

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 048**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99922104 .7**  
96 Fecha de presentación: **19.04.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1071825**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2001**

54 Título: **Procedimiento para el tipado de alelos de HLA**

30 Prioridad:  
**20.04.1998 EP 98870088**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.11.2012**

73 Titular/es:  
**INNOGENETICS N.V. (100.0%)  
INDUSTRIEPARK ZWIJNAARDE 7, BOX 4  
9052 GHENT, BE**

72 Inventor/es:  
**DE CANCK, ILSE;  
MERSCH, GUY y  
ROSSAU, RUDI**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 390 048 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

Procedimiento para el tipado de alelos de HLA

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al tipado de alelos del antígeno leucocitario humano (HLA). Más particularmente, la presente invención se refiere al tipado de nuevos alelos de HLA.

**Antecedentes de la invención**

10 El complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) humano está contenido dentro de aproximadamente 4 Mpb de ADN en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3 (Campbell y Trowsdale, 1993). El MHC humano se divide en las regiones de clase I, clase II y clase III. Los genes de la clase I y la clase II codifican moléculas de la superficie celular altamente polimórficas que se unen y presentan antígenos procesados en forma de péptidos a linfocitos T, iniciando respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales. Las moléculas de clase I, HLA-A, -B, y -C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glucoproteínas de la superficie celular que se unen y presentan péptidos procesados derivados de proteínas endógenamente sintetizadas a linfocitos T CD8+. Estos heterodímeros consisten en una cadena  $\alpha$  codificada por HLA asociada a un polipéptido monomórfico codificado por no MHC, la  $\beta$ -microglobulina (Townsend y Bodmer, 1989; Spencer y Parham, 1996). Las moléculas de clase II están codificadas en la región de HLA. Estas glucoproteínas de la superficie celular consisten en cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas por HLA asociadas como heterodímeros sobre la superficie celular de células presentadoras de antígeno tal como linfocitos B y macrófagos. Las moléculas de clase II sirven de receptores para péptidos procesados. Sin embargo, estos péptidos se derivan predominantemente de proteínas de membrana y extracelulares y se presentan a linfocitos T CD4+. La región HLA-D contiene varios genes de clase II y tiene tres subregiones principales: HLA-DR, -DQ y -DP. Tanto las regiones HLA-DQ como -DP contienen un gen funcional para cada una de sus cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . La subregión HLA-DR contiene un gen funcional para la cadena  $\alpha$ ; el número de genes funcionales para la cadena  $\beta$  varía de uno a dos según el haplotipo (Andersson y col., 1987; Apple y Erlich, 1996).

25 Actualmente se usan una variedad de técnicas para detectar polimorfismo de HLA, que incluyen procedimientos serológicos, bioquímicos, de reconocimiento de linfocitos T y, más recientemente, de biología molecular.

30 La serología sigue siendo el procedimiento pilar para el tipado de HLA - especialmente para la clase I - para muchos laboratorios de histocompatibilidad rutinaria. El ensayo de micro-linfocitotoxicidad (Kissmeyer y col., 1969; Terasaki y McClelland, 1964) es el enfoque convencional: células mononucleares de sangre periférica viables (clase I) o linfocitos T separados (clase II) se mezclan con antisueros (policlonales o monoclonales) de especificidad por HLA conocida.

La detección del polimorfismo puede lograrse considerando la diferente composición de aminoácidos de moléculas de HLA por técnicas bioquímicas tales como isoelectroenfoque unidimensional (IEF; Yang, 1987). Este procedimiento se basa en sustituciones de aminoácidos que contribuyen a cambios en la carga de la molécula de HLA.

35 Otro procedimiento de tipado de HLA es la reacción de linfocitos mixtos (MLR). Simultáneamente a observaciones que se hacen usando antisueros específicos para HLA, se observó que los linfocitos de dos fuentes sin relacionar proliferaban cuando se mezclaban en cultivo (Hirschorn y col., 1963).

40 El análisis de especificidades por HLA de ADN proporcionó un nuevo enfoque para definir sus diferencias polimórficas. En vez de considerar diferencias en la molécula expresada, el polimorfismo se caracteriza al nivel de nucleótidos.

45 Un desarrollo importante y poderoso en el campo de la molecular biología ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y col., 1986; Mullis y Faloona, 1987). En tipado de tejido, la PCR se usa para amplificar las regiones polimórficas de genes HLA. Este producto de PCR de HLA puede luego analizarse para sus diferencias polimórficas, para establecer el tipo de tejido. Se han desarrollado varios de tales enfoques, que incluyen análisis de heterodúplex de productos de PCR (Clay y col., 1994), análisis de polimorfismos conformacionales monocatenarios del producto de PCR (PCR-SSCP; Yoshida y col., 1992), tipado basado en secuencias (SBT; Santamaria y col., 1992 y 1993), el uso de cebadores específicos para secuencia en la reacción de PCR (PCR-SSP; Olerup y Zetterquist, 1991), el uso de PCR en combinación con sondaje de oligonucleótidos específicos para secuencia (PCR-SSOP; Saiki y col., 1986) o sondaje por transferencia puntual inversa (Saiki y col., 1989). Estos enfoques, usados individualmente o en combinación, se han aplicado todos como procedimientos basados en ADN para el tipado de tejido de especificidades por HLA de clase I y clase II. Por ejemplo, Mach y Tiercy (1991) desvelan un procedimiento para el tipado de HLA-DR (clase II) amplificando los alelos diana con cebadores adecuados y determinando los alelos con un panel de sondas específicas para alelo.

55 Para alelos de clase I, las regiones hipervariables se encuentran en diferentes grados en tanto el exón 2 como el exón 3, que codifican el surco de unión a péptido de la molécula de clase I. El polimorfismo dentro de la clase II está contenido principalmente dentro de regiones hipervariables definidas en el exón 2. Estos polimorfismos hacen

diferenciación entre alelos que pueden conseguirse por hibridación con sondas relevantes.

**Objetivos de la invención**

5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new; comprendiendo dicho procedimiento una etapa de amplificación, como se enumera en las reivindicaciones.

También es un objetivo de la presente divulgación proporcionar cebadores para dicha etapa de amplificación.

También es un objetivo de la presente divulgación proporcionar sondas para dicha etapa de hibridación.

También es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un kit de diagnóstico que permita dicho procedimiento para el tipado.

10 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar los fragmentos de proteínas codificados por lo genes HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención desvela la secuencia del exón 2 del alelo de HLA DRB1\*0820. Esta secuencia se identifica por SEC ID N° 1 y se muestra a continuación.

5	10	15	20 (47)
CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT ACG TCT GAG TGT CAT TTC TTC AAT GGG			
	25	30	35 (92)
ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC TTC TAT AAC CAA GAG			
	40	45	50 (137)
GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG GTG			
	55	60	65 (182)
ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG			
	70	75	80 (227)
GAC TTC CTG GAA GAC AGG CGG GCC CTG GTG GAC ACC TAC TGC AGA			
	85	90	
CAC AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA			
			(SEC ID N° 1)

15 La secuencia se muestra de 5' a 3' y va del codón 5 al codón 94 del exón 2. Se indica la numeración de los codones. Las posiciones de nucleótidos se indican entre paréntesis. Esta secuencia ha sido presentada a la base de datos EMBL y se le asignó el número de acceso AJ000927. El alelo DRB1\*0820 es un alelo novedoso que no se ha descrito previamente.

20 La presente invención también desvela la secuencia del exón 2 del alelo de HLA DRB1\*04new. Esta secuencia se identifica por SEC ID N° 50 y se muestra a continuación.

ES 2 390 048 T3

```

6           10           15           20 (43)
T TTC TTG GAG CAG GTT AAA CCT GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG
           25           30           35 (88)
ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC TTC TAT CAC CAA GAG
           40           45           50 (133)
GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG GTG
           55           60           65 (178)
ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG
           70           75           80 (223)
GAC CTC CTG GAG CAG AAG CGG GCC GCG GTG GAC ACC TAC TGC AGA
           85
CAC AAC TAC GGG GTT GGT GA (SEC ID N° 50)

```

5 La secuencia se muestra de 5' a 3' y va del codón 6 al codón 87 del exón 2. Se indica la numeración de los codones. Las posiciones de nucleótidos se indican entre paréntesis. Esta secuencia ha sido presentada a la base de datos EMBL y se le asignó el número de acceso AJ133492. El alelo DRB1\*04new es un alelo novedoso que no se ha descrito previamente.

La presente invención también desvela la secuencia del exón 2 del alelo de HLA DRB4\*01new. Esta secuencia se identifica por SEC ID N° 67 y se muestra a continuación.

```

5           10           15           20 (47)
CA CGT TTC TTG GAG CAG GCT AAG TGT GAG TGT CAT TTC CTC AAT GGG
           25           30           35 (92)
ACG GAG CGA GTG TGG AAC CTG ATC AGA TAC ATC TAT AAC CAA GAG
           40           45           50 (137)
GAG TAC GCG CGC TAC AAC AGT GAT CTG GGG GAG TAC CAG GCG GTG
           55           60           65 (182)
ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAC GCT GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG
           70           75           80 (227)
GAC CTC CTG GAG CGG AGG CGG GCC GAG GTG GAC ACC TAC TGC AGA
           85           90           95 (270)
TAC AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA G

(SEC ID N° 67)

```

10 La secuencia se muestra de 5' a 3' y va del codón 5 al codón 95 del exón 2. Se indica la numeración de los codones. Las posiciones de nucleótidos se indican entre paréntesis. Esta secuencia ha sido presentada a la base de datos EMBL y se le asignó el número de acceso AJ131789. El alelo DRB4\*01new es un alelo novedoso que no se ha descrito previamente.

15 Teniendo conocimiento de esta información de secuencias, el experto podrá idear procedimientos que permitan el tipado de dicho alelo. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new en una muestra; comprendiendo dicho procedimiento:

- i) amplificar un fragmento que comprende todo o parte del exón 2 de dicho alelo usando al menos un par adecuado de cebadores;
- ii) hibridar el producto amplificado de la etapa i) con un conjunto de sondas, hibridándose las sondas de dicho conjunto específicamente con regiones diana que comprenden uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 de dicho alelo;
- iii) determinar a partir del resultado de la etapa ii) la presencia o ausencia de los alelos HLA-DRB1\*0820,

HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new en la muestra.

Los cebadores usados en este procedimiento pueden ser cebadores genéricos, es decir, cebadores que se hibridan con regiones diana que están conservadas, al menos hacia su extremo 3', entre todos los miembros de un grupo de alelos (por ejemplo, el grupo DPB o el grupo DQB o el grupo DRB) y, por tanto, conducirán a la amplificación de todos los alelos dentro de este grupo. Alternativamente, los cebadores pueden ser específicos para subgrupo, es decir, los cebadores que se hibridan con secuencias diana que sólo están presentes en un subgrupo de alelos. Tales cebadores específicos para subgrupo pueden usarse por separado, o más de un cebador de 5' o más de un cebador del extremo 3' pueden usarse juntos en una mezcla. Una mezcla tal se llama algunas veces un cebador múltiple. Pueden usarse diferentes tipos de cebadores en combinación, por ejemplo, puede usarse un cebador de 5' múltiple con un cebador de 3' genérico, etc.

Según una realización más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se define anteriormente, caracterizado adicionalmente porque los cebadores usados para la amplificación del exón 2 de DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new se eligen de la Tabla 1.

**Tabla 1. Cebadores para la amplificación del exón 2 del alelo de HLA DRB1\*0820, el alelo de HLA DRB1\*04new y/o el alelo de HLA DRB4\*01new.**

Cebador	Posición <sup>1</sup> y secuencia	SEC ID Nº
DRBp5'gen	intrón-GATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG-6	SEC ID Nº 3
DRBp5'intron	intrón-ACCGGATCCTTCGTGTCCCCACAG-5	SEC ID Nº 53
DRBp5'DR3, 8, 11, 12, 13,14	intrón-CCCCACAGCACGTTTCTTGAGTACTC-11	SEC ID Nº 4
DRBp5'DR1,7	intrón-TGTCCCCACAG CA CGT TTC TTG TG-9	SEC ID Nº 5
DRBp5'DR4	6-T TTC TTG GAG CAG GTT AAA C-13	SEC ID Nº 6
DRBp5'DR4	5-A CGT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C-13	SEC ID Nº 52
DRBp5'DR9	5-CA CGT TTC TTG AAG CAG GAT AAG TT-13	SEC ID Nº 7
DRBp5'DR10	intrón-CACAG CA CGT TTC TTG GAG G-10	SEC ID Nº 8
DRBp5'DR15, 16	8-CTG TGG CAG CCT AAG AGG-13	SEC ID Nº 9
DRB4p5'	9-TAAGTGTGAGTGTCATTTC-17	SEC ID Nº 54
DRBp3'gen	94-TCGCCGCTGCACTGTGAAGCTC-87	SEC ID Nº 10
DRBp3'DRB1	intrón-ATTCCCGCGCCGCGCT-intrón	SEC ID Nº 11
DRB3'cod86V	92-CTGCACTGTGAAGCTCTCCA-86	SEC ID Nº 12
DRBp3'intron	intrón-CCCGCCCTCCACCATGCTCAC-95	SEC ID Nº 107

<sup>1</sup>Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de los cebadores. "Intrón" significa que el extremo 5' y/o el extremo 3' está/n localizado/s en un intrón.

SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 53 son cebadores genéricos que tienen una región diana que cubre la unión del intrón 1 y el intrón 2. Esta región diana está conservada entre todos los alelos DRB (DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5). SEC ID Nº 4 a 9 y SEC ID Nº 4, 5, 52, 7, 8, 9 constituyen mezclas de cebadores múltiples, que se hibridan con las subclases DR1, DR3, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15 y DR16. Juntas, estas subclases constituyen el grupo de alelos DRB1. SEC ID Nº 4 es el único miembro de estas mezclas de cebadores que se hibrida específicamente con el alelo HLA-DRB1\*0820. SEC ID Nº 6 y 52 son los únicos miembros de la mezcla de cebadores que se hibridan específicamente con el alelo HLA-DRB1\*04new. SEC ID Nº 54 se hibrida específicamente con el alelo HLA-DRB4. Estos cebadores específicos pueden usarse por separado o en una mezcla tal como se ha descrito anteriormente. SEC ID Nº 10 es un cebador genérico que tiene su región diana en el codón 94 al codón 87 en el exón 2. Esta región diana está conservada entre todos los alelos DRB. SEC ID Nº 11 está situada en el intrón 2, y se hibrida con todos los alelos DRB1. La región diana de SEC ID Nº12 está situada en el codón 92 al codón 86. El codón 86 es un codón dimórfico que codifica tanto una Val como una Gly. SEC ID Nº 12 se hibrida con el codón que codifica Val. SEC ID Nº 107 está situada en el intrón 2 y se hibrida con todos los alelos DRB.

Según otra realización más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se define anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichos nucleótidos polimórficos tienen:

las siguientes posiciones en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 67:

5 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 35, 44, 61, 64, 65, 67, 69, 71, 75, 76, 78, 81, 84, 89, 92, 95, 96, 97, 99, 100, 104, 106, 127, 136, 146, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 165, 166, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 203, 205, 207, 208, 209, 217, 218, 219, 220, 221, 237, 239, 241, 244, 245, 251, 257; y

las siguientes posiciones en SEC ID N° 50:

10 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 29, 31, 40, 57, 60, 61, 63, 65, 67, 71, 72, 74, 77, 80, 85, 88, 91, 92, 93, 95, 96, 100, 102, 123, 132, 142, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 161, 162, 182, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 199, 201, 203, 204, 205, 213, 214, 215, 216, 217, 233, 235, 237, 240, 241.

Estos nucleótidos se muestran en negrita en las secuencias anteriores (SEC ID N° 1, 50 y 67).

15 Según una realización incluso más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se define anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas que se hibridan específicamente con una región diana que comprende uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 del alelo DRB1\*0820 se eligen de la Tabla 2.

**Tabla 2. Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA DRB1 \*0820.**

Ref. nº	Posición <sup>1</sup> y secuencia	SEC ID N°
9	9-G TAC TCT ACG TCT GAG TG-15	SEC ID N° 13
26	54-G CCT GAT GCC GAG TAC TGG-61	SEC ID N° 14
25	64-AG AAG GAC TTC CTG GAA GA-70	SEC ID N° 15
21	69-A GCC AGG CGG GCC CTG GTG GA-76	SEC ID N° 16
44	84-GGG GTT GTG GAG AGC-88	SEC ID N° 17
	17-TTC TTC AAT GGG ACG GAG-22	SEC ID N° 18
	26-TTC CTG GAC AGA TAC TTC-31	SEC ID N° 19
	34-CAA GAG GAG TAC GTG CGC-39	SEC ID N° 20
	45-GGG GAG TAC CGG GCG GTG-50	SEC ID N° 21

<sup>1</sup>Las secuencias se facilitan de 5' a 3'. Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de las sondas.

20 Según otra realización incluso más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se define anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas que se hibridan específicamente con una región diana que comprende uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 del alelo DRB1\*04new se eligen de la Tabla 3.

**Tabla 3. Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA DRB1\*04new.**

Ref. nº	Posición <sup>1</sup> y secuencia	SEC ID N°
15	70-CAG AAG CGG GCC GCG-74	SEC ID N° 55
24	32-AT CAC CAA GAG GAG TAC GTG-38	SEC ID N° 56
27	81-CAC AAC TAC GGG GTT GGT GA-87	SEC ID N° 57
36	55-G CCT GAT GCC GAG TAC TGG-61	SEC ID N° 58
49	73-GCC GCG GTG GAC ACC-77	SEC ID N° 59
63	63-C CAG AAG GAC CTC CTG GA-69	SEC ID N° 60

73	28-C AGA TAC TTC TAT CAC CAA GA-35	SEC ID N° 61
<sup>1</sup> Las secuencias se facilitan de 5' a 3'. Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de las sondas.		

Según otra realización incluso más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se define anteriormente, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas que se hibridan específicamente con una región diana que comprende uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 del alelo DRB4\*01new se eligen de la Tabla 4.

**Tabla 4. Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA DRB4\*04new.**

Ref. nº	Posición <sup>1</sup> y secuencia	SEC ID N°
15	72-GG GCC GAG GTG GAC A-77	SEC ID N° 62
36	63-C CAG AAG GAC CTC CTG GA-69	SEC ID N° 63
44	84-GGG GTT GTG GAG AGC-88	SEC ID N° 64
60	35-GAG GAG TAC GCG CGC T-40	SEC ID N° 65
62	22-GAG CGA GTG TGG AAC C-27	SEC ID N° 66
<sup>1</sup> Las secuencias se facilitan de 5' a 3'. Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de las sondas.		

Estas sondas se hibridan con regiones diana que comprenden nucleótidos polimórficos en el exón 2. El conjunto de sondas con SEC ID N° 13 a SEC ID N° 17 produce un único patrón de hibridación para el alelo DRB1\*0820, que permite la discriminación de este alelo de todos los otros alelos DRB1 al nivel alélico. El conjunto de sondas con SEC ID N° 55 a SEC ID N° 61 produce un único patrón de hibridación para el alelo DRB1\*04new, que permite la discriminación de este alelo de todos los otros alelos DRB1 al nivel alélico. El conjunto de sondas con SEC ID N° 62 a SEC ID N° 66 produce un único patrón de hibridación para el alelo DRB4\*01new, que permite la discriminación de este alelo de todos los otros alelos DRB4 al nivel alélico. Actualmente se han descrito 215 alelos DRB1 diferentes y 8 alelos DRB4 diferentes (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Las sondas con SEC ID N° 13 a 17 y 55 a 66 son parte del kit descodificador de DRB (2ª generación) de Innogenetics NV (Gante, Bélgica) que comprende 62 sondas. SEC ID N° 13 a 17 constituyen un subgrupo de sondas de este kit que se hibridan específicamente con el alelo DRB1\*0820. SEC ID N° 55 a 61 constituyen un subgrupo de sondas de este kit que se hibridan específicamente con el alelo DRB1\*04new. SEC ID N° 62 a 66 constituyen un subgrupo de sondas de este kit que se hibridan específicamente con el alelo DRB4\*01new. Las sondas con SEC ID N° 13 a 17 y 55 a 66 han sido optimizadas para funcionar en combinación a las mismas condiciones en un ensayo de LiPA (véase más adelante).

El experto reconocerá que las sondas y cebadores con SEC ID N° 3 a 21 y 52 a 66 pueden adaptarse mediante la adición o delección de uno o más nucleótidos en sus extremidades. Tales adaptaciones pueden requerirse, por ejemplo, si las condiciones de amplificación o hibridación cambian, o si el material amplificado es ARN en lugar de ADN, como es el caso en el sistema NASBA. Pueden aplicarse diferentes técnicas para realizar los procedimientos de la presente invención. Estas técnicas pueden comprender inmovilizar los ácidos polinucleicos de HLA, posiblemente después de la amplificación, sobre un soporte sólido y realizar la hibridación con sondas de oligonucleótidos marcadas. Alternativamente, las sondas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido y la hibridación puede realizarse con ácidos polinucleicos de HLA marcados, posiblemente después de la amplificación. Esta técnica se llama hibridación inversa. Una técnica de hibridación inversa conveniente es el ensayo de sonda en línea (LiPA). Este ensayo usa sondas de oligonucleótidos inmovilizadas como líneas paralelas sobre una tira de soporte sólido (Stuyver y col., 1993). Debe entenderse que cualquier otra técnica para la detección del alelo de HLA anteriormente mencionado también está cubierta por la presente invención.

La presente invención también se refiere a cualquier cebador o cualquier sonda como se indica anteriormente para su uso en un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new. La divulgación se refiere además a un ácido polinucleico aislado, definido por SEC ID N° 1, 50 y 67, correspondiente al exón 2 del alelo HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y HLA-DRB4\*01new, respectivamente. La divulgación también se refiere a cualquier fragmento del mismo que puede usarse como un cebador o como una sonda en un procedimiento para el tipado de dicho alelo.

Además, teniendo acceso a los ácidos polinucleicos aislados definidos por SEC ID N° 1, un experto en la materia podrá aislar el gen HLA-DRB1\*0820 completo de una biblioteca genómica humana. Teniendo acceso al ácido polinucleico aislado definido por SEC ID N° 50, un experto en la materia podrá aislar el gen HLA-DRB1\*04new completo de una biblioteca genómica humana. Teniendo acceso al ácido polinucleico aislado definido por SEC ID N° 67, un experto en la materia podrá aislar el gen HLA-DRB4\*01new completo de una biblioteca genómica humana. Esto puede hacerse cribando la biblioteca con el ácido polinucleico definido por respectivamente SEC ID N° 1, SEC ID N° 50 o SEC ID N° 67 o fragmentos adecuados del mismo como una sonda de hibridación. Por tanto, la presente invención también se refiere al gen HLA-DRB1 \*0820 completo, al HLA-DRB1\*04new completo y al gen HLA-DRB4\*01new completo.

Según otra realización preferida, la presente divulgación se refiere a un kit de diagnóstico que permite el tipado de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new, comprendiendo dicho kit al menos un cebador y/o al menos una sonda como se indica anteriormente. Opcionalmente, este kit también puede comprender una enzima y/o reactivos que permiten la etapa de amplificación y/o reactivos que permiten la etapa de hibridación.

Según otra realización preferida, la presente invención se refiere al fragmento de proteína que está codificado por SEC ID N° 1. La secuencia de este fragmento puede obtenerse convirtiendo la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 1 en la secuencia de aminoácidos correspondiente, por lo que el marco de lectura que va a usarse es como se indica anteriormente. La secuencia de aminoácidos se muestra a continuación como SEC ID N° 2.

```

R F L E Y S T S E C H F F N G T E R V
R F L D R Y F Y N Q E E Y V R F D S D V
G E Y R A V T E L G R P D A E Y W N S Q
K D F L E D R R A L V D T Y C R H N Y G
V V E S F T V Q R R          (SEC ID N° 2)
    
```

Según otra realización preferida, la presente invención se refiere al fragmento de proteína que está codificado por SEC ID N° 50. La secuencia de este fragmento puede obtenerse convirtiendo la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N° 50 en la secuencia de aminoácidos correspondiente, por lo que el marco de lectura que va a usarse es como se indica anteriormente. La secuencia de aminoácidos se muestra a continuación como SEC ID N° 51.

```

F L E Q V K P E C H F F N G T E R V
R F L D R Y F Y H Q E E Y V R F D S D V
G E Y R A V T E L G R P D A E Y W N S Q
K D L L E Q K R A A V D T Y C R H N Y G
V G          (SEC ID N° 51)
    
```

Los cebadores usados en este procedimiento pueden ser cebadores genéricos, es decir, cebadores que se hibridan con regiones diana que están conservadas, al menos hacia su extremo 3', entre todos los alelos de un locus dado (por ejemplo, los alelos de HLA-A o los alelos de HLA-B o los alelos de HLA-C) y, por tanto, conducirán a la amplificación de todos los alelos de este locus. Alternativamente, los cebadores pueden ser específicos para subgrupo, es decir, cebadores que se hibridan con secuencias diana que sólo están presentes en un subgrupo de alelos. Estos cebadores específicos para subgrupo pueden usarse por separado, o pueden usarse más de un cebador de 5' o más de un cebador del extremo 3' juntos en una mezcla. Una mezcla tal se llama algunas veces un cebador múltiple. Pueden usarse diferentes tipos de cebadores en combinación, por ejemplo, puede usarse un cebador de 5' múltiple con un cebador de 3' genérico.

Pueden aplicarse diferentes técnicas para realizar los procedimientos de la presente invención. Estas técnicas pueden comprender inmovilizar los ácidos polinucleicos de HLA, posiblemente después de la amplificación, sobre un soporte sólido y realizar la hibridación con sondas de oligonucleótidos marcadas. Alternativamente, las sondas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido y la hibridación puede realizarse con ácidos polinucleicos de HLA marcados, posiblemente después de la amplificación. Esta técnica se llama hibridación inversa. Una técnica de hibridación inversa conveniente es el ensayo de sonda en línea (LiPA). Este ensayo usa sondas de oligonucleótidos inmovilizadas como líneas paralelas sobre una tira de soporte sólido (Stuyver y col., 1993). Debe entenderse que cualquier otra técnica para la detección del alelo de HLA anteriormente mencionado también está cubierta por la presente divulgación.

**Definiciones**

Las siguientes definiciones y explicaciones permitirán un mejor entendimiento de la presente invención.

El material diana en las muestras que van analizarse puede ser tanto ADN como ARN, por ejemplo, ADN genómico, ARN mensajero o versiones amplificadas de los mismos. Estas moléculas también se llaman en la presente solicitud "ácidos polinucleicos".

5 Están disponibles procedimientos de extracción y purificación muy conocidos para el aislamiento de ARN o ADN de una muestra (por ejemplo, en Sambrook y col., 1989).

Un "nucleótido polimórfico" se refiere a un nucleótido de la secuencia de un alelo de HLA dado que se diferencia en al menos uno de los nucleótidos que se encuentran en la posición correspondiente en otros alelos de HLA del mismo locus.

10 El término "tipado" de un alelo de HLA se refiere a la identificación del alelo, es decir, la detección del alelo y la discriminación del alelo de otros alelos del mismo locus.

15 El término "sonda" según la presente invención se refiere a un oligonucleótido monocatenario que se diseña para hibridarse específicamente con ácidos polinucleicos de HLA. Preferentemente, las sondas de la invención tienen aproximadamente 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferentemente de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos. Longitudes de sondas particularmente preferidas incluyen 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos. Los nucleótidos como se usan en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

20 El término "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos monocatenaria que puede actuar de punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión de cebadores que es complementario a la cadena de ácido nucleico que va a copiarse. La longitud y la secuencia del cebador deben ser de forma que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión. Preferentemente, el cebador tiene aproximadamente 5-50 nucleótidos de longitud. La longitud y la secuencia específica dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, además de las condiciones a las que se usa el cebador, tal como temperatura y fuerza iónica. Debe entenderse que los cebadores de la presente invención pueden usarse como sondas y viceversa, a condición de que se adapten las condiciones experimentales.

25 La expresión "par de cebadores adecuado" en la presente invención se refiere a un par de cebadores que permite la amplificación específica de un fragmento de ácido polinucleico de HLA.

30 El término "región diana" de una sonda o un cebador según la presente invención es una secuencia dentro de los ácidos polinucleicos de HLA para la que la sonda o el cebador es completamente complementario o parcialmente complementario (es decir, con algún grado de desapareamiento). Debe entenderse que el complemento de dichas secuencias diana también es una secuencia diana adecuada en algunos casos.

35 "Hibridación específica" de una sonda con una región diana de los ácidos polinucleicos de HLA significa que dicha sonda forma un dúplex en parte de esta región o con la región entera bajo las condiciones experimentales usadas, y que bajo aquellas condiciones dicha sonda no forma un dúplex con otras regiones de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que va a analizarse.

40 "Hibridación específica" de un cebador con una región diana de los ácidos polinucleicos de HLA significa que, durante la etapa de amplificación, dicho cebador forma un dúplex con parte de esta región o con la región entera bajo las condiciones experimentales usadas, y que bajo aquellas condiciones dicho cebador no forma un dúplex con otras regiones de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que va a analizarse. Debe entenderse que "dúplex" como se usa por este documento significa un dúplex que conducirá a la amplificación específica.

"Amplificación específica" de un fragmento de los ácidos polinucleicos de HLA significa la amplificación del fragmento para el que los cebadores se diseñaron, y no de cualquier otro fragmento de los ácidos polinucleicos presentes en una muestra.

45 El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que emparejarse exactamente con la secuencia diana correspondiente en el molde para garantizar la apropiada amplificación está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok y col., 1990). Sin embargo, cuando los cebadores no son completamente complementarios a su secuencia diana, debe tenerse en cuenta que los fragmentos amplificados tendrán la secuencia de los cebadores y no de la secuencia diana. Los cebadores pueden marcarse con una marca de elección (por ejemplo, biotina). El procedimiento de amplificación usado puede ser tanto reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki y col., 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren y col., 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA; Guatelli y col., 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS; Kwok y col., 1989), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA; Duck, 1990) o amplificación por medio de Q $\beta$  replicasa (Lomeli y col., 1989) o cualquier otro procedimiento adecuado para amplificar moléculas de ácidos nucleicos conocido en la técnica.

55 Las secuencias de sondas y cebadores se representan por toda la memoria descriptiva como oligonucleótidos de ADN monocatenario del extremo 5' al 3'. Es obvio para el experto en la materia que cualquiera de las sondas

especificadas a continuación puede usarse como tal, o en su forma complementaria, o en su forma de ARN (en la que T está sustituido con U).

5 Las sondas según la invención pueden prepararse clonando plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las secuencias de nucleótidos correspondientes, si necesita ser por escisión de estas últimas de los plásmidos clonados usando las nucleasas adecuadas y recuperándolas, por ejemplo, por fraccionamiento según peso molecular. Las sondas según la presente invención también pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, por el procedimiento de fosfotriéster convencional.

10 Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos de nucleótidos tales como fosforotiatos (Matsukura y col., 1987), alquilfosforotiatos (Miller y col., 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen y col., 1991; Nielsen y col., 1993), o pueden contener agentes intercalantes (Asseline y col., 1984). Al igual que la mayoría de las otras variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales de la invención, estas variaciones necesitarán adaptaciones con respecto a las condiciones bajo las cuales el oligonucleótido debe usarse para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados de hibridación eventuales serán esencialmente los mismos que aquellos obtenidos con los oligonucleótidos sin modificar. La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa con el fin de influir positivamente características tales como la cinética de hibridación, reversibilidad de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas de oligonucleótidos, etc.

20 El término "soporte sólido" puede referirse a cualquier sustrato con el que una sonda de oligonucleótidos puede acoplarse, a condición de que retenga sus características de hibridación y a condición de que el nivel de hibridación de referencia permanezca bajo. Normalmente, el sustrato sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip. Antes de la aplicación a la membrana o fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico con el fin de facilitar la fijación o mejorar la eficiencia de hibridación. Tales modificaciones pueden englobar resolución de homopolímeros, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH<sub>2</sub>, grupos SH, grupos carboxílicos o acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

25 El término "marcado" se refiere al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcado puede llevarse a cabo por el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de polimerasa de la amplificación tal como se ilustra por Saiki y col. (1988) o Bej y col. (1990), o cebadores marcados, o por cualquier otro procedimiento conocido para el experto en la materia. La naturaleza de la marca puede ser isotópica (<sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).

30 La "muestra biológica" puede ser, por ejemplo, sangre, muestra de la boca o cualquier otra muestra que comprenda ADN genómico.

Para diseñar sondas con características deseadas pueden aplicarse las siguientes pautas útiles conocidas para el experto en la materia.

35 Debido a que el grado y la especificidad de las reacciones de hibridación tal como aquellas descritas en el presente documento están afectadas por varios factores, la manipulación de uno o más de aquellos factores determinará la sensibilidad y la especificidad exacta de una sonda particular, tanto si es perfectamente complementaria a su diana como si no. La importancia y el efecto de diversas condiciones de ensayo se explican adicionalmente en el presente documento.

40 \*\*La estabilidad del híbrido de ácido nucleico de [sonda : diana] debe elegirse para ser compatible con las condiciones de ensayo. Esto pueden llevarse a cabo evitando secuencias ricas en AT largas, terminando los híbridos con pares de bases G:C y diseñando la sonda con una Tf apropiada. Los puntos de inicio y fin de la sonda deben elegirse de manera que la longitud y el % de GC produzcan una Tf de aproximadamente 2-10°C superior a la temperatura a la que se realizará el ensayo final. La composición de bases de la sonda es significativa debido a que pares de bases G-C presentan mayor estabilidad térmica con respecto a pares de bases A-T debido a puentes de hidrógeno adicionales. Por tanto, la hibridación que implica ácidos nucleicos complementarios de mayor contenido de G-C será más estable a mayores temperaturas.

45 \*\* También deben tenerse en cuenta condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación bajo las que se usará una sonda cuando se diseñe una sonda. Se sabe que el grado de hibridación aumentará a medida que aumenta la fuerza iónica de la mezcla de reacción, y que la estabilidad térmica de los híbridos aumentará con fuerza iónica creciente. Por otra parte, reactivos químicos tales como formamida, urea, DMSO y alcoholes, que rompen enlaces de hidrógeno, aumentarán la rigurosidad de la hibridación. La desestabilización de los puentes de hidrógeno por tales reactivos puede reducir enormemente la Tf. En general, la hibridación óptima para sondas de oligonucleótidos sintéticas de aproximadamente 10-50 bases de longitud se produce aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo de la óptima puede permitir hibridar secuencias de bases desapareadas y, por tanto, pueden producir especificidad reducida.

55 \*\*Se desea tener sondas que se hibridan sólo en condiciones de alta rigurosidad. Bajo condiciones de alta

rigurosidad sólo se formarán híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios; no se formarán híbridos sin un grado de complementariedad suficiente. Por consiguiente, la rigurosidad de las condiciones del ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos cadenas de ácidos nucleicos que forman un híbrido. El grado de rigurosidad se elige de forma que se maximice la diferencia en la estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y el ácido nucleico no diana. \*\*Regiones en el ADN o ARN diana que se sabe que forman estructuras internas fuertes inhibitorias para la hibridación son menos preferidas. Asimismo, deberían evitarse sondas con amplia auto-complementariedad. Como se ha explicado anteriormente, la hibridación es la asociación de dos cadenas individuales de ácidos nucleicos complementarios para formar una doble cadena unida por hidrógeno. Es implícito que si una de las dos cadenas está completamente o parcialmente implicada en un híbrido, será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido. Pueden ser híbridos intramoleculares e intermoleculares formados dentro de las moléculas de un tipo de sonda si puede haber suficiente auto-complementariedad. Tales estructuras pueden evitarse mediante el cuidadoso diseño de las sondas. Diseñando una sonda de manera que una porción sustancial de la secuencia de interés sea monocatenaria, la tasa y el grado de hibridación puede aumentarse enormemente. Están disponibles programas informáticos para buscar este tipo de interacción. Sin embargo, en ciertos casos, puede no ser posible evitar este tipo de interacción.

\*\*Las condiciones de hibridación y lavado convencionales se desvelan en la sección de Materiales y procedimientos de los ejemplos. Otras condiciones son, por ejemplo, 3X SSC (solución salina de citrato de sodio), 20% de FA (formamida) desionizada a 50°C. También pueden usarse otras disoluciones (SSPE (solución salina de fosfato de sodio-EDTA), TMAC (cloruro de tetrametilamonio), etc.) y temperaturas a condición de que se mantenga la especificidad y sensibilidad de las sondas. Si se necesita, tienen que llevarse a cabo ligeras modificaciones de las sondas en longitud o en secuencia para mantener la especificidad y sensibilidad requerida bajo las circunstancias dadas.

El término “tampón de hibridación” significa un tampón que permite una reacción de hibridación entre las sondas y los ácidos polinucleicos presentes en la muestra, o los productos amplificados, bajo las condiciones de rigurosidad apropiadas.

El término “disolución de lavado” significa una disolución que permite lavar los híbridos formados bajo las condiciones de rigurosidad apropiadas.

#### Leyendas de figuras y tablas

La **Figura 1** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo de HLA DRB1\*0820. Los números se refieren a sondas del kit de 2ª generación descodificador DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). Las etapas de amplificación e hibridación se realizaron como se describe en el Ejemplo 2.

La **Figura 2** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo de HLA DRB1\*04new. Los números se refieren a sondas del kit de 2ª generación descodificador DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). Las etapas de amplificación e hibridación se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.

La **Figura 3** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo de HLA DRB4\*01new. Los números se refieren a sondas del kit de 2ª generación descodificador DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). Las etapas de amplificación e hibridación se realizaron como se describe en el Ejemplo 6.

La **Figura 4** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo HLA-B\*3913. Los números se refieren a sondas presentes en el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 8.

La **Figura 5** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo HLA-B\*1406. Los números se refieren a sondas presentes en el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 10.

La **Figura 6** representa un dibujo del resultado de un experimento de LiPA que permite el tipado del alelo HLA-B\*51new. Los números se refieren a sondas presentes en el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 12.

**Tabla 1.** Cebadores usados para la amplificación del exón 2 del alelo de HLA DRB1\*0820, el alelo de HLA DRB1\*04new y/o el alelo de HLA DRB4\*01new. Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de los cebadores. “Intrón” significa que el extremo 5' y/o el extremo 3' está/n localizado/s en un intrón.

**Tabla 2.** Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA DRB1 \*0820. La primera columna muestra números de referencia para algunas de las sondas. Las secuencias se facilitan de

5' a 3'. Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de las sondas.

**Tabla 3.** Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA DRB1\*04new. La primera columna muestra números de referencia para las sondas. Las secuencias se facilitan de 5' a 3'. Los números antes y después de las indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de las sondas.

**Tabla 4.** Sondas de oligonucleótidos que pueden usarse para el tipado del alelo de HLA DRB4\*01new. La primera columna muestra números de referencia para las sondas. Las secuencias se facilitan de 5' a 3'. Los números antes y después de las secuencias indican los codones en los que están localizados los extremos 5' y los extremos 3' de las sondas.

## Ejemplos

Ejemplo 1. Determinación de secuencias del alelo HLA-DRB1\*0820.

El alelo DRB1\*0820 estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico. La muestra se recogió por el Dr. Bart Vandekerckhove del laboratorio de inmunohematología en el Bloedtransfusiecentrum Oost-Vlaanderen en Bélgica. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con la mezcla de cebadores múltiples que consiste en cebadores con SEC ID N° 4 a 9 como cebador de 5' y DRBP3'gen (SEC ID N° 10) como cebador del extremo 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*0820:

```

CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT ACG TCT GAG TGT CAT TTC TTC AAT
GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC TTC TAT AAC CAA
GAG GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG
GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG
AAG GAC TTC CTG GAA GAC AGG CGG GCC CTG GTG GAC ACC TAC TGC
AGA CAC AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA
(SEC ID N° 1)

```

Ejemplo 2. Tipado del alelo DRB1\*0820

El siguiente procedimiento para el tipado del alelo DRB1\*0820 en una muestra se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extrae ADN de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 1. Para la etapa de amplificación pueden usarse diferentes mezclas de cebadores: tanto un par de cebadores genéricos (tal como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10) como un cebador múltiple (tal como la mezcla compuesta por los cebadores con SEC ID N° 4 a SEC ID N° 9) combinado con un cebador genérico (tal como SEC ID N° 10) o un cebador genérico combinado con un cebador que engloba el codón dimórfico 86 (tal como SEC ID N° 3 con SEC ID N° 12). La reacción de amplificación se lleva a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La reacción de PCR está compuesta por 1 etapa de 5 min a 95°C, 35 ciclos de tres etapas (30 s a 95°C, 20 s a 58°C, 30 s a 72°C) y 1 etapa de 10 min a 72°C. El alelo DRB1\*0820 puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Un conjunto de sondas compuesto por las sondas con SEC ID N° 13 a SEC ID N° 17 es suficiente para permitir la diferenciación entre el alelo DRB1\*0820 y cualquier otro alelo DRB1 presentemente conocido al nivel alélico. Sin embargo, en muestras

clínicas están presentes dos alelos DRB1 diferentes, que complica el análisis y necesita el uso de un gran número de sondas. El tipado se complica incluso más por el hecho de que también existen alelos DRB asociados (DRB3, DRB4, DRB5), que muestran amplia homología de secuencias con los alelos DRB1. En la Figura 1, por ejemplo, se llevó a cabo una reacción de amplificación con los cebadores genéricos DRBp5'gen (SEC ID N° 3) y DRBp3'gen (SEC ID N° 10), en las condiciones explicadas brevemente anteriormente. El producto amplificado se sometió a un ensayo de hibridación inversa usando el kit de 2ª generación descodificador DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Este kit comprende un panel de 62 sondas de oligonucleótidos, que incluye las sondas con SEC ID N° 13 a 17 de la Tabla 2. La Figura 1 muestra el resultado del ensayo de hibridación. Los números indican las diferentes sondas que están presentes sobre la tira. De este resultado puede determinarse que el alelo DRB1\*0820 está presente en la muestra, en combinación con los alelos previamente descritos DRB1\*04012 y los alelos asociados DRB4\*01011 y DRB4\*0103 (estos alelos asociados tienen secuencias idénticas en el exón 2). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo DRB1\*0820 se hibrida con las sondas (líneas) 9, 21, 25, 26 y 44 sobre la tira (correspondientes a SEC ID N° 13, 16, 15, 14 y 17 respectivamente).

Ejemplo 3. Determinación de secuencias del alelo HLA-DRB1\*04new.

El alelo DRB1\*04new estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico. La muestra se recogió por el Dr. P. Jindra del Hematologicko-onkologicke odd en Plzen, República checa. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

En un primer experimento, el exón 2 se clonó en el vector pGEMt (Promega, Madison, WI, EE.UU.) después de la amplificación con el cebador DRBp5'gen (SEC ID N° 3) como cebador de 5' y DRBp3'gen (SEC ID N° 10) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,041% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los cebadores SP6 y T7 proporcionados por Eurogentec (Seraing, Bélgica). Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*04new:

```

G ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAG GTT AAA CCT GAG
TGT   CAT TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC
TTC TAT   CAC CAA GAG GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG
TAC CGG GCG   GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC GAG TAC TGG AAC
AGC CAG AAG GAC   CTC CTG GAG CAG AAG CGG GCC GCG GTG GAC ACC TAC
TGC AGA CAC AAC TAC   GGG GTT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA
(SEC ID N° 68)

```

La posición de los cebadores genéricos usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

En un segundo experimento, el exón 2 se amplificó con el cebador DRBp5'DR4 (SEC ID N° 52) como cebador de 5' y DRBp3'gen (SEC ID N° 10) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*04new:

```

A CGT TTC TTG GAG CAG GTT AAA CCT GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG ACG
GAG   CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA TAC TTC TAT CAC CAA GAG GAG TAC
GTG CGC   TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG GTG ACG GAG CTC
GGG CGG CCT   GAT GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GAC CTC CTG GAG
CAG AAG CGG GCC   GCG GTG GAC ACC TAC TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTT
GGT GAG AGC TTC ACA   GTG CAG CGG CGA   (SEC ID N° 69)

```

5

La posición de los cebadores usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

Ejemplo 4. Tipado del alelo DRB1\*04new.

El siguiente procedimiento para el tipado del alelo DRB1\*04new en una muestra se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extrae ADN de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 3. Para la etapa de amplificación pueden usarse diferentes mezclas de cebadores: tanto un par de cebadores genéricos (tal como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10) como un cebador múltiple (tal como la mezcla compuesta por los cebadores con SEC ID N° 4 a SEC ID N° 9 o la mezcla compuesta de cebadores con SEC ID N° 4, 5, 52, 7, 8 y 9) combinado con un cebador genérico (tal como SEC ID N° 10) o un cebador genérico combinado con un cebador que engloba el codón dimórfico 86 (tal como SEC ID N° 3 con SEC ID N° 12). La reacción de amplificación se lleva a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200 μM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La reacción de PCR está compuesta por 1 etapa de 5 min a 95°C, 35 ciclos de tres etapas (30 s a 95°C, 20 s a 58°C, 30 s a 72°C) y 1 etapa de 10 min a 72°C. El alelo DRB1\*04new puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Un conjunto de sondas compuesto por las sondas con SEC ID N° 55 a SEC ID N° 61 es suficiente para permitir la diferenciación entre el alelo DRB1\*04new y cualquier otro alelo DRB1 presentemente conocido al nivel alélico. Sin embargo, en muestras clínicas están presentes dos alelos DRB1 diferentes, que complica el análisis y necesita el uso de un gran número de sondas. El tipado se complica incluso más por el hecho de que también existen alelos DRB asociados (DRB3, DRB4, DRB5), que muestran amplia homología de secuencias con los alelos DRB1. En la Figura 2, por ejemplo, se llevó a cabo una reacción de amplificación con los cebadores genéricos DRBp5'gen (SEC ID N° 3) y DRBp3'gen (SEC ID N° 10), en las condiciones explicadas brevemente anteriormente. El producto amplificado se sometió a un ensayo de hibridación inversa usando el kit de 2ª generación descodificador DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Este kit comprende un panel de 62 sondas de oligonucleótidos, que incluye las sondas con SEC ID N° 55 a 61 de la Tabla 3. La Figura 2 muestra el resultado del ensayo de hibridación. Los números indican las diferentes sondas que están presentes sobre la tira. De este resultado puede determinarse que el alelo DRB1\*04new (líneas 12, 26, 36, 37, 42, 43, 56) está presente en la muestra, en combinación con los alelos previamente descritos DRB1\*1104 (líneas 2, 9, 25, 30, 33, 44, 56) y dos de los alelos asociados DRB4\*01011 (líneas 15, 36, 41, 44, 60, 62) y DRB3\*0202 (líneas 6, 26, 36, 43, 60). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo DRB1\*04new se hibrida con las sondas (líneas) 12, 26, 36, 37, 42, 43 y 56 sobre la tira (correspondientes a SEC ID N° 55, 58, 60, 61, 56, 57 y 59 respectivamente).

35

Ejemplo 5. Determinación de secuencias del alelo HLA-DRB4\*01new.

El alelo DRB4\*01new estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico. La muestra se recogió por el Dr. Bohuslava Jilkova del HLA-Laboratory en Hradec Kralove, República checa. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

40

En un primer experimento, el exón 2 se clonó en el vector pGEMt (Promega, Madison, WI, EE.UU.) después de la amplificación con el cebador DRBp5'intron (SEC ID N° 53) como cebador de 5' y DRBp3'intron (SEC ID N° 107) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:

45

5 min a 95°C

35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)

10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001%

- (peso/volumen) de gelatina; 200  $\mu$ M de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los cebadores SP6 y T7 proporcionados por Eurogentec (Seraing, Bélgica). Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB4\*01new:

```

AC CGG ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAG GCT AAG TGT
GAG TGT CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG CGA GTG TGG AAC CTG ATC AGA TAC
ATC TAT AAC CAA GAG GAG TAC GCG CGC TAC AAC AGT GAT CTG GGG GAG TAC
CAG GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAC GCT GAG TAC TGG AAC AGC CAG
AAG GAC CTC CTG GAG CGG AGG CGG GCC GAG GTG GAC ACC TAC TGC AGA TAC
AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA GAG CAT GGT
GGA GGG CGG G (SEC ID N° 70)

```

La posición de los cebadores usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

- 10 En un segundo experimento, el exón 2 se amplificó con el cebador DRB4p5' (SEC ID N° 54) como cebador de 5' y DRBp3'gen (SEC ID N° 10) como cebador de 3'. El ciclo de reacción de PRC estuvo compuesto por las siguientes etapas:
- 5 min a 95°C
  - 35 veces (30 s a 95°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C)
  - 15 10 min a 72°C.

- La reacción de PCR se llevó a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200  $\mu$ M de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvo la siguiente secuencia, correspondiente al exón 2 del alelo DRB1\*04new:

```

TAA GTG TGA GTG TCA TTT CCT CAA TGG GAC GGA GCG AGT GTG GAA CCT GAT
CAG ATA CAT CTA TAA CCA AGA GGA GTA CGC GCG CTA CAA CAG TGA TCT GGG
GGA GTA CCA GCG GGT GAC GGA GCT GGG GCG GCC TGA CGC TGA GTA CTG GAA
CAG CCA GAA GGA CCT CCT GGA GCG GAG GCG GGC CGA GGT GGA CAC CTA CIG
CAG ATC AAC TAC GGG GTT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA
(SEC ID N° 71)

```

- 25 La posición de los cebadores usados para la amplificación del exón 2 se muestra en negrita.

Ejemplo 6. Tipado del alelo DRB4\*01new.

- El siguiente procedimiento para el tipado del alelo DRB4\*01new en una muestra se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extrae ADN de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 5. Para la etapa de amplificación pueden usarse diferentes combinaciones de cebadores de 5' y de 3': por ejemplo, tanto un par de cebadores genéricos (tal como SEC ID N° 3 y SEC ID N° 10 o SEC ID N° 53 y SEC ID N° 107) como un cebador específico tal como SEC ID N° 54, posiblemente en una mezcla compuesta por otros cebadores de 5' usados para la amplificación de diferentes alelos DRB (por ejemplo SEC ID N° 4 a 9) combinado con un cebador genérico (tal como SEC ID N° 10 ó 107) o un cebador genérico combinado con un cebador que engloba el codón dimórfico 86 (tal como SEC ID N° 3 con SEC ID N° 12). La reacción de amplificación se lleva a cabo en Tris-HCl 10 mM a pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001% (peso/volumen) de gelatina; 200  $\mu$ M de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (concentraciones finales) y 20 pmoles de cada cebador y 1 U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La reacción de PCR está compuesta por 1 etapa de 5 min a 95°C, 35 ciclos de tres etapas (30 s a 95°C, 20 s a 58°C, 30 s a 72°C) y 1 etapa de 10 min a 72°C. El alelo DRB4\*01new puede tiparse

posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Un conjunto de sondas compuesto por las sondas con SEC ID N° 62 a SEC ID N° 66 es suficiente para permitir la diferenciación entre el alelo DRB4\*01new y cualquier otro alelo DRB4 presentemente conocido al nivel alélico. El tipado se complica incluso más por el hecho de que también existen alelos DRB1 y otros alelos asociados (DRB3, DRB4, DRB5) que muestran amplia homología de secuencias con los alelos DRB4. Esto complica el análisis y necesita el uso de un gran número de sondas. En la Figura 3, por ejemplo, se llevó a cabo una reacción de amplificación con los cebadores genéricos DRBp5'gen (SEC ID N° 3) y DRBp3'gen (SEC ID N° 10), en las condiciones explicadas brevemente anteriormente. El producto amplificado se sometió a un ensayo de hibridación inversa usando el kit de 2ª generación descodificador DRB (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Este kit comprende un panel de 62 sondas de oligonucleótidos, que incluye las sondas con SEC ID N° 62 a 66 de la Tabla 4. La Figura 3 muestra el resultado del ensayo de hibridación. Los números indican las diferentes sondas que están presentes sobre la tira. De este resultado puede determinarse que el alelo DRB4\*01new está presente en la muestra, en combinación con los alelos previamente descritos DRB1\*0403 (líneas 15, 20, 26, 36, 37, 42, 44), DRB1\*1301 (líneas 9, 16, 23, 26, 28, 30, 44, 56) y DRB3\*0206 (líneas 6, 26, 36, 43). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo DRB4\*01new se hibrida con las sondas (líneas) 15, 36, 44, 60 y 62 sobre la tira (correspondientes a SEC ID N° 62, 63, 64, 65 y 66 respectivamente).

Ejemplo 7. Determinación de secuencias del alelo HLA-B\*3913.

El alelo B\*3913 estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico brasileño. La muestra se recogió por el Dr. ME Moraes del Lab de Immunogenética, HSE/INCA, Río de Janeiro, Brasil. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con cebadores IBPIN1 e IBPIN3. La reacción de PCR consistió en las siguientes etapas:

- 1 min a 96°C
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 64°C; 50 s a 72°C)
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 62°C; 50 s a 72°C)
- 10 veces (30 s a 95°C; 50 s a 60°C; 50 s a 72°C)
- 15 veces (30 s a 95°C; 50 s a 55°C; 50 s a 72°C)
- 10 min a 72°C

La reacción de amplificación se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM a pH 9,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, 200 µM de dNTP, 2,5 U de Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 µg de ADN. El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron las siguientes secuencias, correspondiente al exón 2 y al exón 3 del alelo B\*3913:

```

GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGC
TTCACTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAAGTTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAG
TCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCGGAGTATTGGACCGGG
AGACACAGATCTCCAAGACCAACACACAGACTTACCAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGC
TACTACAACCAGAGCGAGGCCG                                Exón 2 (SEC ID N° 22)

```

```

GGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGC
GGGCATAACCAGTTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTC
CTGGACCGCGGGCGGACACCCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGTGTGG
CGGAGCAGCTGAGAACCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAG
AACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGG                                Exón 3 (SEC ID N° 23)

```

Ejemplo 8. Tipado del alelo B\*3913.

El siguiente procedimiento, que puede usarse para tipar el alelo B\*3913 en una muestra, se basa en la tecnología de

LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extraen ácidos nucleicos de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 7. Para la etapa de amplificación se usa el par de cebadores IBPIN1 (SEC ID N° 26) e IBPIN3 (SEC ID N° 27). La reacción de PCR se realiza bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 7. El alelo HLA-B\*3913 puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Por ejemplo, la Figura 4 muestra el resultado de un ensayo de hibridación inversa según la técnica de LiPA. Después de una etapa de amplificación como se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron con un panel de 60 sondas usando el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Del resultado mostrado en la Figura 4 puede derivarse que la muestra contuvo el alelo HLA-B\*3913, en combinación con el alelo HLA-B\*52012 conocido. Los números en la Figura 4 indican sondas que están presentes sobre la tira (obsérvese que estas sondas no son las mismas sondas que aquellas en las Figuras 1-3). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo HLA-B\*3913 se hibrida con las siguientes sondas (líneas) sobre la tira: 2 (SEC ID N° 30), 7 (SEC ID N° 32), 10 (SEC ID N° 34), 13 (SEC ID N° 35), 18 (SEC ID N° 36), 19 (SEC ID N° 37), 26 (SEC ID N° 39), 28 (SEC ID N° 42), 36 (SEC ID N° 47), 38 (SEC ID N° 45), 50 (SEC ID N° 38), 53 (SEC ID N° 43) y 56 (SEC ID N° 28).

15 Ejemplo 9. Determinación de secuencias del alelo HLA-B\*1406.

El alelo B\*1406 estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico belga. La muestra se recogió por el Dr. MP Emonds del Bloodtransfusion Center, Lovaina, Bélgica. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con cebadores IBPIN1 e IBPIN3. La reacción de PCR consistió en las siguientes etapas:

- 1 min a 96°C
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 64°C; 50 s a 72°C)
- 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 62°C; 50 s a 72°C)
- 10 veces (30 s a 95°C; 50 s a 60°C; 50 s a 72°C)
- 15 veces (30 s a 95°C; 50 s a 55°C; 50 s a 72°C)
- 10 min a 72°C

La reacción de amplificación se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM a pH 9,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, 200 μM de dNTP, 2,5 U Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 μg de ADN. El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron las siguientes secuencias, correspondiente al exón 2 y al exón 3 del alelo B\* 1406:

```
GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGC
TTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGAGGTTGACAGCGACGCCGCGAG
TCCGAGAGAGGAGCCCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAATATTGGGACCGGA
ACACACAGATCTGCAAGACCAACACACAGACTGACCGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGC
TACTACAACCAGAGCGAGGCCG      Exón 2   (SEC ID N° 72)

GGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGC
GGGTATAACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTC
CTGGACCGCGGCGGACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGAGG
CGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGSCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAG
AACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGG      Exón 3   (SEC ID N° 73)
```

35

Ejemplo 10. Tipado del alelo B\*1406.

El siguiente procedimiento, que puede usarse para tipar el alelo B\*1406 en una muestra, se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extraen ácidos nucleicos de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 9. Para la etapa de amplificación se usa el par de cebadores IBPIN1 (SEC ID N° 26) e

5 IBPIN3 (SEC ID N° 27). La reacción de PCR se realiza bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 9. El alelo HLA-B\*1406 puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Por ejemplo, la Figura 5 muestra el resultado de un ensayo de hibridación inversa según la técnica de LiPA. Después de una etapa de amplificación como se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron con un panel de 60 sondas usando el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Del resultado mostrado en la Figura 5 puede derivarse que la muestra contuvo el alelo HLA-B\*1406. Los números en la Figura 5 indican sondas que están presentes sobre la tira (obsérvese que estas sondas no son las mismas sondas que aquellas en las Figuras 1-3). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo HLA-B\*1406 se hibrida con las siguientes sondas (líneas) sobre la tira: 2 (SEC ID N° 30), 7 (SEC ID N° 32), 9 (SEC ID N° 79), 16 (SEC ID N° 80), 17 (SEC ID N° 81), 19 (SEC ID N° 37), 26 (SEC ID N° 83), 31 (SEC ID N° 87), 36 (SEC ID N° 47), 50 (SEC ID N° 82) y 55 (SEC ID N° 89).

Ejemplo 11. Determinación de secuencias del alelo HLA-B\*51new.

15 El alelo B\*51new estaba presente en una muestra de sangre de un donante caucásico brasileño. La muestra se recogió por el Dr. ME Moraes del Lab de Immunogenética, HSE/INCA, Río de Janeiro, Brasil. Se prepararon ácidos polinucleicos a partir de la muestra de sangre usando el kit de sangre QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó una etapa de amplificación con cebadores IBPIN1 e IBPIN3. La reacción de PCR consistió en las siguientes etapas:

1 min a 96°C

20 5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 64°C; 50 s a 72°C)

5 veces (30 s a 95°C; 50 s a 62°C; 50 s a 72°C)

10 veces (30 s a 95°C; 50 s a 60°C; 50 s a 72°C)

15 veces (30 s a 95°C; 50 s a 55°C; 50 s a 72°C)

10 min a 72°C

25 La reacción de amplificación se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM a pH 9,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, dNTP 200 μM, 2,5 U Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 μg de ADN. El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron las siguientes secuencias, correspondiente al exón 2 y al exón 3 del alelo B\*51new:

```
GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCGCCGIGTCCCGGCCCGCCGGCGGGGAGCCCCGC
TTCATCTCAGTGGGCTACGTTGACGACACGCAGTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAG
TCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGAATATTGGGACCCGA
ACACACAGATCTGCAAGACCAACACACAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGC
TACTACAACCAGAGCGAGGCCG          Exón 2 (SEC ID N° 74)
```

```
GGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGC
GGGTATAACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTC
CTGGACCGCGGGCGACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGTGAGG
CGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAG
AACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCG          Exón 3 (SEC ID N° 75)
```

Ejemplo 12. Tipado del alelo B\*51new.

35 El siguiente procedimiento, que puede usarse para tipar el alelo B\*1406 en una muestra, se basa en la tecnología de LiPA (Stuyver y col., 1993). Se extraen ácidos nucleicos de una muestra de sangre con el kit de sangre QIAamp, como se indica en el Ejemplo 11. Para la etapa de amplificación se usa el par de cebadores IBPIN1 (SEC ID N° 26) e IBPIN3 (SEC ID N° 27). La reacción de PCR se realiza bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 11. El alelo HLA-B\*51new puede tiparse posteriormente por una etapa de hibridación inversa con un panel de sondas de oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una tira de nitrocelulosa. Por ejemplo, la Figura 6 muestra el resultado de

un ensayo de hibridación inversa según la técnica de LiPA. Después de una etapa de amplificación como se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron con un panel de 60 sondas usando el kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Del resultado mostrado en la Figura 6 puede derivarse que la muestra contuvo el alelo HLA-B\*51new, en combinación con el alelo HLA-B\*1501 conocido. Los números en la Figura 6 indican sondas que están presentes sobre la tira (obsérvese que estas sondas no son las mismas sondas que aquellas en las Figuras 1-3). El fragmento de ácido nucleico amplificado del alelo HLA-B\*51new se hibrida con las siguientes sondas (líneas) sobre la tira: 3 (SEC ID N° 90), 6 (SEC ID N° 91), 9 (SEC ID N° 79), 14 (SEC ID N° 92), 18 (SEC ID N° 93), 23 (SEC ID N° 98), 31 (SEC ID N° 87), 35 (SEC ID N° 99), 46 (SEC ID N° 94), 49 (SEC ID N° 95), 52 (SEC ID N° 100), 55 (SEC ID N° 89).

## 10 Referencias

- Andersson G, Larhammar D, Widmark E, Serenius B, Peterson PA y Rask L (1987) Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DRbeta genes. *J. Biol. Chem* 262:8748-8758.
- Apple RJ y Erlich HA (1996) HLA classII genes: structure and diversity. Chapter 5 HLA and MHC: genes, molecules and function. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.
- Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F y Thuong N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3297-3301.
- Barany F (1991) The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl.* 1:5-16.
- Bej A, Mahbubani M, Miller R, Di Cesare J, Haff L y Atlas R (1990) Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol. Cell Probes* 4:353-365.
- Campbell RD y Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunology Today* 14:349-352.
- Clay TM, Culpán D, Howell WM, Sage DA, Bradley BA y Bidwell JL (1994) UHG crossmatching. A comparison with PCR-SSO typing in the selection of HLA-DPB-compatible bone marrow donors. *Transplantation* 58: 200-207.
- Compton J (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350: 91-92.
- Duck P (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques* 9: 142-147.
- Guatelli J, Whitfield K, Kwoh D, Barringer K, Richman D y Gengeras T (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878.
- Hirschorn K, Bach F, Kolodny RL y Firschen IL (1963) Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* 142: 1185-1187.
- Kissmeyer NF, Svejgaard A y Hauge M (1969) The HLA system defined with lymphocytotoxic and platelet antibodies in relation to kidney transplantation. *Transplant. Proc.* 1: 357-361.
- Kwoh D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, Dimichele L y Gengeras T (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177.
- Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C y Sinisky J (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.* 18: 999-1005.
- Landgren U, Kaiser R, Sanders J y Hood L (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241:1077-1080.
- Lomeli H, Tyagi S, Pritchard C, Lisardi P y Kramer F (1989) Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin. Chem.* 35: 1826-1831.
- Mach B y Tiercy J-M (1991) Genotypic typing of HLA class II: from the bench to the bedside. *Hum. Immunol.* 30: 278-284.
- Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J y Broder S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7706-7710.

- Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K y Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18: 5134-5143.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Gold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1: 263-273.
- 5 Mullis KB y Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Nielsen P, Egholm M, Berg R y Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254:1497-1500.
- 10 Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic-Acids-Res.* 21:197-200.
- Olerup O y Zetterquist H (1991) HLA-DRB1\*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 37: 197-204.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn G, Mullis KB y Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.
- 15 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH y Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230-6234.
- 20 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Santamaria P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL, Barbosa JJ, Faras AJ y Rich SS (1992) HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB and DQA genes. *Hum. Immunol.* 33: 69-81.
- Santamaria P, Lindstrom AL, Boyce JM, Jacino MT, Myster SH, Barbosa JJ, Faras AJ y Rich SS (1993) HLA class I sequence-based typing. *Hum. Immunol.* 37: 39-50.
- 25 Spencer WR y Parham P (1996) HLA class I genes: structure and diversity. Chapter 4. *HLA and MHC: genes, molecules and function*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.
- Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborcht B, Van Heuverswyn H y Maertens G (1993) Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 74: 1093-1102.
- 30 Terasaki PH y McClelland JD (1964) Microdotlet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998-1007.
- Townsend A y Bodmer H (1989) Antigen recognition by Class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 601-624.
- Wu D y Wallace B (1989) The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 4: 560-569.
- 35 Yang SY (1987) A standardised method for detection of HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis. *Immunobiology of HLA. Histocompatibility testing* (ed. B Dupont). Springer-Verlag, New York, USA. pp. 332-335.
- Yoshida M, Kimura A, Numano F y Sasazuki T (1992) Polymerase-chain-reaction-based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum. Immunol.* 34: 257-266.
- 40

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para el tipado de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new en una muestra, definiéndose el exón 2 de dichos alelos por SEC ID N° 1, SEC ID N° 50 y SEC ID N° 67, respectivamente; en el que dicho procedimiento comprende:
  - 5           i) amplificar un fragmento que comprende todo o parte del exón 2 de dicho alelo usando al menos un par adecuado de cebadores;
  - ii) determinar la ausencia o presencia de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new en la muestra.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la presencia o ausencia de los alelos se determina por el uso de un conjunto de sondas, hibridándose las sondas de dicho conjunto específicamente con regiones diana que comprenden uno o más nucleótidos polimórficos en el exón 2 o en el exón 3 de dichos alelos.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado adicionalmente porque dichos nucleótidos polimórficos tienen las siguientes posiciones en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 67:
 

15           9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 35, 44, 61, 64, 65, 67, 69, 71, 75, 76, 78, 81, 84, 89, 92, 95, 96, 97, 99, 100, 104, 106, 127, 136, 146, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 165, 166, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 203, 205, 207, 208, 209, 217, 218, 219, 220, 221, 237, 239, 241, 244, 245, 251 y 257; y

            las siguiente posiciones en SEC ID N° 50:

20           5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 29, 31, 40, 57, 60, 61, 63, 65, 67, 71, 72, 74, 77, 80, 85, 88, 91, 92, 93, 95, 96, 100, 102, 123, 132, 142, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 161, 162, 182, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 199, 201, 203, 204, 205, 213, 214, 215, 216, 217, 233, 235, 237, 240, 241, 247, 253.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado adicionalmente porque dichos cebadores se eligen de SEC ID N° 3 a 12, SEC ID N° 52 a 54 y SEC ID N° 107.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado adicionalmente porque dichas sondas se eligen de:
 

25           SEC ID N° 13 a 21 para el tipado de HLA-DRB1\*0820;

            SEC ID N° 55 a 61 para el tipado de HLA-DRB1\*04new; y/o

            SEC ID N° 62 a 66 para el tipado de HLA-DRB4\*01new.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que las sondas se inmovilizan sobre un soporte sólido.
7. Uso de un ácido polinucleico aislado que consiste en el gen HLA-DRB1\*0820 y que comprende la secuencia que consiste en el exón 2 del alelo HLA-DRB1\*0820 definido por SEC ID N° 1, o cualquier fragmento de SEC ID N° 1 que consiste en 10 a 25 nucleótidos, como un cebador o como una sonda para el tipado de dicho alelo.
8. Uso de un ácido polinucleico aislado que consiste en el gen HLA-DRB1\*04new y que comprende la secuencia que consiste en el exón 2 del alelo HLA-DRB1\*04new definido por SEC ID N° 50, o un ácido polinucleico aislado que consiste en el gen HLA-DRB4\*01new y que comprende la secuencia que consiste en el exón 2 del alelo HLA-DRB4\*01new definido por SEC ID N° 67, o cualquier fragmento de SEC ID N° 50 o SEC ID N° 67 que consiste en al menos 10 nucleótidos, como un cebador o como una sonda para el tipado de dicho alelo.
9. Uso de al menos un cebador y/o una sonda como se define en la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para la fabricación de un kit de diagnóstico para el tipado de los alelos HLA-DRB1\*0820, HLA-DRB1\*04new y/o HLA-DRB4\*01new.
10. Un fragmento de proteína como se define por SEC ID N° 2, codificado por SEC ID N° 1, y/o un fragmento de proteína como se define por SEC ID N° 51, codificado por SEC ID N° 50.

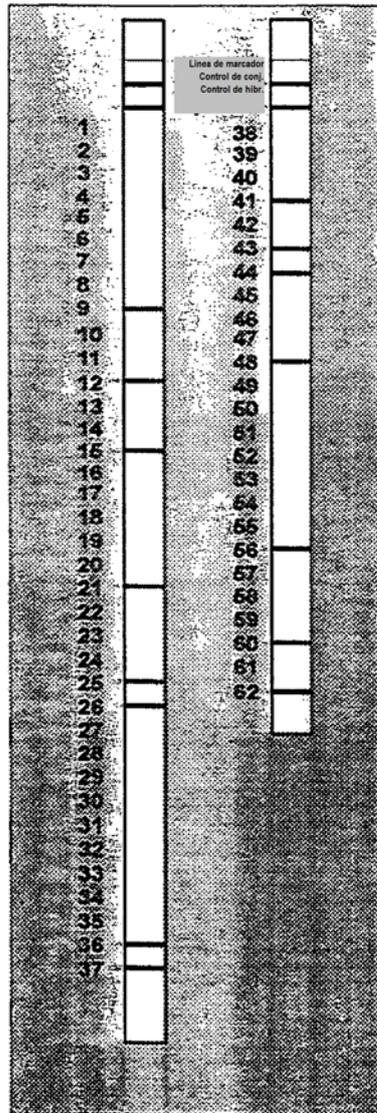


Figura 1

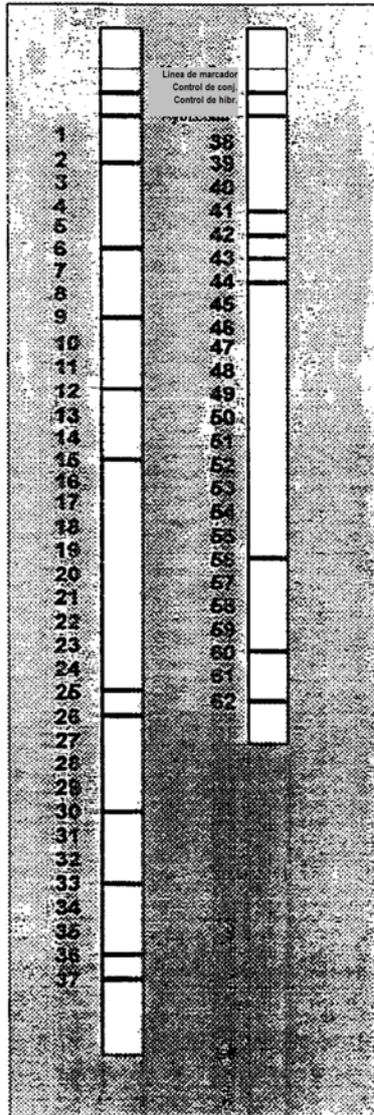


Figura 2

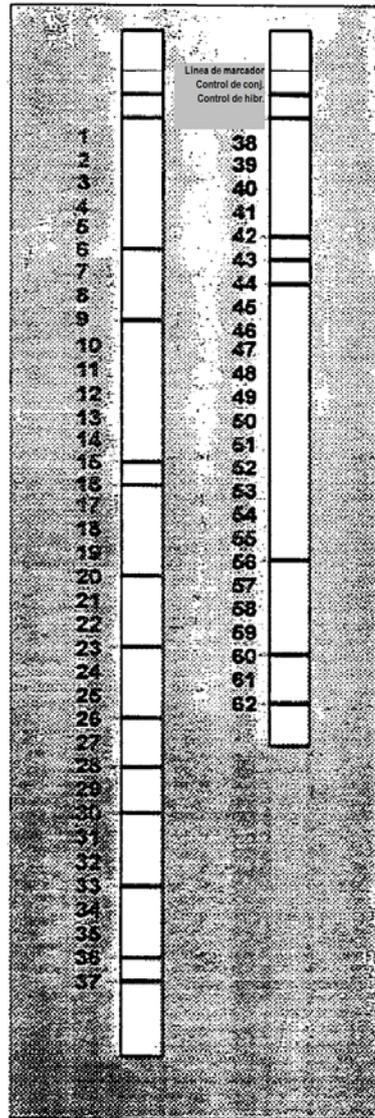


Figura 3

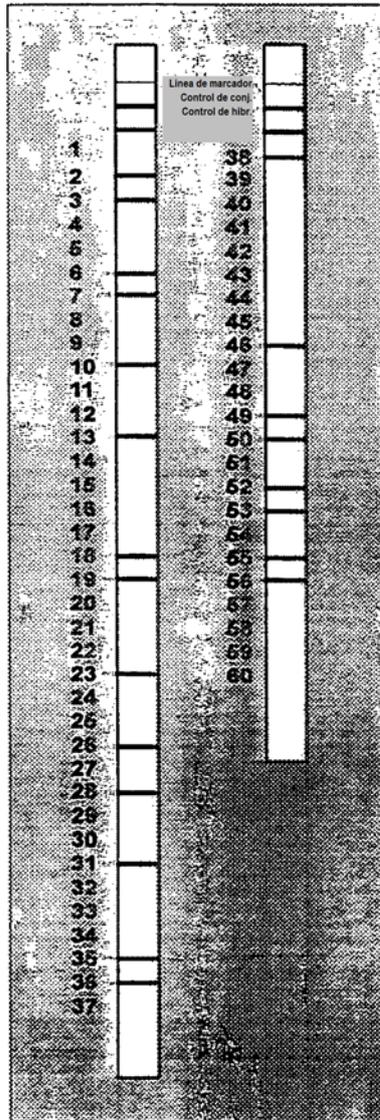


Figura 4

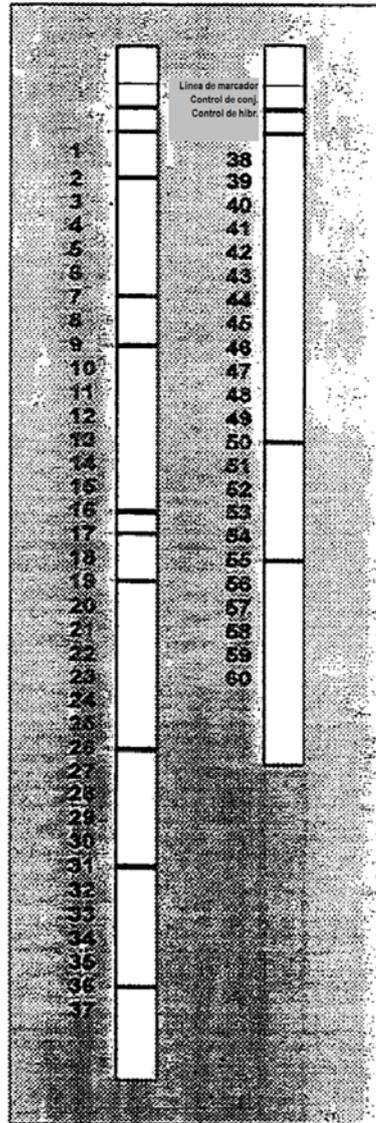


Figura 5

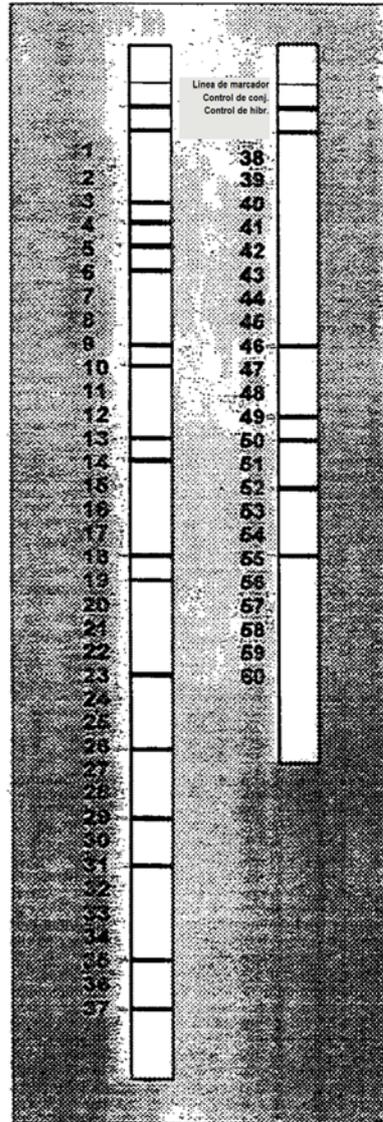


Figura 6