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.
- 30 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 35 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 amplificados 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 40 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.
- 45 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 múltiplex de 50 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.)

		SEQ ID NO: 38	43
		SEQ ID NO: 39	45
		SEQ ID NO: 40	45
		SEQ ID NO: 41	45
		SEQ ID NO: 42	45
		SEQ ID NO: 43	45
		SEQ ID NO: 44	45
		SEQ ID NO: 45	45
		SEQ ID NO: 46	45
		SEQ ID NO: 47	45
		SEQ ID NO: 48	45
		SEQ ID NO: 49	45
		SEQ ID NO: 50	45
		SEQ ID NO: 51	53
		SEQ ID NO: 52	53
		SEQ ID NO: 53	53
		SEQ ID NO: 54	53
		SEQ ID NO: 55	53
		SEQ ID NO: 56	53
		SEQ ID NO: 57	53
		SEQ ID NO: 58	53
		SEQ ID NO: 59	53
		SEQ ID NO: 60	53
		SEQ ID NO: 61	53
		SEQ ID NO: 62	53
		SEQ ID NO: 63	47
		SEQ ID NO: 64	47
		SEQ ID NO: 65	47
		SEQ ID NO: 66	47
		SEQ ID NO: 67	47
		SEQ ID NO: 68	47
		SEQ ID NO: 69	47
		SEQ ID NO: 70	47
		SEQ ID NO: 71	47
		SEQ ID NO: 72	47
		SEQ ID NO: 73	47
Exón 3 HLA-A inverso	PM1230AGCA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGAGCAGACTGGGTGACCGTGGGGT	
	PS102TCAT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCATCCCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102TGAT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTGATCCCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102TGCT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTGTCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102TGCA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102CAGA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCTCCCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102CTCT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCTCCCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102CTCA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCTACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102CTGA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCTACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102ATCA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGATCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102ATCT	GCCCTGCCAGCCCCATCAGTCAGATCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102ATGA	GCCCTGCCAGCCCCATCAGTCAGATCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PS102AGCA	GCCCTGCCAGCCCCATCAGAGCAGCCCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PB1001TCTC	GCCCTCCCTGGGCCATCAGTCAGTCAGTCAGTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001TCTG	GCCCTCCCTGGGCCATCAGTCAGTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001TGAG	GCCCTCCCTGGGCCATCAGTCAGTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001TGCA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGTCAGTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001CAGA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGCAGATGCCTGAATGWTCTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001CATG	GCCCTCCCTGGGCCATCAGCAGATGCCTGAATGWTCTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001CTCA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGCAGATGCCTGAATGWTCTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001CTGA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGCAGATGCCTGAATGWTCTGACTCTCCCGTMA	
	PB1001ATCA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGATCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PB1001CTGC	GCCCTCCCTGGGCCATCAGATCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PB1001ATGA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGATCACCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PB1001AGCA	GCCCTCCCTGGGCCATCAGAGCAGCCCCCTGGTACCVGTGGCTGCA	
	PM1226TCAG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGAG	
	PM1226TCTC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGAG	
	PM1226TCTG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGAG	
	PM1226TGAG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTGAGTGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226TGCA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGTGAGTGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226CAGA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226CAGC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226CATC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226CATG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226CTCA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
	PM1226CTGA	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAGCAGATGACCCCTGCTAAAGGTCTCCAGAG	
Exón 4 HLA-A directo			

		SEQ ID NO: 110
		SEQ ID NO: 111
		SEQ ID NO: 112
		SEQ ID NO: 113
		SEQ ID NO: 114
		SEQ ID NO: 115
		SEQ ID NO: 116
		SEQ ID NO: 117
		SEQ ID NO: 118
		SEQ ID NO: 119
		SEQ ID NO: 120
		SEQ ID NO: 121
		SEQ ID NO: 122
		SEQ ID NO: 123
		SEQ ID NO: 124
		SEQ ID NO: 125
		SEQ ID NO: 126
		SEQ ID NO: 127
		SEQ ID NO: 128
		SEQ ID NO: 129
		SEQ ID NO: 130
		SEQ ID NO: 131
		SEQ ID NO: 132
		SEQ ID NO: 133
		SEQ ID NO: 134
		SEQ ID NO: 135
		SEQ ID NO: 136
		SEQ ID NO: 137
		SEQ ID NO: 138
		SEQ ID NO: 139
		SEQ ID NO: 140
		SEQ ID NO: 141
		SEQ ID NO: 142
		SEQ ID NO: 143
		SEQ ID NO: 144
		SEQ ID NO: 145

49	GCCTCCCTCGGCCCATCAGCTGGGCCCTGAATTCTGACTCTCCCA	SEQ ID NO: 146
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCATGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 147
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 148
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 149
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 150
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 151
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 152
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 153
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 154
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 155
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 156
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 157
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 158
44	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 159
44	GCCTGCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 160
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 161
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 162
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 163
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 164
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 165
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 166
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 167
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 168
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 169
44	GCCTCCCTCGGCCATCAGTCATGGGGTCATGGGCCCCRA	SEQ ID NO: 170
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 171
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 172
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 173
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 174
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 175
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 176
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 177
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 178
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 179
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 180
47	GCCTGCCAGCCCCCTCAGTCAGTCGGCTCTGCTTCCCTGAGAA	SEQ ID NO: 181

RBA41AGAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGAGATGAAATGAAACCGGGTAAAGGYA	SEQ ID NO: 182
RDB1313TCAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGACTCAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 183
RDB1313TCAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 184
RDB1313TCCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 185
RDB1313CTG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 185
RDB1313TGAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 186
RDB1313TGAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTGAAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 187
RDB1313TGCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTGAAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 188
RDB1313CAGC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTGAAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 189
RDB1313CATC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTGAAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 190
RDB1313CATG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTGAAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 191
RDB1313CTCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGTGAAGACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 192
RDB1180TCAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 193
FDB1180TCAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 194
FDB1180TCTC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 195
FDB1180TCTG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 196
FDB1180TGAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 197
FDB1180TGAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 198
FDB1180TGCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 199
FDB1180TCAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 200
FDB1180CATC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 201
FDB1180CATG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 202
FDB1180CTCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 203
FDB1180CTGC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 204
RDB1053TCAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 205
RDB1053TCAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 206
RDB1053TCCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 207
RDB1053TGAT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 208
RDB1053TGAG	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 209
RDB1053TGCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 210
RDB1053CATC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 211
RDB1053CTCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 212
RDB1053ATCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 213
RDB1053ATGC	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 214
RDB1053AGCT	GCCTTGGCCAGCCCCGTCAGCTGCACTCGAGGGCYGGGTCACTCAC	SEQ ID NO: 215

RDB1053AGAT	GCCTGCCAGCCGCTCAGAGATACCTCGAGGTCAAGCCTGACTGACCACA	49	SEQ ID NO: 218
FBNH277TCAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 219
FBNH277TCAT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 220
FBNH277TCTG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 221
FBNH277GAT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 222
FBNH277TGAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 223
FBNH277TGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 224
FBNH277CATG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 225
FBNH277CTCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 226
FBNH277ATCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 227
FBNH277AGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 228
FBNH277AGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 229
FBNH277AGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCATCAAAGTGTCTGAATTCTGACTCTTCCC	52	SEQ ID NO: 230
RBNH287TCAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 231
RBNH287CTCTC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 232
RBNH287TCTG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 233
RBNH287TGAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 234
RBNH287TGCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 235
RBNH287CAGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 236
RBNH287CAGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 237
RBNH287CATC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 238
RBNH287CATG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 239
RBNH287CTCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 240
RBNH287CTGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 241
RBNH287CTGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGAAGGACTT	44	SEQ ID NO: 242
RBNH288TCAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 243
RBNH288CTCTC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 244
RBNH288TCTG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 245
RBNH288TGAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 246
RBNH288CATC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 247
RBNH288CAGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 248
RBNH288CAGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 249
RBNH288CATC	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 250
RBNH288CATG	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 251
RBNH288CTCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 252
RBNH288CTGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCACTCACTGCAAGGGCTCCAGGACTT	41	SEQ ID NO: 253

Exón 4 HLA-C directo

Exón 4 HLA-C inverso

Exón 4 HLA-C inverso

		41	SEQ ID NO: 254
	RBNH288CTGC	GCCTTGCAGCCCCGCTAGCTGTAAGGGCTCCAGGACTT	SEQ ID NO: 255
	FBA400TCAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGGATCCCCGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400TCTC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGGATCCCCGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400TCTG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400TGAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGATTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400CAGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400CATC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400CATG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400CTGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400ATGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400AGAC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400CTCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCTAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	FBA400ATCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCTAGGATCCCCGGAGGGATTTCGTGTACCA	SEQ ID NO: 52
	RDB380TCAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 263
	RDB380TCTC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 263
	RDB380TCTG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 263
	RDB380TGAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 263
	RDB380CAGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 264
	RDB380CATC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 264
	RDB380CATG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 264
	RDB380CTGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 264
	RDB380ATGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 264
	RDB380AGAC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 265
	RDB380CTCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 265
	RDB380ATGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 265
	FBNH86CTC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 266
	FBNH86TGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 266
	FBNH86CAGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 267
	FBNH86CAGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 268
	FBNH86CATC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 269
	FBNH86CTCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 270
	FBNH86CTGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 271
	FBNH86CTGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 272
	FBNH86ATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 273
	FBNH86ATGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 274
	FBNH86ATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 275
	FBNH86TGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 276
	FBNH86CAGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 277
	FBNH86CAGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 278
	FBNH86CATC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 279
	FBNH86CTCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 280
	FBNH86CTGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 281
	FBNH86CTGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 282
	FBNH86ATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 283
	FBNH86CTCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 284
	FBNH86CTGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 285
	FBNH86CTGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 286
	FBNH86ATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 287
	FBNH86ATGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 288
	FBNH86ATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGTCTGAGGACGGCTCACCTCTCCGCTGCA	SEQ ID NO: 289

		52		
Exón 2 DQA1 inverso	FPM066BAGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGATGGTTCTCCATCATTGTGATTAAAGT	SEQ ID NO:	362
	RRR080BTGAG2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGAGGGTAGAAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BTGCT2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGCTCGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BTGCA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGCACTGACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BCAGA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BCATG2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGCGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BCTC2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGCTCGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BCTCA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGCTACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BCTGA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGCTACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BATCA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGATACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BATC2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGATACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BATGA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGATACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	RRR080BAGCA2	GCCTTGCAGCCGCTCACTGAGACGGTAGAGTTGTACGGTTA	SEQ ID NO:	43
	F5AIN1.46TCAT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	375
	F5AIN1.46TGAT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	376
	F5AIN1.46TGCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	377
	F5AIN1.46TGCA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	378
	F5AIN1.46CAGA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	379
	F5AIN1.46CTCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	380
	F5AIN1.46CTCA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	381
	F5AIN1.46CTGA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	382
	F5AIN1.46ATCA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	383
	F5AIN1.46ATCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	384
	F5AIN1.46ATGA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	385
	F5AIN1.46AGCA	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	386
	FDB1215TCAT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	387
	FDB1215TCTC	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	388
	FDB1215TGAT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	389
	FDB1215TGCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	390
	FDB1215CAGC	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	391
	FDB1215CATC	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	392
	FDB1215CTCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	393
	FDB1215CTGC	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	394
	FDB1215ATCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	395
	FDB1215ATGC	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	396
	FDB1215AGCT	GCCTCCTCGGCCATCAGTCATGAAACGGCCCTCTGGGAGAACAA	SEQ ID NO:	397
Exón 2 HLA-A directo se empareja con el exón 1-2 HLA-A inverso (PM1219)				
Exón 2 HLA-C directo se empareja con el exón 2 HLA-C inverso (DB1313)				
		;		

		47	SEQ ID NO: 398
		50	SEQ ID NO: 399
		50	SEQ ID NO: 400
		50	SEQ ID NO: 401
		50	SEQ ID NO: 402
		50	SEQ ID NO: 403
		50	SEQ ID NO: 404
		50	SEQ ID NO: 405
		50	SEQ ID NO: 406
		50	SEQ ID NO: 407
		50	SEQ ID NO: 408
		50	SEQ ID NO: 409
		50	SEQ ID NO: 410
		51	SEQ ID NO: 411
		51	SEQ ID NO: 412
		51	SEQ ID NO: 413
		51	SEQ ID NO: 414
		51	SEQ ID NO: 415
		51	SEQ ID NO: 416
		51	SEQ ID NO: 417
		51	SEQ ID NO: 418
		51	SEQ ID NO: 419
		51	SEQ ID NO: 420
		51	SEQ ID NO: 421
		51	SEQ ID NO: 422
		47	SEQ ID NO: 423
		47	SEQ ID NO: 424
		47	SEQ ID NO: 425
		47	SEQ ID NO: 426
		47	SEQ ID NO: 427
		47	SEQ ID NO: 428
		47	SEQ ID NO: 429
		47	SEQ ID NO: 430
		47	SEQ ID NO: 431
		47	SEQ ID NO: 432
		47	SEQ ID NO: 433
		47	SEQ ID NO: 434
Exón 2 DRB1 directo			
FDB1215AGAT	GCCTCCCTGCCCATCAGAGATAGTCGACGAADCGGGCTCTGSGGA		
FCRX28TCAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTCAGCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28TCGT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28TGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGCTCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28TGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGCTCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28CAGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCATGCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28CATG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCATGCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28CTCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCTCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28CTGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGCTCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28ATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGATCACGGATCAGGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28ATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGAGACCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28AGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAAGAGATCCGGATCCTCTGTGCCCCCACAGCACG		
FCRX28AGAT	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60TCAG	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60TCTG	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60TGT	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60TGC	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60CAGA	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60CATG	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60CTCT	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60CTGA	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60ATCA	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60ATGA	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60AGCA	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
RAB60AGAT	GCCTGGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTCCGGATCAGCCGAATTGGAAAGCTCTC		
FDPA1E2_TCAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TCAT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TCTC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TCCTG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TGAG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TGCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_CAGC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_CATC	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_CATG	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
FDPA1E2_TCCT	GCCTCCCTCGGCCATCAAGTGATGTTGAATTGAAAGATGAG		
Exón 2 DRB1 inverso			
pares con exón 2 DP A1 inverso (PM159B)			

		47	SEQ ID NO: 434
		52	SEQ ID NO: 435
		52	SEQ ID NO: 436
		52	SEQ ID NO: 437
		52	SEQ ID NO: 438
		52	SEQ ID NO: 439
		52	SEQ ID NO: 440
		52	SEQ ID NO: 441
		52	SEQ ID NO: 442
		52	SEQ ID NO: 443
		52	SEQ ID NO: 444
		52	SEQ ID NO: 445
		52	SEQ ID NO: 446
		52	SEQ ID NO: 447
		43	SEQ ID NO: 448
		43	SEQ ID NO: 449
		43	SEQ ID NO: 450
		43	SEQ ID NO: 451
		43	SEQ ID NO: 452
		43	SEQ ID NO: 453
		43	SEQ ID NO: 454
		43	SEQ ID NO: 455
		43	SEQ ID NO: 456
		43	SEQ ID NO: 457
		43	SEQ ID NO: 458
		43	SEQ ID NO: 459
		43	SEQ ID NO: 460
		43	SEQ ID NO: 461
		43	SEQ ID NO: 462
		43	SEQ ID NO: 463
		43	SEQ ID NO: 464
		43	SEQ ID NO: 465
		43	SEQ ID NO: 466
		43	SEQ ID NO: 467
		43	SEQ ID NO: 468
		43	SEQ ID NO: 469
Exón 2 DQA1 directo	FDP1E2_CTGC	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTGAAGATGAG	
	FPM1240BTCA	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BTGAT	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BTGCT	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BCTCT	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BCTCA	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BATCA	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BATCT	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BTGCA	GCCTCCCTGGCCATCAGCTCATGTTCTTCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BCAGA	GCCTCCCTGGCCATCAGCAGAGTTCTYCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BCTGA	GCCTCCCTGGCCATCAGCTGAGTTCTYCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BATGA	GCCTCCCTGGCCATCAGATGAGTTCTYCATCATTTTGATTAAGGT	
	FPM1240BAGCA	GCCTCCCTGGCCATCAGAGCAGTTCTYCATCATTTTGATTAAGGT	
	RRR060BTCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BTGAT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BTGCT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BCTCT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BCTCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BATCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BATCT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BTGCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BCAGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BTGTA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BATGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RRR060BAGCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3TGA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3TGCT	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3TGCA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3CAGA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3CTCT	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3CTCA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3CTGA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3ATCA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3ATCT	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3ATGA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
	RHLACE3AGCA	GCCTTGGCCAGCCCCGCTCAGTCAGTGGTAGAGTTGAGCGTTA	
Exón 2 DQA1 inverso			
Exón 3 HLA-C			
cebador inverso para la reamplificación			
de los amplicones DB1180, DB1053			

RHLACE3AGCT	Exón 2, 3, 4 HLA-A	FPM1231TCAGA	GCCTTGCAGCCGGCTCAGAGCTCTCCCCACTGCCCTGGTAC	43	SEQ ID NO:	470
	Segundos cebadores con MIDs de 5 bases	FPM1231TCATC	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	471
		FPM1231TCATCA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	472
		FPM1231TCATGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	473
		FPM1231TGATC	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	474
		FPM1231TGAGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	475
		FPM1231TGCTC	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	476
		FPM1231TGAT	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	477
		FPM1231CATCA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	478
		FPM1231CATGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	479
		FPM1231CATGAGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	480
		FPM1231CATGCA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCATCGGAAACGGCCCTGTGGGAGAGCA	51	SEQ ID NO:	481
		FPM1229TCATC	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	482
		FPM1229TCATCA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	483
		FPM1229TCATGA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	484
		FPM1229TGATC	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	485
		FPM1229TGAGA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	486
		FPM1229TGCTC	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	487
		FPM1229TGAT	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	488
		FPM1229TGAGAT	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	489
		FPM1229CATCA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	490
		FPM1229CATGA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	491
		FPM1229CATGAGA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	492
		FPM1229CATGCA	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	493
		FPM1229CATGAT	GCCCTCCCTCGGGCCATCAGTCAGACTGGCTGACCKYGGGT	44	SEQ ID NO:	494
		RPB1003TCAGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	495
		RPB1003TCATC	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	496
		RPB1003TCATCA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	497
		RPB1003TCATGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	498
		RPB1003TGATC	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	499
		RPB1003TGAGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	500
		RPB1003TGCTC	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	501
		RPB1003TGAT	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	502
		RPB1003CATCA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	503
		RPB1003CATGAGA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	504
		RPB1003CATGCA	GCCCTTGCAGCCGGCTCAGTCAGAGGGTATTCAGTGTGGTCCC	52	SEQ ID NO:	505

		52	49
RPM1003CATGA	GCC TTGCCAGCCCCCTCAGGTGATGAGAGGGTGTATTCTAGTGTTGGTCCCAA	SEQ ID NO:	506
FPM1252TCAGA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	507
FPM1252TCATG	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252TCCT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252TCGTA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTGATGCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252TGATG	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTGATGCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252TGAGA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTGAGACTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252TGCTG	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTGCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252TGAT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTGCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252CAGAT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCAGATCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252CAGCT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCAGCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252CATCT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCATCTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1252CATGA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCATGACTGGGTTCTGTCYCTCCCCAT	SEQ ID NO:	49
FPM1248TCAGA	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTCAGACTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	519
FPM1248TCATG	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTCAGTCATGCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	520
FPM1248TCCT	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTCAGTCCTCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	521
FPM1248TCGTA	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTCAGTCCTGACTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	522
FPM1248TGATG	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTGATGCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	523
FPM1248TGAGA	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTGAGACTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	524
FPM1248TGCTG	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTGCTGCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	525
FPM1248TGAT	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGTGCTGATCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	526
FPM1248CAGAT	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGCAGATCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	527
FPM1248CAGCT	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGCAGCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	528
FPM1248CATCT	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGCATCTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	529
FPM1248CATGA	GCC TTGCCAGCCCCCTCAAGCATGACTCCAGAGGGCTCTGCTTTCCSTA	SEQ ID NO:	530
FPM1411TCAGA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	531
FPM1411TCATG	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411TCCT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411TCGTA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411TGATG	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411TGAGA	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411TGCTG	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411TGAT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGTCAGTCATGTCGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411CAGAT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCAGATCTGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411CAGCT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCAGCTGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43
FPM1411CATCT	GCC TCCCCTGGGCCATCAAGCATCTGGTCACATGGTGGTCC	SEQ ID NO:	43

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

		43	
		43	SEQ ID NO: 543
		43	SEQ ID NO: 544
		43	SEQ ID NO: 545
		43	SEQ ID NO: 546
		43	SEQ ID NO: 547
		43	SEQ ID NO: 548
		43	SEQ ID NO: 549
		43	SEQ ID NO: 550
		43	SEQ ID NO: 551
		43	SEQ ID NO: 552
		43	SEQ ID NO: 553
		43	SEQ ID NO: 554
		43	SEQ ID NO: 555
		49	SEQ ID NO: 556
		49	SEQ ID NO: 557
		49	SEQ ID NO: 558
		49	SEQ ID NO: 559
		49	SEQ ID NO: 560
		49	SEQ ID NO: 561
		49	SEQ ID NO: 562
		49	SEQ ID NO: 563
		49	SEQ ID NO: 564
		49	SEQ ID NO: 565
		49	SEQ ID NO: 566
		43	SEQ ID NO: 567
		43	SEQ ID NO: 568
		43	SEQ ID NO: 569
		43	SEQ ID NO: 570
		43	SEQ ID NO: 571
		43	SEQ ID NO: 572
		43	SEQ ID NO: 573
		43	SEQ ID NO: 574
		43	SEQ ID NO: 575
		43	SEQ ID NO: 576
		43	SEQ ID NO: 577
FCM141CATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGCATGACTGGTCACATGGTGGTCC		
RCM142TCAGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TCATG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TCCTCT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TCCTGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TGATG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TGAGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TGCTG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142TGCAAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142CAAGCT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142CATCT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142CATGC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGATAATGACCCCTCATCCC		
RCM142CAGAG	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGAGATAATGACCCCTCATCCC		
FBA765TCAGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGCTAGTCATCGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765TCATC	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGCTAGCATCTAGATATGACCCCTCATCCC		
FBA765TCATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGCTAGCATCTAGATATGACCCCTCATCCC		
FBA765TCATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGCTAGCATCTAGATATGACCCCTCATCCC		
FBA765TGATC	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGCTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765TGAGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765TGCTC	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765TGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765TGATC	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765TGATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765CAGAT	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765CAGCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765CATCA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
FBA765CATGA	GCCTCCCTCGGCCATCAGTAGCTAGTGTGCAAGAGATAAGTGT		
RBA767TCAGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TCATC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TCATCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TCATGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TGATC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TGAGA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TGCTC	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767TGAT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767CAGAT	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767CAGCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
RBA767CATCA	GCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTAGCAGAGGGAAAGTGAAGGGGCC		
	Exón 4 HLA-C		
segundos cebadores con MIDs de 5 bases			

RBA762CATGA	GCCTTGCAGCCCCGCTCAGCATGAGAGGGAAAGGTGAGGGCC	SEQ ID NO: 578
RBA762TCAGC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCATGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 579
RBA762TCATG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCATGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 580
RBA762TCTCT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCATGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 581
RBA762TCTGC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTCATGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 582
RBA762TGTG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 583
RBA762TGATG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTCAGTGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 584
RBA762TGAGC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTGAGCAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 585
RBA762TGCTG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTGCTGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 586
RBA762TGCAG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGTGAGGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 587
RBA762CAGAG	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGCAGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 588
RBA762CAGCT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGCAGCTAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 589
RBA762CATCT	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGCATCTAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 590
RBA762CATGC	GCCCTGCCAGCCCCGCTCAAGCATGCACTGAGTGACATCAGGATAAAGAGATGGAA	SEQ ID NO: 591

Exón 3 DQB1
segundos cebadores con MIDs de 5 bases

Tabla 2

CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
JWS	DRB1	1103	1102	FH6	DRB1	1101/10	1101	E41B1324	DRB1	1102/10	1102	H3001	DRB1	1102	1102	
JWS	DRB3	0101	0101	FH6	DRB5	0102	02	E41B1324	DRB5	0102	0102	H3001	DQA1	0102 (1.2)	0102 (1.2)	
JWS	DQA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)	FH6	DQA1	0101 (1.1)	0102 (1.2)	E41B1324	DQA1	0103 (1.3)	0103 (1.3)	H3001	DQB1	0502	0502	
JWS	DQB1	0201/2	0501	FH6	DQB1	0501	0202	E41B1324	DQB1	0501/10	0501/10	H3001	DPA1	0201/10	0201/10	
JWS	DPA1	0103/10	0201/2	FH6	DPA1	0103/10	0103/10	E41B1324	DPA1	0103/10	0103/10	H3001	DPB1	0501	0501	
JWS	DPB1	0101/10	0201/2	FH6	DPB1	0201/2	0101	E41B1324	DPB1	0201/2	0101	H3001	HLA-A	0101	0101	
JWS	HLA-A	0101	0201	FH6	HLA-A	0101	0201	E41B1324	HLA-A	0101	0101	H3001	HLA-B	1402	1402	
JWS	HLA-B	0001/4	18	FH6	HLA-B	0005	2102	E41B1324	HLA-B	0001/10	3201/10	H3001	HLA-C	0002	0002	
JWS	HLA-C	05	17	FH6	HLA-C	05	17	E41B1324	HLA-C	1202	1202	CatLineName	LocusName	Allele1	Allele2	
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
RAJ	DRB1	0001	1001		JY	DRB1	0001	0	SACV	DRB1	0401	0401	0005	DQA1	0101 (1.1)	0101 (1.1)
RAJ	DRB1	02	02		JY	DRB1	01	0	SACV	DRB1	0401	0401	0005	DQB1	0501	0501
RAJ	DQA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)		JY	DQA1	0101 (1.1)	0102 (1.2)	SACV	DQA1	0301 (3)	0301 (3)	0005	DPA1	0100/10	0100/10
RAJ	DQB1	0201/2	0501		JY	DQB1	0201/2	0501	SACV	DQB1	0202	0202	0005	DPB1	0501/2	0501/2
RAJ	DPA1	0200/2	0200/2		JY	DPA1	0100/10	0100/10	SACV	DPA1	0201/10	0201/10	0005	HLA-A	1501/171N	1501/171N
RAJ	DPB1	0100/10	0100/10		JY	DPB1	0201/2	0201	SACV	DPB1	0201/10	0201/10	0005	HLA-B	5001	5001
RAJ	HLA-A	03	03		JY	HLA-A	1201/10	1201/10	SACV	HLA-A	0301	0301	0005	HLA-C	0102	0102
RAJ	HLA-B	1510	1510		JY	HLA-B	0702/10	0702/10	SACV	HLA-B	0702	0702				
RAJ	HLA-C	03	04		JY	HLA-C	0702/10	0702/10	SACV	HLA-C	0702	0702				
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
NAMALWA	DRB1	1105	1103	Z2222	DRB1	0100/10	1001	LADA	DRB1	0201/2	1101/10	SST0	DRB1	0403	0403	
NAMALWA	DRB5	01	0	Z2222	DQA1	0101 (1.1)	0101 (1.1)	LADA	DRB1	02	0	SST0	DQA1	0301 (3)	0301 (3)	
NAMALWA	DQA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)	Z2222	DRB1	0501	0201	LADA	DRB1	0101	0101	SST0	DQB1	0305	0305	
NAMALWA	DQB1	0102 (1.2)	0501 (4)	Z2222	DPA1	0100/10	0201/10	LADA	DQA1	0101 (1.1)	0501 (4)	SST0	DPA1	0100/10	0100/10	
NAMALWA	DPA1	0202	0502	Z2222	DPB1	0201/2	1301	LADA	DQB1	0201/2	0501	SST0	DPB1	0201	0201	
NAMALWA	DPB1	0201/2	0201/2	Z2222	HLA-A	2302	3002	LADA	DPA1	0100/10	1201/10	SST0	HLA-A	0201	0201	
NAMALWA	HLA-A	03	03	Z2222	HLA-B	5701/2	7801/2	LADA	DPB1	0501	1701	SST0	HLA-B	4402	4402	
NAMALWA	HLA-B	0702	1401	Z2222	HLA-C	1801	1101/2	LADA	HLA-A	0201	0201	SST0	HLA-C	0501	0501	
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
NAMALWA	HLA-C	0701/6	0702/3	LH	DRB1	0301	0404	LADA	HLA-C	0702/3	0807	BNA0/6N4D0	DRB1	0404	0404	
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
APA	DRB1	1105	1501/10/10	LH	DRB1	01	0	BNA0/6N4D0	DRB4	0102	0102	BNA0/6N4D0	DRB4	0102	0102	
APA	DRED	0200/2	0	LH	DQA1	0301 (3)	0501 (4.1)	BNA0/6N4D0	DRB3	0202	0	BNA0/6N4D0	DQB1	0302	0302	
APA	DRB5	01	0	LH	DRB1	0201	0402	BNA0/6N4D0	DRB4	0101	0	BNA0/6N4D0	DPA1	0100/10	0100/10	
APA	DQA1	0101 (1.1)	0102 (1.2)	LH	DPA1	0201/10	0201/2	BNA0/6N4D0	DQA1	0101 (1.1)	0301 (2)	BNA0/6N4D0	DPB1	0301	0301	
APA	DQB1	0503/10	0501	LH	DPB1	0100/10	0301	BNA0/6N4D0	DPA1	0300/2	0502	BNA0/6N4D0	HLA-A	02	3101/2	
APA	DPA1	0701/2	0702/2	LH	HLA-A	2402	7402	BNA0/6N4D0	DPB1	0100/10	0202/2	BNA0/6N4D0	HLA-B	1401	4001	
APA	DPB1	0501	0501	LH	HLA-B	0802	2702	BNA0/6N4D0	DRB1	0401/10	0501	BNA0/6N4D0	HLA-C	03	0302	
APA	HLA-A	2403	1101	LH	HLA-C	0102	0701/5	BNA0/6N4D0	HLA-A	1101	2601	BNA0/6N4D0	DRB1	1301	1301	
APA	HLA-B	0502	3502	CatLineName	LocusName	Allele1	Allele2	BNA0/6N4D0	HLA-B	0705/6	55	CatLineName	LocusName	Allele1	Allele2	
APA	HLA-C	08	12005	V00	DRB1	0101	0301	BNA0/6N4D0	DRB1	02	02	APD	DRB1	1301	1301	
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
MG	DRB1	0401/15	1001	V00	DQA1	0101 (1.1)	0501 (4.1)	AMAV/AMAL	DRB1	1503	1503	APD	DQA1	0103 (1.3)	0103 (1.3)	
MG	DRB5	01	0	V00	DQB1	0101/2	0501	AMAV/AMAL	DRB5	0101	0101	APD	DQB1	0503	0503	
MG	DQA1	0101 (1.1)	0501 (4)	V00	DPA1	0100/10	0100/10	AMAV/AMAL	DQA1	0102 (1.2)	0102 (1.2)	APD	DPA1	0100/10	0100/10	
MG	DQB1	0302/7	0501	V00	DPB1	0201/2	0401	AMAV/AMAL	DQB1	0202	0502	APD	DPB1	0402	0402	
MG	DPB1	0100/10	0100/10	V00	HLA-A	0101	0301	AMAV/AMAL	DPB1	0402	0402	APD	HLA-A	0101	0101	
MG	HLA-A	0101	0201	V00	HLA-B	1001	2501	AMAV/AMAL	HLA-A	0202	0502	APD	HLA-B	0101	0101	
MG	HLA-B	15	3701	V00	HLA-C	0102	0701/5/15	AMAV/AMAL	HLA-B	5301	5301	APD	HLA-C	0502	0502	
MG	HLA-C	03	1002	AMALA	DRB1	1402	1402	AMAV/AMAL	HLA-C	0401	0401	HAR	DRB1	0301	0301	
					AMALA	DRB1	0101	0101	AMAV/AMAL	DRB1	0101	0101	AMAV/AMAL	DRB1	0301	0301
CellLineName	LocusName	Allele1	Allele2													
TIL	DRB1	1301	1501	AMALA	DQA1	0501 (4.1)	0501 (4.1)	CRK	DRB1	0201	0201	HAR	DQA1	0501 (4.1)	0501 (4.1)	
TIL	DQA1	0103 (1.2)	0103 (1.3)	AMALA	DQB1	1001	1201	CRK	DQA1	0201 (2)	0201 (2)	HAR	DQB1	0501	0501	
TIL	DCB1	0200	0200	AMALA	DPA1	0103/10	0103/10	CRK	DQB1	1201	1201	HAR	DPA1	0100/10	0100/10	
TIL	DPA1	0100/10	0201/10	AMALA	DPB1	0102	0402	CRK	DPA1	0201/2	0201/2	HAR	DPB1	0401	0401	
TIL	DPB1	0201	1301	AMALA	HLA-A	021701	021701	CRK	DPB1	0101/10	0101/10	HAR	HLA-A	0101	0101	
TIL	HLA-A	1102	1300	AMALA	HLA-B	1501	1501	CRK	HLA-A	2002/4	2502/4	HAR	HLA-B	0801	0801/5	
TIL	HLA-B	51	5401	AMALA	HLA-C	1003	1010	CRK	HLA-B	4403	4403	HAR	HLA-C	0701/6	0701/6	
TIL	HLA-C	0102	0202	AMALA	HLA-C	1003	1010	CRK	HLA-C	1801	1801					

REIVINDICACIONES

1. Método 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, comprendiendo dicho método:
 - 5 (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:
 - 10 (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
 - 15 (ii).el cebador inverso comprende las siguientes secuencias, en sentido 5' a 3':
 - 20 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;
 - 25 (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 determinar qué alelos están presentes en el individuo.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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

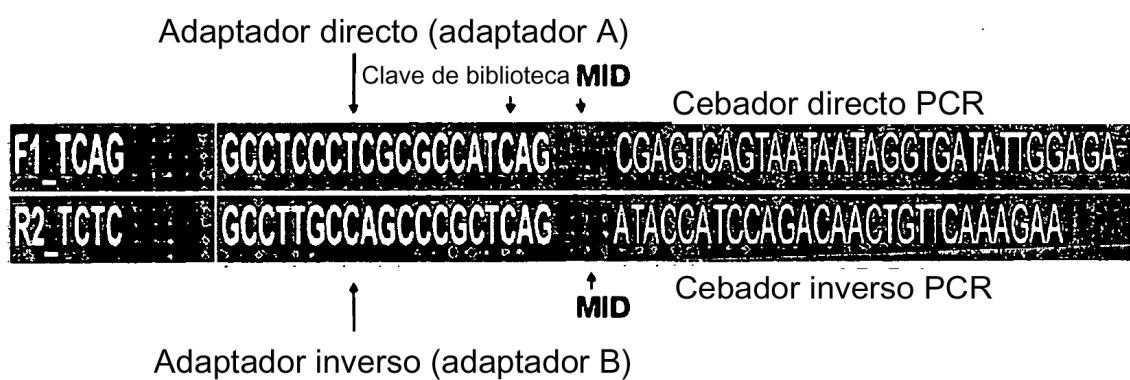


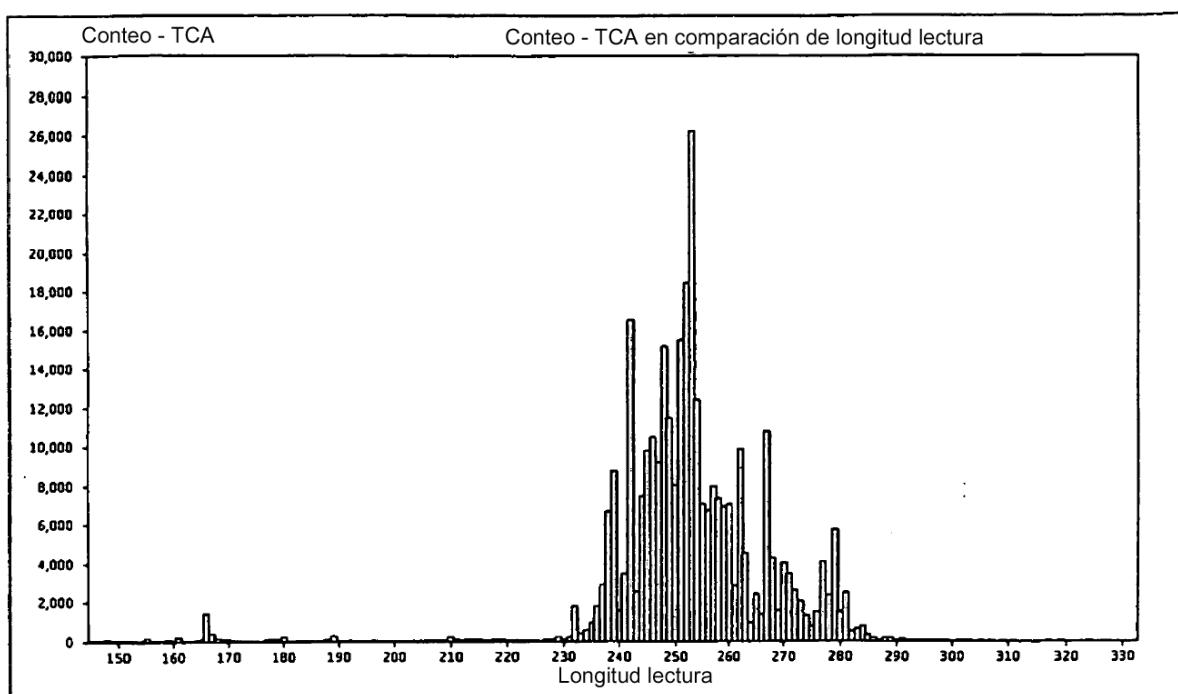
Fig. 2

Fig. 3

	lecturas directas		lecturas inversas	
	lectura	lectura	lectura	lectura
ADJUSTACION 2	598	605	444	437
ADJUSTACION 3	562	678	617	692
ADJUSTACION 4	58	541	256	571
ADJUSTACION 5	224	112	135	348
ADJUSTACION 6	300	400	426	342
ADJUSTACION 7	458	580	447	586
ADJUSTACION 8	74	565	610	597
ADJUSTACION 9	226	164	212	152
ADJUSTACION 10	512	512	415	564
ADJUSTACION 11	598	760	619	628
ADJUSTACION 12	412	464	547	528
ADJUSTACION 13	276	454	186	455
ADJUSTACION 14	271	280	241	318
ADJUSTACION 15	189	406	279	340
ADJUSTACION 16	474	485	428	361
ADJUSTACION 17	198	494	516	607
ADJUSTACION 18	254	651	257	570
ADJUSTACION 19	256	403	334	357
ADJUSTACION 20	258	348	292	219
ADJUSTACION 21	415	538	549	493
ADJUSTACION 22	247	480	597	484
ADJUSTACION 23	314	136	182	125
ADJUSTACION 24	399	400	389	407
ADJUSTACION 25	491	657	563	550
ADJUSTACION 26	310	423	305	489
ADJUSTACION 27	715	812	78	674
ADJUSTACION 28	252	240	227	280
ADJUSTACION 29	291	410	231	287
ADJUSTACION 30	598	605	444	437
ADJUSTACION 31	562	678	617	692
ADJUSTACION 32	58	541	256	571
ADJUSTACION 33	224	112	135	348
ADJUSTACION 34	300	400	426	342
ADJUSTACION 35	458	580	447	586
ADJUSTACION 36	74	565	610	597
ADJUSTACION 37	226	164	212	152
ADJUSTACION 38	512	512	415	564
ADJUSTACION 39	598	760	619	628
ADJUSTACION 40	412	464	547	528
ADJUSTACION 41	276	454	186	455
ADJUSTACION 42	271	280	241	318
ADJUSTACION 43	189	406	279	340
ADJUSTACION 44	474	485	428	361
ADJUSTACION 45	198	494	516	607
ADJUSTACION 46	254	651	257	570
ADJUSTACION 47	256	403	334	357
ADJUSTACION 48	258	348	292	219
ADJUSTACION 49	415	538	549	493
ADJUSTACION 50	247	480	597	484
ADJUSTACION 51	314	136	182	125
ADJUSTACION 52	399	400	389	407
ADJUSTACION 53	491	657	563	550
ADJUSTACION 54	310	423	305	489
ADJUSTACION 55	715	812	78	674
ADJUSTACION 56	252	240	227	280
ADJUSTACION 57	291	410	231	287
ADJUSTACION 58	598	605	444	437
ADJUSTACION 59	562	678	617	692
ADJUSTACION 60	58	541	256	571
ADJUSTACION 61	224	112	135	348
ADJUSTACION 62	300	400	426	342
ADJUSTACION 63	458	580	447	586
ADJUSTACION 64	74	565	610	597
ADJUSTACION 65	226	164	212	152
ADJUSTACION 66	512	512	415	564
ADJUSTACION 67	598	760	619	628
ADJUSTACION 68	412	464	547	528
ADJUSTACION 69	276	454	186	455
ADJUSTACION 70	271	280	241	318
ADJUSTACION 71	189	406	279	340
ADJUSTACION 72	474	485	428	361
ADJUSTACION 73	198	494	516	607
ADJUSTACION 74	254	651	257	570
ADJUSTACION 75	256	403	334	357
ADJUSTACION 76	258	348	292	219
ADJUSTACION 77	415	538	549	493
ADJUSTACION 78	247	480	597	484
ADJUSTACION 79	314	136	182	125
ADJUSTACION 80	399	400	389	407
ADJUSTACION 81	491	657	563	550
ADJUSTACION 82	310	423	305	489
ADJUSTACION 83	715	812	78	674
ADJUSTACION 84	252	240	227	280
ADJUSTACION 85	291	410	231	287
ADJUSTACION 86	598	605	444	437
ADJUSTACION 87	562	678	617	692
ADJUSTACION 88	58	541	256	571
ADJUSTACION 89	224	112	135	348
ADJUSTACION 90	300	400	426	342
ADJUSTACION 91	458	580	447	586
ADJUSTACION 92	74	565	610	597
ADJUSTACION 93	226	164	212	152
ADJUSTACION 94	512	512	415	564
ADJUSTACION 95	598	760	619	628
ADJUSTACION 96	412	464	547	528
ADJUSTACION 97	276	454	186	455
ADJUSTACION 98	271	280	241	318
ADJUSTACION 99	189	406	279	340
ADJUSTACION 100	474	485	428	361
ADJUSTACION 101	198	494	516	607
ADJUSTACION 102	254	651	257	570
ADJUSTACION 103	256	403	334	357
ADJUSTACION 104	258	348	292	219
ADJUSTACION 105	415	538	549	493
ADJUSTACION 106	247	480	597	484
ADJUSTACION 107	314	136	182	125
ADJUSTACION 108	399	400	389	407
ADJUSTACION 109	491	657	563	550
ADJUSTACION 110	310	423	305	489
ADJUSTACION 111	715	812	78	674
ADJUSTACION 112	252	240	227	280
ADJUSTACION 113	291	410	231	287
ADJUSTACION 114	598	605	444	437
ADJUSTACION 115	562	678	617	692
ADJUSTACION 116	58	541	256	571
ADJUSTACION 117	224	112	135	348
ADJUSTACION 118	300	400	426	342
ADJUSTACION 119	458	580	447	586
ADJUSTACION 120	74	565	610	597
ADJUSTACION 121	226	164	212	152
ADJUSTACION 122	512	512	415	564
ADJUSTACION 123	598	760	619	628
ADJUSTACION 124	412	464	547	528
ADJUSTACION 125	276	454	186	455
ADJUSTACION 126	271	280	241	318
ADJUSTACION 127	189	406	279	340
ADJUSTACION 128	474	485	428	361
ADJUSTACION 129	198	494	516	607
ADJUSTACION 130	254	651	257	570
ADJUSTACION 131	256	403	334	357
ADJUSTACION 132	258	348	292	219
ADJUSTACION 133	415	538	549	493
ADJUSTACION 134	247	480	597	484
ADJUSTACION 135	314	136	182	125
ADJUSTACION 136	399	400	389	407
ADJUSTACION 137	491	657	563	550
ADJUSTACION 138	310	423	305	489
ADJUSTACION 139	715	812	78	674
ADJUSTACION 140	252	240	227	280
ADJUSTACION 141	291	410	231	287
ADJUSTACION 142	598	605	444	437
ADJUSTACION 143	562	678	617	692
ADJUSTACION 144	58	541	256	571
ADJUSTACION 145	224	112	135	348
ADJUSTACION 146	300	400	426	342
ADJUSTACION 147	458	580	447	586
ADJUSTACION 148	74	565	610	597
ADJUSTACION 149	226	164	212	152
ADJUSTACION 150	512	512	415	564
ADJUSTACION 151	598	760	619	628
ADJUSTACION 152	412	464	547	528
ADJUSTACION 153	276	454	186	455
ADJUSTACION 154	271	280	241	318
ADJUSTACION 155	189	406	279	340
ADJUSTACION 156	474	485	428	361
ADJUSTACION 157	198	494	516	607
ADJUSTACION 158	254	651	257	570
ADJUSTACION 159	256	403	334	357
ADJUSTACION 160	258	348	292	219
ADJUSTACION 161	415	538	549	493
ADJUSTACION 162	247	480	597	484
ADJUSTACION 163	314	136	182	125
ADJUSTACION 164	399	400	389	407
ADJUSTACION 165	491	657	563	550
ADJUSTACION 166	310	423	305	489
ADJUSTACION 167	715	812	78	674
ADJUSTACION 168	252	240	227	280
ADJUSTACION 169	291	410	231	287
ADJUSTACION 170	598	605	444	437
ADJUSTACION 171	562	678	617	692
ADJUSTACION 172	58	541	256	571
ADJUSTACION 173	224	112	135	348
ADJUSTACION 174	300	400	426	342
ADJUSTACION 175	458	580	447	586
ADJUSTACION 176	74	565	610	597
ADJUSTACION 177	226	164	212	152
ADJUSTACION 178	512	512	415	564
ADJUSTACION 179	598	760	619	628
ADJUSTACION 180	412	464	547	528
ADJUSTACION 181	276	454	186	455
ADJUSTACION 182	271	280	241	318
ADJUSTACION 183	189	406	279	340
ADJUSTACION 184	474	485	428	361
ADJUSTACION 185	198	494	516	607
ADJUSTACION 186	254	651	257	570
ADJUSTACION 187	256	403	334	357
ADJUSTACION 188	258	348	292	219
ADJUSTACION 189	415	538	549	493
ADJUSTACION 190	247	480	597	484
ADJUSTACION 191	314	136	182	125
ADJUSTACION 192	399	400	389	407
ADJUSTACION 193	491	657	563	550
ADJUSTACION 194	310	423	305	489
ADJUSTACION 195	715	812	78	674
ADJUSTACION 196	252	240	227	280
ADJUSTACION 197	291	410	231	287
ADJUSTACION 198	598	605	444	437
ADJUSTACION 199	562	678	617	692
ADJUSTACION 200	58	541	256	571
ADJUSTACION 201	224	112	135	348
ADJUSTACION 202	300	400	426	342
ADJUSTACION 203	458	580	447	586
ADJUSTACION 204	74	565	610	597
ADJUSTACION 205	226	164	212	152
ADJUSTACION 206	512	512	415	564
ADJUSTACION 207	598	760	619	628
ADJUSTACION 208	412	464	547	528
ADJUSTACION 209	276	454	186	455
ADJUSTACION 210	271	280	241	318
ADJUSTACION 211	189	406	279	340
ADJUSTACION 212	474	485	428	361
ADJUSTACION 213	198	494	516	607
ADJUSTACION 214	254	651	257	570
ADJUSTACION 215	256	403	334	357
ADJUSTACION 216	258	348	292	219
ADJUSTACION 217	415	538	549	493
ADJUSTACION 218	247	480	597	484
ADJUSTACION 219	314	136	182	125
ADJUSTACION 220	399	400	389	407
ADJUSTACION 221	491	657	563	550
ADJUSTACION 222	310	423	305	489
ADJUSTACION 223	715	812	78	674
ADJUSTACION 224	252	240	227	280
ADJUSTACION 225	291	410	231	287
ADJUSTACION 226	598	605	444	437
ADJUSTACION 227	562	678	617	692