

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 097**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2006 E 06740852 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **02.01.2008 EP 1871906**

54 Título: **Genotipificación de loci de HLA**

30 Prioridad:

08.04.2005 US 669760 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.01.2013

73 Titular/es:

**LINKAGE BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
890 Dubuque Avenue
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

ANTOVICH, ZACHARY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 394 097 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

Genotipificación de loci de HLA

5 **Campo de la invención**

Métodos para detectar secuencias de nucleótidos y genotipificar loci complejos.

10 **Antecedentes de la invención**

10 El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de humanos es un grupo de genes localizados en el sexto cromosoma. Los genes del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) se localizan en este complejo y codifican proteínas que presentan antígeno de la superficie celular. Estas proteínas tienen un importante papel en la capacidad del sistema inmune para reconocer "lo propio" frente a "lo ajeno" y son un factor de gran importancia que influye en la inmunidad, la autoinmunidad, la enfermedad genética y el trasplante de tejidos. Las proteínas HLA se dividen en tres clases: Clase I (HLA A, B, C, etc.), Clase II (HLA DR, DQ, DP, etc.) y Clase III, que incluyen otros componentes, tales como proteínas del complemento y citoquinas. Los genes de las Clases I y II son altamente polimórficos, lo que da como resultado una tremenda diversidad genética entre la población humana.

20 La tipificación del HLA es un procedimiento mediante el cual se identifica una proteína o genotipo HLA de un individuo. Habitualmente se realiza la tipificación del HLA antes del trasplante de órganos sólidos. La compatibilidad del HLA de un paciente y un donante puede reducir el rechazo inmunológico y mejorar los resultados de supervivencia (Takemoto *et al.*, Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation, The New England Journal of Medicine, 12 de Oct. de 2000, 343 (15): 1078-84). También se usa la tipificación del HLA en una amplia variedad de otras aplicaciones, incluyendo las pruebas de paternidad, el análisis forense, las pruebas de enfermedades genéticas y la investigación biomédica general.

30 Históricamente, la tipificación del HLA era realizada utilizando técnicas serológicas; sin embargo, estas técnicas no pueden diferenciar entre muchos de los alelos que se sabe existen en la población. Los métodos de genotipificación basados en ADN más recientes son más informativos y están encontrando una amplia aceptación. Existen tres métodos comunes de genotipificación del HLA: (1) Secuenciación directa del ADN, que requiere una etapa de amplificación por PCR y procedimientos caros de secuenciación; este método es utilizado para descubrir nuevos alelos y cuando se requiere una tipificación de alta resolución. (2) PCR con Sonda Oligonucleotídica Específica de Secuencia (SSOP-PCR), que requiere una etapa de amplificación por PCR, una etapa de inmovilización, una etapa de detección con sonda y una etapa de análisis. (3) PCR con Cebado Específico de Secuencia (SSP-PCR), que requiere una etapa de amplificación por PCR, una etapa de electroforesis en gel y una etapa de análisis. Downing *et al.*, 2004, 8(3): 301-312, describen la tipificación de HLA de cinco loci de voluntarios donantes de células madre hematopoyéticas utilizando SSP-PCR. Tiemann *et al.*, 2002, 47: 131-134, describen la tipificación rápida del ADN del alelo HLA-B27 por PCR en tiempo real utilizando tecnología LightCycler. Slateva *et al.*, 2002, Tissue Antigens, 59(2), suplemento 13, describe la fluorotipificación de HLA-DRB basada en curvas de fusión mediadas por SYBR Green.

45 Los tres métodos consumen tiempo y son realizados por tecnólogos médicos altamente entrenados. La secuenciación directa del HLA es innecesaria y demasiado cara para la mayoría de las necesidades de tipificación. La SSOP-PCR requiere mucha mano de obra a menos que se emplee maquinaria cara para automatizar los procedimientos. La SSP-PCR también requiere mucha mano de obra, pero puede ser el método más simple de llevar a cabo. Con la SSP-PCR, se utiliza el poder de discriminación de la PCR para amplificar alelos o grupos de alelos específicos. Se diseñan cebadores oligonucleotídicos para solaparse con regiones polimórficas. Los cebadores que se hibridan por completo con estas regiones tienen una temperatura de fusión (T_f) mayor que los pares mal emparejados y facilitan la amplificación. Los cebadores mal emparejados no consiguen amplificar. La genotipificación de un locus de HLA mediante SSP-PCR requiere múltiples reacciones PCR, suficientes para definir cada alelo o grupo de alelos. Por ejemplo, el gen HLA-A solo tiene 262 alelos y aproximadamente 25 familias de alelos, según definen Schreuder, G. *et al.*, The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB 1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -Q, -DR and -DQ antigens, Tissue Antigens 2005, 65: 1-55. Véase también Krausa y Browning, A comprehensive PCR-SSP typing system for identification of HLA-A locus alleles, Tissue Antigens, 1996, 47: 237-144.

60 La tecnología SSP-PCR es comúnmente utilizada para realizar la genotipificación de HLA de cadáveres donantes de órganos. Frecuentemente, este trabajo se realiza tarde por la noche, cuando, lamentablemente, llegan muchas víctimas de accidentes a los hospitales o a los depósitos de cadáveres. Se recogen los órganos donados y se guardan en hielo a la espera de trasplante. Mientras tanto, se envían muestras de sangre de los cadáveres donantes a los laboratorios de diagnóstico para realizar la tipificación del HLA. El tiempo de isquemia de los órganos es inversamente proporcional al éxito en el trasplante, por lo que resulta crítico un tiempo rápido de entrega de la tipificación del HLA. Cuanto antes se pueda trasplantar el órgano, mejor. La tipificación del HLA es con frecuencia la

variable limitante del tiempo en este proceso. El análisis posterior a la ejecución después de la SSP-PCR es un proceso largo que requiere electroforesis en gel, documentación de datos y evaluación de datos. Existe, por lo tanto, una necesidad en la técnica de una versión mejorada de la genotipificación por SSP-PCR, mediante la cual se puedan obtener resultados más rápidamente, con menos etapas y de un modo más automatizado.

Utilizando la invención aquí descrita, la identificación del HLA se produce en una sola etapa. Se añaden muestras de ensayo de ADN a recipientes de reacción llenados previamente y se cargan en un ciclador/lector térmico. No se necesitan pipeteado, manipulación, lectura o análisis adicionales. Sólo cargar la muestra, proceder e informar.

Resumen de la invención

La invención describe un nuevo método de genotipificación en un locus de HLA utilizando un sistema de PCR múltiple que tiene una mezcla maestra de PCR uniforme y aplicando un perfil de termociclación uniforme, cuyo método consiste en las siguientes etapas: (i) establecer una pluralidad de al menos 25 recipientes de reacción PCR, cada uno con una solución acuosa que contiene un par de cebadores de PCR control para amplificar una región control de ADN, un par de cebadores de PCR específicos para alelos de HLA diferentes para amplificar diferentes alelos de HLA en el locus y una mezcla maestra de PCR uniforme que tiene un colorante fluorescente capaz de unirse selectivamente a ADN de doble hebra; (ii) añadir una muestra biológica que contiene ADN codificante de HLA y ADN codificante control; (iii) amplificar el ADN codificante de HLA y el ADN codificante control en los recipientes de reacción utilizando un perfil de termociclación uniforme en la pluralidad de recipientes de reacción para obtener soluciones que contienen ADN amplificado que tiene un amplicón control y amplicón de HLA, donde la temperatura de fusión del amplicón control es al menos 10°C inferior a la temperatura de fusión de los amplicones de HLA; y (iv) determinar el tipo de HLA por el perfil de fusión de ADN en las soluciones. La invención también describe un sistema de genotipificación en un locus de HLA utilizando un método de la invención, donde el sistema comprende:

- i) un termociclador que consta de una pluralidad de al menos 25 recipientes de reacción PCR, donde cada recipiente de reacción contiene un par de cebadores de PCR capaces de amplificar una región control de ADN, un par diferente de cebadores de PCR específicos para alelos de HLA para amplificar diferentes alelos de HLA en el locus de HLA y una mezcla maestra de PCR uniforme que tiene un colorante fluorescente capaz de detectar ADN de doble hebra, donde la temperatura de fusión del amplicón control amplificado por el par de cebadores control es al menos 10°C inferior a la temperatura de fusión del amplicón de HLA amplificado por el par de cebadores específicos de alelos; y
- ii) un ordenador conectado de forma operativa a los recipientes de reacción, donde el ordenador es capaz de determinar el genotipo de HLA comparando los perfiles de fusión de las soluciones con los de soluciones estándar.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 – Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A02 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN control negativa. (Duplicado).

Figura 2 – Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A02 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN positiva. (Duplicado).

Figura 3 – Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A24 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN control negativa. (Duplicado).

Figura 4 - Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A24 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN positiva. (Duplicado).

Figura 5 - Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A02 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN positiva.

Figura 6 - Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A02 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN negativa.

Figura 7 - Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A7401 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN positiva.

Figura 8 - Representación de la curva de fusión (-dF/dT) de alelos A7401 específicos del grupo HLA-A con muestra de ADN negativa. (Duplicado).

Descripción detallada

I. Introducción.

5 Esta invención proporciona un sistema simple de PCR para la genotipificación de un locus de HLA. Con anterioridad a este trabajo, no se esperaba que se pudieran amplificar y luego identificar simultáneamente todos los PNS en un locus dado de HLA utilizando una mezcla maestra uniforme, un perfil de termociclación uniforme y análisis de curvas de fusión fluorescentes. El número de polimorfismos, la similitud de secuencias entre alelos que frecuentemente da lugar a coamplificación no deseada, la necesidad de que todos los diferentes pares de cebadores amplifiquen de forma similar, la necesidad de que cada amplicón se funda a una temperatura similar, la necesidad de evitar una secuencia de ADN que pudiera producir curvas de fusión superfluas y la necesidad de fundir a temperaturas que permitan distinguir entre el alelo específico y un amplicón control, presentaban un obstáculo logístico a dicho sistema. Sorprendentemente, se ha descubierto que, utilizando un análisis de las curvas de fusión, una selección juiciosa de la mezcla maestra y un cuidadoso diseño de los cebadores, se puede crear un sistema que amplifique los loci de HLA en un grado que permita la genotipificación en un sistema basado en PCR sencillo y simultáneamente ciclado.

El procedimiento de PCR está descrito en las patentes EE.UU. 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188. El trabajo previo de Newton *et al.* demostró un método de genotipificación utilizando ARMS, una forma de SSP-PCR (Newton *et al.*, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS), Nucleic Acids Research 17(7): 2503-2516, 1989, y pat. EE.UU. 5.595.890). Se ha utilizado esta estrategia con la PCR en tiempo real y el análisis de curvas de fusión fluorescentes para detectar polimorfismos nucleotídicos simples (PNS) (Papp, A. *et al.*, Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Using Allele-Specific PCR and Fluorescence Melting Curves, BioTechniques, Vol. 35, 2-6 de Mayo de 2003). Por otra parte, se ha hablado más ampliamente de la detección de PNS con PCR en tiempo real y sondas fluorogénicas (Livak, K.J., Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay, Genet. Anal. 14(5-6): 143-149, 1999. Varios obstáculos importantes hacen que la primera técnica sea más difícil de diseñar y de poner en práctica que la última.

Tomblor y Deutsch publicaron un método de análisis de curvas de fusión en 1993 (Spectrofluorometric Assay For Hybridization of Oligodeoxynucleotides Using Ethidium Dimer, Biotechniques, Dic. 1993, Volumen 15, Número 6: pp. 1060-1064), y posteriormente Yguerabide y Ceballos (Quantitative Fluorescence method for continuous measurement of DNA hybridization kinetics using a fluorescent intercalator, Anal. Biochem., 1 de Julio de 1995, 228(2): 208-220). En estos artículos, fluoróforos acuosos se unen selectivamente a ADN de doble hebra (ADNdh) y fluorescen cuando se excitan a sus longitudes de onda apropiadas. Se explota este fenómeno para identificar ADN por su Tf. Al fundirse el ADN, se libera colorante fluorescente a la solución y la fluorescencia disminuye. Las diferencias en la Tf de las especies de ADN individuales aparecen como cambios en la pendiente del gráfico de fluorescencia frente a temperatura. Por razones de simplicidad, el primer análisis de fluorescencia derivativo negativo proporciona un medio fácil para identificar productos de ADN transformando los cambios en la pendiente en curvas distintas (Fig. 1-4).

Los ensayos de PNS que utilizan PCR en tiempo real y sondas fluorogénicas son más fáciles de diseñar y de poner en práctica, ya que los ensayos requieren dos cebadores flanquean tés y una tercera sonda oligonucleotídica. La señal fluorescente se libera sólo después de que se hayan producido los tres sucesos de hibridación y de que se haya escindido el fluoróforo que se encuentra sobre la sonda. Por el contrario, los colorantes de unión a ADNdh utilizados en el análisis de las curvas de fusión fluorescen en contacto con cualquier ADNdh. Se ha de verificar la especificidad de las curvas de fusión para confirmar si la fluorescencia observada es específica o el resultado de sucesos de amplificación inesperados. La utilización de ADN genómico aumenta además la posibilidad de que los cebadores SSP se hibriden en localizaciones distintas de sus dianas pretendidas. Por estas razones, el análisis de SSP-PCR y curvas de fusión requiere más optimización y una cuidadosa atención para su diseño y sigue siendo menos popular que los métodos de PCR en tiempo real.

Con anterioridad a nuestro trabajo, no se podía predecir una genotipificación eficaz de un locus altamente polimórfico complejo utilizando análisis de curvas de fusión en una sola operación de termociclación. Las publicaciones previas han demostrado la identificación de unos cuantos sitios PNS individuales (véase Papp, antes citado; también Germer e Higuchi, Single Tube Genotyping without Oligonucleotide Probes, Genome Research, 9: 72-78, 1999); sin embargo, seguía habiendo una variedad de obstáculos para genotipificar con éxito un locus entero de HLA. Estos obstáculos incluyen:

(1) Efectos inesperados en las curvas de fusión causados por colorantes que se unen a ADNdh: Se ha visto que las propiedades de algunos colorantes que se unen a ADNdh influyen en los enlaces GC o en la fusión en múltiples etapas con ADN de longitud mayor. Las propiedades de las curvas de fusión son significativamente diferentes de las bandas de electroforesis; unas se basan en el peso molecular y las otras en la Tf. Una reacción PCR que produce una sola banda en un gel de electroforesis puede producir

múltiples bandas cuando se analiza utilizando curvas de fusión, y viceversa. No se sabía si estos colorantes crearían resultados inesperados en una variedad de reacciones SSP-PCR (Giglio *et al.*, Demonstration of preferential binding of SYBR[®] Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR, *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, N^o 22, 2003).

(2) Problemas de especificidad desconocida causados por coamplificación de alelos específicos y sus dianas competitivas: La PCR específica de alelos puede con frecuencia amplificar alelos competitivos, pero la electroforesis en gel es generalmente menos sensible que la espectrofotometría, por lo que es permisible una pequeña cantidad de alelo competitivo (ruido). No estaba claro si este ruido plantearía un problema con las curvas de fusión fluorescentes al dirigirse a tantas secuencias diferentes.

(3) Problemas de pobre amplificación y/o especificidad causados por los reactivos: Una sola mezcla maestra uniforme puede no producir resultados sólidos en una pluralidad de recipientes de reacción. La genotipificación con SSP-PCR requiere numerosas reacciones y llevaría demasiado tiempo optimizar los reactivos para cada ensayo individual. Sería necesaria una sola mezcla maestra, y era cuestionable si esto funcionaría.

(4) Pobre rendimiento del ensayo causado por un perfil de termociclación uniforme: De nuevo, no estaba claro si se podría diseñar una pluralidad de reacciones alrededor de las mismas condiciones y amplificar selectivamente. El mantenimiento de una temperatura consistente limitaría las opciones de optimización.

(5) Interferencia causada por múltiples cebadores de control negativo y específicos de alelos: No estaba claro si multiplicar estos grupos en una sola reacción PCR afectaría a la reproducibilidad o causaría un dímero de cebadores inaceptable. Además, constituía un reto diseñar un control que tuviera una T_f suficientemente separada de todos los demás amplicones en el grupo de genotipificación.

El resultado no estaba garantizado, pero sorprendentemente estos obstáculos fueron superados y, después de una cantidad significativa de optimización y de buena suerte, se finalizó la prueba del concepto y se desarrolló un modelo de trabajo de genotipificación del HLA. A continuación se discuten las estrategias de diseño.

II. Definiciones.

A menos que se defina de otro modo, todas las palabras tienen su significado habitual.

Alelos - Formas alternativas de un locus genético; se hereda por separado un solo alelo para cada locus de cada progenitor.

Amplicón - Un término para cualquier fragmento pequeño de ADN replicante.

Consanguíneo – Relación por sangre; descendiente de un ancestro común.

Primera derivada - La derivada de una función en un punto mide la velocidad a la cual cambia el valor de la función al cambiar el argumento de la función; una derivada proporciona una formulación matemática de la noción de velocidad de cambio.

Fluoróforo – Una pequeña molécula, o una parte de una molécula mayor, que puede excitarse por la luz para emitir fluorescencia.

Genotipo – Todo o parte de la constitución genética de un individuo o grupo.

Isquemia – Flujo reducido de sangre oxigenada a un órgano debido a un flujo sanguíneo inadecuado.

Locus – La posición sobre un cromosoma de un gen o alelo particular.

Mezcla maestra – Una combinación de reactivos de PCR (v.g., MgCl, dNTP, tampón, etc.).

Surco menor – El área de la doble hélice de ADN entre los esqueletos de fosfato de azúcar que está menos expuesta, en contraposición al "surco mayor", que está más expuesto.

Reacción en cadena de polimerasa – Un método de amplificación de una secuencia de ADN utilizando una polimerasa termoestable y dos cebadores oligonucleotídicos, uno complementario a la hebra sentido en un extremo de la secuencia que se ha de amplificar y el otro complementario a la hebra antisentido en el otro extremo. Como las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir posteriormente como plantillas adicionales para las mismas secuencias de cebadores, series sucesivas de hibridación de cebadores, alargamiento de hebras y disociación producen una rápida amplificación de la secuencia deseada.

Polimorfismos – La aparición en una población (o entre poblaciones) de varias formas fenotípicas asociadas con

alelos de un gen u homólogos de un cromosoma.

Temperatura de fusión térmica (Tf) – La temperatura por debajo de la cual un cebador oligonucleotídico se hibridará con su plantilla de ADN y por encima de la cual el cebador oligonucleotídico se disociará de su plantilla de ADN.

Termociclador – Un instrumento que cicla repetidamente a través de diversas temperaturas necesarias para un proceso químico iterativo dependiente de la temperatura, tal como la PCR.

Uniforme – Que tiene siempre la misma forma, manera o grado: que no varía o no es variable.

Abreviaturas

PCR – Reacción en cadena de polimerasa

PNS – Polimorfismo nucleotídico simple

HLA – Antígeno leucocitario humano

SSP-PCR – Reacción en cadena de polimerasa con cebadores específicos de secuencia

SSOP-PCR – Reacción en cadena de polimerasa con sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia

ADNdh – ADN de doble hélice

ADNsh – ADN de hélice sencilla

III. Preparación de las muestras.

Se obtienen muestras de ADN genómico de sangre humana. Se dispone de una variedad de protocolos publicados o de kits comerciales para aislar ADN de sangre entera o sus componentes separados. Un método de laboratorio genérico que utiliza vacutainers heparinizados y extracción con fenol es igualmente efectivo (The Nucleic Acid Protocols Handbook, Marzo de 2000, páginas 3-7). Se tendría que medir la absorbancia de fluorescencia a 260 nm y 280 nm para determinar la pureza del ADN.

Se puede guardar el ADN genómico a 4°C si la muestra va a ser usada en unos pocos días. Habría que congelarla a -20°C si la muestra va a ser guardada durante más de una semana. Para un tiempo prolongado de almacenaje, utilícese un congelador a -70°C.

IV. Sistemas de tipificación del HLA.

Las reacciones PCR individuales son realizadas simultáneamente en tubos individuales o en placas de reacción de termociclación. Se han utilizado placas de reacción tanto de 96 pocillos como de 384 pocillos en la presente descripción.

Los recipientes de reacción contienen los componentes químicos, enzima polimerasa, tampón y cebadores oligonucleotídicos necesarios para la amplificación del ADN. Se ponen en un termociclador de PCR, que calienta y enfría los recipientes de reacción para amplificar el ADN utilizando el proceso de PCR. Una variedad de fabricantes comerciales venden termocicladores de PCR. En la presente descripción, se utiliza el sistema de detección de secuencias 7900HT de Applied Biosystems.

Se analizan las reacciones PCR individuales al finalizar el proceso de amplificación. Se usa un colorante fluorescente que se une a ADN de doble hebra para identificar la presencia o ausencia de productos de amplificación. Se usa un instrumento termociclador acoplado a un ordenador que monitoriza y almacena los datos de fluorescencia para detectar estos productos. De nuevo, una variedad de fabricantes comerciales venden termocicladores para PCR controlados por ordenador capaces de monitorizar y registrar la fluorescencia (v.g., Applied Biosystems, Bio-Rad y Stratagene). Obsérvese que los recipientes de reacción pueden ser manipulados en un termociclador de PCR estándar y luego cambiados a un segundo termociclador que monitoriza la fluorescencia al final de la operación, o tanto la amplificación como la detección posterior a la amplificación pueden ser llevadas a cabo en el mismo termociclador. No se requiere registro de la fluorescencia durante la termociclación de la PCR. La prueba es una lectura de punto final, que requiere un registro de curva de fusión tras el proceso de amplificación. En la presente descripción, se usa el sistema de detección de secuencias 7900HT de Applied Biosystems acoplado a un ordenador Dell tanto para amplificar como para detectar productos específicos.

Se monitoriza la fluorescencia y se almacena en un ordenador durante el proceso de detección. Posteriormente, se usa un programa para calcular la primera derivada de los datos de fluorescencia. Se identifican los productos de amplificación específicos a partir del gráfico de la primera derivada negativa (-dF) frente a la temperatura (dT). Se pueden realizar los cálculos de la primera derivada de forma integrada en el ordenador usado para la detección, o se pueden cargar los datos sin procesar y se pueden hacer los cálculos de la primera derivada en otro ordenador >Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 1997, 245: 154-60).

V. Creación de un sistema de PCR múltiple de múltiples recipientes a gran escala usando una mezcla maestra y un perfil de termociclación uniformes.

Se describe lo siguiente:

Reactivos de PCR y colorante que se une a ADNdh:

Se optimizan y combinan reactivos de PCR estándar para formar una mezcla que se utilizará en todos los recipientes de reacción. Estos reactivos incluyen tampón para PCR, MgCl₂, dNTP y ADN polimerasa. Se pueden titular los componentes de la PCR individuales para determinar la combinación más efectiva. Se requieren múltiples rondas de termociclación para determinar un equilibrio eficiente de reactivos. Es importante seleccionar una ADN polimerasa apropiada. Es suficiente una ADN polimerasa *Taq* (*Thermus aquaticus*) o su equivalente con moderada procesabilidad, bajo índice de errores y que carezca de actividad 3' a 5' exonucleasa. Se optimizan los reactivos con un subgrupo de cebadores de PCR diseñados siguiendo las directrices que se dan a continuación. Una vez estudiados y optimizados los componentes, se añaden conjuntamente para formar una "mezcla maestra". Se usa la mezcla maestra en todos los recipientes de reacción, y ésta minimiza los procedimientos de manipulación de líquidos.

Se estudia un colorante que se une a ADN de doble hebra y se añade a la mezcla maestra. En la presente descripción, se usa SYBR[®] Green I de Molecular Probes, aunque se puede substituir con LC Green[®] de Idaho Technologies, bromuro de etidio u otro colorante que se una a ADNdh similar. El SYBR[®] Green I se excita a 497 nm y emite a 520 nm (Molecular Probes Product Information Sheet, SYBR[®] Green I Nucleic Acid Gel Stain, Revisado el 24 de Sept. de 2003).

La descripción utiliza varias estrategias de diseño para evitar incertidumbres asociadas a los colorantes de unión a ADN: (1) Siempre que sea posible, se diseñan los amplicones de manera que sean cortos, ya que amplicones más largos podrían producir curvas de fusión adicionales. Un amplicón "corto" tiene alrededor de 100 pares de bases. El producto específico de alelo no debería solaparse con el producto control negativo. (2) El amplicón control negativo está diseñado para tener una baja T_f, de tal forma que se funda pronto y permita una mayor flexibilidad cuando se diseñan productos específicos de alelo (discutidos más adelante). (3) Todos los cebadores son estudiados para asegurarse de una señal potente y de resultados reproducibles. Los cebadores que no lo consiguen son rediseñados y estudiados de nuevo en un proceso de bucle de retroalimentación. (4) Se mantienen constantes la mezcla maestra y las condiciones de termociclación optimizadas durante el proceso de diseño de los cebadores.

Condiciones de termociclación:

Las temperaturas de termociclación, las pendientes de rampa, los tiempos de retardo y los números de ciclos de la PCR habrían de ser estudiados empíricamente con un subgrupo de cebadores específicos de alelos para maximizar la fuerza de la señal y minimizar los requerimientos temporales. Pueden ser necesarias numerosas pruebas para determinar el perfil más efectivo. Por ejemplo, se pueden estudiar perfiles de PCR de tres etapas (hibridación, extensión, fusión) frente a perfiles de dos etapas (hibridación y extensión a la misma temperatura y luego fusión). Se pueden realizar cambios en las temperaturas de hibridación, extensión y fusión, así como en los tiempos de retardo y en la duración de los ciclos. Habría que alterar el número total de ciclos para cada ronda durante el proceso de optimización para asociar el mejor perfil de termociclación con el número óptimo de ciclos. Menos ciclos significan más rápida genotipificación. Se puede emplear el análisis de curvas de fusión para determinar qué perfiles y números de ciclos producen las curvas de fusión más sólidas (mayor amplitud) y tienen la mejor reproducibilidad. Después de haber determinado el perfil de termociclación y el número de ciclos óptimos, éstos deben mantenerse constantes durante el resto del proceso de desarrollo.

Control negativo:

Se utiliza un grupo cebadores de control negativo de PCR para eliminar la posibilidad de que se pueda confundir una reacción PCR fallida con una amplificación negativa (falso negativo). El amplicón control en muchos ensayos tradicionales de PCR es frecuentemente mayor que el producto de interés. En estas aplicaciones, se usa electroforesis en gel de agarosa para separar el ADN heterogéneo por tamaño. Las especies de ADN de menor

tamaño se mueven más rápidamente a través del gel que las especies de mayor tamaño; por lo tanto, puede resultar ventajoso diseñar un amplicón control de mayor tamaño, ya que los productos de ADN específicos aparecerán más rápidamente en un gel y la electroforesis puede finalizar poco después de aparecer la banda control.

5 En la presente descripción, sin embargo, el amplicón control está diseñado para ser más pequeño que el amplicón específico de alelo. El control negativo está también diseñado para ser rico en AT, lo que producirá una curva de fusión a una temperatura mucho más inferior que los productos específicos de alelos con los que se multiplica. Así, la curva del control negativo será detectada a una temperatura anterior y no interferirá con los productos específicos de alelos. La longitud y la composición del ADN son dos variables importantes en la Tf. Los ADN de menor tamaño
10 resultan más afectados por cambios en la longitud que los ADN de mayor tamaño. Cuanto mayor sea el producto, más se aproxima a su límite de Tf. La utilización de un pequeño amplicón control rico en AT disminuye la probabilidad de solapamiento con los amplicones específicos de alelos y permite una mayor flexibilidad de diseño; se pueden diseñar productos específicos de alelos para que se fundan a cualquier temperatura por encima del control negativo.

15 Se seleccionó Apo B en la presente descripción para su uso como control negativo. Este gen de una sola copia está altamente estudiado y se dispone de una amplia información de secuencia (Fisher y Ginsberg, Complexity in the Secretary Pathway: The Assembly and Secretion of Apolipoprotein B-containing Lipoproteins, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, Nº 20, 17 de Mayo, pp. 17377-17380, 2002; véase también el número de acceso del GenBank M14162). Se seleccionaron varias regiones pequeñas ricas en AT desprovistas de polimorfismos y unidades repetitivas y se diseñaron cebadores utilizando un programa de diseño de cebadores (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pp. 365-386).

25 El diseño de cebadores depende de muchos factores. Para una revisión, por favor véanse Abd-Elsalam, K., African Journal of Biotechnology, Vol. 2(5), pp. 91-95, Mayo de 2003, o Kolmodin y Williams, The Nucleic Acid Protocols Handbook, PCR: Basic Principles and Routine Practice, Marzo de 2000, páginas 572-580. Para una revisión de cálculos termodinámicos, véanse Breslauer *et al.* (1986), Proc. Nat. Acad. Sci. 83: 3746-50, y Sugimoto *et al.* (1996), Nucl. Acids Res. 24: 4501-4505. Se pueden pedir cebadores oligonucleotídicos a un proveedor comercial (v.g., IDT, Sigma Genosys, Invitrogen, etc.) o se pueden sintetizar usando el equipo y las químicas apropiadas.

35 Una vez se ha desarrollado un grupo de cebadores de control negativo operativos, éste debería ser estudiado frente a muestras de ADN normal. Las concentraciones de cebadores hacia delante e inversos deben variar entre 0 nM y 900 nM, creando una matriz de optimización para cada grupo de cebadores. Se establecen reacciones de control no plantilla (que carecen de ADN) para detectar la amplificación de dímeros de cebadores a varias concentraciones de cebadores. Se deben seleccionar los grupos de cebadores con la señal más sólida y amplificación de dímeros de cebadores mínima o indetectable.

40 Estrategias de diseño de cebadores específicos para alelos de HLA:

Las siguientes estrategias de diseño de cebadores son críticas para crear un sistema multi-PCR múltiple, de múltiples recipientes, eficaz para la genotipificación del HLA. Existen cuatro etapas clave: (1) elegir los sitios de unión del cebador; (2) diseñar los cebadores e incorporar bases malemparejadas 3' cuando sea apropiado; (3)
45 estudiar los cebadores para determinar la selectividad y la reproducibilidad; y (4) rediseñar los cebadores que fallan.

(1) Elección de los sitios de unión del cebador: Se han identificado centenares de alelos en el locus de HLA-A solo. Los sitios del cebador deben ser cuidadosamente seleccionados de manera que incluyan el alelo o grupo de alelos abordados, pero que excluyan secuencias homólogas o estrechamente relacionadas. Se definirá un grupo de alelos o un alelo simple como "alelo" por razones de simplicidad en las siguientes explicaciones. La descripción hace uso de SSP-PCR, por lo que los polimorfismos en el extremo 3' de los sitios del cebador son abordados y utilizados para amplificar alelos simples frente a sus homólogos estrechamente relacionados, casi idénticos.

55 Los recientes avances en la bioinformática han creado un número de herramientas de utilidad que comparan la homología de secuencia e identifican polimorfismos. Se dispone de GenBank, BLAST, dbSNP y otros recursos gracias al National Center for Biotechnology Information (NCBI). Adicionalmente, la fundación Anthony Nolan ofrece una serie de herramientas bioinformáticas específicas para el HLA. Todos los alelos publicados en los loci de HLA-A son obtenidos del dominio público y se alinean mediante herramientas de alineación de secuencias, tales como ClustalX (Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876-4882, 1997), o incluso manualmente. Las áreas de similitud entre alelos y las áreas de polimorfismo deben ser
60 visibles al realizar la alineación. Se seleccionan los sitios de unión del cebador de tal forma que cada par de cebadores incluya el alelo de interés pero excluya todos los demás alelos.

Habría que comparar los genes homólogos conocidos, tales como HLA-A, B, C, E, F, G, etc. para los loci de la clase I, y los pseudogenes HLA H, J, K, etc., frente a los sitios de unión del cebador seleccionados para asegurar la especificidad. Se aplica la misma regla a los loci de la clase II. Si se comparten los sitios polimórficos seleccionados en otro locus, se deben seleccionar nuevos sitios. Se puede eliminar la amplificación no específica con esta etapa bioinformática adicional.

(2) Diseño de los cebadores: Se diseñan los cebadores con cualquier número de herramientas pública y comercialmente disponibles siguiendo las reglas tradicionales de la PCR. Para grupos de cebadores difíciles que producen amplificación no específica, dos estrategias pueden mejorar los índices de éxito del ensayo. La primera consiste en incorporar un malemparejamiento interno en el extremo 3' de los cebadores para aumentar la discriminación alélica. Se incorporan los malemparejamientos según sea necesario después de los ensayos de los cebadores. Kwok, S. *et al.* describen los efectos del malemparejamiento y la eficiencia de la PCR (Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies, *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, Nº 4, 1990, 999-1005. Se diseñan los grupos de cebadores con una Tf de aproximadamente 58°C-62°C. Se pueden incorporar los malemparejamientos en la penúltima base 3', dos bases desde el extremo, y ocasionalmente tres bases desde el extremo. Los malemparejamientos pueden ser aleatoriamente seleccionados y empíricamente estudiados, aunque se deberían seguir ciertas reglas siempre que fuera posible. Por ejemplo, es con frecuencia eficaz seleccionar un malemparejamiento idéntico al alelo competitivo (v.g., seleccionar una "C" si el alelo que se ha de excluir es una "C" en la misma posición).

La segunda estrategia consiste en añadir una cola prolongada 5' al/a los cebador(es). 5-7 bases GC adicionales pueden tener un marcado efecto sobre la amplificación. Un producto que previamente se amplificaba con lentitud puede acelerarse utilizando esta técnica. La cola producirá un área de hibridación más larga en posteriores rondas de PCR, lo que aumenta la Tf y promueve la hibridación y la prolongación.

Se deben comparar los grupos de cebadores con la secuencia completa del genoma humano utilizando BLAST o un programa similar para asegurarse de que no existen sitios de hibridación no específica en cualquier otro lugar (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990), Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). Además, habría que estudiar la secuencia Alu, los transposones y otros elementos repetitivos *in silico*. Se rechazan los diseños si se descubren sitios no específicos.

(3) Estudio y optimización de cebadores: Finalmente, se estudian los cebadores frente a ADN de control positivo y negativo. El ADN de control positivo debe ser obtenido o identificado con anterioridad. Se debe establecer una matriz de concentración para cada par de cebadores (de 25 nM a 900 nM) para determinar las concentraciones óptimas. Se añaden reacciones de control no plantilla para identificar la amplificación no específica. Se establece una segunda matriz de concentración de cebadores para optimizar la reacción múltiple, consistente en cebadores específicos de grupo y cebadores de control negativo. Se realizan controles no plantilla para identificar sucesos de cebado cruzado no específico.

Los cebadores deben satisfacer los siguientes criterios empíricos:

1. Muestra de control de ADN positivo: Se ha de observar una curva de fusión específica de alelo en la ventana Tf apropiada. No tiene que haber solapamiento de la ventana Tf con curvas falsas. También puede estar visible el pico del control negativo, pero esto no es un requerimiento.
2. Muestra de control de ADN negativo: Se observa una curva de fusión solamente para el amplicón del control negativo. No se observa una curva dentro de la ventana Tf específica de alelo.
3. Muestra de control de ADN positivo o negativo: Las curvas falsas causadas por cebado falso o dímero de cebadores, de ser visibles, no interfieren con los resultados positivos y negativos.

Los ensayos fallan por las siguientes razones:

1. Falso negativo: Se observa una curva de fusión sólo para el amplicón del control negativo. El ensayo falla porque no se detecta el alelo de interés. La PCR específica puede haber fallado. La estructura terciaria del ADN, problemas de Tf, malemparejamientos 3' intencionados y malos reactivos pueden todos ellos causar fallo del ensayo.
2. Falso positivo: Se observan curvas de fusión para el amplicón del control negativo y el amplicón del control positivo. En este caso, se detectaron ambos grupos de cebadores, pero sólo se habría amplificado el producto negativo. Los ensayos fallidos de este tipo no son infrecuentes en el desarrollo, ya que los sitios de unión de los cebadores pueden diferir en tan sólo un único par de bases. En estos casos, el rediseño de los grupos de cebadores y la incorporación de un malemparejamiento 3' intencionado pueden proporcionar una especificidad adicional.
3. Resultado no claro: Se detectan productos de amplificación falsos (cebado falso) y/o productos díméricos de cebadores que se solapan con la Tf de los productos específicos.

Los cebadores fallidos deben ser rediseñados. Pueden ser suficientes cambios simples en la longitud de los cebadores o en la composición de los pares de bases. Alternativamente, se deben elegir nuevos sitios de unión de los cebadores y rediseñar los cebadores siguiendo las etapas anteriores.

- 5 Los pares de cebadores que pasan el cribado inicial son ampliamente estudiados con múltiples muestras de control positivo y negativo para determinar la precisión y la reproducibilidad del ensayo.

Sistema de PCR múltiple con múltiples recipientes:

- 10 Una vez diseñados y optimizados todos los cebadores específicos de alelos, se mezclan con cebadores de control negativo y se transfieren a los recipientes de reacción apropiados. Se mezclan la muestra de ADN, la polimerasa y la mezcla maestra entre sí y se añaden a cada recipiente. Los recipientes están listos para la termociclación.

VI. Genotipificación de un locus de HLA.

- 15 En la presente descripción, se desean 30 reacciones para tipificar el locus de HLA-A. Se transfieren los recipientes (placas o tubos) al instrumento de termociclación, que se programa con el perfil de termociclación y el número de ciclos optimizados. Al final del proceso de amplificación, se enfrían los recipientes brevemente y se calientan luego lentamente para iniciar el ciclo de fusión. Se registran y almacenan las mediciones de fluorescencia mediante el
20 ordenador. Se transfieren los datos sin procesar de fluorescencia y temperatura desde el instrumento de termociclación y se calcula la primera derivada negativa (-dF). Se representa -dF frente a la temperatura para generar una curva para cada recipiente de reacción, que se imprime y guarda.

- 25 Se identifica el ADN positivo por los picos específicos de Tf (el pico negativo puede o no estar presente). Se identifica el ADN de control negativo por un único pico en la ventana Tf correcta. El patrón de los picos en la suma de los recipientes de reacción define el tipo de locus de HLA. Todos los recipientes de reacción deben mostrar, como mínimo, un pico de amplificación: o bien el pico negativo, o bien el específico de alelo. Si ninguno de los picos está presente, la reacción PCR ha fallado en ese recipiente.

- 30 Una vez se ha verificado el proceso PCR en cada pocillo, se registran los recipientes que muestran productos de amplificación específicos de grupo. Típicamente, cada ADN tiene dos productos específicos de grupo (uno materno, uno paterno) en el ADN no homocigótico y no consanguíneo. Por supuesto, ocasionalmente las muestras de ADN pueden ser homocigóticas o compartir alelos específicos de grupo, en cuyo caso se detecta una sola curva específica de grupo entre todo el grupo. Esta curva puede tener una amplitud mayor de lo normal, ya que está
35 presente el doble de ADN antes de la amplificación.

- Debido a la complejidad de los genes HLA, con frecuencia existen excepciones dentro de los grupos de cebadores específicos de grupo. Por ejemplo, determinados alelos específicos de grupo pueden no amplificarse con el resto del grupo. Estos casos raros deben ser detectados con grupos de cebadores independientes si la aplicación requiere
40 una fina resolución. En otro ejemplo, determinados alelos no específicos de grupo pueden amplificarse como alelos de grupo. Estos raros tipos deben ser observados y pueden producir resultados de genotipificación ambiguos. Reacciones adicionales pueden elucidar ambigüedades; sin embargo, el tiempo y el gasto añadidos en el estudio de alelos raros pueden no resultar prácticos. Se pueden consultar sitios públicos de internet, tales como ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc, para determinar frecuencias de alelos.

- 45 Nomenclatura del HLA (un ejemplo de un alelo HLA-A común):

A*02 - los dos primeros dígitos indican el nombre de grupo familiar o serológico.

- 50 A*0202 - alelo distinto.

A*020202 - cambio de bases sinónimo (no codificante).

- 55 A*02020201 - cambio de bases intrónico.

(Schreuder, G. *et al.*, The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens, Tissue Antigens 2005: 65: 1-55).

- 60 Como puede apreciarse por la descripción proporcionada anteriormente, la presente invención tiene una amplia variedad de aplicaciones. Por consiguiente, se ofrece el siguiente ejemplo con fines ilustrativos y no se pretende considerarlo como una limitación de la invención en modo alguno.

Ejemplo

Ejemplo 1: Método de tipificación del locus de HLA-A

5 **Ejemplo 1A: Preparación de la muestra:**

Se preparó ADN genómico humano a partir de sangre entera utilizando vacutainers heparinizados y extracción con fenol (The Nucleic Acid Protocols Handbook; Marzo de 2000, páginas 3-7). Se realizó la tipificación de HLA-A utilizando kits comerciales de Pel-Freeze. Se obtuvieron muestras adicionales de ADN definidas por HLA-A de la European Collection of Cell Cultures (Wiltshire, U.K.). Se guardaron las muestras de ADN a -20°C hasta estar listas para su uso.

Ejemplo 1B: Sistemas mecánicos utilizados para llevar a cabo la invención.

15 Se usaron el sistema de detección de secuencias 7900HT de Applied Biosystems y el ordenador de sobremesa Dell para la termociclación y la detección fluorescente (software SDS versión 2.1). Se utilizaron placas de reacción de termociclación ópticamente transparentes de 384 pocillos de Applied Biosystems como recipientes de reacción y se cubrieron con cubiertas adhesivas ópticamente transparentes antes de la termociclación.

20 **Ejemplo 1C: Materiales y métodos**

Mezcla maestra 2X: Tampón (MgCl₂ 6,0 mM, Tris-Cl 20 mM pH 8,3, KCl 100 mM, Tween 20 al 0,02%, glicerol al 1,2%, dNTP, dATP 0,4 mM, dCTP 0,4 mM, dGTP 0,4 mM y dUTP 0,8 mM), ADN polimerasa AmpliTaq[®] (Applied Biosystems) 0,125 U/μl y SYBR[®] Green I diluido a 1/40.000 (Molecular Probes Cat#S-7563).

25 Se transfieren 10 μl de mezcla maestra 2X a cada pocillo. Se añaden los cebadores, la muestra de ADN y ddH₂O (de ser necesario) para llevar el volumen final de reacción a 20 μl. La concentración de la muestra es de 1 ng/μl o 20 ng de ADN total.

30 Se emplea un perfil de termociclación de PCR en dos etapas para optimizar los pares de cebadores y cuando se estudia el ADN de la muestra: Calentar hasta 95°C durante 90 segundos, luego 38 ciclos a 95°C durante 15 segundos y a 64°C durante 60 segundos (hibridación y prolongación combinadas). Después de la operación, se disminuye la temperatura hasta 4°C durante 60 segundos y comienza entonces el ciclo de curva de fusión. La temperatura sube de 60°C a 95°C, con una tasa de incremento de 2°C por minuto.

35 Tal como se ha discutido, se escogió ApoB como control negativo; se trata de un gen de una sola copia bien caracterizado. Se seleccionaron múltiples regiones cortas ricas en AT y se diseñaron y sintetizaron grupos de cebadores (Integrated DNA Technologies, Inc.; Coralville, IA). Se seleccionó un único grupo que producía una curva de fusión limpia y consistente a una baja T_f.

40 Se diseñaron 30 grupos de cebadores específicos de grupo siguiendo los procedimientos previamente esbozados. Se identificaron los sitios de cebadores que cubrían la mayoría del locus de HLA-A a partir de fuentes publicadas. Se agruparon los alelos por los polimorfismos comunes contenidos en los exones 2 y 3 del gen HLA-A. Se preferían los amplicones más cortos siempre que fuera posible para aumentar la eficiencia de la PCR y mejorar el análisis de las curvas de fusión. Se diseñaron los cebadores utilizando el Software Primer Express (Applied Biosystems), buscando una T_f de entre 58° y 62°C. Después de verificar que los sitios de cebadores eran específicos y no estaban compartidos por otra secuencia homóloga o pseudogenes y de someter a BLAST el grupo frente al genoma humano, se pidieron cebadores a IDT. Algunos cebadores incorporan un malemparejamiento 3' para aumentar la especificidad. Otros tienen una cola 5' adicional para aumentar la eficiencia. Mediante una planificación y un diseño cuidadosos, aproximadamente un 80% de nuestros cebadores funcionan la primera vez. El resto debe ser rediseñado. Se optimizaron las concentraciones de cebadores para cada nuevo grupo variando las concentraciones de cebadores tanto hacia delante como inversos de [50 nM] a [900 nM]. Se mantuvieron constantes los cebadores de control negativo a [75 nM]. La optimización ayudó a reducir el falso cebado y con frecuencia mejoró la amplitud de las curvas de fusión. Se debe optimizar la concentración de cebadores para cada lote de nuevo cebador.

55 Al final de cada ronda, se cargaron los datos de fluorescencia sin procesar y se calcularon los valores de la primera derivada negativa para generar curvas de fusión.

60 Se facilitan ejemplos de curvas de fusión representativas (Fig. 1-8)

Ejemplo 1D: Resultados

Detalles de los cebadores:

- 5 1. A01
 F: GAGCTTATGCGCACGGTACGCAAGTGGGAGGCGAT (SEC ID N°: 1)
 R: CAGGTATCTGCGGAGCACG (SEC ID N°: 2)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*010101<09
- 10 Secuencias NO detectadas:
 A*0110
 Otros alelos detectados:
 Ninguno
 Concentración de cebadores: [200 nM]
- 15 Control: [50 nM]
 Longitud del amplicón: 102 pb
 Tf estimada = 86°C
- 20 2. A02
 F: GGGAGCCCCGCTTCATCGTA (SEC ID N°: 3)
 R: TCTCCCCGTCCCAATACTCCGAA (SEC ID N°: 4)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*02010101~0273 (véanse excepciones)
- 25 Secuencias NO detectadas:
 A*020109,0248,0250,0255,0242?
 Otros alelos detectados:
 Ninguno
 Concentración de cebadores: [200 nM]
- 30 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 133 pb
 Tf estimada = 87,26°C
34. A02 Parte II
 F:GAGGGCCGTGCGACGTGGGGTCGGAAT (SEC ID N°: 5)
 R:GCACTTGTGCTTGGTGGTCTGAGAT (SEC ID N°: 6)
- 35 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*02010101~0272
 Secuencias NO detectadas:
 A*0210, 0219, 0239, 0250, 0252, 0265 y 0273
- 40 Otros alelos detectados:
 A*6901
 Examinar las curvas de fusión en cuanto a 2414 y 36's, 11's o 68's para ver el poder de discriminación con sólo un cebador.
 Concentración de cebadores: [200 nM]
- 45 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 147 pb
 Tf estimada = 86°C
- 50 4. A0250
 F:GCTCCCACTCCATGAGGTATTTGTT (SEC ID N°: 7)
 F2:AGagGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTGTT (SEC ID N°: 8)
 R:GGGCCGCTCCCACTTCT (SEC ID N°: 9)
 R2:ATGGGCCGTCTCCCACTTCT (SEC ID N°: 10)
- 55 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*0250 y otra 02.
 Secuencias NO detectadas:
 A*0205, 020601, 020602, 020603, 0208, 0210, 0214, 0219, 0221, 0228, 0241, 0244, 0251, 0254, 0257, 0261, 0265, 0272
 Concentración de cebadores: [400 nM] (mezcla de ambos hacia delante)
- 60 Control: [75 nM] (mezcla de ambos inversos)
 Longitud del amplicón: 450 pb
 Tf estimada = 90°C

5. A03
 F:CCCAGTCACAGACTGACCGAGTTG (SEC ID N°: 11)
 R:CACTCCACGCACGTGTCA (SEC ID N°: 12)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 5 A*03 alelos 03010101, 03010102N, 03010103, 030102, 030103, 0302, 0303N, 0304, 0306, 0307, 0308?, 0309?,
 0311N, 0312, 0313, 0314
 Secuencias NO detectadas:
 A*0305, 0310 (comprobar 0308?, 0309?)
 Otros alelos detectados:
 10 A*6819
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 536 pb
 Tf estimada = 90°C
- 15 6. A03II
 F:GCTCCCACTCCATGAGGTATTTGTT (SEC ID N°: 13)
 R:GTCCACTCGGTCAGTCTGTGTC (SEC ID N°: 14)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 20 A*03 alelos 03010101, 03010102N, 03010103, 030102, 030103, 0302, 0303N, 0304, 0305, 0306, 0307, 0309, 0310,
 0311N, 0313, 0314
 Secuencias NO detectadas:
 A*0308, 0309 cuestionable y 0312
 Otros alelos detectados:
 25 A*0234, *023501, *0256 y *0262, HLA-C01
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [100 nM]
 Longitud del amplicón: 231 pb
 Tf estimada = 89,8°C
- 30 7. A11
 F:CCAGTTCTCACACCATCCAGCTA (SEC ID N°: 15)
 R:GGCCCTCCAGGTAGGCTCTGT (SEC ID N°: 16)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 35 A*110101 ~ 07/09 ~ 19
 Secuencias NO detectadas:
 A* 1108
 Otros alelos detectados:
 A*0302, *0310
 40 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 220 pb
 Tf estimada = 88,9°C
- 45 8. A11II
 F:CCAGTTCTCACACCATCCAGCTA (SEC ID N°: 17)
 R:ACTTGCGCTTGGTGATCTGAGGT (SEC ID N°: 18)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 50 A*110101 ~ 19
 Secuencias NO detectadas:
 Ninguno
 Otros alelos detectados:
 A*01 (excepto 0103), A*3601, A*3602, A*3604
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 55 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 172 pb
 Tf estimada = 88,0°C
- 60 9. A23
 F:CGGAGTATTGGGACGAGGAGACTG (SEC ID N°: 19)
 R:GCCCCGCCCTCTCAACTGCTCCGCCACTC (SEC ID N°: 20)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*2301~2307N, 2308N, 2310, 2311N, 2312

- Secuencias NO detectadas:
A*2309
Otros alelos detectados:
A*3007, 3108, 3205
- 5 Concentración de cebadores: [200 nM]
Control: [75 nM]
Longitud del amplicón: 543 pb
Tf estimada = 90,0°C
- 10 10. A23II
F:CGGAGTATTGGGACGAGGAGACTG (SEC ID Nº: 21)
R:GTGGCAGGGCCTTGCCGTCGTAGGCGAA (SEC ID Nº: 22)
Secuencias que detectarán estos cebadores:
A*2301~12
- 15 Secuencias NO detectadas:
A*2309
Otros alelos detectados:
A*0246, 0248, 0270, 24 (excepto 240204?, 2408, 2417, 2424, 2429, 2439?, 2441, 2442)
Concentración de cebadores: [400 nM]
Control: [75 nM]
Longitud del amplicón: 445 pb
Tf estimada = 90,1°C
- 20 11. A24
F:TTCTCACACCCTCCAGATGATGCT (SEC ID Nº: 23)
R:CGCCTCCCACTTGCGCCT (SEC ID Nº: 24)
Secuencias que detectarán estos cebadores:
A*24020101~04/06~13/17~23/25~46
- 25 Secuencias NO detectadas:
A*2405, 2414, 2415, 2424
Otros alelos detectados:
A*0210, 021701, 021702, 0239
Concentración de cebadores: [200 nM]
Control: [75 nM]
Longitud del amplicón: 175 pb
Tf estimada = 87,2°C
- 30 12. A24II
R:GGGACGAGGAGACAGGGAGA (SEC ID Nº: 25)
L:TTGTAGTAGCGGAGCGCGA (SEC ID Nº: 26)
Secuencias que detectarán estos cebadores:
A*24020101~24020102L/240202~06/2405~08/2409N/10/11N/13~15/17/18/20~23/25~27/29~35/36N/37~39/40N/41~43/45N/46; 2408? 2429? 2442?
- 35 Secuencias NO detectadas:
A*2404, 2419, 2424, 2428, 2444
Otros alelos detectados:
A*2301~06/2307N/2308N/2310/2311N/2312 (pérdida de A*2309 solamente), A*3108?, 3205? y 3107?
Concentración de cebadores: [200 nM]
Control: [75 nM]
Longitud del amplicón: 79 pb
Tf estimada = 82,2°C
- 40 13. A24III
F:CGGAGTATTGGGACGAGGAGACTG (SEC ID Nº: 27)
R:CTCTCTGCTGCTCCGCCACCT (SEC ID Nº: 28)
Secuencias que detectarán estos cebadores:
A*A11 24, excepto las enumeradas a continuación:
Secuencias NO detectadas:
A*2406?, 2408, 2413?, 2418?, 2422, 2424, 2429, 2442
- 45 Otros alelos detectados:
A*0246?, 0248?, 0270?
Concentración de cebadores: [200 nM]
Control: [75 nM]
- 50 60

Longitud del amplicón: 544 pb
Tf estimada = 90,0°C

14. A2424

5 F:CGGAGTATTGGGACCGGAAC (SEC ID N°: 29)
R:CTCTCTGCTGCTCCGCCACCT (SEC ID N°: 30)
Secuencias que detectarán estos cebadores:
A*2424

Secuencias NO detectadas

10 Ninguna

Otros alelos detectados:

A*6826

Concentración de cebadores: [200 nM]

Control: [75 nM]

15 Longitud del amplicón: 588 pb

Tf estimada = 90,3°C

15. A25

20 F:CCCACTCACAGACTGACCGAGATAG (SEC ID N°: 31)
R:CGCGCACCCGATGTAATCCTTGCCGTCGTCA (SEC ID N°: 32)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

A*250101, 250102?, 2502, 2503, 2504

Secuencias NO detectadas:

Ninguna

25 Otros alelos detectados:

Ninguno

Concentración de cebadores: [400 nM]

Control: [75 nM]

Longitud del amplicón: 409 pb

30 Tf estimada = 90,2°C

16. A26

35 F:CCCACTCACAGACTGACCGAGCTAA (SEC ID N°: 33)
F2:CCAGTCACAGACTGACCGAGCTAA (SEC ID N°: 34)
R:CGCGCACCCGATGTAATCCTTGCCGTCGTCA (SEC ID N°: 35)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

A*2601, 2602, 2604, 2605?, 260701, 260702, 2608, 2609, 2610, 2611N, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2622 y 2623

Secuencias NO detectadas:

40 A*2603, 2606, 2621

Otros alelos detectados:

A*4301

Concentración de cebadores: [400 nM]

Control: [75 nM]

45 Longitud del amplicón: 408 pb

Tf estimada = 90,2°C

17. A26II

50 F:CGGAGTATTGGGACCGGAAC (SEC ID N°: 36)
R:GATGTAATCCTTGCCGTCGTCA (SEC ID N°: 37)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

A*2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2608, 2609, 2610, 2611N, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2620, 2621, 2622 y 2623

Secuencias NO detectadas:

55 A*260701, 260702, 2619

Otros alelos detectados:

A*2501~04, *3401~06, *6601~04

Concentración de cebadores: [200 nM]

Control: [75 nM]

60 Longitud del amplicón: 445 pb

Tf estimada = 90,2°C

18. A29
 F:GGCTCCCACTCCATGAGGTATTTGA (SEC ID N°: 38)
 R:TCGCGGCGTTCGCTGTTA (SEC ID N°: 39)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 5 A*29010101 ~ A*2911 (TODAS)
 Secuencias NO detectadas:
 Ninguna
 Otros alelos detectados:
 Ninguno
 10 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 124 pb
 Tf estimada = 87,8°C
- 15 19. A30
 F:CCAGTTCTCACACCATCCAGCTA (SEC ID N°: 40)
 R:GCCGTCGTAGGCGTGCTCT (SEC ID N°: 41)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*300101~A*3012
 20 Secuencias NO detectadas:
 Ninguna
 Otros alelos detectados:
 Ninguno
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 25 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 91 pb
 Tf estimada = 84,0°C
20. A31
 30 F:GGCTCCCACTCCATGAGGTATTTGA (SEC ID N°: 42)
 R:CGCGGAGTGGTCTCCTGGTCCCAATACTCAGGCAT (SEC ID N°: 43)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*310102/3102~07/09/10
 Secuencias NO detectadas:
 35 A*3108
 Otros alelos detectados:
 Ninguno
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 40 Longitud del amplicón: 186 pb
 Tf estimada = 89,5°C
21. A3108
 45 F:GGCTCCCACTCCATGAGGTATTTGA (SEC ID N°: 44)
 R:TTGTAGTAGCGGAGCGCGA (SEC ID N°: 45)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*3108
 Secuencias NO detectadas:
 Ninguna
 50 Otros alelos detectados:
 A*3107, B0802?, B0803?
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 186 pb
 55 Tf estimada = 89,5°C
22. A32
 F:CACGCAGTTCGTGCGGTCT (SEC ID N°: 46)
 R:TTGTAGTAGCGGAGCGCGA (SEC ID N°: 47)
 60 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*3201~03/05~08
 Secuencias NO detectadas:
 A*3204

- Otros alelos detectados:
 Ninguno
 Concentración de cebadores: [400 nM]
 Control: [75 nM]
 5 Longitud del amplicón: 168 pb
 Tf estimada = 87,5°C
23. A3204
 F:GCTCCCACTCCATGAGGTATTTGTT (SEC ID N°: 48)
 10 R:TTGTAGTAGCGGAGCGCGA (SEC ID N°: 49)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*3201~06/08
 Secuencias NO detectadas:
 A*3207
 15 Otros alelos detectados:
 A*2503
 Concentración de cebadores: [400 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 256 pb
 20 Tf estimada = 89,8°C
24. A34
 F:GCGGGAGCAGGCGGGTACCAGCAGGACGAT (SEC ID N°: 50)
 F2:GCGGGAGCAGTCGGGTACCGGCAGGACGAT (SEC ID N°: 51)
 25 R:GAGCCACTCCACGCACGT (SEC ID N°: 52)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*3401~3406 (todas)
 Secuencias NO detectadas:
 Ninguna
 30 Otros alelos detectados:
 A*2609, 3103, 3104
 Concentración de cebadores: F+F2=[800 nM] R=[200 nM]
 Control: [150 nM]
 Longitud del amplicón: 172 pb
 35 Tf estimada = 87,8°C
25. A4301
 F:GGCCGGAGTATTGGGACCTAC (SEC ID N°: 53)
 R:CGATGTAATCCTTGCCGTCTCA (SEC ID N°: 54)
 40 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 A*4301
 Secuencias NO detectadas:
 Ninguna
 Otros alelos detectados:
 45 Ninguno
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 448 pb
 Tf estimada = 90,3°C
 50
26. A66
 F:CCCAGTCACAGACTGACCGAGTTG (SEC ID N°: 55)
 R:AGCCACTCCACGCACCG (SEC ID N°: 56)
 Secuencias que detectarán estos cebadores:
 55 A*6601, 6604
 Secuencias NO detectadas:
 A*6602, A*6603
 Otros alelos detectados:
 A*0238, 11 (excepto 1104 y 1117), 2603, 2606, 2621
 60 B*1543?, 2725?, 5303?
 Concentración de cebadores: [200 nM]
 Control: [75 nM]
 Longitud del amplicón: 540 pb

Tf estimada = 90,0°C

27. A6602/03

F:CGGGTACCAGCAGGACGAT (SEC ID N°: 57)

5 R:GGAGCCACTCCACGCACTC (SEC ID N°: 58)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

A*6602, 6603

Secuencias NO detectadas:

A*6601, 6604

10 Otros alelos detectados:

Ninguno

Concentración de cebadores: [200 nM]

Control: [75 nM]

Longitud del amplicón: 173 pb

15 Tf estimada = 88,0°C

28. A6901

F:CGGAGTATTGGGACCGGAA (SEC ID N°: 59)

20 R:CGCGGAGGAAGCGCGA (SEC ID N°: 60)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

A*6901

Secuencias NO detectadas:

Ninguna

Otros alelos detectados:

25 A*0255

Concentración de cebadores: [200 nM]

Control: [75 nM]

Longitud del amplicón: 406 pb

Tf estimada = 91,0°C

30

29. A74

F:CACGCAGTTCGTGCGGTCT (SEC ID N°: 61)

R:CGCAGGGTCCCCAGGTCTA (SEC ID N°: 62)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

35 A*7401~7409

Secuencias NO detectadas:

A*7410

Otros alelos detectados:

Ninguno

40 Concentración de cebadores: [200 nM]

Control: [75 nM]

Longitud del amplicón: 156 pb

Tf estimada = 87,0°C

45 30. A8001

F:GCTCCCACTCCATGAGGTATTTGTT (SEC ID N°: 63)

R:GCGCCCGGCGGCGTCTGTCGAAAT (SEC ID N°: 64)

Secuencias que detectarán estos cebadores:

A*8001

50 Secuencias NO detectadas:

Ninguna

Otros alelos detectados:

Ninguno

Concentración de cebadores: [400 nM]

55 Control: [75 nM]

Longitud del amplicón: 128 pb

Tf estimada = 88,0°C

Listado de secuencias

5 <110> Antovich, Zachary
Linkage Biosciences Inc.

<120> Genotipificación de loci de HLA

<130> 025757-000110PC

10 <140> PCT/US06/Aún sin asignar
<141> Aún sin asignar

<150> US 60/669.760
<151> 08-04-2005

15 <160> 64

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20 <210> 1
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A01 F

<400> 1
gagcttatgc gcacggtacg caagtgaggag gcgat 35

30 <210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A01 R

40 <400> 2
caggtatctg cggagcacg 19

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A02 F

50 <400> 3
gggagccccg cttcatcgta 20

<210> 4
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A02 R

60 <400> 4
tctccccgtc ccaatactcc gaa 23

<210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A02 Parte II F

 10 <400> 5
 gagggccgtg cgacgtgggg tcggaat 27

 <210> 6
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A02 Parte II R
 20
 <400> 6
 gcactgtgc ttggtgtct gagat 25

 <210> 7
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A0250 F

 <400> 7
 gctcccactc catgaggtat ttgtt 25

 35 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A0250 F2

 <400> 8
 45 agagggctct cactccatga ggtattgtt 30

 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A0250 R

 <400> 9
 55 gggccgcctc ccacttct 18

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A0250 R2

ES 2 394 097 T3

	<400> 10 atgggccgtc tcccattct	20
5	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A03 F	
15	<400> 11 cccagtcaca gactgaccga gttg	24
20	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A03 R	
30	<400> 12 cactccacgc acgtgtca	18
35	<210> 13 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A03II F	
45	<400> 13 gctcccactc catgaggat ttgtt	25
50	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A03II R	
60	<400> 14 gtccactcgg tcagtctgtg tc	22
65	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A11 F	
75	<400> 15 ccaggttctc acaccatcca gcta	24
80	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A11 R	
5	<400>	16	
		ggccctccag gtaggctctg t	21
	<210>	17	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A11II F	
15	<400>	17	
		ccaggttctc acaccatcca gcta	24
	<210>	18	
	<211>	23	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A11II R	
25	<400>	18	
		acttgcgctt ggtgatctga ggt	23
	<210>	19	
30	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A23 F	
	<400>	19	
		cggagtattg ggacgaggag actg	24
40	<210>	20	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A23 R	
	<400>	20	
		gcccggccct ctcaactgct cggccactc	29
50	<210>	21	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
55	<220>		
	<223>	Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A23II F	
	<400>	21	
60		cggagtattg ggacgaggag actg	24
	<210>	22	
	<211>	28	

ES 2 394 097 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A23II R

<400> 22
 gtggcagggc cttgccgtcg taggcgaa 28

10 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A24 F

<400> 23
 20 ttctcacacc ctccagatga tgct 24

<210> 24
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A24 R

<400> 24
 30 cgctcccac ttgcgct 18

<210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A24II R

<400> 25
 40 gggacgagga gacagggaga 20

<210> 26
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A24II L

<400> 26
 50 ttgtagtagc ggagcgca 19

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A24III F

<400> 27
 cggagtattg ggacgaggag actg 24

ES 2 394 097 T3

<210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A24III R

 10 <400> 28
 ctctctgctg ctccgccacc t 21

 <210> 29
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A2424 F
 20
 <400> 29
 cggagtattg ggaccggaac 20

 <210> 30
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A2424 R

 <400> 30
 ctctctgctg ctccgccacc t 21

 35 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A25 F

 <400> 31
 45 ccactcaca gactgaccga gatag 25

 <210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A25 R

 <400> 32
 55 cgcgaccccg atgtaatcct tgccgtcgtc a 31

 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A26 F

ES 2 394 097 T3

	<400> 33 ccactcacag actgaccgag ctaa	24
5	<210> 34 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A26 F2	
15	<400> 34 ccagtcacag actgaccgag ctaa	24
20	<210> 35 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A26 R	
30	<400> 35 cgcgacccg atgtaactct tgccgctgc a	31
35	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A26II F	
45	<400> 36 cggagtattg ggaccggaac	20
50	<210> 37 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A26II R	
60	<400> 37 gatgtaatcc ttgccgtcgt ca	22
65	<210> 38 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A29 F	
75	<400> 38 ggctcccact ccatgagga ttga	25
80	<210> 39 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 394 097 T3

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A29 R

5 <400> 39
 tcgcggcgctc gctgtta 17
 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A30 F

15 <400> 40
 ccaggttctc acaccatcca gcta 24
 <210> 41
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A30 R

25 <400> 41
 gccgtcgtag gcgtgctct 19
 <210> 42
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A31 F

35 <400> 42
 ggctcccact ccatgaggtta ttga 25
 40 <210> 43
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A31 R

45 <400> 43
 cgcgagtggtg tctcctggctc ccaatactca ggcat 35
 50 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A3108 F

60 <400> 44
 ggctcccact ccatgaggtta ttga 25
 <210> 45
 <211> 19

ES 2 394 097 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A3108 R

<400> 45
 ttgtagtagc ggagcgca 19

10 <210> 46
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A32 F

<400> 46
 20 cacgcagttc gtgcggtc 19

<210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A32 R

<400> 47
 30 ttgtagtagc ggagcgca 19

<210> 48
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A3204 F

<400> 48
 40 gctcccactc catgaggat ttgtt 25

<210> 49
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A3204 R

<400> 49
 50 ttgtagtagc ggagcgca 19

<210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A34 F

<400> 50
 gcgggagcag gcgggtacca gcaggacgat 30

<210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A34 F2

 10 <400> 51
 gcgggagcag tcgggtaccg gcaggacgat 30

 <210> 52
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A34 R
 20
 <400> 52
 gagccactcc acgcacgt 18

 <210> 53
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A4301 F
 30
 <400> 53
 ggccggagta ttggaccta c 21

 35 <210> 54
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A4301 R

 <400> 54
 cgatgtaatc ctgcccgtcg tca 23
 45
 <210> 55
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A66 F

 <400> 55
 55 cccagtcaca gactgaccga gttg 24

 <210> 56
 <211> 17
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A66 R

ES 2 394 097 T3

	<400> 56 agccactcca cgcaccg	17
5	<210> 57 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A6602/03 F	
15	<400> 57 cgggtaccag caggacgat	19
20	<210> 58 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A6602/03 R	
30	<400> 58 ggagccactc cacgcactc	19
35	<210> 59 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A6901 F	
45	<400> 59 cggagtattg ggaccggaa	19
50	<210> 60 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A6901 R	
60	<400> 60 cgcggaggaa gcgcga	16
65	<210> 61 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A74 F	
75	<400> 61 cacgcagttc gtcggtct	19
80	<210> 62 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 394 097 T3

<220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A74 R

5 <400> 62
cgcaggggtcc ccaggtcta 19
<210> 63
<211> 25
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A8001 F

15 <400> 63
gctcccactc catgaggtat ttgtt 25
<210> 64
<211> 26
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR específico del grupo HLA-A A8001 R

25 <400> 64
gcgcccggcg gcgtcgctgt cgaaat 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de genotipificación en un locus de HLA utilizando un sistema de PCR múltiple que tiene una mezcla maestra de PCR uniforme y aplicando un perfil de termociclación uniforme, cuyo método consiste en las siguientes etapas:
- 10 i) establecer una pluralidad de al menos 25 recipientes de reacción PCR con una solución acuosa cada uno que contiene un par de cebadores de PCR para amplificar una región control de ADN, un par de cebadores de PCR específicos de alelos de HLA diferentes para amplificar diferentes alelos de HLA en el locus y una mezcla maestra de PCR uniforme que tiene un colorante fluorescente capaz de detectar ADN de doble hebra;
- 15 ii) añadir una muestra biológica que contiene ADN codificante de HLA y ADN codificante control;
- iii) amplificar el ADN codificante de HLA y el ADN codificante control en los recipientes de reacción utilizando un perfil de termociclación uniforme en la pluralidad de recipientes de reacción para obtener soluciones que contienen ADN amplificado que tiene un amplicón control y amplicones de HLA, donde la temperatura de fusión del amplicón control es al menos 10°C inferior a la temperatura de fusión de los amplicones de HLA; y
- iv) determinar el tipo de HLA por el perfil de fusión del ADN en las soluciones.
- 20 2. Un método de la reivindicación 1, donde el marcaje fluorescente se une al surco menor del ADN de doble hebra amplificado.
3. Un método de la reivindicación 1, donde el amplicón control tiene una T_f por debajo de 75°C.
- 25 4. Un método de la reivindicación 1, donde el número de recipientes de reacción es suficiente para identificar suficientes polimorfismos como para definir una familia de alelos o un solo alelo para un locus de HLA dado.
5. Un método de la reivindicación 1, donde la etapa determinante incluye el cálculo de la primera derivada del perfil de fusión fluorescente de las soluciones.
- 30 6. Un método de la reivindicación 1, donde el método comprende la etapa de utilización de un ordenador para calcular la primera derivada a partir de los datos sin procesar y de aporte de resultados gráficos.
7. Un método de la reivindicación 1, donde la muestra biológica procede de tejido cadavérico.
- 35 8. Un método de la reivindicación 1, donde el número de recipientes de reacción de la PCR es mayor de 35.
9. Un método de la reivindicación 1, donde el locus es seleccionado entre el grupo consistente en HLA A, HLA B, HLA C, HLA DR, HLA DP y HLA DQ.
- 40 10. Un sistema de genotipificación en un locus de HLA utilizando un método de la reivindicación 1, donde el sistema comprende:
- 45 i) un termociclador consistente en una pluralidad de al menos 25 recipientes de reacción de PCR, donde cada recipiente de reacción contiene un par de cebadores de PCR capaz de amplificar una región control de ADN, un par de cebadores de PCR específicos de alelos de HLA para amplificar diferentes alelos de HLA en el locus de HLA y una mezcla maestra de PCR uniforme que tiene un colorante fluorescente capaz de detectar ADN de doble hebra, donde la temperatura de fusión del amplicón control amplificado por el par de cebadores control es al menos 10°C inferior a la temperatura de fusión del amplicón de HLA amplificado por el par de cebadores específicos de alelos; y
- 50 ii) un ordenador operativamente conectado a los recipientes de reacción, donde el ordenador es capaz de determinar el genotipo de HLA comparando los perfiles de fusión de las soluciones con los de soluciones estándar.
- 55 11. Un sistema de la reivindicación 10, donde el colorante fluorescente se une al surco menor del ADN de doble hebra amplificado.
12. Un sistema de la reivindicación 10, donde el ordenador determina el genotipo de HLA calculando la primera derivada del perfil de fusión fluorescente de las soluciones.
- 60 13. Un sistema de la reivindicación 10, donde el amplicón control tiene una T_f por debajo de 75°C.
14. Un sistema de la reivindicación 10, donde el número de recipientes de reacción es suficiente para identificar

suficientes polimorfismos como para definir una familia de alelos o un solo alelo para un locus de HLA dado.

5 15. Un sistema de la reivindicación 10, donde el ordenador calcula la primera derivada de los perfiles de fusión y proporciona resultados gráficos.

16. Un sistema de la reivindicación 10, donde el número de recipientes de reacción de la PCR es mayor de 35.

10 17. Un sistema de la reivindicación 10, donde el locus es seleccionado entre el grupo consistente en HLA A, HLA B, HLA C, HLA DR, HLA DP y HLA DQ.

18. Un sistema de la reivindicación 10, donde el ordenador proporciona un perfil de termociclación uniforme en la pluralidad de recipientes de reacción.

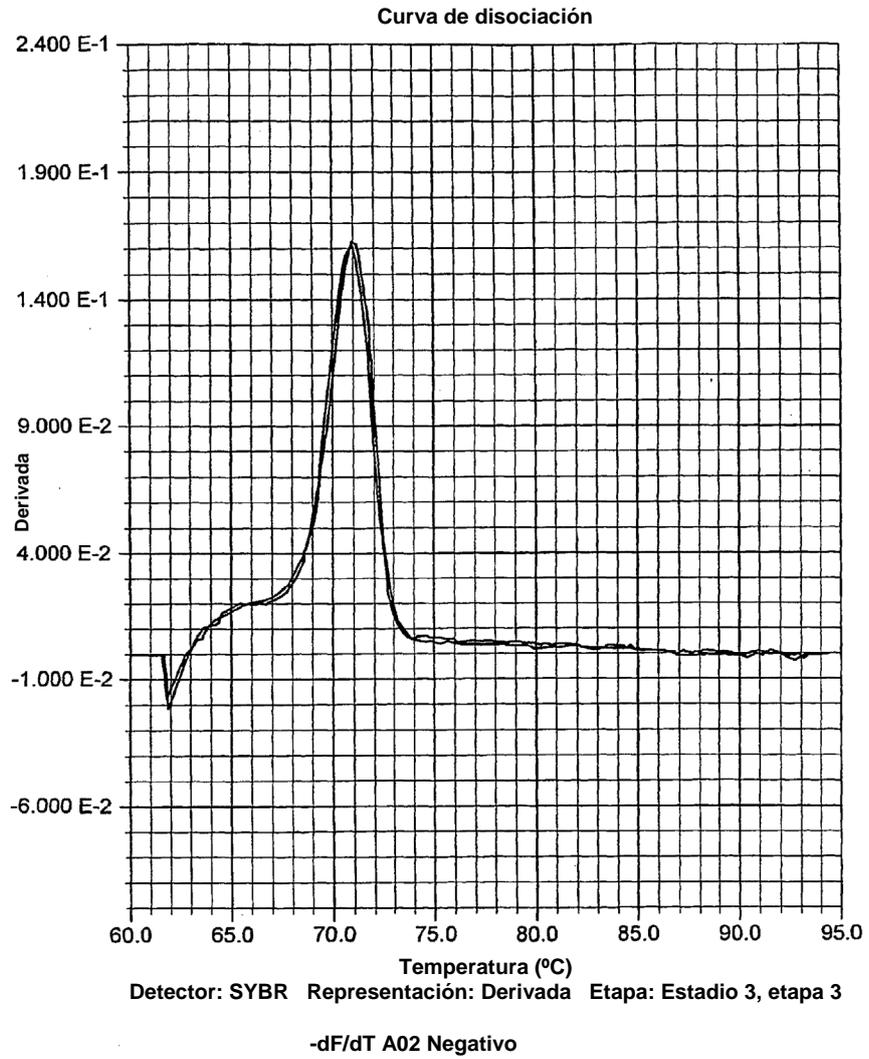


FIG. 1

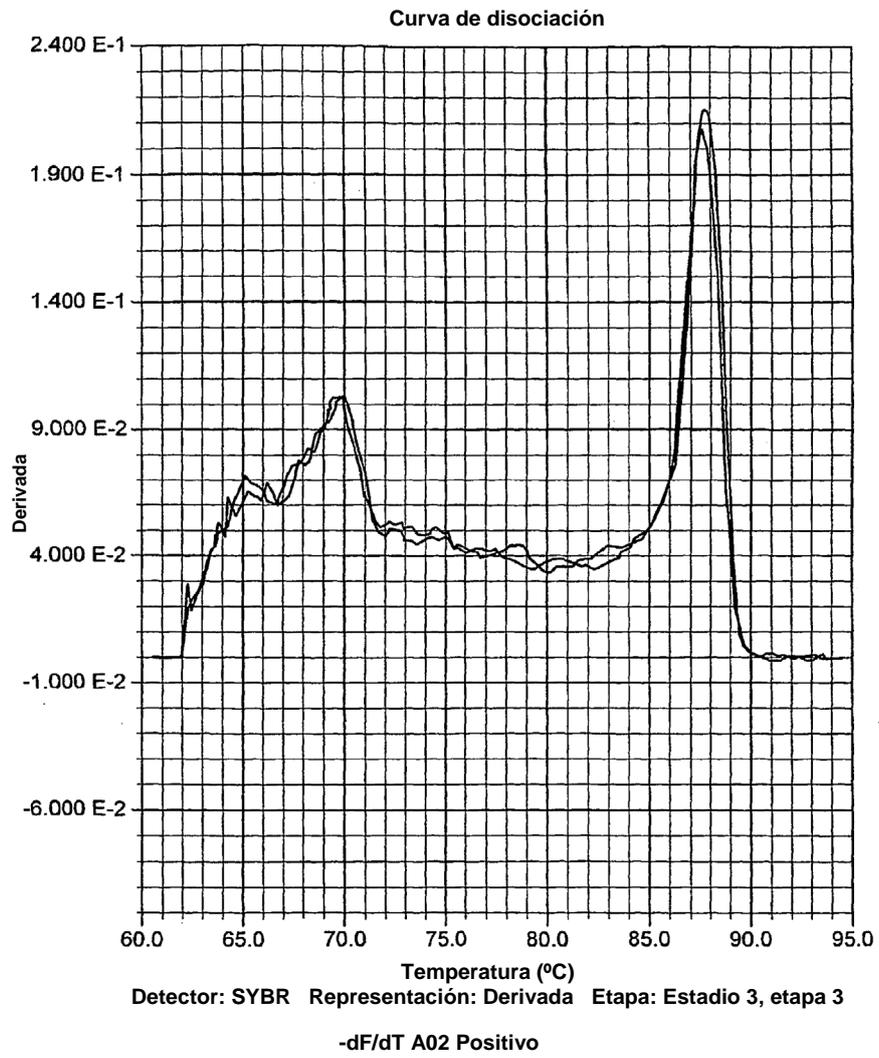
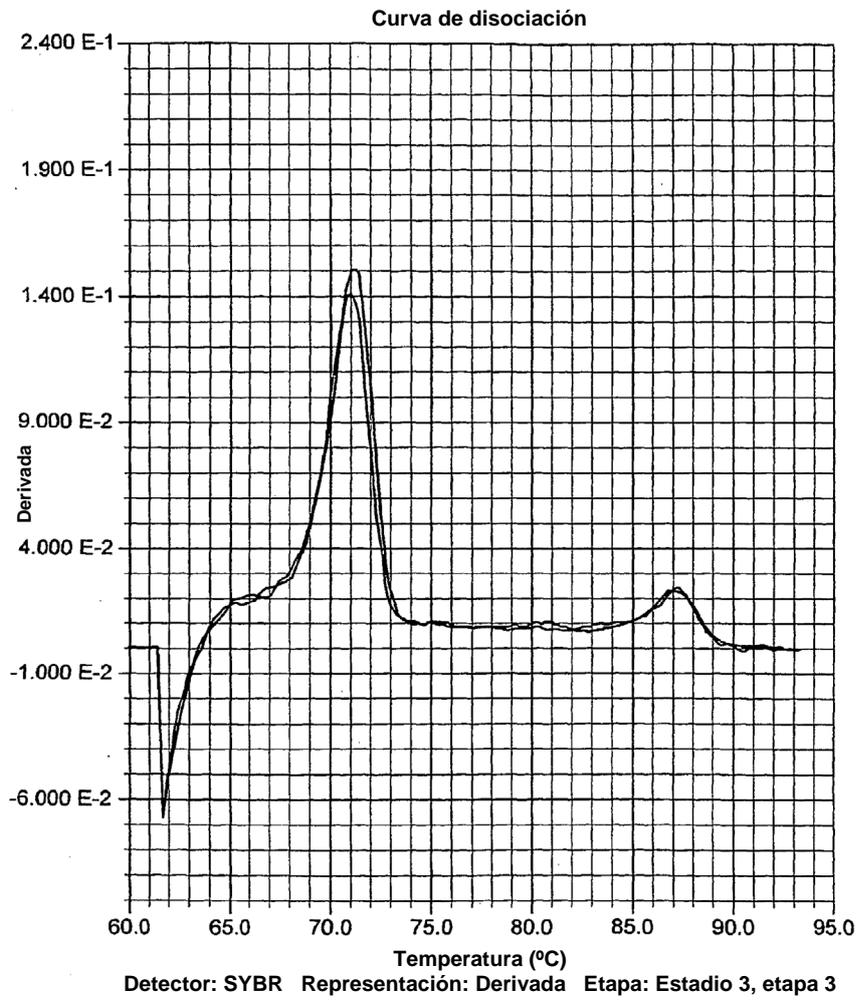


FIG. 2



-dF/dT A24 Negativo

FIG. 3

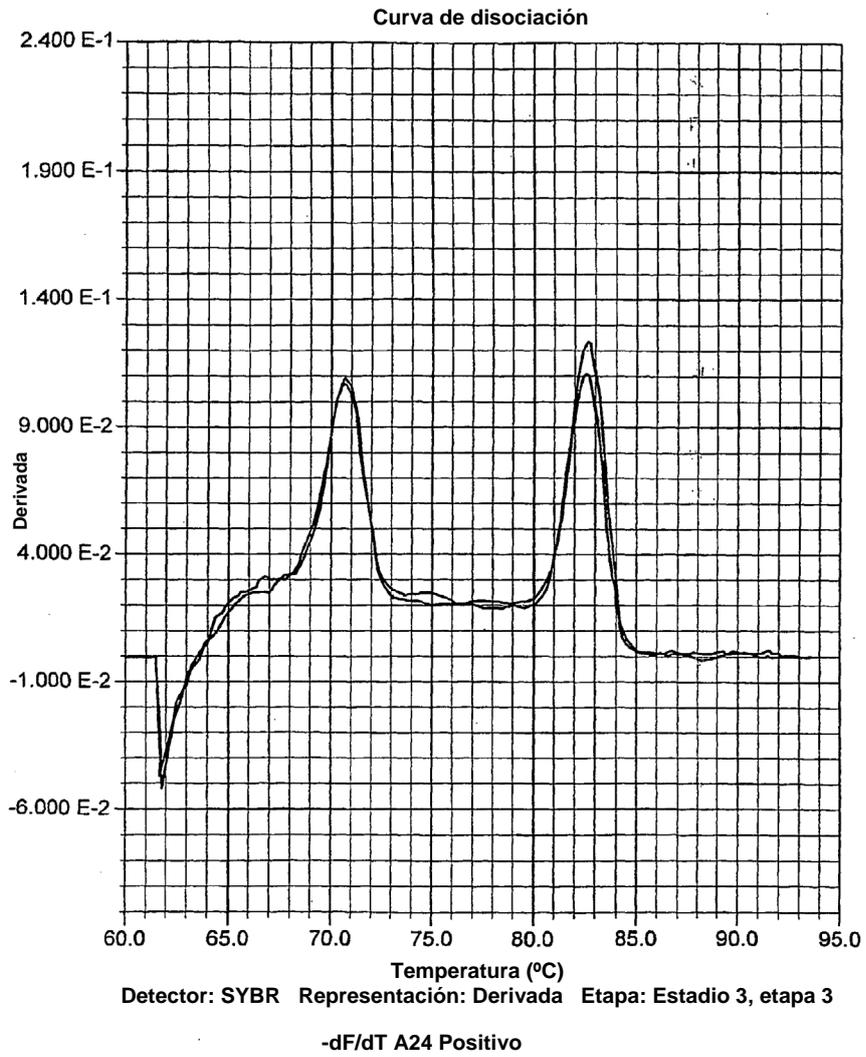


FIG. 4

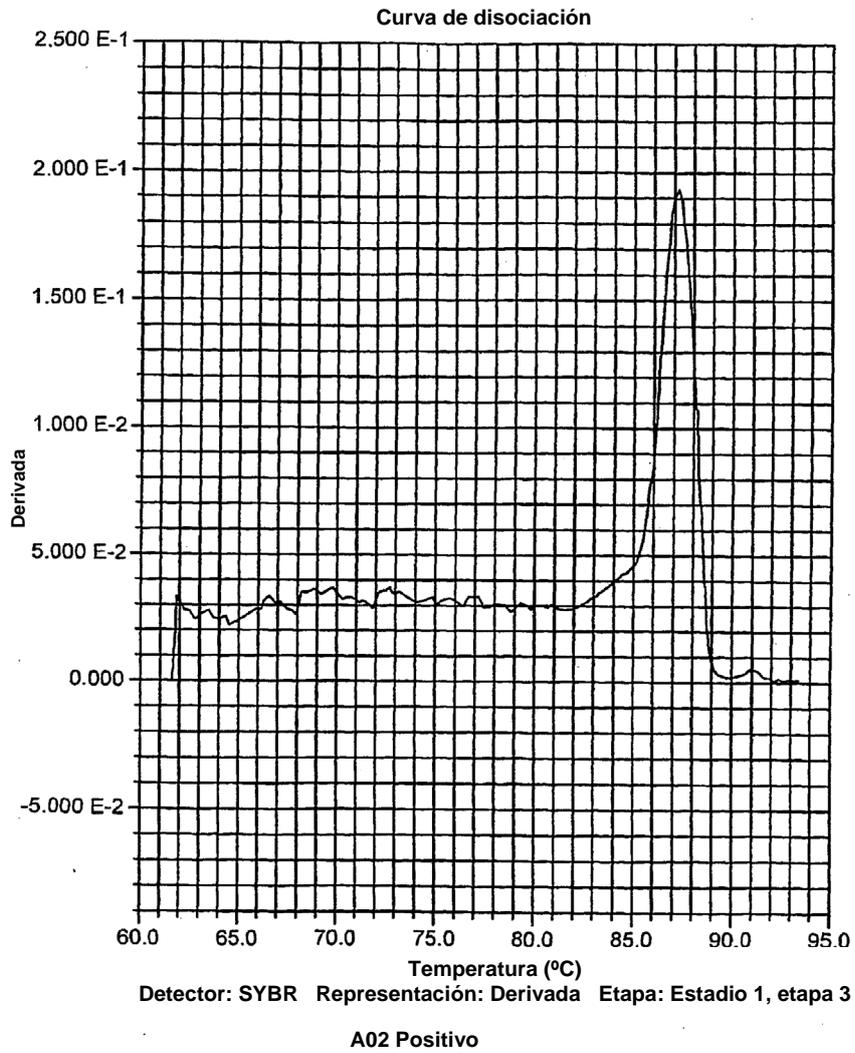
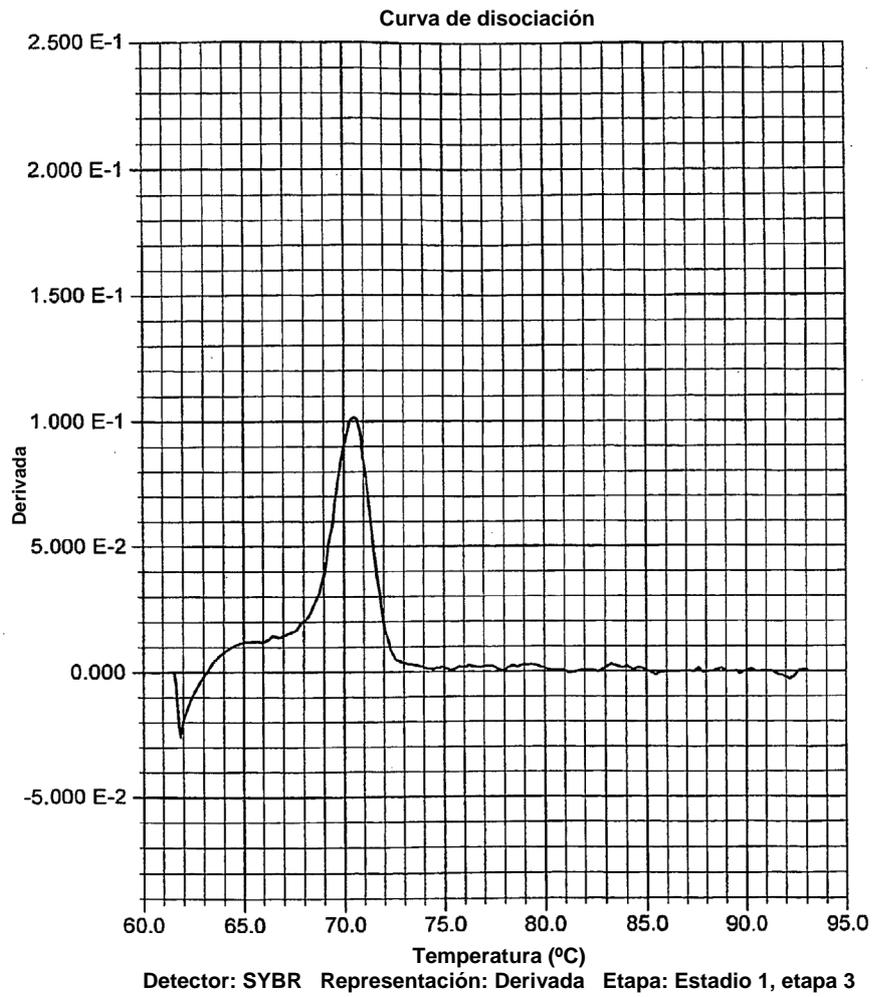
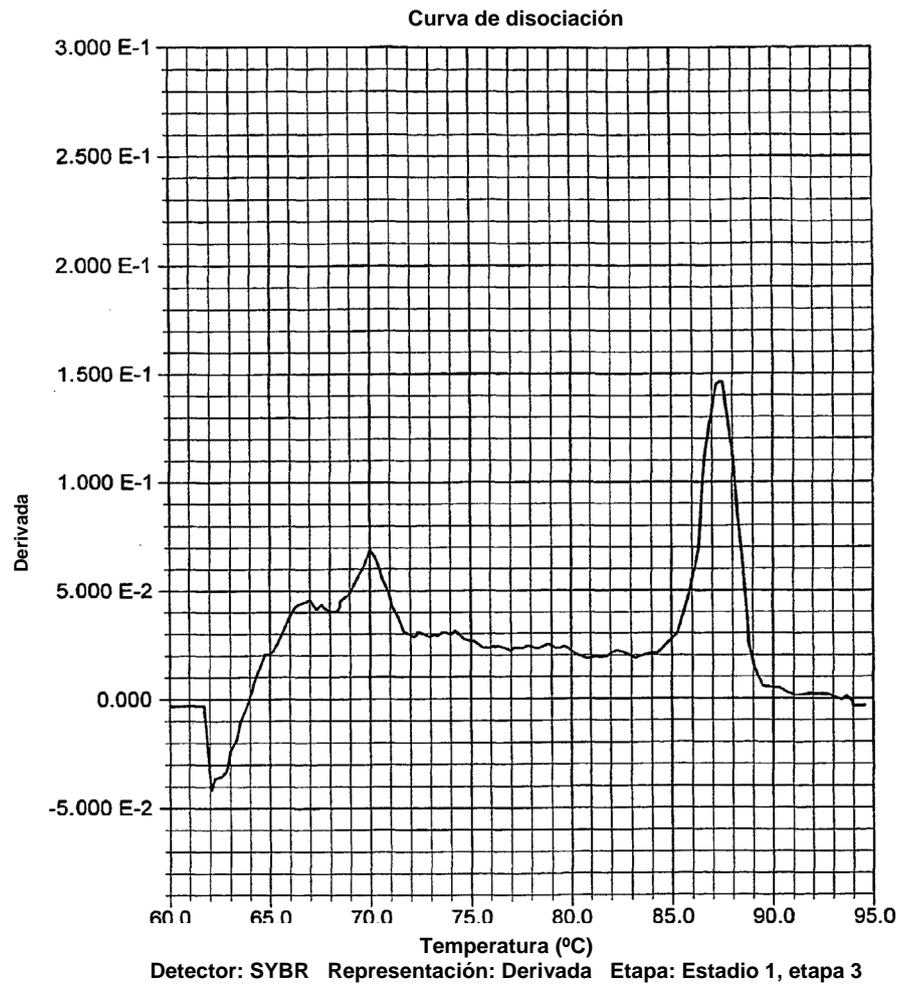


FIG. 5



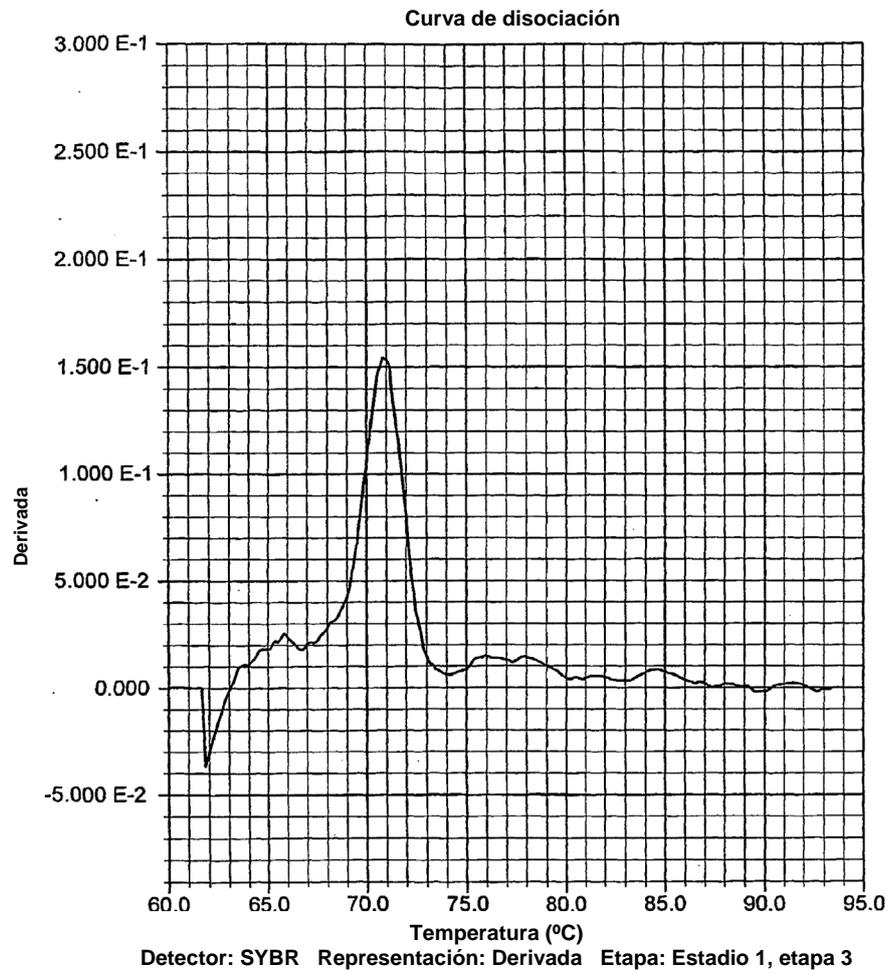
A02 Negativo

FIG. 6



A7401 Positivo

FIG. 7



A7401 Negativo

FIG. 8