

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 420**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2000 E 10182224 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2319942**

54 Título: **Método para la amplificación de alelos HLA Clase I**

30 Prioridad:

11.06.1999 US 138614 P
09.04.1999 EP 99870068

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2013

73 Titular/es:

INNOGENETICS N.V. (100.0%)
Technologiepark 6
9052 Ghent, BE

72 Inventor/es:

DE CANCK, ILSE;
ROMBOUT, ANNELIES y
ROSSAU, RUDI

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 430 420 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

Método para la amplificación de alelos HLA Clase I

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un método para la tipificación o subtipificación de HLA-B. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para la amplificación separada, locus-específica del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) está incluido dentro de aproximadamente 4 Mbp de ADN en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3 (Campbell y Trowsdale, 1993). El MHC humano se divide en regiones de clase I, clase II y clase III. Los genes de clase I y clase II codifican moléculas de la superficie celular altamente polimórficas que se unen y presentan antígenos procesados en forma de péptidos a los linfocitos T, iniciando tanto las respuestas inmunes celulares como humorales.

Las moléculas clase I del MHC humano, HLA-A, -B, y -C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glicoproteínas de la superficie celular que se unen y presentan péptidos procesados derivados de las proteínas endógenamente sintetizadas de las células T CD8+. Estos heterodímeros consisten en una cadena α de HLA codificada asociada con un polipéptido monomórfico no MHC codificado β -microglobulina (Townsend y Bodmer, 1989; Spencer y Parham, 1996). Las moléculas de clase II del MHC humano se codifican en la región HLA-D. Estas glicoproteínas de la superficie celular consisten en cadenas α - y β - HLA- codificadas, asociadas como heterodímeros sobre la célula superficie de células presentadoras de antígenos tales como células B y macrófagos. Las moléculas de clase II sirven como receptores para péptidos procesados. Sin embargo, estos péptidos se derivan predominantemente de las proteínas de membrana y extracelular y se presentan a las células T CD4+. La región HLA-D contiene diversos genes clase II y tiene tres subregiones principales: HLA-DR, -DQ, y -DP. Tanto las regiones HLA-DQ como -DP contienen un gen funcional por cada una de sus cadenas α - y β -. La subregión HLA-DR contiene un gen funcional para la cadena α ; el número de genes funcionales para la cadena β varía de uno a dos de acuerdo con el haplotipo (Andersson y otros, 1987; Apple y Erlich, 1996).

Existe polimorfismo extensivo en la mayoría de los loci. En vista de la importancia biológica y médica de estos antígenos, se requiere una técnica altamente sensible y rápida para la tipificación de HLA. Una variedad de técnicas se usan actualmente para detectar el polimorfismo de HLA, incluyendo serológicas, bioquímicas, reconocimiento de células T y, más recientemente, los métodos de biología molecular.

La serología continua siendo el método soporte principal para la tipificación de HLA -especialmente de clase I- en muchos laboratorios de rutina de histocompatibilidad. El ensayo de micro-linfocitotoxicidad (Kissmeyer y otros, 1969; Terasaki y McClelland, 1964) es la aproximación estándar: células mononucleares viables de sangre periférica (clase I) o células B separadas (clase II) se mezclan con el antisuero (policlonal o monoclonal) de especificidad HLA conocida.

La detección del polimorfismo se puede lograr buscando en la diferente composición de aminoácidos de las moléculas de HLA a través de técnicas bioquímicas tal como focalización isoelectrica unidimensional (IEF; Yang, 1987). Este método descansa en las sustituciones de aminoácidos que contribuyen a los cambios en la carga de la molécula de HLA.

Otro método de tipificación de HLA es la reacción mixta de linfocitos (MLR). En conjunto con las observaciones que se realizan usando antisuero HLA-específico, se observó que los linfocitos procedentes de dos fuentes no relacionadas, pueden proliferar cuando se mezclan en el cultivo (Hirschom y otros, 1963).

Los análisis de las especificidades de HLA a partir de ADN proporcionan un nuevo enfoque para definir sus diferencias polimórficas. En lugar de observar las diferencias en la molécula expresada, el polimorfismo se caracteriza a nivel de nucleótido.

Un desarrollo importante y poderoso en el campo de la biología molecular ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y otros, 1986; Mullis and Faloona, 1987). En la tipificación de tejidos, se usa el PCR para amplificar las regiones polimórficas de genes HLA. Este producto HLA de PCR puede analizarse después por sus diferencias polimórficas, para establecer el tipo de tejido. Varios enfoques de este tipo se desarrollaron, incluyendo análisis heterodúplex de los productos de PCR (Clay y otros, 1994), análisis conformacional del polimorfismo de simple cadena del producto de PCR (PCR-SSCP; Yoshida y otros, 1992), tipificación basada en la secuencia (SBT; Santamaria y otros, 1992 y 1993), el uso de

cebadores específicos de secuencia en la reacción de PCR (PCR-SSP; Olerup y Zetterquist, 1991), el uso de PCR en combinación con el sondeo del oligonucleótido secuencia-específico (PCR-SSOP; Saiki y otros, 1986) o sondeo en membrana de transferencia puntual reversa (Saiki y otros, 1989). Estos enfoques, usados simplemente o en combinación, se han aplicado como métodos basados en ADN para la tipificación de tejidos de especificidades de HLA clase I y clase II. Los métodos de tipificación de ADN deben preferirse a los métodos serológicos proporcionados, siempre que está disponible un método de tipificación de ADN fácil, rápido y seguro. Algunas diferencias nivel de subtipo que son detectables por los métodos de ADN pueden no ser detectadas con los métodos actuales de tipificación serológica, aunque estas diferencias pueden provocar el rechazo del aloinjerto (Fleischhauer y otros, 1990).

El sistema HLA es el sistema genético humano más polimórfico se conoce todavía. Los genes de HLA Clase I comparten una estructura similar (de 5' a 3'): una región de flaqueo no traducida en 5', un primer exón (exón 1) que tiene una longitud de aproximadamente 73 pares de bases, un primer intrón (intrón 1) que tiene una longitud de aproximadamente 130 pares de bases, un segundo exón (exón 2), que tiene una longitud de aproximadamente 250 pares de bases, un segundo intrón (intrón 2), que tiene una longitud de aproximadamente 272 pares de bases, un tercer exón (exón 3), que tienen una longitud de aproximadamente 276 pares de bases, un tercer intrón (intrón 3), que tiene una longitud de aproximadamente 588 pares de bases y cuarto exón (exón 4), que tiene una longitud de aproximadamente 276 pares de bases. Las sustituciones polimórficas dentro de los alelos HLA Clase I están ubicados principalmente tanto en el exón 2 como en el exón 3, que codifica la hendidura de unión del péptido de la molécula de clase I. Estos polimorfismos hacen diferenciación entre alelos alcanzables a través una variedad de técnicas de biología molecular tales como secuenciación o hibridación con sondas competentes. En los estuches de diagnóstico actuales el exón 2 y exón 3 se amplifican juntos, resultando en amplicones de aproximadamente 1 kb, que está formado por al menos el exón 2, intrón 2 y exón 3. Los cebadores locus-específico están disponibles para la amplificación de estos amplicones de 1 kb. Sin embargo, dichos amplicones grandes son difíciles de amplificar y mostrar la formación de estructura secundaria que resulta en la hibridación ineficiente de algunas sondas. Adicionalmente, debido a la aparición de nuevos alelos HLA-clase I, ciertas combinaciones de alelos no pueden distinguirse más sólo por la detección de polimorfismo en el exón 2 y el exón 3 y se requiere la tipificación adicional en el exón 4. Esto plantea la necesidad de la amplificación adicional del exón 4, lo que resulta en un amplicón aún más grande. Por lo tanto, una amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 puede desearse resultando en productos de amplificación que permiten una tipificación más eficiente de los alelos HLA Clase I. Sin embargo, como los sitios de hibridación de cebador locus-específico son escasos y no se pueden encontrar en el exón 2, exón 3 o exón 4, no es tan evidente la amplificación separada y locus-específica del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A, HLA -B y HLA -C.

Los métodos y estuches para la tipificación de HLA-B basada en la amplificación de los exones 2 y 3 se describen por ejemplo en WO 99/07 883 y WO 97/23 645. Los cebadores específicos para HLA-B se describen por ejemplo en EP-A-0 414 469, WO 97/20 197.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la amplificación separada locus-específica del exón 2, exón 3 y exón 4 de los alelos HLA-B.

Es un objetivo más específico de la presente invención proporcionar un método de una amplificación de única etapa, locus-específica, separada de los tres exones, exón 2, exón 3 y exón 4, de los alelos HLA-B.

En la presente descripción se describen además cebadores para usar en un método para la amplificación separada locus-específica del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, cebadores para usar en un método para la amplificación separada locus-específica del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, cebadores para usar en un método para la amplificación separada locus-específica del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, un conjunto cebador para usar en un método para la amplificación separada locus-específica del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, un conjunto cebador para usar en un método para la amplificación separada locus-específica del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C

Un conjunto cebador para usar en un método para la amplificación separada locus-específica del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, una mezcla cebador multiplex para usar en un método para la amplificación separada locus-específica de una etapa del exón 2 y exón 3 de HLA-A, HLA-B o HLA-C, una mezcla cebador multiplex para usar en un método para la amplificación separada locus-específica de una etapa del exón 2 y exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C y una mezcla cebador multiplex para usar en un método para la amplificación separada locus-específica de una etapa del exón 3 y exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

Es otro objetivo más específico de la presente invención proporcionar una mezcla cebador multiplex para usar en un método para la amplificación separada locus-específica de una etapa del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

Es otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-B en una muestra.

5 Es otro objetivo de la presente invención es proporcionar un estuche mejorado de diagnóstico para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-B en una muestra.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un ensayo de sonda de línea mejorado para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-B en una muestra.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un método para la amplificación locus-específica, separada del exón 2, exón 3 y el exón 4B de los alelos HLA-B, haciendo uso de al menos un conjunto cebador en donde:

- 15
- para la amplificación del exón 2, el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-B;
 - para la amplificación del exón 3, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-B y/o el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de HLA-B;
 - para la amplificación del exón 4, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de HLA-C.
- 20

25 Los métodos de amplificación de la descripción hacen uso de un conjunto cebador de los cuales al menos uno de los cebadores se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 o en el intrón 3 del gen de HLA Clase I para obtener la amplificación separada del exón 2 (sin exón 3 o exón 4), exón 3 (sin exón 2 o exón 4) y/o exón 4 (sin exón 2 o exón 3).

30 En el caso donde se amplifica el exón 2, el cebador inverso se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2, mientras que el cebador directo puede seleccionarse para hibridar con una región corriente arriba al exón 2 (por ejemplo, en intrón 1 o en exón 1) o a los nucleótidos iniciales del exón 2. En una modalidad preferida, el cebador directo se hibrida a una región locus-específica corriente arriba al exón 2 (por ejemplo, en intrón 1 o en exón 1) o a los nucleótidos iniciales locus-específicos del exón 2 y el cebador inverso se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2

35 En el caso donde se amplifica el exón 3, el cebador directo se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2, mientras que el cebador inverso puede seleccionarse para hibridar con los nucleótidos finales del exón 3 o corriente abajo del exón 3 (por ejemplo, en intrón 3) o el cebador inverso se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3, mientras que el cebador directo puede seleccionarse para hibridar con una región corriente arriba al exón 3 (por ejemplo, intrón 2) o a los nucleótidos iniciales del exón 3. En una modalidad preferida, el exón 3 se amplifica mediante el uso de un conjunto cebador de los cuales el cebador directo se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 y el cebador inverso se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3.

40

45 En el caso en que se amplifica el exón 4, el cebador directo se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3, mientras que el cebador inverso puede seleccionarse para hibridar con los nucleótidos finales del exón 4 o corriente abajo al exón 4 (por ejemplo, en intrón 4). En una modalidad preferida, el cebador directo se hibrida a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3, mientras que el cebador inverso se hibrida con secuencias objetivos locus-específicas en el extremo del exón 4 o corriente abajo al exón 4 (por ejemplo, en intrón 4) .

50 Este nuevo método de amplificación resultará en la amplificación de fragmentos de ADN más cortos, que sólo contiene el exón 2, sólo exón 3 o sólo exón 4, que son mucho más fáciles para amplificar y mucho más fácil de usar en diferentes métodos de tipificación tales como secuenciación o hibridación con diferentes sondas específicas al alelo. De la sección de ejemplos es evidente que conjuntos de cebadores que contiene un cebador que hibrida con una secuencia objetivo en el intrón 2 o intrón 3 proporcionan una amplificación mucho mejor y más fácil del exón 2, exón 3 o exón 4 de alelos HLA Clase I y un patrón de hibridación más claro y pronunciado con las sondas de tipificación de alelos. Ha sido el mérito de los presentes inventores definir cebadores específicos que permiten esta amplificación separada del exón 2, exón 3 o exón 4 de un solo locus de HLA, mientras que dichos exones de otros loci de HLA (es decir, otros genes HLA clásicos, genes HLA no clásicos o pseudogenes) no se co-amplifican. Como los amplicones específicos pueden dar lugar a una tipificación fallida en el producto de amplificación, el método de amplificación de la invención ciertamente mejorará la seguridad de los actuales métodos de tipificación.

55

60

El término "locus-específico" significa así que el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de solamente un locus (es decir, HLA-A, HLA-B o HLA-C) se amplifica mientras que el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de los otros loci de HLA (es decir otros genes HLA clásicos, genes HLA no clásicos o pseudogenes) no se amplifican. Así, cuando se usan los cebadores específicos para la amplificación del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B, HLA-C o de otros loci de HLA no se amplifican. Igualmente, cuando se usan los cebadores específicos para la amplificación del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, HLA-C o de otros loci de HLA no se amplifican. Igualmente, cuando se usan los cebadores específicos para la amplificación del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, HLA-B o de otros loci de HLA no se amplifican. A partir de esto es evidente que el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de 2, 3 o más loci de HLA pueden nunca ser amplificados juntos. Así, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A pueden nunca ser amplificados en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B. Igualmente, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A pueden nunca ser amplificados en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B. Igualmente, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B pueden nunca ser amplificados en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-C. Igualmente, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B pueden nunca ser amplificados en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-C. Como consecuencia, la presente invención se relaciona con un método para la amplificación separada locus-específica, de los alelos HLA-B del exón 2, exón 3 y exón 4. Esto significa que la invención se relaciona con un método para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B.

El término "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótido de cadena simple capaz de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a la cadena de ácido nucleico que se copia. La longitud y la secuencia del cebador deben ser tales que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión. En una modalidad específica, la longitud del cebador es aproximadamente 5-50 nucleótidos. En otra modalidad específica, la longitud del cebador es aproximadamente 10-30 nucleótidos. En otra modalidad específica, la longitud de los cebadores es aproximadamente 20-25 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad del objetivo ADN o ARN requerido, así como de las condiciones en las que se usa el cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.

La expresión "conjunto cebador" o "par cebador" se refiere a un par cebador que permiten la amplificación de parte o de todo el exón 2, exón 3 o exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C. Un conjunto cebador consiste siempre en un cebador directo (o cebador 5') y un cebador inverso (o cebador 3').

Los términos "hibridar específicamente" y "se hibrida específicamente" significa que, durante la etapa de amplificación, dicho cebador forma un dúplex con parte de su secuencia objetivo o con toda la secuencia objetivo en las condiciones experimentales usadas, y que bajo esas condiciones dicho cebador no forma un dúplex con otras secuencias de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que se analiza. Se debe entender que los cebadores que se diseñan para hibridar específicamente con una secuencia objetivo de un ácido nucleico, pueden caer dentro de dicha secuencia objetivo o puede, superponerse en gran medida con dicha secuencia objetivo (es decir, forma un dúplex con nucleótidos externos, así como dentro de dicha secuencia objetivo).

El término "secuencia objetivo" de un cebador de acuerdo con la presente invención es una secuencia dentro del intrón 2 o intrón 3 de los alelos HLA Clase I a la cual el cebador es completamente complementario o parcialmente complementario (es decir, con no coincidencias de hasta 20%, 15%, 10% o 5%). Es de entenderse que el complemento de dicha secuencia objetivo es también una secuencia objetivo adecuada en algunos casos. El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que coincidir exactamente con la secuencia objetivo correspondiente en el molde para garantizar la amplificación apropiada es ampliamente documentado en la literatura (Kwok y otros, 1990). Sin embargo, cuando los cebadores no son completamente complementarios a su secuencia objetivo, se debe tomar en cuenta que los fragmentos amplificados tendrán la secuencia de los cebadores y no de la secuencia objetivo.

En una modalidad, la amplificación se realiza en un tubo de reacción con un conjunto cebador para la amplificación del exón 2 como se describió anteriormente (el cebador inverso se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2) y, consecuentemente sólo se amplifica el exón 2. En otra modalidad, la amplificación se realiza en un tubo de reacción con un conjunto cebador para la amplificación del exón 3 como se describió anteriormente (cebador directo se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2) y, consecuentemente sólo se amplifica el exón 3.

En otra modalidad, la amplificación se realiza en un tubo de reacción con un conjunto cebador para la amplificación del exón 3 como se describió anteriormente (el cebador inverso se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3) y, consecuentemente sólo se amplifica el exón 3.

En otra modalidad, la amplificación se realiza en un tubo de reacción con un conjunto cebador para la amplificación del exón 3 como se describió anteriormente (cebador directo se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 y el

cebador inverso se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3) y, consecuentemente sólo se amplifica el exón 3.

En otra modalidad, la amplificación se realiza en un tubo de reacción con un conjunto cebador para la amplificación del exón 4 como se describió anteriormente (cebador directo se hibrida con una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3) y, consecuentemente sólo se amplifica el exón 4.

En consecuencia, en la presente descripción se describen métodos para la amplificación separada del exón 2, exón 3 o exón 4 de los alelos HLA Clase I.

En otra modalidad, los diferentes conjuntos cebadores involucrados en la amplificación del exón 2 y la amplificación del exón 3 se mezclan y se realiza en un único tubo de reacción la amplificación separada tanto del exón 2 como el exón 3. Así, la presente descripción se refiere también a un método descrito anteriormente, caracterizado además tanto porque tanto el exón 2 como el exón 3 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante el uso de una mezcla cebador múltiple que contiene al menos un par cebador para la amplificación del exón 2 y al menos un par cebador para la amplificación del exón 3. En consecuencia, la presente descripción se refiere a un método para la amplificación separada del exón 2 y exón 3 de alelos HLA Clase I.

En otra modalidad, los diferentes conjuntos cebadores involucrados en la amplificación del exón 2 y la amplificación del exón 4 se mezclan y se realiza en un único tubo de reacción la amplificación separada tanto del exón 2 como el exón 4. Así, la presente descripción se refiere además a un método descrito anteriormente, caracterizado además porque tanto el exón 2 como el exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante el uso de una mezcla cebador múltiple que contiene al menos un par cebador para la amplificación del exón 2 y al menos un par cebador para la amplificación del exón 4. En consecuencia, la presente descripción se refiere a un método para la amplificación separada del exón 2 y exón 4 de alelos HLA Clase I.

En otra modalidad, los diferentes conjuntos cebadores involucrados en la amplificación del exón 3 y la amplificación del exón 4 se mezclan y se realiza en un único tubo de reacción la amplificación separada tanto del exón 3 como el exón 4. Así, la presente descripción también se refiere a un método descrito anteriormente, caracterizado además porque tanto el exón 3 como el exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante el uso de una mezcla cebador múltiple que contiene al menos un par cebador para la amplificación del exón 3 y al menos un par cebador para la amplificación del exón 4. En consecuencia, la presente descripción se refiere a un método para la amplificación separada del exón 3 y exón 4 de alelos HLA Clase I.

En otra modalidad, los diferentes conjuntos cebador involucrados en la amplificación del exón 2, la amplificación del exón 3 y la amplificación del exón 4 se mezclan y se realiza en un único tubo de reacción la amplificación separada de los tres exones, el exón 2, exón 3 y el exón 4. Así, la presente invención se refiere además a un método descrito anteriormente, caracterizado además porque los tres exones, el exón 2, exón 3 y el exón 4, de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican por el uso de una mezcla cebador múltiple que contiene al menos un par cebador para la amplificación del exón 2, al menos un par cebador para la amplificación del exón 3 y al menos un par cebador para la amplificación del exón 4. En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de alelos HLA Clase I.

El método de amplificación usado puede ser ya sea la reacción en cadena de polimerasa (PCR; Saiki y otros, 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren y otros, 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA; Guatelli y otros, 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS; Kwok y otros, 1989), amplificación del desplazamiento de la cadena (SDA; Duck, 1990) o amplificación por medio de la Q β replicasa (Lomeli y otros, 1989) o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico conocidas en la técnica. Además, las técnicas TMA (Guatelli y otros, 1990) o bDNA (Sanchez-Pescador y otros, 1988; Urdea y otros, 1991) se pueden usar en el método de la presente invención. En una modalidad específica, el exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B se amplifican por PCR.

En una modalidad específica, la presente invención se refiere a un método descrito anteriormente, caracterizado, además porque la secuencia objetivo locus-específica está situada en una de las siguientes posiciones:

- 35 o 170 del intrón 2 de HLA-B (Fig. 2) y 42, 46, 65, 68, 96, 438, 502, 524, 547 o 571 del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5)

Según estas posiciones todas contienen nucleótidos locus-específicos, estas posiciones son particularmente adecuadas para diseñar un cebador eficaz en la amplificación locus-específica del exón 2, exón 3 o exón 4. Los cebadores pueden ser de diferente longitud. En una modalidad específica, la longitud del cebador es aproximadamente 5-50 nucleótidos. En otra modalidad específica, la longitud del cebador es aproximadamente 10-30 nucleótidos. En otra modalidad específica, la

longitud de los cebadores es aproximadamente 20-25 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad del objetivo ADN o ARN requerido, así como de las condiciones en las que se usa el cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.

5 En una modalidad específica, la presente invención se refiere a un método descrito anteriormente caracterizado además porque dichas posiciones constituyen el extremo 3' del cebador que se usa para la amplificación del exón 2, exón 3 o exón 4. Así, de las posiciones descritas anteriormente, se pueden diseñar los cebadores directos así como inversos que tengan su extremo 3' en estas posiciones específicas. El cebador inverso que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas del intrón 2 mencionadas anteriormente permitirá la amplificación locus-específica del exón 2 del alelo HLA-B. El cebador directo que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas del intrón 2 mencionadas anteriormente permitirá la amplificación locus-específica del exón 2 del alelo HLA-B. El cebador inverso que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas del intrón 3 mencionadas anteriormente permitirá la amplificación locus-específica del exón 3 del alelo HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivo. El cebador directo que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas del intrón 3 mencionadas anteriormente permitirá la amplificación locus-específica del exón 4 del alelo HLA-B. Los cebadores pueden ser de diferente longitud. En una modalidad específica, la longitud del cebador es aproximadamente 5-50 nucleótidos. En otra modalidad específica, la longitud del cebador es aproximadamente 10-30 nucleótidos. En otra modalidad específica, la longitud de los cebadores es aproximadamente 20-25 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad del objetivo ADN o ARN requerido, así como de las condiciones en las que se usa el cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.

20 La presente descripción se refiere además a un método para la tipificación de HLA-A caracterizado además porque el cebador se elige de la siguiente lista:

- para la amplificación del exón 2 de HLA-A (tabla 1):

25 5'ATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 1)
 5'GATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 2)
 5'GGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 3)
 5'YGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 4)
 30 5'YGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 5)
 5'GGYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 6)
 5'GGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (sec. con núm. de ident. 7)
 5'GGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (sec. con núm. de ident. 8)
 5'AGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (sec. con núm. de ident. 9)
 35 5'AAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (sec. con núm. de ident. 10)
 5'CAAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (sec. con núm. de ident. 11)
 5'CTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (sec. con núm. de ident. 12)
 5'TCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (sec. con núm. de ident. 13)
 40 5'CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (sec. con núm. de ident. 14)
 5'CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (sec. con núm. de ident. 15)
 5'GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (sec. con núm. de ident. 16)
 5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (sec. con núm. de ident. 17)
 5'TCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (sec. con núm. de ident. 18)
 45 5'CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (sec. con núm. de ident. 19)
 5'CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (sec. con núm. de ident. 20)
 5'GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (sec. con núm. de ident. 21)
 5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (sec. con núm. de ident. 22)
 5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (sec. con núm. de ident. 23)
 50 5'CCTGGCCTCTCCCGGGDCA3' (sec. con núm. de ident. 30)
 5' GCCTGGCCTCTCCCGGGDCA3' (sec. con núm. de ident. 31)
 5'CGCCTGGCCTCTCCCGGGDCA3' (sec. con núm. de ident. 32)
 5'GCGCCTGGCCTCTCCCGGGDCA3' (sec. con núm. de ident. 33)
 5'GGCGCCTGGCCTCTCCCGGGDCA3' (sec. con núm. de ident. 34)
 5'AGGCCTGGCCTCTCCCGGGDCA3' (sec. con núm. de ident. 35)
 55 5'AGGCGCCTGGCCTCTCCCG3' (sec. con núm. de ident. 36)
 5'AAGGCGCCTGGCCTCTCCCG3' (sec. con núm. de ident. 37)
 5'WAAGGCGCCTGGCCTCTCCCG3' (sec. con núm. de ident. 38)
 5'TWAAGGCGCCTGGCCTCTCCCG3' (sec. con núm. de ident. 39)
 5'GTWAAGGCGCCTGGCCTCTCCCG3' (sec. con núm. de ident. 40)
 60 5'GGTWAAGGCGCCTGGCCTCTCCCG3' (sec. con núm. de ident. 41)

ES 2 430 420 T3

5'CCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (sec. con núm. de ident. 42)
5'ACCGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (sec. con núm. de ident. 43)
5'AACCGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (sec. con núm. de ident. 44)
5'AAACCGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (sec. con núm. de ident. 45)
5'GAAACCGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (sec. con núm. de ident. 46)
5'TGAAACCGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (sec. con núm. de ident. 47)
5'YCCVGGCCCGACCAACCYGG3' (sec. con núm. de ident. 48)
5'GYCCVGGCCCGACCAACCYGG3' (sec. con núm. de ident. 49)
5'YGYCCVGGCCCGACCAACCYGG3' (sec. con núm. de ident. 50)
5'CYGYCCVGGCCCGACCAACCYGG3' (sec. con núm. de ident. 51)
5'CCYGYCCVGGCCCGACCAACCYGG3' (sec. con núm. de ident. 52)
5'CCCYGYCCVGGCCCGACCAACCYGG3' (sec. con núm. de ident. 53)

• para la amplificación del exón 3 de HLA-A (tabla 2; tabla 3):

5'CGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (sec. con núm. de ident. 54)
5'ACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (sec. con núm. de ident. 55)
5'CACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (sec. con núm. de ident. 56)
5'CCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (sec. con núm. de ident. 57)
5'CCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (sec. con núm. de ident. 58)
5'CCCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (sec. con núm. de ident. 59)
5'GGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (sec. con núm. de ident. 60)
5'GGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (sec. con núm. de ident. 61)
5'CGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (sec. con núm. de ident. 62)
5'CCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (sec. con núm. de ident. 63)
5'TCCGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (sec. con núm. de ident. 64)
5'CTCCGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (sec. con núm. de ident. 65)
5'CCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (sec. con núm. de ident. 66)
5'RCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (sec. con núm. de ident. 67)
5'CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (sec. con núm. de ident. 68)
5'CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEQ NO 69)
5'TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (sec. con núm. de ident. 70)
5'ATCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (sec. con núm. de ident. 71)
5'CCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (sec. con núm. de ident. 72)
5'CCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (sec. con núm. de ident. 73)
5'RCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (sec. con núm. de ident. 74)
5'CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (sec. con núm. de ident. 75)
5'CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (sec. con núm. de ident. 76)
5'TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (sec. con núm. de ident. 77)
5'CGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (sec. con núm. de ident. 84)
5'CCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (sec. con núm. de ident. 85)
5'GCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (sec. con núm. de ident. 86)
5'AGCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (sec. con núm. de ident. 87)
5'AAGCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (sec. con núm. de ident. 88)
5'GAAGCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (sec. con núm. de ident. 89)
5'GACYCCGAGACCCTTGDC3' (sec. con núm. de ident. 90)
5'GGACYCCGAGACCCTTGDC3' (sec. con núm. de ident. 91)
5'GGGACYCCGAGACCCTTGDC3' (sec. con núm. de ident. 92)
5'CGGGACYCCGAGACCCTTGDC3' (sec. con núm. de ident. 93)
5'GCGGGACYCCGAGACCCTTGDC3' (sec. con núm. de ident. 94)
5'CGCGGGACYCCGAGACCCTTGDC3' (sec. con núm. de ident. 95)
5'GACCCTTGDC3GGGAGAGG3' (sec. con núm. de ident. 96)
5'AGACCCTTGDC3GGGAGAGG3' (sec. con núm. de ident. 97)
5'GAGACCCTTGDC3GGGAGAGG3' (sec. con núm. de ident. 98)
5'CGAGACCCTTGDC3GGGAGAGG3' (sec. con núm. de ident. 99)
5'CCGAGACCCTTGDC3GGGAGAGG3' (sec. con núm. de ident. 100)
5'YCCGAGACCCTTGDC3GGGAGAGG3' (sec. con núm. de ident. 101)
5'GTTTAGGCCAAAAATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 102)
5'AGTTTAGGCCAAAAATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 103)
5'CAGTTTAGGCCAAAAATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 104)

ES 2 430 420 T3

5'TCAGTTTtagGCCAAAAATCCCCC3' (sec. con núm. de ident. 105)
5'TTCAGTTTtagGCCAAAAATCCCCC3' (sec. con núm. de ident. 106)
5'TTTCAGTTTtagGCCAAAAATCCCCC3' (sec. con núm. de ident. 107)
5'AGCCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (sec. con núm. de ident. 150)
5'5 CAGCCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (sec. con núm. de ident. 151)
5'5 CCAGCCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (sec. con núm. de ident. 152)
5'5 GCCAGCCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (sec. con núm. de ident. 153)
5'5 GGCCAGCCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (sec. con núm. de ident. 154)
5'5 AGGCCAGCCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (sec. con núm. de ident. 155)
5'5 CCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (sec. con núm. de ident. 156)
5'5 CCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (sec. con núm. de ident. 157)
5'5 TCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (sec. con núm. de ident. 158)
5'5 CTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (sec. con núm. de ident. 159)
5'5 TCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (sec. con núm. de ident. 160)
5'5 GTCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (sec. con núm. de ident. 161)
5'5 CCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (sec. con núm. de ident. 162)
5'5 TCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (sec. con núm. de ident. 163)
5'5 GTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (sec. con núm. de ident. 164)
5'5 GGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (sec. con núm. de ident. 165)
5'5 TGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (sec. con núm. de ident. 166)
5'5 TTGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (sec. con núm. de ident. 167)
5'5 CTAGTGTGGTCCCAAWTGT3' (sec. con núm. de ident. 168)
5'5 TCTAGTGTGGTCCCAAWTGT3' (sec. con núm. de ident. 169)
5'5 TTCTAGTGTGGTCCCAAWTGT3' (sec. con núm. de ident. 170)
5'5 ATTCTAGTGTGGTCCCAAWTGT3' (sec. con núm. de ident. 171)
5'5 TATTCTAGTGTGGTCCCAAWTGT3' (sec. con núm. de ident. 172)
5'5 ATATTCTAGTGTGGTCCCAAWTGT3' (sec. con núm. de ident. 173)
5'5 GGGYGATATTCTAGTGTGG3' (sec. con núm. de ident. 174)
5'5 AGGGYGATATTCTAGTGTGG3' (sec. con núm. de ident. 175)
5'5 GAGGGYGATATTCTAGTGTGG3' (sec. con núm. de ident. 176)
5'5 GGAGGGYGATATTCTAGTGTGG3' (sec. con núm. de ident. 177)
5'5 GGGAGGGYGATATTCTAGTGTGG3' (sec. con núm. de ident. 178)
5'5 AGGGAGGGYGATATTCTAGTGTGG3' (sec. con núm. de ident. 179)
5'5 GGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 180)
5'5 GGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 181)
5'5 AGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 182)
5'5 GAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 183)
5'5 AGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 184)
5'5 CAGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 185)
5'5 CCCAGGAGGAKCCTCTCCC3' (sec. con núm. de ident. 186)
5'5 ACCCAGGAGGAKCCTCTCCC3' (sec. con núm. de ident. 187)
5'5 AACCAGGAGGAKCCTCTCCC3' (sec. con núm. de ident. 188)
5'5 AAACCCAGGAGGAKCCTCTCCC3' (sec. con núm. de ident. 189)
5'5 GAAACCCAGGAGGAKCCTCTCCC3' (sec. con núm. de ident. 190)
5'5 GAAAACCCAGGAGGAKCCTCTCCC3' (sec. con núm. de ident. 191)
5'5 AGGATCTGAAACCCAGGAG3' (sec. con núm. de ident. 192)
5'5 CAGGATCTGAAACCCAGGAG3' (sec. con núm. de ident. 193)
5'5 ACAGGATCTGAAACCCAGGAG3' (sec. con núm. de ident. 194)
5'5 TACAGGATCTGAAACCCAGGAG3' (sec. con núm. de ident. 195)
5'5 GTACAGGATCTGAAACCCAGGAG3' (sec. con núm. de ident. 196)
5'5 GGTACAGGATCTGAAACCCAGGAG3' (sec. con núm. de ident. 197)
5'5 TCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (sec. con núm. de ident. 198)
5'5 CTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (sec. con núm. de ident. 199)
5'5 CCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (sec. con núm. de ident. 200)
5'5 ACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (sec. con núm. de ident. 201)
5'5 AACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (sec. con núm. de ident. 202)
5'5 GAACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (sec. con núm. de ident. 203)

60 • para la amplificación del exón 4 de HLA-A (tabla 4):

5'TTCTGTGCTCYCTTCCCAT3' (sec. con núm. de ident. 204)
 5'GTTCTGTGCTCYCTTCCCAT3'(sec. con núm. de ident. 205)
 5'GGTTCTGTGCTCYCTTCCCAT3' (sec. con núm. de ident. 206)
 5'GGGTTCTGTGCTCYCTTCCCAT3' (sec. con núm. de ident. 207)
 5'TGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCAT3' (sec. con núm. de ident. 208)
 5'CTGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCAT3' (sec. con núm. de ident. 209)
 5'GGTGCCTGTCCATTCTCAA3' (sec. con núm. de ident. 24)
 5'RGGTGCCTGTCCATTCTCAA3' (sec. con núm. de ident. 25)
 5'CRGGTGCCTGTCCATTCTCAA3' (sec. con núm. de ident. 26)
 5'CCRGGTGCCTGTCCATTCTCAA3' (sec. con núm. de ident. 27)
 5'CCCRGGTGCCTGTCCATTCTCAA3' (sec. con núm. de ident. 28)
 5'TCCCRGGTGCCTGTCCATTCTCAA3' (sec. con núm. de ident. 29)
 5'CTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (sec. con núm. de ident. 210)
 5'GCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (sec. con núm. de ident. 211)
 5'TGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (sec. con núm. de ident. 212)
 5'RTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (sec. con núm. de ident. 213)
 5'YRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (sec. con núm. de ident. 214)
 5'GYRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (sec. con núm. de ident. 215)
 5'GTCCCATKACAGATRCMMAA3' (sec. con núm. de ident. 216)
 5'TGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (sec. con núm. de ident. 217)
 5'GTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (sec. con núm. de ident. 218)
 5'AGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (sec. con núm. de ident. 219)
 5'GAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (sec. con núm. de ident. 220)
 5'GGAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (sec. con núm. de ident. 221)

En una modalidad de la invención, los cebadores usados en el método se escogen de la lista:

- para la amplificación del exón 2 de HLA-B (tabla 5):

5'ACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 108)
 5'AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 109)
 5'CAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 110)
 5'CCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 111)
 5'MCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 112)
 5'GMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 113)
 5'YGMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 314)

- para la amplificación del exón 3 de HLA-B (tabla 6; tabla 7):

5'CYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 114)
 5'CCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 115)
 5'GCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 116)
 5'GGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 117)
 5'CGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 118)
 5'CCGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 119)
 5'CCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 120)
 5'ACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 121)
 5'TACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 122)
 5'TTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 123)
 5'TTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 124)
 5'GTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 125)
 5'CGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 222)
 5'GCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 223)
 5'CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 224)
 5'CGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 225)
 5'TCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 226)
 5'CTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 227)
 5'TCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 228)
 5'TTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 229)
 5'CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 230)
 5'TCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 231)

5 5'TTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 232)
 5'CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 233)
 5'TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 234)
 5'YTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 235)
 5'CYTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 236)
 5'GATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (sec. con núm. de ident. 237)
 5'TGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (sec. con núm. de ident. 238)
 5'CTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (sec. con núm. de ident. 239)
 10 5'GCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (sec. con núm. de ident. 240)
 5'CGTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (sec. con núm. de ident. 241)
 5'CTAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (sec. con núm. de ident. 242)
 5'GCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (sec. con núm. de ident. 243)
 5'CGTGATCCCATTTTCCTCYT3' (sec. con núm. de ident. 244)
 15 5'GCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (sec. con núm. de ident. 245)
 5'AGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (sec. con núm. de ident. 246)
 5'TAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (sec. con núm. de ident. 247)
 5'CTAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (sec. con núm. de ident. 248)
 5'TCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 249)
 5'CTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 250)
 20 5'TCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 251)
 5'TTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 252)
 5'ATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 253)
 5'CATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 254)

25 • para la amplificación del exón 4 de HLA-B (tabla 8):

5'AGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 255)
 5'GAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 256)
 30 5'GGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 257)
 5'AGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 258)
 5'TAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 259)
 5'ATAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 260)
 5'TGTCTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 261)
 35 5'GTGTCTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 262)
 5'GGTGTCTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 263)
 5'AGGTGTCTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 264)
 5'CAGGTGTCTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 265)
 5'CCAGGTGTCTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 266)
 40 5'TCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 267)
 5'GTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 268)
 5'GGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 269)
 5'TGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 270)
 5'CTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 271)
 45 5'KCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 272)
 5'GKCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 273)
 5'TSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 274)
 5'GTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 275)
 5'TGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 276)
 50 5'GTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 277)
 5'GGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 278)
 5'GGGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 279)
 5'GWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 280)
 5'TGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 281)
 5'CTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 282)
 55 5'CCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 283)
 5'GCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 284)
 5'CGCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 285)

En la presente descripción se describen además métodos en donde los cebadores se seleccionan de la siguiente lista:

60 • para la amplificación del exón 2 de HLA-C (tabla 9):

5'GTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 126)
 5'GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 127)
 5'CGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 128)
 5'CCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 129)
 5'YCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 130)
 5'CYCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 131)

• para la amplificación del exón 3 de HLA-C (tabla 10):

5'CGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (sec. con núm. de ident. 132)
 5'TCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (sec. con núm. de ident. 133)
 5'GTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (sec. con núm. de ident. 134)
 5'GGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (sec. con núm. de ident. 135)
 5'GGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (sec. con núm. de ident. 136)
 5'CGGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (sec. con núm. de ident. 137)
 5'CGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (sec. con núm. de ident. 138)
 5'TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (sec. con núm. de ident. 139)
 5'CTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (sec. con núm. de ident. 140)
 5'CCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (sec. con núm. de ident. 141)
 5'CCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (sec. con núm. de ident. 142)
 5' ACCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3 ' (sec. con núm. de ident. 143)

• para la amplificación del exón 4 de HLA-C (tabla 11):

5'GTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (sec. con núm. de ident. 286)
 5'GGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (sec. con núm. de ident. 287)
 5'AGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (sec. con núm. de ident. 288)
 5'CAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (sec. con núm. de ident. 289)
 5'CCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (sec. con núm. de ident. 290)
 5'CCCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (sec. con núm. de ident. 291)
 5'TGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (sec. con núm. de ident. 292)
 5'CTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (sec. con núm. de ident. 293)
 5'GCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (sec. con núm. de ident. 294)
 5'GGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (sec. con núm. de ident. 295)
 5'AGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (sec. con núm. de ident. 296)
 5'CAGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (sec. con núm. de ident. 297)
 5'CTCAGGATRGTCACATGGSC3' (sec. con núm. de ident. 298)
 5'TCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (sec. con núm. de ident. 299)
 5'TTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (sec. con núm. de ident. 300)
 5'RTTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (sec. con núm. de ident. 301)
 5'CRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (sec. con núm. de ident. 302)
 5'CCRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (sec. con núm. de ident. 303)
 5'GCGCTGTTGGAGTGTGCAA3' (sec. con núm. de ident. 78)
 5'GGCGCTGTTGGAGTGTGCAA3' (sec. con núm. de ident. 79)
 5'GGGCGCTGTTGGAGTGTGCAA3' (sec. con núm. de ident. 80)
 5'TGGGCGCTGTTGGAGTGTGCAA3' (sec. con núm. de ident. 81)
 5'ATGGGCGCTGTTGGAGTGTGCAA3' (sec. con núm. de ident. 82)
 5'CATGGGCGCTGTTGGAGTGTGCAA3' (sec. con núm. de ident. 83)
 5'SCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 304)
 5'CSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 305)
 5'TCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 306)
 5'GTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 307)
 5'TGTCSAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 308)
 5'GTGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (sec. con núm. de ident. 309)

En otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a cualquier método descrito anteriormente, caracterizado además porque la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con al menos los siguientes cebadores directos:

• para HLA-B: IBPinl: B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG (sec. con núm. de ident. 145)

En otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a cualquier método descrito anteriormente, caracterizado además porque la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con al menos los siguientes cebadores inversos:

- 5 • para HLA-B: 3ex4IBbio: B-TCGGCAGCCCCTCATGCTGT (sec. con núm. de ident. 312);

En una modalidad muy específica, la presente invención se relaciona con cualquier método descrito anteriormente, caracterizado además porque:

- 10 - la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con al menos el siguiente conjunto de cebadores:

- para HLA-B: IBPin1 (B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG; sec. con núm. de ident. 145) y IB3Pin2bio (B-AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC; sec. con núm. de ident. 109);

- 15 - la amplificación del exón 3 se lleva a cabo con al menos el siguiente conjunto de cebadores:

- para HLA-B: IB5Pin 2bio (B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG; sec. con núm. de ident. 224) y IB3Pin3bio (B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC; sec. con núm. de ident. 234);

- 20 - la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con al menos el siguiente conjunto de cebadores:

- para HLA-B: 5ex4IBbio (B-TCACATGGGTGGTCCTAGG; sec. con núm. de ident. 267) y 3ex4IBbio (B-TCGGCAGCCCCTCATGCTGT; sec. con núm. de ident. 312);

- 25 El experto entenderá que estos cebadores (sec. con núms. de ident. 1 a 314) pueden adaptarse mediante la adición o supresión de uno o más nucleótidos en sus extremidades. Tales adaptaciones pueden ser necesarias, por ejemplo, si se cambian las condiciones de amplificación, si el material amplificado es ARN en lugar de ADN, según sea el caso, por ejemplo, en el sistema NASBA.

- 30 La presente descripción se refiere además a un cebador como el descrito anteriormente, para su uso en la amplificación del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B, o HLA-C, dicho cebador se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivamente; más específicamente, dicho cebador se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica situada en la posición:

- 35 • 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 o 181 del intrón 2 de HLA-A (Fig. 1); o
- 35 o 170 del intrón 2 de HLA-B (Fig. 2); o
 - 84, 107 o 142 del intrón 2 de HLA-C (Fig. 3);

- 40 más específicamente, dicho cebador se elige de la tabla 1 (para la amplificación del exón 2 de HLA-A) de la tabla 5 (para la amplificación del exón 2 de HLA-B) o de la tabla 9 (para a amplificación del exón 2 de HLA-C).

- 45 La presente descripción también se refiere adicionalmente a un cebador como el descrito anteriormente, para su uso en la amplificación del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B, o HLA-C, dicho cebador se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 (cebador directo) o a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 (cebador inverso), de HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivamente; más específicamente, dicho cebador se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica situada en la posición:

- 50 • 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 o 181 del intrón 2 de HLA-A (Fig. 1) o 32, 50, 62, 73, 83, 86, 118, 130, 150 del intrón 3 de HLA-A (Fig. 4); o
- 35 o 170 del intrón 2 de HLA-B (Fig. 2) o 42, 46, 65, 68, 96, del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5); o
 - 84, 107 o 142 del intrón 2 de HLA-C (Fig. 3).

- 55 más específicamente, dicho cebador se elige de la tabla 2 o tabla 3 (para la amplificación del exón 3 de HLA-A) de la tabla 6 o tabla 7 (para la amplificación del exón 3 de HLA-B).

La presente descripción se refiere además a un cebador como se describió anteriormente, para usar en la amplificación del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, dicho cebador hibrida específicamente una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivamente; más específicamente, dicho cebador hibrida específicamente una secuencia objetivo locus-específica situada en la posición:

- 501, 525, 561 o 571 del intrón 3 de HLA-A (Fig. 4); o
- 438, 502, 524, 547 o 571 del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5); o
- 461, 477, 527, 545 o 561 del intrón 3 de HLA-C (Fig. 6).

5

más específicamente, dicho cebador se elige de la tabla 4 (para la amplificación del exón 4 de HLA-A) de la tabla 8 (para la amplificación del exón 4 de HLA-B) o de la tabla 11 (para a amplificación del exón 4 de HLA-C).

10

La presente descripción se refiere además a un conjunto cebador que consiste en una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió anteriormente, para uso en la amplificación de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C del exón 2. En un aspecto específico, la presente descripción se refiere a la combinación del cebador directo 5APBio (sec. con núm. de ident. 144) para HLA-A, IBPin1 (sec. con núm. de ident. 145) para HLA-B o 5CIN1 (sec. con núm. de ident. 146) para HLA-C y un cebador inverso que hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivamente; más específicamente, dicho cebador inverso hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica situada en la posición:

15

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 o 181 del intrón 2 de HLA-A; o
- 35 o 170 del intrón 2 de HLA-B; o
- 84, 107 o 142 del intrón 2 de HLA-C;

20

más específicamente, dicho cebador inverso se elige de la tabla 1 (para la amplificación del exón 2 de HLA-A) de la tabla 5 (para la amplificación del exón 2 de HLA-B) o de la tabla 9 (para a amplificación del exón 2 de HLA-C).

25

La presente descripción se refiere además a una conjunto cebador que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como descrito anteriormente, para su uso en la amplificación del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C. En un aspecto específico, la presente descripción se refiere a la combinación de un cebador directo que hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivamente; más específicamente, dicho cebador directo hibrida específicamente a unas secuencias objetivos locus-específicas situadas en la posición:

30

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 o 181 del intrón 2 de HLA-A; o
- 35 o 170 del intrón 2 de HLA-B; o
- 84, 107 o 142 del intrón 2 de HLA-C;

35

más específicamente, dicho cebador directo se elige de la tabla 2 (para la amplificación del exón 3 de HLA-A), de la tabla 6 (para la amplificación del exón 3 de HLA- B) o de la tabla 10 (para la amplificación del exón 3 de HLA- C) y un cebador inverso que hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de HLA-A, HLA-B o HLA-C respectivamente; más específicamente, dicho cebador inverso hibrida específicamente a unas secuencias objetivo locus-específicos situadas en la posición:

40

- 32, 50, 62, 73, 83, 86, 118, 130, 150 (Fig. 4) del intrón 3 de HLA-A; o
- 42, 46, 65, 68, 96, del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5);

45

más específicamente, dicho cebador inverso se elige de la tabla 3 (para la amplificación del exón 3 de HLA-A) de la tabla 7 (para la amplificación del exón 3 de HLA-B) o de 3CIN3 (sec. con núm. de ident. 149) (para la amplificación del exón 3 de HLA-C).

50

La presente descripción se refiere además a una conjunto cebador que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como descrito anteriormente, para su uso en la amplificación del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C. En un aspecto específico, la presente descripción se refiere a la combinación de un cebador directo hibridarse específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, dicho cebador hibrida específicamente a unas secuencias objetivas locus-específicas situadas en la posición:

55

- 501, 525, 561 o 571 del intrón 3 de HLA-A (Fig. 4); o
- 438, 502, 524, 547 o 571 del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5); o
- 461, 477, 527, 545 o 561 del intrón 3 de HLA-C (Fig. 6).

más específicamente, dicho cebador directo se elige de la tabla 4 (para la amplificación del exón 4 de HLA-A), de la tabla 8 (para la amplificación del exón 4 de HLA- B) o de la tabla 11 (para la amplificación del exón 4 de HLA-C) y un cebador inverso 3ex4APbio (sec. con núm. de ident. 311) para HLA-A, 3ex4IBbio (sec. con núm. de ident. 312) para HLA-B o 3ex4ICbio (sec. con núm. de ident. 313) para HLA-C.

5

En un aspecto específico, los cebadores se usan en una mezcla que permite la amplificación separada del exón 2 y exón 3. Como consecuencia, la presente descripción se relaciona con una mezcla cebador múltiple que contiene al menos un par cebador como se describió anteriormente para la amplificación del exón 2 y un par cebador como se describió anteriormente para la amplificación del exón 3.

10

En un aspecto específico, la mezcla cebador múltiple para la amplificación separada del exón 2 y exón 3 comprende los siguientes conjuntos de cebadores:

- para la amplificación separada del exón 2 y el exón 3 de HLA-A:

15

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec con núm. de ident.
Exón 1-2	5APbio (5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
	3ex2APbio (3')	B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
Exón 3	5ex3APbio (5')	B-CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	104
	3ex3APbio (3')	B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156

- para la amplificación separada del exón 2 y el exón 3 de HLA-B:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec con núm. de ident.
Exón 2	IBPinbio (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
	IB3Pin2bio (3')	B-AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
Exón 3	IB5Pin2bio(5')	B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224
	IB3Pin3bio (3')	B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234

20

- para la amplificación separada del exón 2 y el exón 3 de HLA-C:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec con núm. de ident.
Exón 2	5CIN1(5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
	IC3Pin2bio(3')	B-GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
Exón 3	IC5Pin2bio(5')	B-TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGAAGGCTCCCCACT	149

25

En un aspecto específico, los cebadores se usan en una mezcla que permite la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4. Como consecuencia, la presente descripción se relaciona con una mezcla cebadora múltiple que contiene al menos un par cebador como se describió anteriormente para la amplificación del exón 2 , un par cebador como se describió anteriormente para la amplificación del exón 3 y un par cebador como se describió anteriormente para la amplificación del exón 4.

30

En un aspecto específico, la mezcla cebadora múltiple para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 comprende los siguientes conjuntos de cebadores:

- para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A:

ES 2 430 420 T3

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec con núm. de ident.
Exón 1-2	5APbio (5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
	3ex2APbio (3')	B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
Exón 3	5ex3APbio (5')	B-CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	104
	3ex3APbio (3')	B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156
Exón 4	5ex4APbio (5')	B-GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	205
	3ex4APbio (3')	B-TTGGGCAGACCCTCATGCTGC	311

- para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec con núm. de ident.
Exón 2	IBPin1bio (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
	IB3Pin2bio (3')	B-AAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
Exón 3	IB5Pin2bio(5')	B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224
	IB3Pin3bio (3')	B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234
Exón 4	5ex4IBbio (5')	B-TCACATGGGTGGTCCTAGG	267
	3ex4IBbio (3')	B-TCGGCAGCCCCTCATGCTGT	312

5 - para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec con núm. de ident.
Exón 2	5CIN1(5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
	IC3Pin2bio(3')	B-GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
Exón 3	IC5Pin2bio(5')	B-TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149
Exón 4	5ex4ICbio(5')	B-TCTCAGGATRGTCACATGGSC	299
	3ex4ICbio(3')	B-CATCTCAGGGTGMRRGGGCTT	313

10 Los cebadores se pueden marcar. El marcaje se puede llevar a cabo por cualquier método conocido por la persona experimentada en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica (³²P, ³⁵S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).

15 Los oligonucleótidos usados como cebadores pueden comprender además análogos de nucleótidos tales como fosforodiatos (Matsukura y otros 1987), alquilfosforodiatos (Miller y otros, 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen y otros, 1991; Nielsen y otros, 1993) o pueden contener agentes intercalantes (Asseline y otros, 1984). Como la mayoría de las otras variaciones o modificaciones introducidas dentro de las secuencias originales de ADN, estas variaciones requerirán adaptaciones con respecto a las condiciones bajo las que el oligonucleótido debe ser usado para obtener la especificidad y sensibilidad requerida. Sin embargo, los resultados eventuales de la hibridación serán esencialmente los mismos que aquellos obtenidos con los oligonucleótidos sin modificar. La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa para influenciar positivamente las características tales como la cinética de hibridación, reversibilidad de la formación del híbrido, estabilidad biológica de las moléculas de oligonucleótidos, etc.

25 La presente descripción se relaciona además con el uso de los cebadores, los conjuntos de cebadores y/o la mezcla cebadora de la descripción en un método para la amplificación locus-específica y separada del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

La presente descripción se relaciona además con un método para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) si es necesario, la liberación, aislamiento y/o concentración de los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;
 (ii) amplificación de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención;
 (iii) tipificación específica de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C presentes en dicha muestra.

10 La liberación, concentración y aislamiento de los ácidos nucleicos de la muestra se puede hacer por cualquier método conocido en la técnica. En la actualidad, diversos estuches comerciales están disponibles, tales como el estuche QIAamp Blood de Qiagen (Hilden, Alemania) para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de sangre o el 'Estuche de Preparación de molde de PCR de pureza alta' (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica). Otros procedimientos bien conocidos para el aislamiento de ADN o ARN a partir de una muestra biológica están además disponibles (Sambrook y otros, 1989).
 15 Los ácidos nucleicos se amplifican posteriormente por el método de la invención descrito anteriormente. Los productos de esta etapa de amplificación son después idealmente adecuados para la tipificación del alelo específico presente en la muestra. Actualmente se conocen 169 alelos diferentes de HLA-A, 332 alelos diferentes de HLA-B y 87 alelos diferentes de HLA-C. La tipificación de estos alelos se puede hacer por cualquier método conocido en la técnica, tales como el análisis dúplex de los productos de PCR (Clay y otros, 1994) , análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple del producto de PCR (PCR-SSCP; Yoshida y otros, 1992), tipificación basada en la secuencia (SBT; Santamaria y otros, 1992 y 1993) , el uso de cebadores específicos a la secuencia en la reacción de PCR (PCR-SSP; Olerup y Zetterquist, 1991), el uso de PCR en combinación con el sondeo de oligonucleótido específico a la secuencia (PCR-SSOP; Saiki y otros, 1986),
 20 Membrana de transferencia puntual convencional, transferencia Southern, sándwich o sondeo por Membrana de transferencia puntual inverso (Saiki y otros, 1989). Para obtener resultados rápidos y fáciles si se involucra una multitud de sondas, puede ser conveniente un formato de hibridación inversa. Como consecuencia, en una modalidad preferida, las sondas seleccionadas se inmovilizan a ciertos lugares sobre un soporte sólido y los ácidos polinucleicos amplificados se marcan para permitir la detección de los híbridos formados. El término "soporte sólido" puede referirse a cualquier sustrato al que una sonda de oligonucleótido se puede acoplar, con tal que conserve sus características de hibridación y con tal que el nivel de fondo de la hibridación se mantenga bajo. Por lo general, el sustrato sólido será una placa de microtitulación (por ejemplo, en la técnica de DEIA), una membrana (por ejemplo, nilón o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip.
 25 Antes de la aplicación a la membrana o fijación, puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico para facilitar la fijación o mejorar la eficiencia de hibridación. Dichas modificaciones pueden abarcar poner la cola al homopolímero, acoplar con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH₂, grupos SH, grupos carboxílicos, o acoplar con biotina, haptenos o proteínas.

35 La presente descripción además se relaciona con un estuche de diagnóstico para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C en una muestra que comprende los siguientes componentes:

- (i) cuando sea adecuado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;
 40 (ii) un conjunto cebador o una mezcla cebadora de acuerdo con la descripción;
 (iv) un medio para la tipificación de los alelos específicos de HLA-A , HLA-B o HLA-C presentes en dicha muestra.

Un estuche de diagnóstico específico y muy fácil de usar es el Ensayo de Sonda de una Línea para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C en una muestra que comprende los siguientes componentes:

- 45 (i) cuando sea adecuado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;
 (ii) un par cebador o una mezcla cebadora de acuerdo con la invención;
 (iii) al menos una sonda que se hibrida específicamente con uno de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, fijado a un soporte sólido;
 50 (iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;
 (v) una solución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha solución;
 (vi) cuando sea adecuado, un medio para detectar los híbridos que resultan de la hibridación precedente.

55 En esta modalidad, el conjunto de sondas seleccionadas se inmoviliza a una tira de membrana en una forma de línea. Dichas sondas se pueden inmovilizar individualmente o como mezclas a los lugares delineados. Los ácidos polinucleicos de HLA-A, HLA-B o HLA-C amplificados se pueden marcar con biotina, y el híbrido se puede después detectar con un sistema de desarrollo de color no radiactivo, a través de un acoplamiento con biotina-estreptavidina.

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 adecuadas.

5 El término "solución de lavado" significa una solución que permite el lavado de los híbridos formados bajo las condiciones de rigurosidad adecuadas.

10 La presente descripción se relaciona además con el uso de los cebadores, los conjuntos de cebadores y/o las mezclas cebadoras de la invención para la fabricación de un estuche de diagnóstico o Ensayo de sonda de Línea para la tipificación de HLA Clase I.

15 A lo largo de esta descripción y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra forma, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa indicada o grupo de número entero o etapas indicadas pero no a la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

La presente invención se relaciona con métodos, un estuche de diagnóstico, y un estuche de ensayo de sonda de línea como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas 1 a 12

20 LEYENDAS DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1.** Alineación de 29 secuencias del intrón 2 de HLA-A. La secuencia consenso se muestra en la parte superior de la figura. Los nucleótidos conformes a la secuencia consenso se indican con una línea vertical. Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se indican. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición. La secuenciación se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 1.

Figura 2. Alineación de 38 secuencias del intrón 2 de HLA-B. La secuencia consenso se muestra en la parte superior de la figura. Los nucleótidos conformes a la secuencia consenso se indican con una línea vertical. Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se indican. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición. La secuenciación se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 1.

30 **Figura 3.** Alineación de 13 secuencias del intrón 2 de HLA-C. La secuencia consenso se muestra en la parte superior de la figura. Los nucleótidos conformes a la secuencia consenso se indican con una línea vertical. Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se indican. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición. La secuenciación se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 1.

35 **Figura 4.** Alineación de 12 secuencias del intrón 3 de HLA-A. La secuencia consenso se muestra en la parte superior de la figura. Los nucleótidos conformes a la secuencia consenso se indican con una línea vertical. Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se indican. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición.

Figura 5. Alineación de 22 secuencias del intrón 3 de HLA-B. La secuencia consenso se muestra en la parte superior de la figura. Los nucleótidos conformes a la secuencia consenso se indican con una línea vertical. Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se indican. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición.

40 **Figura 6.** Alineación de 12 secuencias del intrón 3 de HLA-C. La secuencia consenso se muestra en la parte superior de la figura. Los nucleótidos conformes a la secuencia consenso se indican con una línea vertical. Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se indican. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición.

45 **Figura 7.** Resultados de un Ensayo de sonda de línea para la tipificación de HLA-A como se indica en el ejemplo 5. Los ácidos nucleicos se amplificaron mediante uso de: (A) 5APBio (cebador directo; sec. con núm. de ident. 144) y 3APBio (cebador inverso; sec. con núm. de ident. 147) para la amplificación del exón 2 y el exón 3 de HLA-A en un amplicón sencillo; (B) la mezcla cebadora múltiple para la amplificación separada del exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-A. Las sondas con los números 1, 4, 9, 10, 12 y 13 claramente muestran una señal más fuerte después de la hibridación con los amplicones obtenidos mediante el uso de la mezcla cebadora múltiple (banda B) .

50 **Figura 8.** Resultados de un Ensayo de sonda de línea para la tipificación de HLA-B tal como se indica en el ejemplo 6. Los ácidos nucleicos se amplificaron mediante uso de: (B) IBPin1 (cebador directo; sec. con núm. de ident.145) e IBPin3 (cebador inverso; sec. con núm. de ident.148) para la amplificación del exón 2 y el exón 3 de HLA-B en un amplicón simple; (B) la mezcla cebadora múltiple para la amplificación separada del exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-B. Las sondas con los números 9, 10, 18, 19, 20, 34 y 35 evidentemente muestran una señal más fuerte después de la hibridación con los amplicones obtenidos mediante el uso de la mezcla cebadora múltiple (tiras B).

TABLAS

Tabla 1. Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 2 de HLA-A.

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
67	ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
	GATCTCGGACCCGGAGACTGT	2
	GGATCTCGGACCCGGAGACTGT	3
	YGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	4
	GYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	5
	GGYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	6
96	GGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	7
	GGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	8
	AGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	9
	AAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	10
	CAAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	11
109	CTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	12
	TCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	13
	CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	14
	CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	15
	GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	16
	GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	17
110	TCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	18
	CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	19
	CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	20
	GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	21
	GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	22
	GGGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	23
118	CCTGGCCTCTCCCGGGDCA	30
	GCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	31
	CGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	32
	GCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	33
	GGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	34
	AGGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	35
123	AGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	36
	AAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	37
	WAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	38
	TWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	39
	GTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	40

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	GGTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	41
131	CCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	42
	ACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	43
	AACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	44
	AAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	45
	GAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	46
	TGAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	47
181	YCCVGCCTCCGACCAACCYGG	48
	GYCCVGCCTCCGACCAACCYGG	49
	YGYCCVGCCTCCGACCAACCYGG	50
	CYGYCCVGCCTCCGACCAACCYGG	51
	CCYGYCCVGCCTCCGACCAACCYGG	52
	CCCYGYCCVGCCTCCGACCAACCYGG	53

Tabla 2. Los cebadores directos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-A.

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
67	CGGACGGGCCRGGTSRCCCA	54
	ACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	55
	CACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	56
	CCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	57
	CCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	58
	CCCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	59
96	GGTCCGAGATCCRCCCCGAA	60
	GGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	61
	CGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	62
	CCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	63
	TCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	64
	CTCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	65
109	CCCCGAAGCCGCGGGACYCC	66
	RCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	67
	CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	68
	CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	69
	TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	70
	ATCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	71
110	CCCGAAGCCGCGGGACYCCG	72
	CCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	73
	RCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	74
	CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	75

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	76
	TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	77
118	CGCGGGACYCCGAGACCCTT	84
	CCGCGGGACYCCGAGACCCTT	85
	GCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	86
	AGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	87
	AAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	88
	GAAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	89
123	GACYCCGAGACCCTTGDCCC	90
	GGACYCCGAGACCCTTGDCCC	91
	GGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	92
	CGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	93
	GCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	94
	CGCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	95
131	GACCCTTGDCCC GGGAGAGG	96
	AGACCCTTGDCCC GGGAGAGG	97
	GAGACCCTTGDCCC GGGAGAGG	98
	CGAGACCCTTGDCCC GGGAGAGG	99
	CCGAGACCCTTGDCCC GGGAGAGG	100
	YCCGAGACCCTTGDCCC GGGAGAGG	101
181	GTTTAGGCCAAAAATCCCC	102
	AGTTTAGGCCAAAAATCCCC	103
	CAGTTTAGGCCAAAAATCCCC	104
	TCAGTTTAGGCCAAAAATCCCC	105
	TTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCC	106
	TTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCC	107

Tabla 3. Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-A.

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
32	AGCCCGGGAGATCTAYAGGC	150
	CAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	151
	CCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	152
	GCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	153
	GGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	154
	AGGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	155
50	CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156
	CCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	157
	TCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	158

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	CTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	159
	TCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	160
	GTCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	161
62	CCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	162
	TCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	163
	GTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	164
	GGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	165
	TGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	166
	TTGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	167
73	CTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	168
	TCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	169
	TTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	170
	ATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	171
	TATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	172
	ATATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	173
83	GGGYGATATTCTAGTGTTGG	174
	AGGGYGATATTCTAGTGTTGG	175
	GAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	176
	GGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	177
	GGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	178
	AGGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	179
86	GGAGGGYGATATTCTAGTGT	180
	GGGAGGGYGATATTCTAGTGT	181
	AGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	182
	GAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	183
	AGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	184
	CAGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	185
118	CCCAGGAGGAKCCTCTCCC	186
	ACCCAGGAGGAKCCTCTCCC	187
	AACCCAGGAGGAKCCTCTCCC	188
	AAACCCAGGAGGAKCCTCTCCC	189
	GAAACCCAGGAGGAKCCTCTCCC	190
	GGAAACCCAGGAGGAKCCTCTCCC	191
130	AGGATCTGGAAACCCAGGAG	192
	CAGGATCTGGAAACCCAGGAG	193
	ACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	194
	TACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	195

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	GTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	196
	GGTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	197
150	TCAGAGTCACTCTCTGGTAC	198
	CTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	199
	CCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	200
	ACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	201
	AACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	202
	GAACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	203

Tabla 4. Cebadores directos usados para la amplificación del exón 4 de HLA-A.

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
501	TTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	204
	GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	205
	GGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	206
	GGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	207
	TGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	208
	CTGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	209
525	GGTGTCCCTGTCCATTCTCAA	24
	RGGTGTCCCTGTCCATTCTCAA	25
	CRGGTGTCCCTGTCCATTCTCAA	26
	CCRGGTGTCCCTGTCCATTCTCAA	27
	CCCRGGTGTCCCTGTCCATTCTCAA	28
	TCCCRGGTGTCCCTGTCCATTCTCAA	29
561	CTGGWGGAGTGTCCCATKAC	201
	GCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	211
	TGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	212
	RTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	213
	YRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	214
	GYRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	215
571	GTCCCATKACAGATRCMMAA	216
	TGTCCCATKACAGATRCMMAA	217
	GTGTCCCATKACAGATRCMMAA	218
	AGTGTCCCATKACAGATRCMMAA	219
	GAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA	220
	GGAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA	221

Tabla 5. Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 2 de HLA-B.

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
----------------------------	-------------------	-------------------------

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
170	ACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	108
	AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
	CAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	110
	CCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	111
	MCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	112
	GMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	113
	YGMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	314

Tabla 6. Cebadores directos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-B.

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
35	CYGGGGCGSAGGTCACGACT	114
	CCYGGGGCGSAGGTCACGACT	115
	GCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	116
	GGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	117
	CGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	118
	CCGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	119
170	CCCGGTTTCATTTTCAGTTG	120
	ACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	121
	TACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	122
	TTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	123
	TTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	124
	GTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	125
	CGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	222
	GCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	223
	CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224

Tabla 7. Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-B.

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
42	CGTKGGAGSCCATCCCCGSC	225
	TCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	226
	CTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	227
	TCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	228
	TTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	229
	CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	230
46	TCTCGTKGGAGSCCATCCCC	231
	TTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	232
	CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	233
	TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	YTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	235
	CYTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	236
65	GATCCCATTTTCCTCYTCTT	237
	TGATCCCATTTTCCTCYTCTT	238
	CTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	239
	GCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	240
	CGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	241
	GCGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	242
68	GCTGATCCCATTTTCCTCYT	243
	CGCTGATCCCATTTTCCTCYT	244
	GCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	245
	AGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	246
	TAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	247
	CTAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	248
96	TCCATTCAAGGGAGGGCGAC	249
	CTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	250
	TCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	251
	TTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	252
	ATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	253
	CATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	254

Tabla 8. Cebadores directos usados para la amplificación del exón 4 de HLA-B.

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
438	AGATTATCCCAGGTGCCTGC	255
	GAGATTATCCCAGGTGCCTGC	256
	GGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	257
	AGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	258
	TAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	259
	ATAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	260
502	TGTCCTGYCCATTCTCAGKC	261
	GTGTCCTGYCCATTCTCAGKC	262
	GGTGTCTGYCCATTCTCAGKC	263
	AGGTGTCTGYCCATTCTCAGKC	264
	CAGGTGTCTGYCCATTCTCAGKC	265
	CCAGGTGTCTGYCCATTCTCAGKC	266
524	TCACATGGGTGGTCCTAGG	267
	GTCACATGGGTGGTCCTAGG	268
	GGTCACATGGGTGGTCCTAGG	269

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	TGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	270
	CTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	271
	KCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	272
	GKCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	273
547	TSCCATGARAGATGCMAAGC	274
	GTSCCATGARAGATGCMAAGC	275
	TGTSCCATGARAGATGCMAAGC	276
	GTGTSCCATGARAGATGCMAAGC	277
	GGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC	278
	GGGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC	279
571	GWAWTTTCTGACTCTTCCCA	280
	TGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	281
	CTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	282
	CCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	283
	GCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	284
	CGCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	285

Tabla 9. Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 2 de HLA-C.

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
107	GTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	126
	GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
	CGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	128
	CCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	129
	YCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	130
	CYCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	131

Tabla 10. Cebadores directos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-C.

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
84	CGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	132
	TCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	133
	GTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	134
	GGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	135
	GGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	136
	CGGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	137
142	CGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	138
	TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	CTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	140
	CCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	141

ES 2 430 420 T3

posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
	CCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	142
	ACCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	143

Tabla 11. Cebadores directos usados para la amplificación del exón 4 de HLA-C.

posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
461	GTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	286
	GGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	287
	AGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	288
	CAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	289
	CCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	290
	CCCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	291
477	TGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	292
	CTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	293
	GCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	294
	GGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	295
	AGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	296
	CAGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	297
527	CTCAGGATRGTCACATGGSC	298
	TCTCAGGATRGTCACATGGSC	299
	TTCTCAGGATRGTCACATGGSC	300
	RTTCTCAGGATRGTCACATGGSC	301
	CRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC	302
	CCRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC	303
545	GCGCTGTTGGAGTGTGCGAA	78
	GCGCTGTTGGAGTGTGCGAA	79
	GGCGCTGTTGGAGTGTGCGAA	80
	TGGCGCTGTTGGAGTGTGCGAA	81
	ATGGCGCTGTTGGAGTGTGCGAA	82
	CATGGCGCTGTTGGAGTGTGCGAA	83
561	SCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	304
	CSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	305
	TCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	306
	GTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	307
	TGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	308
	GTGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	309

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Determinación de la secuencia del intrón 2 de diversos alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C**

5 Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Parte del exón 1, intrón 2, exón 2, intrón 2 y exón 3 de HLA-A se amplificaron mediante el uso del siguiente conjunto cebador:

Cebador	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
5APBio (5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
3APBio (3')	B-CCGTGCGCTGCAGCGTCTCCTTCCCG	147
B = biotina.		

10

El exón 2, intrón 2 y exón 3 de HLA-B se amplificaron mediante el uso del siguiente conjunto cebador:

Cebador	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
IBPin1 (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
IBPin3 (3')	B-GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT	148
B = biotina.		

15

El exón 2, intrón 2 y exón 3 de HLA-C se amplificaron mediante el uso del siguiente conjunto cebador:

Cebador	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
5CIN1 (5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149
B = biotina.		

El ciclo de reacción PCR se compuso de las siguientes etapas:

20

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

25

La reacción de amplificación se llevó a cabo en 50 mM Tris-HCl pH 9.2, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 200 µM dNTPs, 2.5 U de polimerasa Taq, 1.5 mM de MgCl₂, 15 pmol de cada cebador y 0.1 a 0.5 µg de ADN.

30

El amplicón resultante se clonó en el vector pGEMT (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). El análisis de la secuencia de nucleótidos se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado Modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) con nucleótidos dideoxi marcados con fluorescencia (Estuche de secuenciación cíclica de la reacción del terminador colorante Prism™ Ready, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. 29 secuencias del intrón 2 se obtuvieron para HLA-A, 38 para HLA-B y 13 para HLA-C. Las secuencias se muestran en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

35

Ejemplo 2: Amplificación del exón 2 y el exón 3 de HLA-A

40

Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Basado en la alineación de secuencia de las secuencias del intrón 2 de HLA-A (Figura 1), un cebador inverso y uno directo locus-específico se diseñó para la

amplificación específica del exón 2 de HLA -A y el exón 3, respectivamente. Con estos cebadores, una mezcla cebadora se construyó para la amplificación separada del exón 2 y el exón 3 de HLA -A consistente de los siguientes 2 conjuntos de cebadores:

- 5 • para el exón 2: 5APBio (sec. con núm. de ident. 144) como cebador directo y 5'ATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (sec. con núm. de ident. 1) como un cebador inverso;
- para el cebador 3: 5'CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (sec. con núm. de ident. 104) como cebador directo y 3APBio (sec. con núm. de ident. 147) como cebador inverso.

10 El ciclo de reacción PCR se compuso de las siguientes etapas:

5 min a 96°C;
35 veces (30 s a 96°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 10 mM Tris.HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (p/v) gelatina, 200µM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20 pmol de cada cebador y 1U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La longitud de los productos de PCR obtenidos se verificó en un gel de agarosa de acuerdo con Sambrook y otros (1989).

20 **Ejemplo 3: Amplificación del exón 2 y el exón 3 de HLA-B**

Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Basada en la alineación de secuencia de las secuencias del intrón 2 de HLA-B (Figura 2), un cebador inverso y uno directo, locus-especifico se diseñó para la amplificación específica del exón 2 de HLA-B y el exón 3, respectivamente. Con estos cebadores, una mezcla cebadora se construyó para la amplificación separada del exón 2 y el exón 3 de HLA-B consistente de los siguientes 2 conjuntos de cebadores:

- 30 • para el exón 2: IBPin1 (sec. con núm. de ident. 145) como cebador directo y 5'ACCCGCGGGGATTTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 310) como un cebador inverso;
- para el exón 3: 5'ACCCGTTTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 121) como cebador directo y IBPin3 (sec. con núm. de ident. 148). como un cebador inverso

35 El ciclo de reacción PCR se compuso de las siguientes etapas:

5 min a 96°C;
35 veces (30 s a 96°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C);
40 10 min a 72°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 10 mM Tris.HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (p/v) gelatina, 200µM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20 pmol de cada cebador y 1U de AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La longitud de los productos de PCR obtenidos se verificó en un gel de agarosa de acuerdo con Sambrook y otros (1989).

45 **Ejemplo 4: Amplificación del exón 2 y el exón 3 de HLA-C**

Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Basado en la alineación de secuencia de las secuencias del intrón 2 de HLA-C (Figura 3), un cebador inverso y uno directo, locus-especifico se diseñó para la amplificación específica del exón 2 de HLA-C y el exón 3, respectivamente. Con estos cebadores, una mezcla cebadora se construyó para la amplificación separada del exón 2 y el exón 3 de HLA-C consistente de los siguientes 2 conjuntos de cebadores:

- 55 • para el exón 2: 5CIN1 (sec. con núm. de ident. 146) como cebador directo y 5'GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (sec. con núm. de ident. 127) como un cebador inverso;
- para el exón 3: 5'TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (sec. con núm. de ident. 139) como cebador directo y 3CIN3 (sec. con núm. de ident. 149) como un cebador inverso.

El ciclo de reacción PCR se compuso de las siguientes etapas:

- 5 5 min a 96°C;
35 veces (30 s a 96°C; 20 s a 58°C; 30 s a 72°C);
10 min a 72°C.

10 La reacción PCR se llevó a cabo en 10 mM Tris.HCl pH 8.3 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.001% (p/v) gelatina, 200µM DNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20 pmol de cada cebador y 1U AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La longitud de los productos de PCR obtenidos se verificó en un gel de agarosa de acuerdo con Sambrook y otros (1989).

Ejemplo 5: Amplificación del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A

15 Las muestras de sangre se recogieron a partir de un donante caucásico en B.A.R.C. (Gent, Bélgica). Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5.1 Mezcla cebadora para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A

20 Una mezcla cebadora se usó para la amplificación separada del exón 2, el exón 3 y el exón 4 de HLA-A consistente de los siguientes conjuntos de cebadores:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
Exón 1-2	5APbio (5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
	3ex2APbio (3')	B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
Exón 3	5ex3APbio(5')	B-CAGTTTtagGCCAAAAATCCCCC	104
	3ex3APbio (3')	B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156
Exón 4	5ex4APbio (5')	B-GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	205
	3ex4APbio (3')	B-TTGGGCAGACCCTCATGCTGC	311

B = biotina.

25 El ciclo de reacción PCR se compuso de las siguientes etapas:

- 30 1 min a 96 °C;
5 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 64 °C; 50 s a 72 °C);
5 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 62 °C; 50 s a 72 °C);
10 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 60 °C; 50 s a 72 °C);
15 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 55 °C; 50 s a 72 °C);
5 min a 72 °C;
4°C.

35 La reacción PCR se llevó a cabo en 50 mM Tris.HCl pH 9.2, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 200µM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 U de Taq polimerasa. (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, Nueva Jersey, Estados Unidos), 20 pmol de cebador 5APbio, 20 pmol de cebador 3ex2APbio, 40 pmol de cebador 5ex3APbio, 40 pmol de cebador 3ex3APbio, 15 pmol de cebador 5ex4APbio, 15 pmol de cebador 3ex4APbio y 0.1-0.5 µg de ADN.

40 La longitud de los productos de amplificación obtenidos se verificó en un gel de agarosa 3% de acuerdo con Sambrook y otros (1989). 3 bandas de diferentes longitudes relativas se obtuvieron respectivamente al exón 2 (559 pb), exón 3 (439 pb) y exón 4 (380 pb) de HLA -A. Mediante el uso de este protocolo, los exones HLA-A se amplificaron lo suficientemente fuerte para la posterior tipificación en un ensayo de hibridación.

5.2 Prueba de los productos de amplificación obtenidos en un ensayo de tipificación de HLA-A

[0093] Los amplicones de HLA-A se tipifican posteriormente en un ensayo de hibridación inversa basado en la tecnología de LiPA (Stuyver y otros, 1993). Después de la etapa de amplificación como se describió anteriormente, los ácidos nucleicos

amplificados se hibridaron a un panel de 36 sondas mediante el uso del estuche LiPA de HLA -A (Innogenetics, Gante, Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante . Los resultados de esta hibridación inversa se muestran en la Figura 7.

5 Para la comparación, un producto de amplificación que comprende además el exón 2 y exón 3 en un amplicón simple se obtuvo mediante el uso de 5APBio (cebador directo; sec. con núm. de ident. 144) y 3APBio (cebador inverso; sec. con núm. de ident. 147). La hibridación de este amplicón mayor a las sondas en la tira de LiPA se muestra además en la Figura 7. La Figura 7 ilustra evidentemente que los amplicones obtenidos mediante amplificación separada del exón 2 y el exón 3 permiten una tipificación más evidente y pronunciada después del amplicón mayor obtenido mediante la amplificación del exón 2 y el exón 3 en un amplicón simple.

Ejemplo 6: Amplificación del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B

15 Las muestras de sangre se recogieron a partir de un donante caucásico en B.A.R.C. (Gent, Bélgica). Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

6.1 Mezcla cebadora para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B

20 Una mezcla cebadora se usó para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B consistente de los siguientes conjuntos de cebadores:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
Exón 2	IBPin1bio (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
	IB3Pin2bio (3')	B-AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
Exón 3	IB5Pin2bio (5')	B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224
	IB3Pin3bio (3')	B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234
Exón 4	5ex4IBbio (5')	B-TCACATGGGTGGTCCTAGG	267
	3ex4IBbio (3')	B-TCGGCAGCCCTCATGCTGT	312

B = biotina.

25 El ciclo de reacción PCR se compuso de las siguientes etapas:

- 1 min a 96 °C;
- 5 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 64 °C; 50 s a 72 °C);
- 5 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 62 °C; 50 s a 72 °C);
- 10 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 60 °C; 50 s a 72 °C);
- 30 15 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 55 °C; 50 s a 72 °C);
- 5 min a 72 °C;
- 4°C

35 La reacción PCR se llevó a cabo en 50 mM Tris.HCl pH 9.2, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 200µM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 U de Taq polimerasa. (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, Nueva Jersey, Estados Unidos), 35 pmol de cebador IBPin1bio, 35 pmol de cebador IBPin2bio, 50 pmol de cebador IB5Pin2bio, 50 pmol de cebador IB3Pin3bio, 10 pmol de cebador 5ex4IBbio, 10 pmol de cebador 3ex4IBbio y 0.1-0.5 µg de ADN.

40 La longitud de los productos de amplificación obtenidos se verificó en un gel de agarosa 3% de acuerdo con Sambrook y otros (1989). 3 bandas de diferente longitud se obtuvieron relativas respectivamente al exón 2 de HLA-B (555 pb), exón 3 (446 pb) y exón 4 (323 pb). Mediante el uso de este protocolo, los exones HLA -B se amplificaron lo suficientemente fuerte para la tipificación posterior en un ensayo de sonda de línea.

6.2 Prueba de los productos de amplificación obtenida en un ensayo de tipificación de HLA-B.

45 Los amplicones de HLA -B se tipifican posteriormente en un ensayo de hibridación inversa basado en la tecnología LiPA (Stuyver y otros, 1993). Después de la etapa de amplificación como se describió anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron a un panel de 60 sondas mediante el uso del estuche LiPA de HLA-B (Innogenetics, Gent,

Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados de esta hibridación inversa se muestran en la Figura 8.

Para la comparación, un producto de amplificación que comprende además el exón 2 y exón 3 en un amplicón simple se obtuvo mediante el uso de IBPin1 (cebador directo; sec. con núm. de ident. 145) y IBPin3 (cebador inverso; sec. con núm. de ident. 148). La hibridación de este amplicón mayor a las sondas en la tira de LiPA se muestra además en la Figura 8. La Figura 8 ilustra evidentemente que los amplicones obtenidos mediante amplificación separada del exón 2 y exón 3 permiten una tipificación más evidente y pronunciada después del amplicón mayor obtenido mediante amplificación del exón 2 y el exón 3 en un amplicón sencillo.

Ejemplo 7: Amplificación del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C

Los ácidos nucleicos se prepararon a partir de muestras de sangre mediante el uso del estuche QIAamp Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una mezcla cebadora se usa para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C consistente de los siguientes conjuntos de cebadores:

Amplicón	Conjunto cebador	Secuencia (5'-3')	Sec. con núm. de ident.
Exón 2	SCIN1(5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
	IC3Pin2bio(3')	B-GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
Exón 3	IC5Pin2bio(5')	B-TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149
Exón 4	Sex4ICbio(5')	B-TCTCAGGATRGTCACATGGSC	299
	3ex4ICbio(3')	B-CATCTCAGGGTGMRGGGCTT	313

B = biotina.

El ciclo de la reacción PCR se compone de las siguientes etapas:

- 1 min a 96 °C;
- 5 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 64 °C; 50 s a 72 °C);
- 5 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 62 °C; 50 s a 72 °C);
- 10 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 60 °C; 50 s a 72 °C);
- 15 veces (30 s a 96 °C; 50 s a 55 °C; 50 s a 72 °C);
- 5 min a 72 °C;
- 4°C.

La reacción PCR se lleva a cabo en 50 mM Tris.HCl pH 9.2, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 200µM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 U de polimerasa Taq (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, Nueva Jersey, Estados Unidos), 20 pmol de cada cebador y 0.1-0.5 µg de ADN.

La longitud de los productos de amplificación obtenidos se verifica en un gel de agarosa 3 % de acuerdo a Sambrook y otros. (1989). 3 bandas de diferente tamaño se obtuvieron relativas al exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C. Mediante el uso de este protocolo, los exones de HLA-C se amplifican lo suficientemente fuerte para la posterior tipificación en un Ensayo de Sonda de Línea.

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. Capítulo 5 HLA and MHC: genes, molecules and function. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, Reino Unido.

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 Estados Unidos 81: 3297-3301.

Barany F (1991) The ligase chain reaction in a PCR world. PCR Methods Appl 1: 5-16.

Campbell RD y Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. Immunology Today 14: 349-352.

- Clay TM, Culpan D, Howell WM, Sage DA, Bradley BA y Bidwell JL (1994) UHG crossmatching. A comparison with PCR-SSO typing in the selection de HLA-DPB-compatible bone marrow donors. *Transplantation* 58: 200-207.
- Compton J (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350: 91-92.
- 5 Duck P (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques* 9: 142-147.
- Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, Dupont B y Yang SY (1990) Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *New Eng J Med* 323: 1818-1822.
- 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 Estados Unidos* 87: 1874-1878.
- 10 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 Estados Unidos* 86: 1173-1177.
- 15 Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C y Sninsky JJ (1990) Effects of de cebador-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic 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.
- 20 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.
- Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J and Broder S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 84: 7706-7710.
- 25 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.
- Mullis KB y Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- 30 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.
- Nielsen P, Egholm M, Berg R y Buchardt O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic-Acids-Res* 21: 197-200.
- 35 Olerup O y Zetterquist H (1991) HLA-DRB1*10 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 37: 197-204.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, 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.
- 40 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA (1988) de cebador-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 immobilizes sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 86: 6230-6234.
- Sambrook J, Fritsch Ey Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos.
- 45 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.
- Sanchez-Pescador R, Stempien MS y Urdea MS (1988) Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 beta-lactamase-mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. *J Clin Microbiol* 26: 1934-1938.
- 50 Spencer WR y Parham P (1996) HLA class I genes: structure and diversity. *Capítulo 4. HLA and MHC: genes, molecules and function*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, R.U..
- Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght 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.
- 55 Terasaki PH y McClelland JD (1964) Microdot 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.
- Urdea MS, Horn T, Fultz TJ, Anderson M, Running JA, Hamren S, Ahle D y Chang CA (1991) Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser* 24:197-200.
- 60 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.

Yang SY (1987) A standardised method for detection de HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis. Immunobiology de HLA. Histocompatibility testing (ed. B Dupont). Springer-Verlag, Nueva York, Estados Unidos. págs. 332-335.

5 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.

10

REIVINDICACIONES

1. Método para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-B en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- (i) si es necesario, la liberación, aislamiento y/o concentración de los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;
- (ii) amplificación separada locus-específica, del exón 2, exón 3 y exón 4 de los alelos HLA-B, haciendo uso de al menos tres conjuntos de cebadores, en donde:

- para la amplificación del exón 2, el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-B;
- para la amplificación del exón 3, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 2 de HLA-B y/o el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de HLA-B; y
- para la amplificación del exón 4, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia objetivo locus-específica en el intrón 3 de HLA-B;

(iii) tipificación del alelo específico de HLA-B presente en dicha muestra.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la secuencia objetivo locus-específica se sitúa en la posición 35 o 170 del intrón 2 de HLA-B (Fig. 2) y/o posición 42, 46, 65, 68, 96, 438, 502, 524, 547 o 571 del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5).

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2 **caracterizado porque** dichas posiciones constituyen el extremo 3' del cebador que se usa para la amplificación del exón 2, exón 3 o exón 4.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizado porque** el cebador se selecciona a partir de la siguiente lista:

- para la amplificación del exón 2 de HLA-B (tabla 5):

- 5'ACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 108)
- 5'AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 109)
- 5'CAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 110)
- 5'CCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 111)
- 5'MCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 112)
- 5'GMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 113)
- 5'YGMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 314)
- para la amplificación del exón 3 de HLA-B (Tabla 6; Tabla 7):
- 5'CYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 114)
- 5'CCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 115)
- 5'GCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 116)
- 5'GGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 117)
- 5'CGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 118)
- 5'CCGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (sec. con núm. de ident. 119)
- 5'CCCGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 120)
- 5'ACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 121)
- 5'TACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 122)
- 5'TTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 123)
- 5'TTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 124)
- 5'GTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 125)
- 5'CGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 222)
- 5'GCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 223)
- 5'CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 224)
- 5'CGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 225)
- 5'TCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 226)
- 5'CTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 227)
- 5'TCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 228)
- 5'TTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 229)

ES 2 430 420 T3

5'CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (sec. con núm. de ident. 230)
5'TCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 231)
5'TTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 232)
5'CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 233)
5'TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 234)
5'YTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 235)
5'CYTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 236)
5'GATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 237)
5'TGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 238)
5'CTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 239)
5'GCTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 240)
5'CGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 241)
5'GCGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 242)
5'GCTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 243)
5'CGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 244)
5'GCGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 245)
5'AGCGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 246)
5'TAGCGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 247)
5'CTAGCGTGATCCCATTTTCTCTCTT3' (sec. con núm. de ident. 248)
5'TCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 249)
5'CTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 250)
5'TCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 251)
5'TTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 252)
5'ATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 253)
5'CATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (sec. con núm. de ident. 254)

- para la amplificación del exón 4 de HLA-B (tabla 8):

5'AGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 255)
5'GAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 256)
5'GGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 257)
5'AGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 258)
5'TAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 259)
5'ATAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (sec. con núm. de ident. 260)
5'TGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 261)
5'GTGTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 262)
5'GGTGTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 263)
5'AGGTGTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 264)
5'CAGGTGTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 265)
5'CCAGGTGTCTGYCCATTCTCAGKC3' (sec. con núm. de ident. 266)
5'TCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 267)
5'GTCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 268)
5'GGTCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 269)
5'TGGTCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 270)
5'CTGGTCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 271)
5'KCTGGTCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 272)
5'GKCTGGTCACATGGGTGGTCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 273)
5'TSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 274)
5'GTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 275)
5'TGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 276)
5'GTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 277)
5'GGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 278)
5'GGGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (sec. con núm. de ident. 279)
5'GWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 280)
5'TGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 281)
5'CTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 282)
5'CCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 283)
5'GCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 284)
5'CGCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (sec. con núm. de ident. 285)

5. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado porque** la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con el siguiente cebador directo:
- 5 5'GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG3' (sec. con núm. de ident. 145).
6. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado porque** la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con el siguiente cebador inverso:
- 10 5'TCGGCAGCCCCTCATGCTGT3' (sec. con núm. de ident. 312).
7. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado porque**:
- la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con al menos el siguiente conjunto de cebadores:

15 5'GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG3' (sec. con núm. de ident. 145) y
5'AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (sec. con núm. de ident. 109);
 - la amplificación del exón 3 se lleva a cabo con al menos el siguiente conjunto de cebadores:

20 5'CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (sec. con núm. de ident. 224) y
5'TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (sec. con núm. de ident. 234);
 - la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con al menos el siguiente conjunto de cebadores:

25 S'TCACATGGGTGGTCCTAGG3' (sec. con núm. de ident. 267) y
5'TCGGCAGCCCCTCATGCTGT3' (sec. con núm. de ident. 312).
8. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado porque** tanto el exón 2 como el exón 3 de HLA-B se amplifican mediante el uso de una mezcla cebadora múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3.
9. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado porque** todos los tres exones, exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B se amplifican mediante el uso de una mezcla cebadora múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2, al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 4.
10. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizado porque** la etapa de tipificación se lleva a cabo por hibridación con una o más sondas adecuadas.
- 40 11. Un estuche de diagnóstico para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-B en una muestra que comprende los siguientes componentes:
- (i) cuando sea adecuado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;
 - (ii) una mezcla cebadora que contiene al menos:
 - un conjunto cebador para la amplificación del exón 2 consistente de una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la amplificación del exón 2 de los alelos HLA-B.
 - un conjunto cebador para la amplificación del exón 3 consistente de una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la amplificación del exón 3 de los alelos HLA-B, y
 - un conjunto cebador para la amplificación del exón 4 consistente de una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la amplificación del exón 4 de los alelos HLA-B.
 - (iii) un medio para la tipificación del alelo específico de HLA-B presente en dicha muestra.

12. Un estuche de ensayo de sonda de línea para la tipificación o subtipificación de uno o más alelos HLA-B en una muestra que comprende los siguientes componentes:

5

(i) cuando sea adecuado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) una mezcla cebadora que contiene al menos

10

- un conjunto cebador para la amplificación del exón 2 consistente de una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la amplificación del exón 2 de los alelos HLA-B.

- un conjunto cebador para la amplificación del exón 3 consistente de una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la amplificación del exón 3 de los alelos HLA-B, y

15

- un conjunto cebador para la amplificación del exón 4 consistente de una combinación de un cebador directo y uno inverso como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la amplificación del exón 4 de los alelos HLA-B.

20

(iii) al menos una sonda que se hibrida específicamente con el exón 2, exón 3 o exón 4 de HLA-B, fijado a un soporte sólido;

(iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;

(v) una solución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha solución;

(vi) cuando sea adecuado, un medio para detectar los híbridos que resultan de la hibridación precedente.

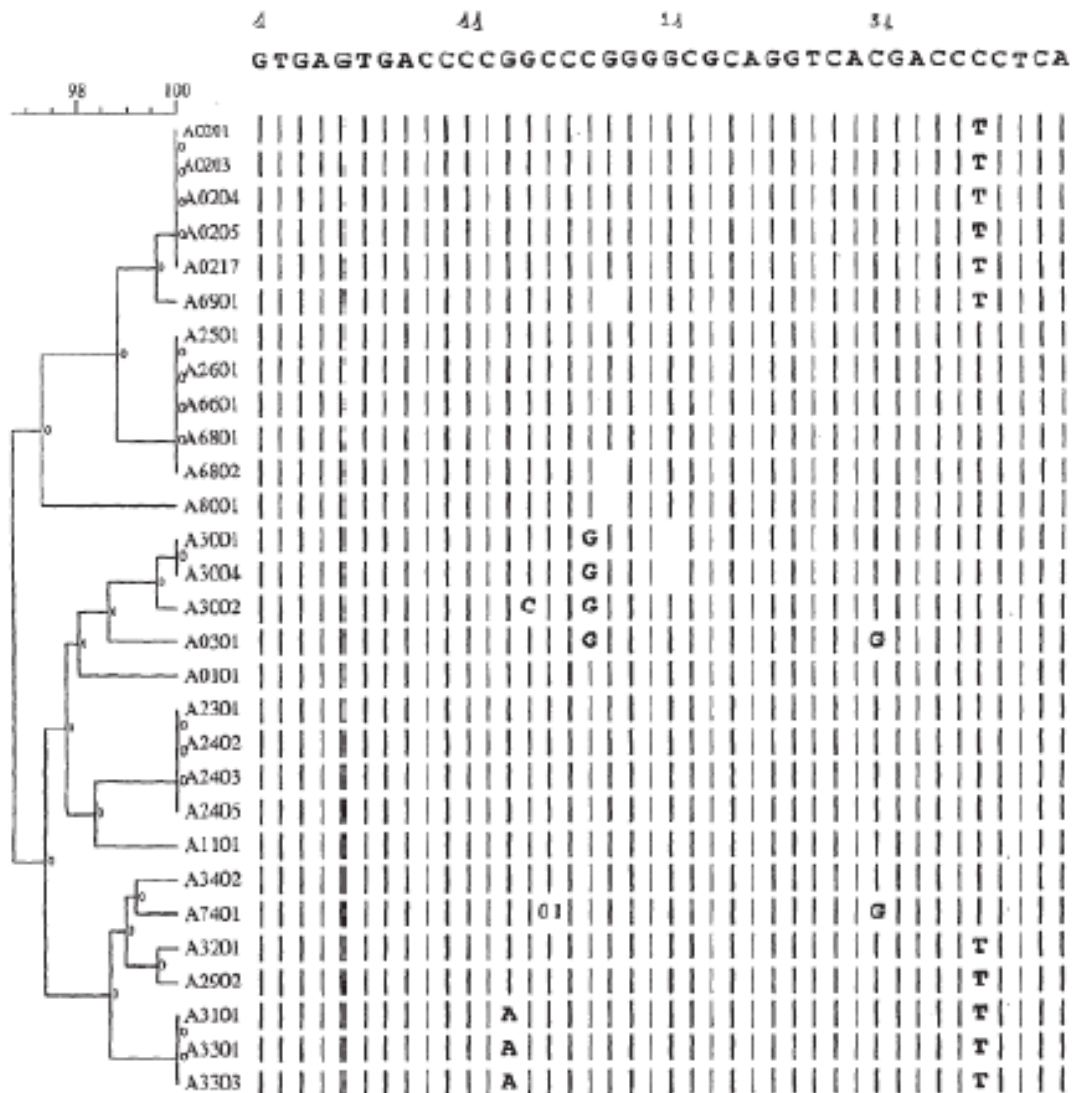


Figura 1

CCAC³¹CCCGAAGCCG¹⁰⁴CGGGACCCCGAGACCCTTG¹³¹CCCCGGGAGAGGCC¹³⁴CC

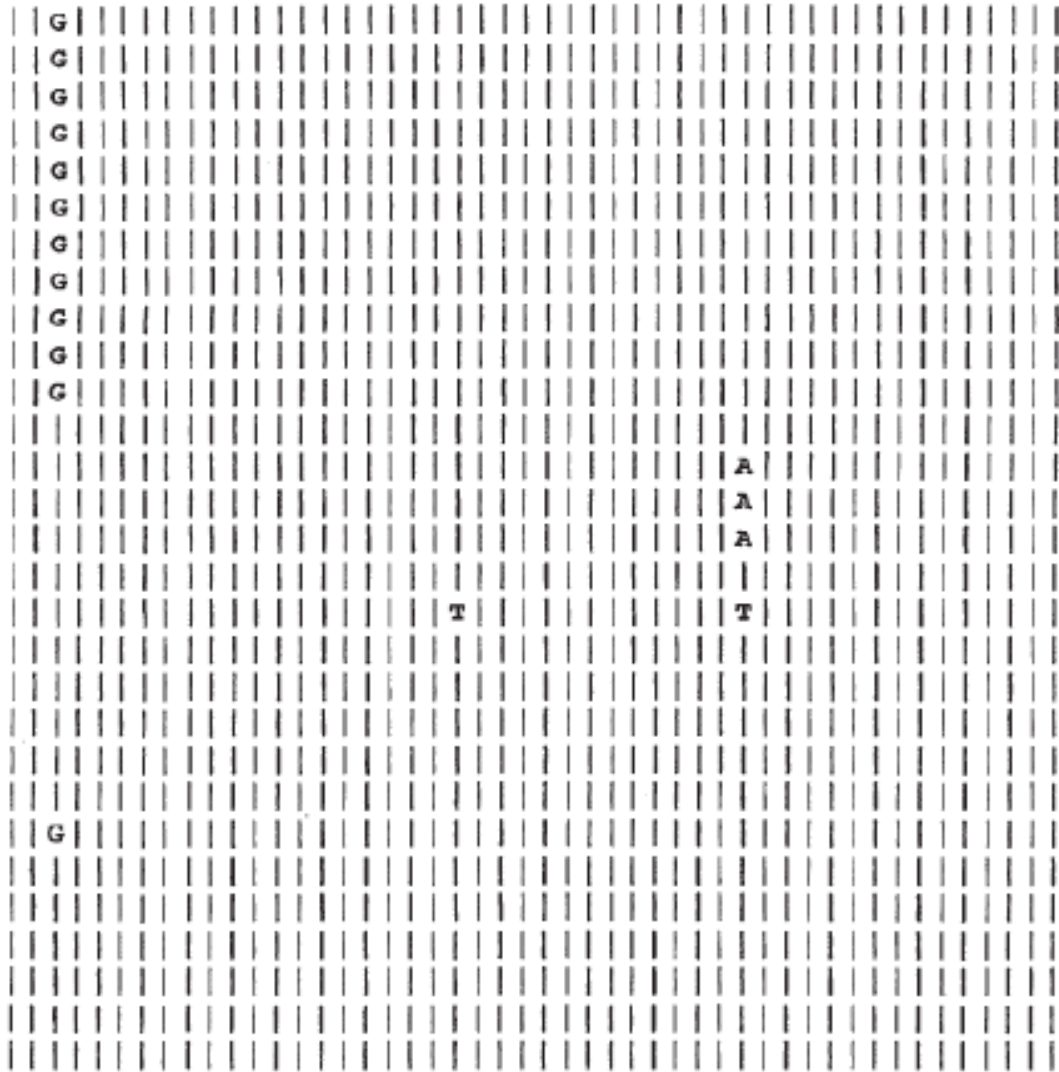


Figura 1 – cont. 2

AGGCGC¹⁴²TTTACC¹⁵¹CGGTTTCATTTTCAGTTTAGGCC¹⁷⁴AAAAATCCCCCG¹⁸⁴

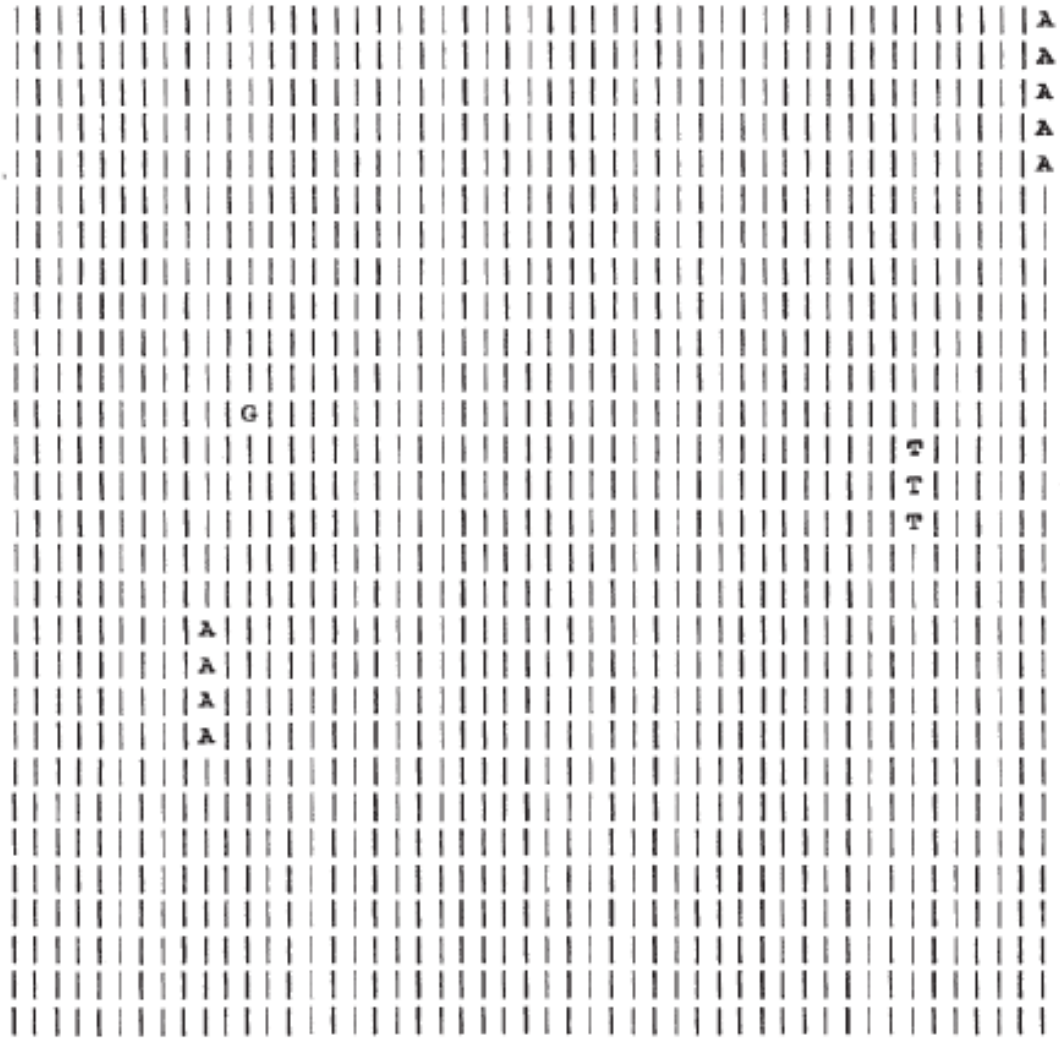


Figura 1 – cont. 3

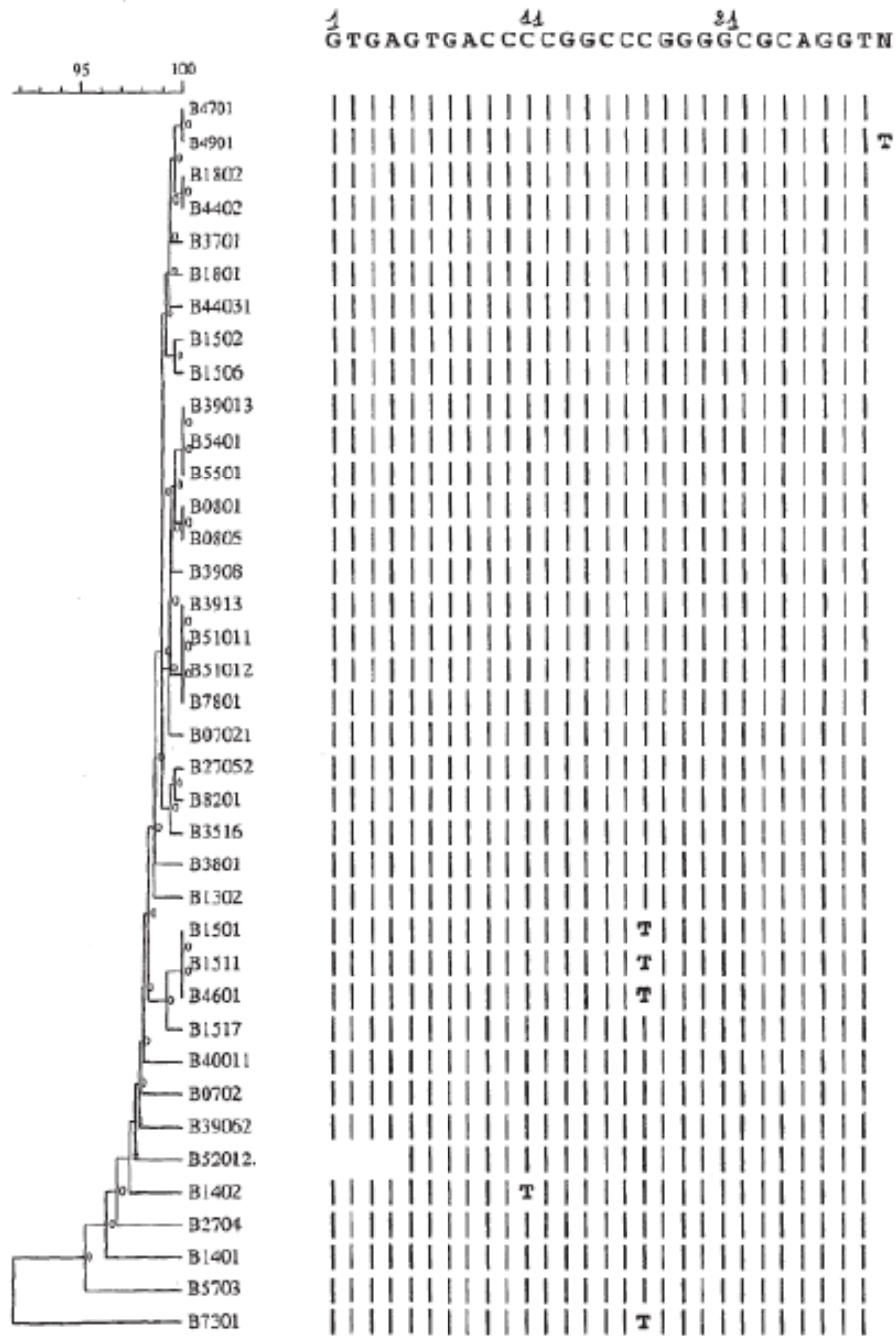


Figura 2

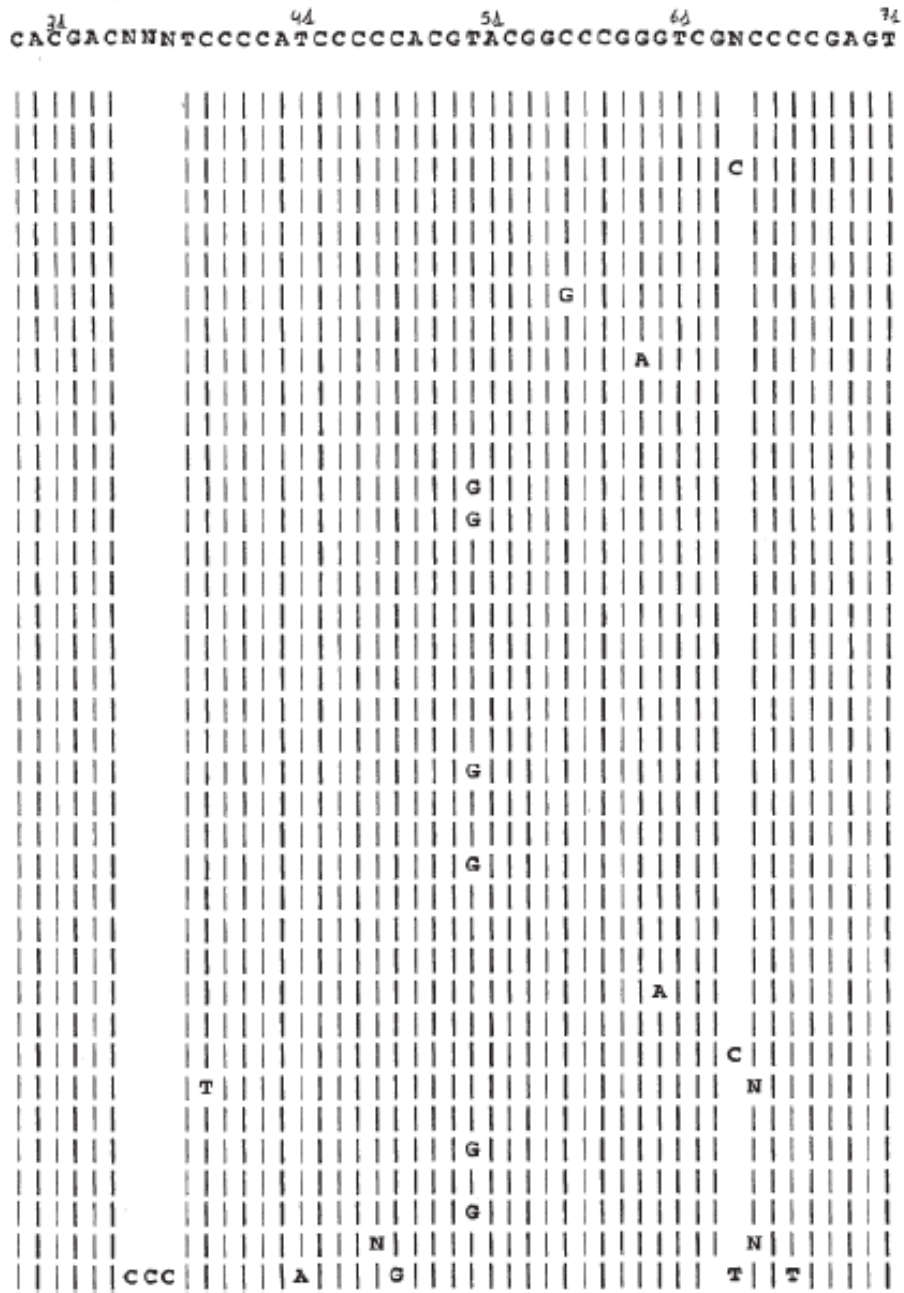


Figura 2 – cont. 1

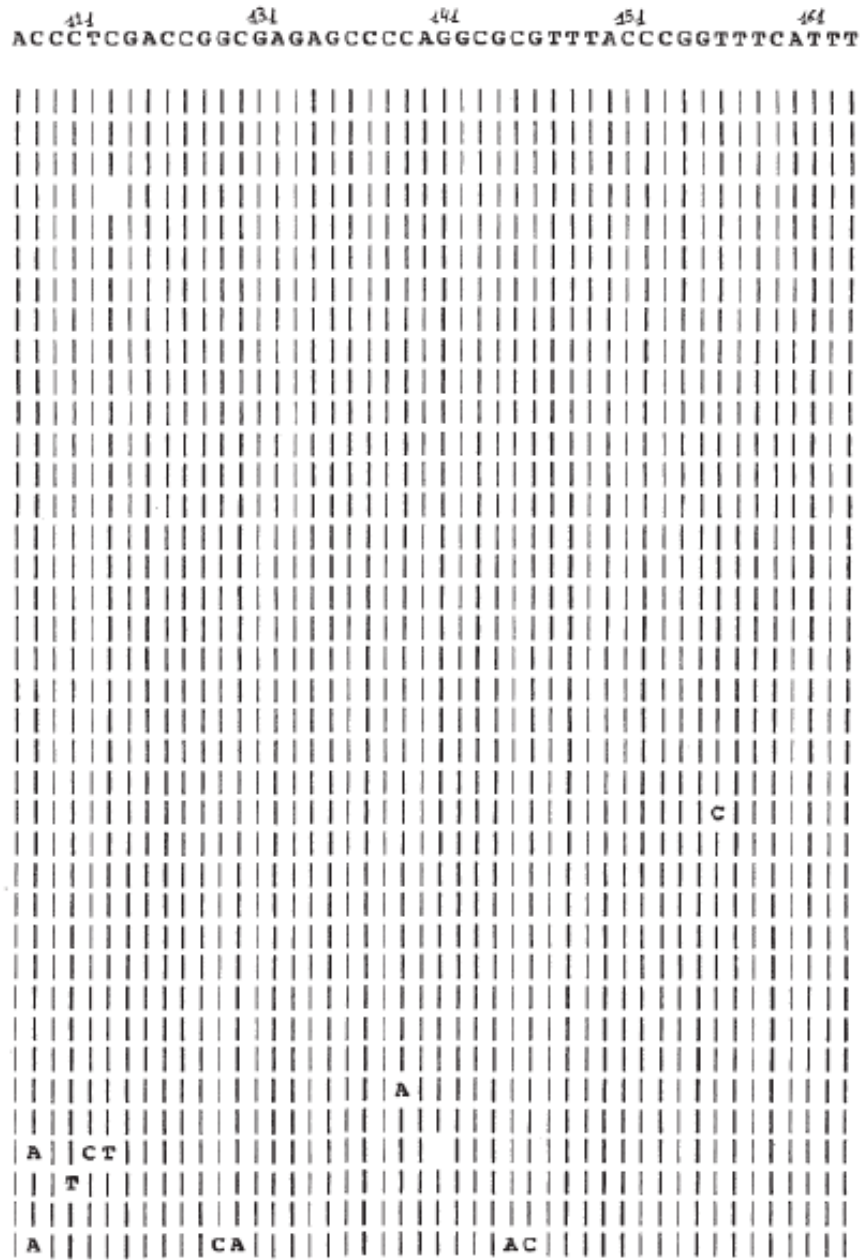


Figura 2 – cont. 3

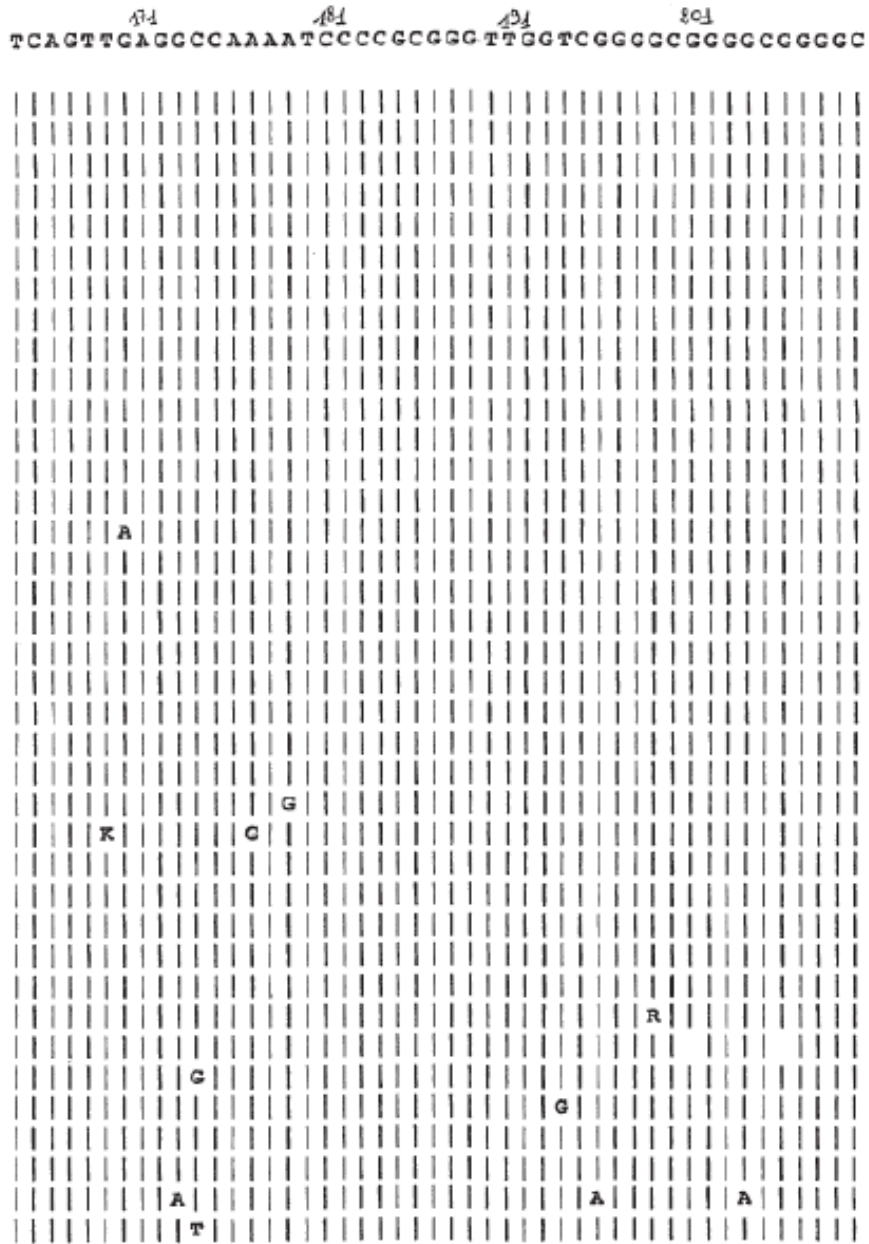


Figura 2 - cont. 4

144	154	164	174	184	194	204	214	224	234	244	Sec. con núm. ident
TCGGNNNNGGGGACGGGGCTGACCGCGGGGCCGGGGCCAGN											
										T	345
GG	CTCG									T	346
											347
											348
			T								349
				A							350
											351
										G	352
											353
											354
											355
											356
											357
											358
											359
				T							360
				T							361
				T							362
				T							363
			T								364
								G			365
								G			366
								G			367
											368
											369
									T		370
									T		371
									T		372
									T		373
			T			T					374
			T				A		N		375
							N				376
				T						A	377
			T					G			378
											379
			T					G		A	380
N		N				NN			N		381
		T	N				A	C	T		382

Figura 2 – cont. 5

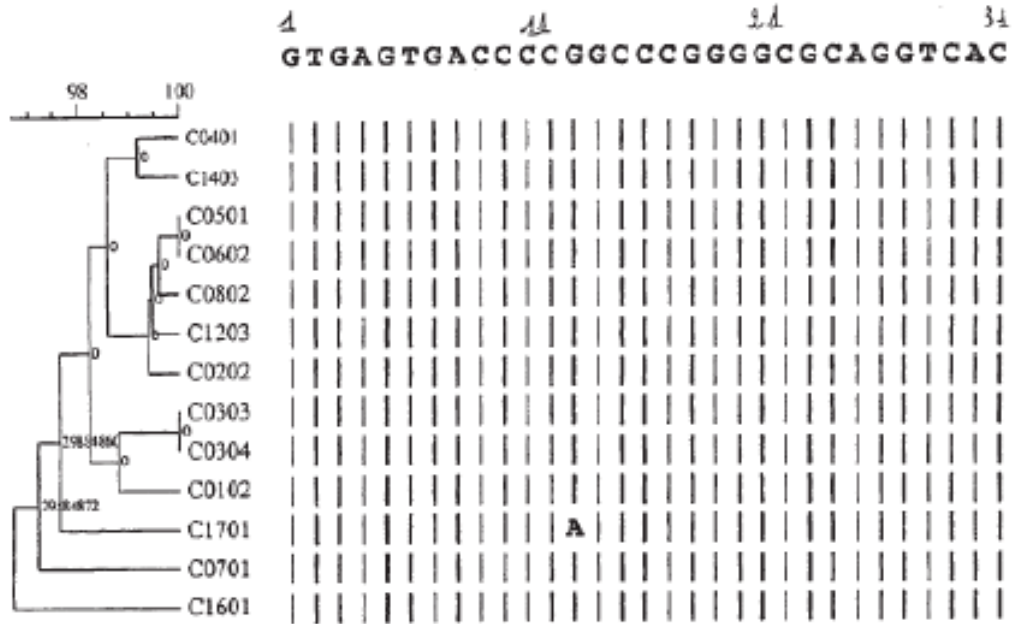


Figura 3

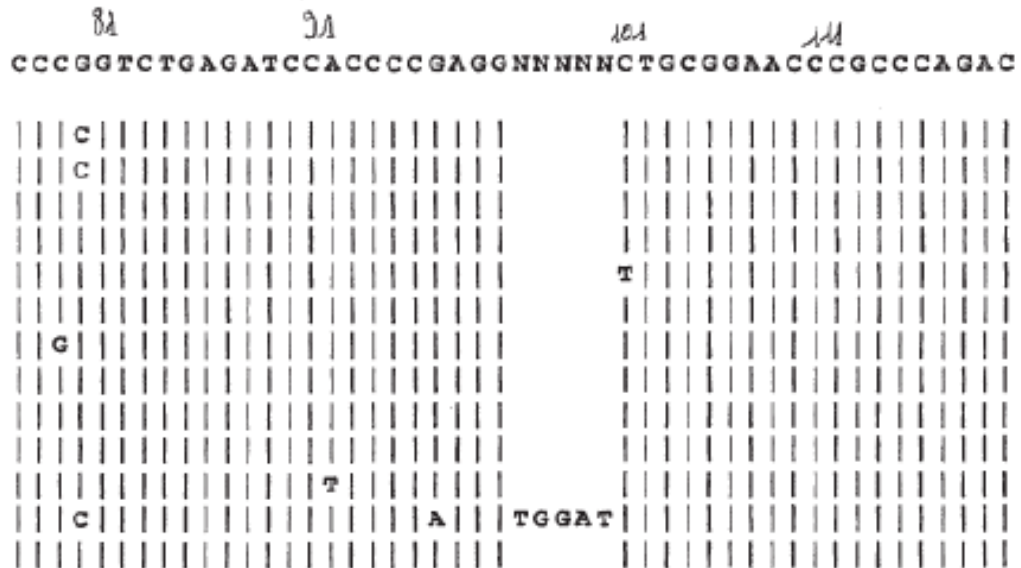


Figura 3 – cont. 2

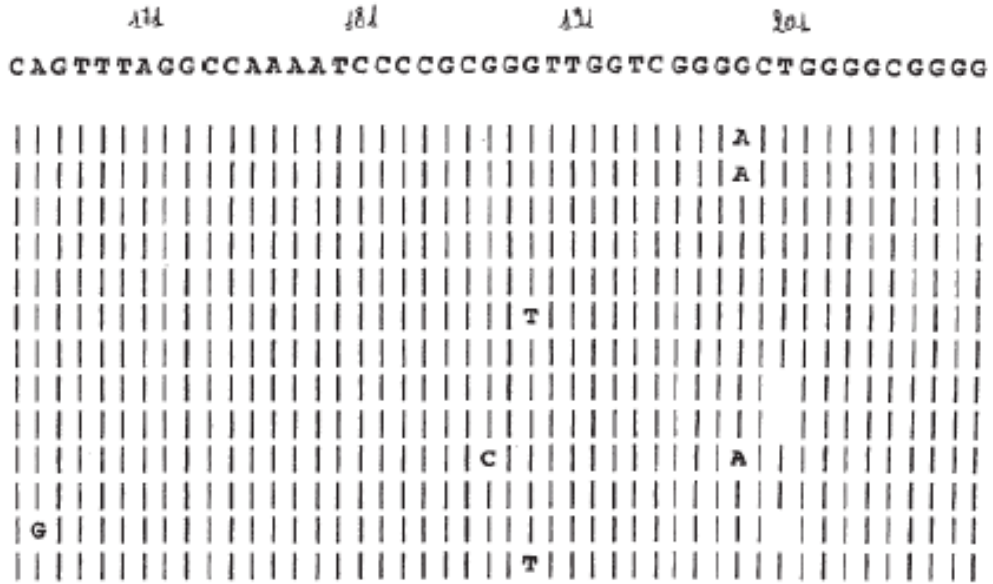


Figura 3 – cont. 4

111	121	131	141	sec. con núm. ident.
CTCGGGGGACGGGGCTGACCACGGGGGCGGGGCCAG				
				383
				384
				385
				386
				387
				388
				389
				390
				391
				392
				393
				394
				395

Figura 3 – cont. 5

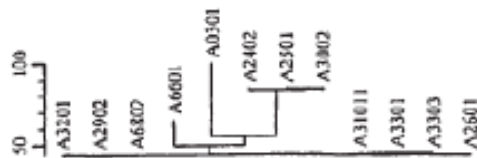
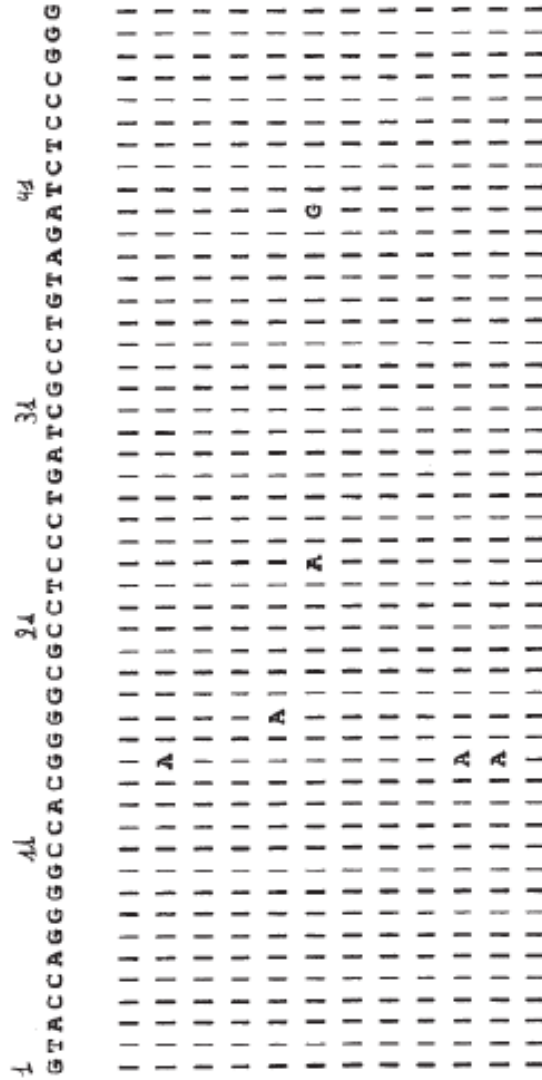


Figura 4

¹²¹ TGAGGGAGGGAAATCCTCCTGGGTTTCCAGATCCTGTACCAGAGAGTGGACICTGGAGGTTCCGCC
¹³¹ ¹⁵¹ ¹⁶¹ ¹⁷¹ ¹⁸¹ ¹⁹¹ ²⁰¹ ²¹¹ ²²¹ ²³¹ ²⁴¹ ²⁵¹ ²⁶¹ ²⁷¹ ²⁸¹ ²⁹¹ ³⁰¹ ³¹¹ ³²¹ ³³¹ ³⁴¹ ³⁵¹ ³⁶¹ ³⁷¹ ³⁸¹ ³⁹¹ ⁴⁰¹ ⁴¹¹ ⁴²¹ ⁴³¹ ⁴⁴¹ ⁴⁵¹ ⁴⁶¹ ⁴⁷¹ ⁴⁸¹ ⁴⁹¹ ⁵⁰¹ ⁵¹¹ ⁵²¹ ⁵³¹ ⁵⁴¹ ⁵⁵¹ ⁵⁶¹ ⁵⁷¹ ⁵⁸¹ ⁵⁹¹ ⁶⁰¹ ⁶¹¹ ⁶²¹ ⁶³¹ ⁶⁴¹ ⁶⁵¹ ⁶⁶¹ ⁶⁷¹ ⁶⁸¹ ⁶⁹¹ ⁷⁰¹ ⁷¹¹ ⁷²¹ ⁷³¹ ⁷⁴¹ ⁷⁵¹ ⁷⁶¹ ⁷⁷¹ ⁷⁸¹ ⁷⁹¹ ⁸⁰¹ ⁸¹¹ ⁸²¹ ⁸³¹ ⁸⁴¹ ⁸⁵¹ ⁸⁶¹ ⁸⁷¹ ⁸⁸¹ ⁸⁹¹ ⁹⁰¹ ⁹¹¹ ⁹²¹ ⁹³¹ ⁹⁴¹ ⁹⁵¹ ⁹⁶¹ ⁹⁷¹ ⁹⁸¹ ⁹⁹¹ ¹⁰⁰¹ ¹⁰¹¹ ¹⁰²¹ ¹⁰³¹ ¹⁰⁴¹ ¹⁰⁵¹ ¹⁰⁶¹ ¹⁰⁷¹ ¹⁰⁸¹ ¹⁰⁹¹ ¹¹⁰¹ ¹¹¹¹ ¹¹²¹ ¹¹³¹ ¹¹⁴¹ ¹¹⁵¹ ¹¹⁶¹ ¹¹⁷¹ ¹¹⁸¹ ¹¹⁹¹ ¹²⁰¹ ¹²¹¹ ¹²²¹ ¹²³¹ ¹²⁴¹ ¹²⁵¹ ¹²⁶¹ ¹²⁷¹ ¹²⁸¹ ¹²⁹¹ ¹³⁰¹ ¹³¹¹ ¹³²¹ ¹³³¹ ¹³⁴¹ ¹³⁵¹ ¹³⁶¹ ¹³⁷¹ ¹³⁸¹ ¹³⁹¹ ¹⁴⁰¹ ¹⁴¹¹ ¹⁴²¹ ¹⁴³¹ ¹⁴⁴¹ ¹⁴⁵¹ ¹⁴⁶¹ ¹⁴⁷¹ ¹⁴⁸¹ ¹⁴⁹¹ ¹⁵⁰¹ ¹⁵¹¹ ¹⁵²¹ ¹⁵³¹ ¹⁵⁴¹ ¹⁵⁵¹ ¹⁵⁶¹ ¹⁵⁷¹ ¹⁵⁸¹ ¹⁵⁹¹ ¹⁶⁰¹ ¹⁶¹¹ ¹⁶²¹ ¹⁶³¹ ¹⁶⁴¹ ¹⁶⁵¹ ¹⁶⁶¹ ¹⁶⁷¹ ¹⁶⁸¹ ¹⁶⁹¹ ¹⁷⁰¹ ¹⁷¹¹ ¹⁷²¹ ¹⁷³¹ ¹⁷⁴¹ ¹⁷⁵¹ ¹⁷⁶¹ ¹⁷⁷¹ ¹⁷⁸¹ ¹⁷⁹¹ ¹⁸⁰¹ ¹⁸¹¹ ¹⁸²¹ ¹⁸³¹ ¹⁸⁴¹ ¹⁸⁵¹ ¹⁸⁶¹ ¹⁸⁷¹ ¹⁸⁸¹ ¹⁸⁹¹ ¹⁹⁰¹ ¹⁹¹¹ ¹⁹²¹ ¹⁹³¹ ¹⁹⁴¹ ¹⁹⁵¹ ¹⁹⁶¹ ¹⁹⁷¹ ¹⁹⁸¹ ¹⁹⁹¹ ²⁰⁰¹ ²⁰¹¹ ²⁰²¹ ²⁰³¹ ²⁰⁴¹ ²⁰⁵¹ ²⁰⁶¹ ²⁰⁷¹ ²⁰⁸¹ ²⁰⁹¹ ²¹⁰¹ ²¹¹¹ ²¹²¹ ²¹³¹ ²¹⁴¹ ²¹⁵¹ ²¹⁶¹ ²¹⁷¹ ²¹⁸¹ ²¹⁹¹ ²²⁰¹ ²²¹¹ ²²²¹ ²²³¹ ²²⁴¹ ²²⁵¹ ²²⁶¹ ²²⁷¹ ²²⁸¹ ²²⁹¹ ²³⁰¹ ²³¹¹ ²³²¹ ²³³¹ ²³⁴¹ ²³⁵¹ ²³⁶¹ ²³⁷¹ ²³⁸¹ ²³⁹¹ ²⁴⁰¹ ²⁴¹¹ ²⁴²¹ ²⁴³¹ ²⁴⁴¹ ²⁴⁵¹ ²⁴⁶¹ ²⁴⁷¹ ²⁴⁸¹ ²⁴⁹¹ ²⁵⁰¹ ²⁵¹¹ ²⁵²¹ ²⁵³¹ ²⁵⁴¹ ²⁵⁵¹ ²⁵⁶¹ ²⁵⁷¹ ²⁵⁸¹ ²⁵⁹¹ ²⁶⁰¹ ²⁶¹¹ ²⁶²¹ ²⁶³¹ ²⁶⁴¹ ²⁶⁵¹ ²⁶⁶¹ ²⁶⁷¹ ²⁶⁸¹ ²⁶⁹¹ ²⁷⁰¹ ²⁷¹¹ ²⁷²¹ ²⁷³¹ ²⁷⁴¹ ²⁷⁵¹ ²⁷⁶¹ ²⁷⁷¹ ²⁷⁸¹ ²⁷⁹¹ ²⁸⁰¹ ²⁸¹¹ ²⁸²¹ ²⁸³¹ ²⁸⁴¹ ²⁸⁵¹ ²⁸⁶¹ ²⁸⁷¹ ²⁸⁸¹ ²⁸⁹¹ ²⁹⁰¹ ²⁹¹¹ ²⁹²¹ ²⁹³¹ ²⁹⁴¹ ²⁹⁵¹ ²⁹⁶¹ ²⁹⁷¹ ²⁹⁸¹ ²⁹⁹¹ ³⁰⁰¹ ³⁰¹¹ ³⁰²¹ ³⁰³¹ ³⁰⁴¹ ³⁰⁵¹ ³⁰⁶¹ ³⁰⁷¹ ³⁰⁸¹ ³⁰⁹¹ ³¹⁰¹ ³¹¹¹ ³¹²¹ ³¹³¹ ³¹⁴¹ ³¹⁵¹ ³¹⁶¹ ³¹⁷¹ ³¹⁸¹ ³¹⁹¹ ³²⁰¹ ³²¹¹ ³²²¹ ³²³¹ ³²⁴¹ ³²⁵¹ ³²⁶¹ ³²⁷¹ ³²⁸¹ ³²⁹¹ ³³⁰¹ ³³¹¹ ³³²¹ ³³³¹ ³³⁴¹ ³³⁵¹ ³³⁶¹ ³³⁷¹ ³³⁸¹ ³³⁹¹ ³⁴⁰¹ ³⁴¹¹ ³⁴²¹ ³⁴³¹ ³⁴⁴¹ ³⁴⁵¹ ³⁴⁶¹ ³⁴⁷¹ ³⁴⁸¹ ³⁴⁹¹ ³⁵⁰¹ ³⁵¹¹ ³⁵²¹ ³⁵³¹ ³⁵⁴¹ ³⁵⁵¹ ³⁵⁶¹ ³⁵⁷¹ ³⁵⁸¹ ³⁵⁹¹ ³⁶⁰¹ ³⁶¹¹ ³⁶²¹ ³⁶³¹ ³⁶⁴¹ ³⁶⁵¹ ³⁶⁶¹ ³⁶⁷¹ ³⁶⁸¹ ³⁶⁹¹ ³⁷⁰¹ ³⁷¹¹ ³⁷²¹ ³⁷³¹ ³⁷⁴¹ ³⁷⁵¹ ³⁷⁶¹ ³⁷⁷¹ ³⁷⁸¹ ³⁷⁹¹ ³⁸⁰¹ ³⁸¹¹ ³⁸²¹ ³⁸³¹ ³⁸⁴¹ ³⁸⁵¹ ³⁸⁶¹ ³⁸⁷¹ ³⁸⁸¹ ³⁸⁹¹ ³⁹⁰¹ ³⁹¹¹ ³⁹²¹ ³⁹³¹ ³⁹⁴¹ ³⁹⁵¹ ³⁹⁶¹ ³⁹⁷¹ ³⁹⁸¹ ³⁹⁹¹ ⁴⁰⁰¹ ⁴⁰¹¹ ⁴⁰²¹ ⁴⁰³¹ ⁴⁰⁴¹ ⁴⁰⁵¹ ⁴⁰⁶¹ ⁴⁰⁷¹ ⁴⁰⁸¹ ⁴⁰⁹¹ ⁴¹⁰¹ ⁴¹¹¹ ⁴¹²¹ ⁴¹³¹ ⁴¹⁴¹ ⁴¹⁵¹ ⁴¹⁶¹ ⁴¹⁷¹ ⁴¹⁸¹ ⁴¹⁹¹ ⁴²⁰¹ ⁴²¹¹ ⁴²²¹ ⁴²³¹ ⁴²⁴¹ ⁴²⁵¹ ⁴²⁶¹ ⁴²⁷¹ ⁴²⁸¹ ⁴²⁹¹ ⁴³⁰¹ ⁴³¹¹ ⁴³²¹ ⁴³³¹ ⁴³⁴¹ ⁴³⁵¹ ⁴³⁶¹ ⁴³⁷¹ ⁴³⁸¹ ⁴³⁹¹ ⁴⁴⁰¹ ⁴⁴¹¹ ⁴⁴²¹ ⁴⁴³¹ ⁴⁴⁴¹ ⁴⁴⁵¹ ⁴⁴⁶¹ ⁴⁴⁷¹ ⁴⁴⁸¹ ⁴⁴⁹¹ ⁴⁵⁰¹ ⁴⁵¹¹ ⁴⁵²¹ ⁴⁵³¹ ⁴⁵⁴¹ ⁴⁵⁵¹ ⁴⁵⁶¹ ⁴⁵⁷¹ ⁴⁵⁸¹ ⁴⁵⁹¹ ⁴⁶⁰¹ ⁴⁶¹¹ ⁴⁶²¹ ⁴⁶³¹ ⁴⁶⁴¹ ⁴⁶⁵¹ ⁴⁶⁶¹ ⁴⁶⁷¹ ⁴⁶⁸¹ ⁴⁶⁹¹ ⁴⁷⁰¹ ⁴⁷¹¹ ⁴⁷²¹ ⁴⁷³¹ ⁴⁷⁴¹ ⁴⁷⁵¹ ⁴⁷⁶¹ ⁴⁷⁷¹ ⁴⁷⁸¹ ⁴⁷⁹¹ ⁴⁸⁰¹ ⁴⁸¹¹ ⁴⁸²¹ ⁴⁸³¹ ⁴⁸⁴¹ ⁴⁸⁵¹ ⁴⁸⁶¹ ⁴⁸⁷¹ ⁴⁸⁸¹ ⁴⁸⁹¹ ⁴⁹⁰¹ ⁴⁹¹¹ ⁴⁹²¹ ⁴⁹³¹ ⁴⁹⁴¹ ⁴⁹⁵¹ ⁴⁹⁶¹ ⁴⁹⁷¹ ⁴⁹⁸¹ ⁴⁹⁹¹ ⁵⁰⁰¹ ⁵⁰¹¹ ⁵⁰²¹ ⁵⁰³¹ ⁵⁰⁴¹ ⁵⁰⁵¹ ⁵⁰⁶¹ ⁵⁰⁷¹ ⁵⁰⁸¹ ⁵⁰⁹¹ ⁵¹⁰¹ ⁵¹¹¹ ⁵¹²¹ ⁵¹³¹ ⁵¹⁴¹ ⁵¹⁵¹ ⁵¹⁶¹ ⁵¹⁷¹ ⁵¹⁸¹ ⁵¹⁹¹ ⁵²⁰¹ ⁵²¹¹ ⁵²²¹ ⁵²³¹ ⁵²⁴¹ ⁵²⁵¹ ⁵²⁶¹ ⁵²⁷¹ ⁵²⁸¹ ⁵²⁹¹ ⁵³⁰¹ ⁵³¹¹ ⁵³²¹ ⁵³³¹ ⁵³⁴¹ ⁵³⁵¹ ⁵³⁶¹ ⁵³⁷¹ ⁵³⁸¹ ⁵³⁹¹ ⁵⁴⁰¹ ⁵⁴¹¹ ⁵⁴²¹ ⁵⁴³¹ ⁵⁴⁴¹ ⁵⁴⁵¹ ⁵⁴⁶¹ ⁵⁴⁷¹ ⁵⁴⁸¹ ⁵⁴⁹¹ ⁵⁵⁰¹ ⁵⁵¹¹ ⁵⁵²¹ ⁵⁵³¹ ⁵⁵⁴¹ ⁵⁵⁵¹ ⁵⁵⁶¹ ⁵⁵⁷¹ ⁵⁵⁸¹ ⁵⁵⁹¹ ⁵⁶⁰¹ ⁵⁶¹¹ ⁵⁶²¹ ⁵⁶³¹ ⁵⁶⁴¹ ⁵⁶⁵¹ ⁵⁶⁶¹ ⁵⁶⁷¹ ⁵⁶⁸¹ ⁵⁶⁹¹ ⁵⁷⁰¹ ⁵⁷¹¹ ⁵⁷²¹ ⁵⁷³¹ ⁵⁷⁴¹ ⁵⁷⁵¹ ⁵⁷⁶¹ ⁵⁷⁷¹ ⁵⁷⁸¹ ⁵⁷⁹¹ ⁵⁸⁰¹ ⁵⁸¹¹ ⁵⁸²¹ ⁵⁸³¹ ⁵⁸⁴¹ ⁵⁸⁵¹ ⁵⁸⁶¹ ⁵⁸⁷¹ ⁵⁸⁸¹ ⁵⁸⁹¹ ⁵⁹⁰¹ ⁵⁹¹¹ ⁵⁹²¹ ⁵⁹³¹ ⁵⁹⁴¹ ⁵⁹⁵¹ ⁵⁹⁶¹ ⁵⁹⁷¹ ⁵⁹⁸¹ ⁵⁹⁹¹ ⁶⁰⁰¹ ⁶⁰¹¹ ⁶⁰²¹ ⁶⁰³¹ ⁶⁰⁴¹ ⁶⁰⁵¹ ⁶⁰⁶¹ ⁶⁰⁷¹ ⁶⁰⁸¹ ⁶⁰⁹¹ ⁶¹⁰¹ ⁶¹¹¹ ⁶¹²¹ ⁶¹³¹ ⁶¹⁴¹ ⁶¹⁵¹ ⁶¹⁶¹ ⁶¹⁷¹ ⁶¹⁸¹ ⁶¹⁹¹ ⁶²⁰¹ ⁶²¹¹ ⁶²²¹ ⁶²³¹ ⁶²⁴¹ ⁶²⁵¹ ⁶²⁶¹ ⁶²⁷¹ ⁶²⁸¹ ⁶²⁹¹ ⁶³⁰¹ ⁶³¹¹ ⁶³²¹ ⁶³³¹ ⁶³⁴¹ ⁶³⁵¹ ⁶³⁶¹ ⁶³⁷¹ ⁶³⁸¹ ⁶³⁹¹ ⁶⁴⁰¹ ⁶⁴¹¹ ⁶⁴²¹ ⁶⁴³¹ ⁶⁴⁴¹ ⁶⁴⁵¹ ⁶⁴⁶¹ ⁶⁴⁷¹ ⁶⁴⁸¹ ⁶⁴⁹¹ ⁶⁵⁰¹ ⁶⁵¹¹ ⁶⁵²¹ ⁶⁵³¹ ⁶⁵⁴¹ ⁶⁵⁵¹ ⁶⁵⁶¹ ⁶⁵⁷¹ ⁶⁵⁸¹ ⁶⁵⁹¹ ⁶⁶⁰¹ ⁶⁶¹¹ ⁶⁶²¹ ⁶⁶³¹ ⁶⁶⁴¹ ⁶⁶⁵¹ ⁶⁶⁶¹ ⁶⁶⁷¹ ⁶⁶⁸¹ ⁶⁶⁹¹ ⁶⁷⁰¹ ⁶⁷¹¹ ⁶⁷²¹ ⁶⁷³¹ ⁶⁷⁴¹ ⁶⁷⁵¹ ⁶⁷⁶¹ ⁶⁷⁷¹ ⁶⁷⁸¹ ⁶⁷⁹¹ ⁶⁸⁰¹ ⁶⁸¹¹ ⁶⁸²¹ ⁶⁸³¹ ⁶⁸⁴¹ ⁶⁸⁵¹ ⁶⁸⁶¹ ⁶⁸⁷¹ ⁶⁸⁸¹ ⁶⁸⁹¹ ⁶⁹⁰¹ ⁶⁹¹¹ ⁶⁹²¹ ⁶⁹³¹ ⁶⁹⁴¹ ⁶⁹⁵¹ ⁶⁹⁶¹ ⁶⁹⁷¹ ⁶⁹⁸¹ ⁶⁹⁹¹ ⁷⁰⁰¹ ⁷⁰¹¹ ⁷⁰²¹ ⁷⁰³¹ ⁷⁰⁴¹ ⁷⁰⁵¹ ⁷⁰⁶¹ ⁷⁰⁷¹ ⁷⁰⁸¹ ⁷⁰⁹¹ ⁷¹⁰¹ ⁷¹¹¹ ⁷¹²¹ ⁷¹³¹ ⁷¹⁴¹ ⁷¹⁵¹ ⁷¹⁶¹ ⁷¹⁷¹ ⁷¹⁸¹ ⁷¹⁹¹ ⁷²⁰¹ ⁷²¹¹ ⁷²²¹ ⁷²³¹ ⁷²⁴¹ ⁷²⁵¹ ⁷²⁶¹ ⁷²⁷¹ ⁷²⁸¹ ⁷²⁹¹ ⁷³⁰¹ ⁷³¹¹ ⁷³²¹ ⁷³³¹ ⁷³⁴¹ ⁷³⁵¹ ⁷³⁶¹ ⁷³⁷¹ ⁷³⁸¹ ⁷³⁹¹ ⁷⁴⁰¹ ⁷⁴¹¹ ⁷⁴²¹ ⁷⁴³¹ ⁷⁴⁴¹ ⁷⁴⁵¹ ⁷⁴⁶¹ ⁷⁴⁷¹ ⁷⁴⁸¹ ⁷⁴⁹¹ ⁷⁵⁰¹ ⁷⁵¹¹ ⁷⁵²¹ ⁷⁵³¹ ⁷⁵⁴¹ ⁷⁵⁵¹ ⁷⁵⁶¹ ⁷⁵⁷¹ ⁷⁵⁸¹ ⁷⁵⁹¹ ⁷⁶⁰¹ ⁷⁶¹¹ ⁷⁶²¹ ⁷⁶³¹ ⁷⁶⁴¹ ⁷⁶⁵¹ ⁷⁶⁶¹ ⁷⁶⁷¹ ⁷⁶⁸¹ ⁷⁶⁹¹ ⁷⁷⁰¹ ⁷⁷¹¹ ⁷⁷²¹ ⁷⁷³¹ ⁷⁷⁴¹ ⁷⁷⁵¹ ⁷⁷⁶¹ ⁷⁷⁷¹ ⁷⁷⁸¹ ⁷⁷⁹¹ ⁷⁸⁰¹ ⁷⁸¹¹ ⁷⁸²¹ ⁷⁸³¹ ⁷⁸⁴¹ ⁷⁸⁵¹ ⁷⁸⁶¹ ⁷⁸⁷¹ ⁷⁸⁸¹ ⁷⁸⁹¹ ⁷⁹⁰¹ ⁷⁹¹¹ ⁷⁹²¹ ⁷⁹³¹ ⁷⁹⁴¹ ⁷⁹⁵¹ ⁷⁹⁶¹ ⁷⁹⁷¹ ⁷⁹⁸¹ ⁷⁹⁹¹ ⁸⁰⁰¹ ⁸⁰¹¹ ⁸⁰²¹ ⁸⁰³¹ ⁸⁰⁴¹ ⁸⁰⁵¹ ⁸⁰⁶¹ ⁸⁰⁷¹ ⁸⁰⁸¹ ⁸⁰⁹¹ ⁸¹⁰¹ ⁸¹¹¹ ⁸¹²¹ ⁸¹³¹ ⁸¹⁴¹ ⁸¹⁵¹ ⁸¹⁶¹ ⁸¹⁷¹ ⁸¹⁸¹ ⁸¹⁹¹ ⁸²⁰¹ ⁸²¹¹ ⁸²²¹ ⁸²³¹ ⁸²⁴¹ ⁸²⁵¹ ⁸²⁶¹ ⁸²⁷¹ ⁸²⁸¹ ⁸²⁹¹ ⁸³⁰¹ ⁸³¹¹ ⁸³²¹ ⁸³³¹ ⁸³⁴¹ ⁸³⁵¹ ⁸³⁶¹ ⁸³⁷¹ ⁸³⁸¹ ⁸³⁹¹ ⁸⁴⁰¹ ⁸⁴¹¹ ⁸⁴²¹ ⁸⁴³¹ ⁸⁴⁴¹ ⁸⁴⁵¹ ⁸⁴⁶¹ ⁸⁴⁷¹ ⁸⁴⁸¹ ⁸⁴⁹¹ ⁸⁵⁰¹ ⁸⁵¹¹ ⁸⁵²¹ ⁸⁵³¹ ⁸⁵⁴¹ ⁸⁵⁵¹ ⁸⁵⁶¹ ⁸⁵⁷¹ ⁸⁵⁸¹ ⁸⁵⁹¹ ⁸⁶⁰¹ ⁸⁶¹¹ ⁸⁶²¹ ⁸⁶³¹ ⁸⁶⁴¹ ⁸⁶⁵¹ ⁸⁶⁶¹ ⁸⁶⁷¹ ⁸⁶⁸¹ ⁸⁶⁹¹ ⁸⁷⁰¹ ⁸⁷¹¹ ⁸⁷²¹ ⁸⁷³¹ ⁸⁷⁴¹ ⁸⁷⁵¹ ⁸⁷⁶¹ ⁸⁷⁷¹ ⁸⁷⁸¹ ⁸⁷⁹¹ ⁸⁸⁰¹ ⁸⁸¹¹ ⁸⁸²¹ ⁸⁸³¹ ⁸⁸⁴¹ ⁸⁸⁵¹ ⁸⁸⁶¹ ⁸⁸⁷¹ ⁸⁸⁸¹ ⁸⁸⁹¹ ⁸⁹⁰¹ ⁸⁹¹¹ ⁸⁹²¹ ⁸⁹³¹ ⁸⁹⁴¹ ⁸⁹⁵¹ ⁸⁹⁶¹ ⁸⁹⁷¹ ⁸⁹⁸¹ ⁸⁹⁹¹ ⁹⁰⁰¹ ⁹⁰¹¹ ⁹⁰²¹ ⁹⁰³¹ ⁹⁰⁴¹ ⁹⁰⁵¹ ⁹⁰⁶¹ ⁹⁰⁷¹ ⁹⁰⁸¹ ⁹⁰⁹¹ ⁹¹⁰¹ ⁹¹¹¹ ⁹¹²¹ ⁹¹³¹ ⁹¹⁴¹ ⁹¹⁵¹ ⁹¹⁶¹ ⁹¹⁷¹ ⁹¹⁸¹ ⁹¹⁹¹ ⁹²⁰¹ ⁹²¹¹ ⁹²²¹ ⁹²³¹ ⁹²⁴¹ ⁹²⁵¹ ⁹²⁶¹ ⁹²⁷¹ ⁹²⁸¹ ⁹²⁹¹ ⁹³⁰¹ ⁹³¹¹ ⁹³²¹ ⁹³³¹ ⁹³⁴¹ ⁹³⁵¹ ⁹³⁶¹ ⁹³⁷¹ ⁹³⁸¹ ⁹³⁹¹ ⁹⁴⁰¹ ⁹⁴¹¹ ⁹⁴²¹ ⁹⁴³¹ ⁹⁴⁴¹ ⁹⁴⁵¹ ⁹⁴⁶¹ ⁹⁴⁷¹ ⁹⁴⁸¹ ⁹⁴⁹¹ ⁹⁵⁰¹ ⁹⁵¹¹ ⁹⁵²¹ ⁹⁵³¹ ⁹⁵⁴¹ ⁹⁵⁵¹ ⁹⁵⁶¹ ⁹⁵⁷¹ ⁹⁵⁸¹ ⁹⁵⁹¹ ⁹⁶⁰¹ ⁹⁶¹¹ ⁹⁶²¹ ⁹⁶³¹ ⁹⁶⁴¹ ⁹⁶⁵¹ ⁹⁶⁶¹ ⁹⁶⁷¹ ⁹⁶⁸¹ ⁹⁶⁹¹ ⁹⁷⁰¹ ⁹⁷¹¹ ⁹⁷²¹ ⁹⁷³¹ ⁹⁷⁴¹ ⁹⁷⁵¹ ⁹⁷⁶¹ ⁹⁷⁷¹ ⁹⁷⁸¹ ⁹⁷⁹¹ ⁹⁸⁰¹ ⁹⁸¹¹ ⁹⁸²¹ ⁹⁸³¹ ⁹⁸⁴¹ ⁹⁸⁵¹ ⁹⁸⁶¹ ⁹⁸⁷¹ ⁹⁸⁸¹ ⁹⁸⁹¹ ⁹⁹⁰¹ ⁹⁹¹¹ ⁹⁹²¹ ⁹⁹³¹ ⁹⁹⁴¹ ⁹⁹⁵¹ ⁹⁹⁶¹ ⁹⁹⁷¹ ⁹⁹⁸¹ ⁹⁹⁹¹ ¹⁰⁰⁰¹ ¹⁰⁰¹¹ ¹⁰⁰²¹ ¹⁰⁰³¹ ¹⁰⁰⁴¹ ¹⁰⁰⁵¹ ¹⁰⁰⁶¹ ¹⁰⁰⁷¹ ¹⁰⁰⁸¹ ¹⁰⁰⁹¹ ¹⁰¹⁰¹ ¹⁰¹¹¹ ¹⁰¹²¹ ¹⁰¹³¹ ¹⁰¹⁴¹ ¹⁰¹⁵¹ ¹⁰¹⁶¹ ¹⁰¹⁷¹ ¹⁰¹⁸¹ ¹⁰¹⁹¹ ¹⁰²⁰¹ ¹⁰²¹¹ ¹⁰²²¹ ¹⁰²³¹ ¹⁰²⁴¹ ¹⁰²⁵¹ ¹⁰²⁶¹ ¹⁰²⁷¹ ¹⁰²⁸¹ ¹⁰²⁹¹ ¹⁰³⁰¹ ¹⁰³¹¹ ¹⁰³²¹ ¹⁰³³¹ ¹⁰³⁴¹ ¹⁰³⁵¹ ¹⁰³⁶¹ ¹⁰³⁷¹ ¹⁰³⁸¹ ¹⁰³⁹¹ ¹⁰⁴⁰¹ ¹⁰⁴¹¹ ¹⁰⁴²¹ ¹⁰⁴³¹ ¹⁰⁴⁴¹ ¹⁰⁴⁵¹ ¹⁰⁴⁶¹ ¹⁰⁴⁷¹ ¹⁰⁴⁸¹ ¹⁰⁴⁹¹ ¹⁰⁵⁰¹ ¹⁰⁵¹¹ ¹⁰⁵²¹ ¹⁰⁵³¹ ¹⁰⁵⁴¹ ¹⁰⁵⁵¹ ¹⁰⁵⁶¹ ¹⁰⁵⁷¹ ¹⁰⁵⁸¹ ¹⁰⁵⁹¹ ¹⁰⁶⁰¹ ¹⁰⁶¹¹ ¹⁰⁶²¹ ¹⁰⁶³¹ ¹⁰⁶⁴¹ ¹⁰⁶⁵¹ ¹⁰⁶⁶¹ ¹⁰⁶⁷¹ ¹⁰⁶⁸¹ ¹⁰⁶⁹¹ ¹⁰⁷⁰¹ ¹⁰⁷¹¹ ¹⁰⁷²¹ ¹⁰⁷³¹ ¹⁰⁷⁴¹ ¹⁰⁷⁵¹ ¹⁰⁷⁶¹ ¹⁰⁷⁷¹ ¹⁰⁷⁸¹ ¹⁰⁷⁹¹ ¹⁰⁸⁰¹ ¹⁰⁸¹¹ ¹⁰⁸²¹ ¹⁰⁸³¹ ¹⁰⁸⁴¹ ¹⁰⁸⁵¹ ¹⁰⁸⁶¹ ¹⁰⁸⁷¹ ¹⁰⁸⁸¹ ¹⁰⁸⁹¹ ¹⁰⁹⁰¹ ¹⁰⁹¹¹ ¹⁰⁹²¹ ¹⁰⁹³¹ ¹⁰⁹⁴¹ ¹⁰⁹⁵¹ ¹⁰⁹⁶¹ ¹⁰⁹⁷¹ ¹⁰⁹⁸¹ ¹⁰⁹⁹¹ ¹¹⁰⁰¹ ¹¹⁰¹¹ ¹¹⁰²¹ ¹¹⁰³¹ ¹¹⁰⁴¹ ¹¹⁰⁵¹ ¹¹⁰⁶¹ ¹¹⁰⁷¹ ¹¹⁰⁸¹ ¹¹⁰⁹¹ ¹¹¹⁰¹ ¹¹¹¹¹ ¹¹¹²¹ ¹¹¹³¹ ¹¹¹⁴¹ ¹¹¹⁵¹ ¹¹¹⁶¹ ¹¹¹⁷¹ ¹¹¹⁸¹ ¹¹¹⁹¹ ¹¹²⁰¹ ¹¹²¹¹ ¹¹²²¹ ¹¹²³¹ ¹¹²⁴¹ ¹¹²⁵¹ ¹¹²⁶¹ ¹¹²⁷¹ ¹¹²⁸¹ ¹¹²⁹¹ ¹¹³⁰¹ ¹¹³¹¹ ¹¹³²¹ ¹¹³³¹ ¹¹³⁴¹ ¹¹³⁵¹ ¹¹³⁶¹ ¹¹³⁷¹ ¹¹³⁸¹ ¹¹³⁹¹ ¹¹⁴⁰¹ ¹¹⁴¹¹ ¹¹⁴²¹ ¹¹⁴³¹ ¹¹⁴⁴¹ ¹¹⁴⁵¹ ¹¹⁴⁶¹ ¹¹⁴⁷¹ ¹¹⁴⁸¹ ¹¹⁴⁹¹ ¹¹⁵⁰¹ ¹¹⁵¹¹ ¹¹⁵²¹ ¹¹⁵³¹ ¹¹⁵⁴¹ ¹¹⁵⁵¹ ¹¹⁵⁶¹ ¹¹⁵⁷¹ ¹¹⁵⁸¹ ¹¹⁵⁹¹ ¹¹⁶⁰¹ ¹¹⁶¹¹ ¹¹⁶²¹ ¹¹⁶³¹ ¹¹⁶⁴¹ ¹¹⁶⁵¹ ¹¹⁶⁶¹ ¹¹⁶⁷¹ ¹¹⁶⁸¹ ¹¹⁶⁹¹ ¹¹⁷⁰¹ ¹¹⁷¹¹ ¹¹⁷²¹ ¹¹⁷³¹ ¹¹⁷⁴¹ ¹¹⁷⁵¹ ¹¹⁷⁶¹ ¹¹⁷⁷¹ ¹¹⁷⁸¹ ¹¹⁷⁹¹ ¹¹⁸⁰¹ ¹¹⁸¹¹ ¹¹⁸²¹ ¹¹⁸³¹ ¹¹⁸⁴¹ ¹¹⁸⁵¹ ¹¹⁸⁶¹ ¹¹⁸⁷¹ ¹¹⁸⁸¹ ¹¹⁸⁹¹ ¹¹⁹⁰¹ ¹¹⁹¹¹ ¹¹⁹²¹ ¹¹⁹³¹ ¹¹⁹⁴¹ ¹¹⁹⁵¹ ¹¹⁹⁶¹ ¹¹⁹⁷¹ ¹¹⁹⁸¹ ¹¹⁹⁹¹ ¹²⁰⁰¹ ¹²⁰¹¹ ¹²⁰²¹ ¹²⁰³¹ ¹²⁰⁴¹ ¹²⁰⁵¹ ¹²⁰⁶¹ ¹²⁰⁷¹ ¹²⁰⁸¹ ¹²⁰⁹¹ ¹²¹⁰¹ ¹²¹¹¹ ¹²¹²¹ ¹²¹³¹ ¹²¹⁴¹ ¹²¹⁵¹ ¹²¹⁶¹ ¹²¹⁷¹ ¹²¹⁸¹ ¹²¹⁹¹ ¹²²⁰¹ ¹²²¹¹ ¹²²²¹ ¹²²³¹ ¹²²⁴¹ ¹²²⁵¹


```

      63A      64A      65A      66A      67A      68A      69A      70A
TCCACGGAA TAGGAGATTATCCCAGGGTGCCTGTGTCCACAGGGCTGGTCTGGGTTCCTGTGCTCCC
|||||
|||||
|||||
CIAC |||||
      ||| ||A||||| | |
      ||||| ||A|||||
      ||||| ||A|||||
      ||||| ||A|||||
      ||||| ||| |||
      ||||| |||||
      ||||| |||||
      ||||| |||||

```

Figura 4 – cont. 7

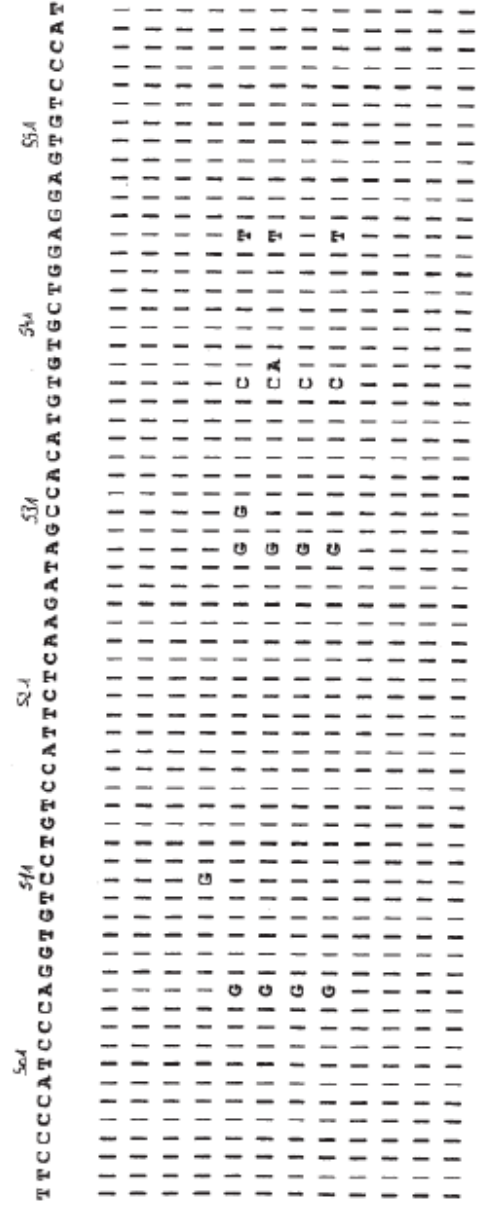


Figura 4 – cont. 8

564	574	584	sec. con núm. ident.
NACAGATGCNAAATGCCCTGAAATGTTCTTGACTCTTCCCTGACAG			
G	I	I	396
I	I	I	397
A	I	I	398
I	I	I	399
A	I	I	400
C	I	I	401
C	I	I	402
I	I	I	403
I	I	I	404
I	I	I	405
I	I	I	406
I	I	I	407

Figura 4 – cont. 9

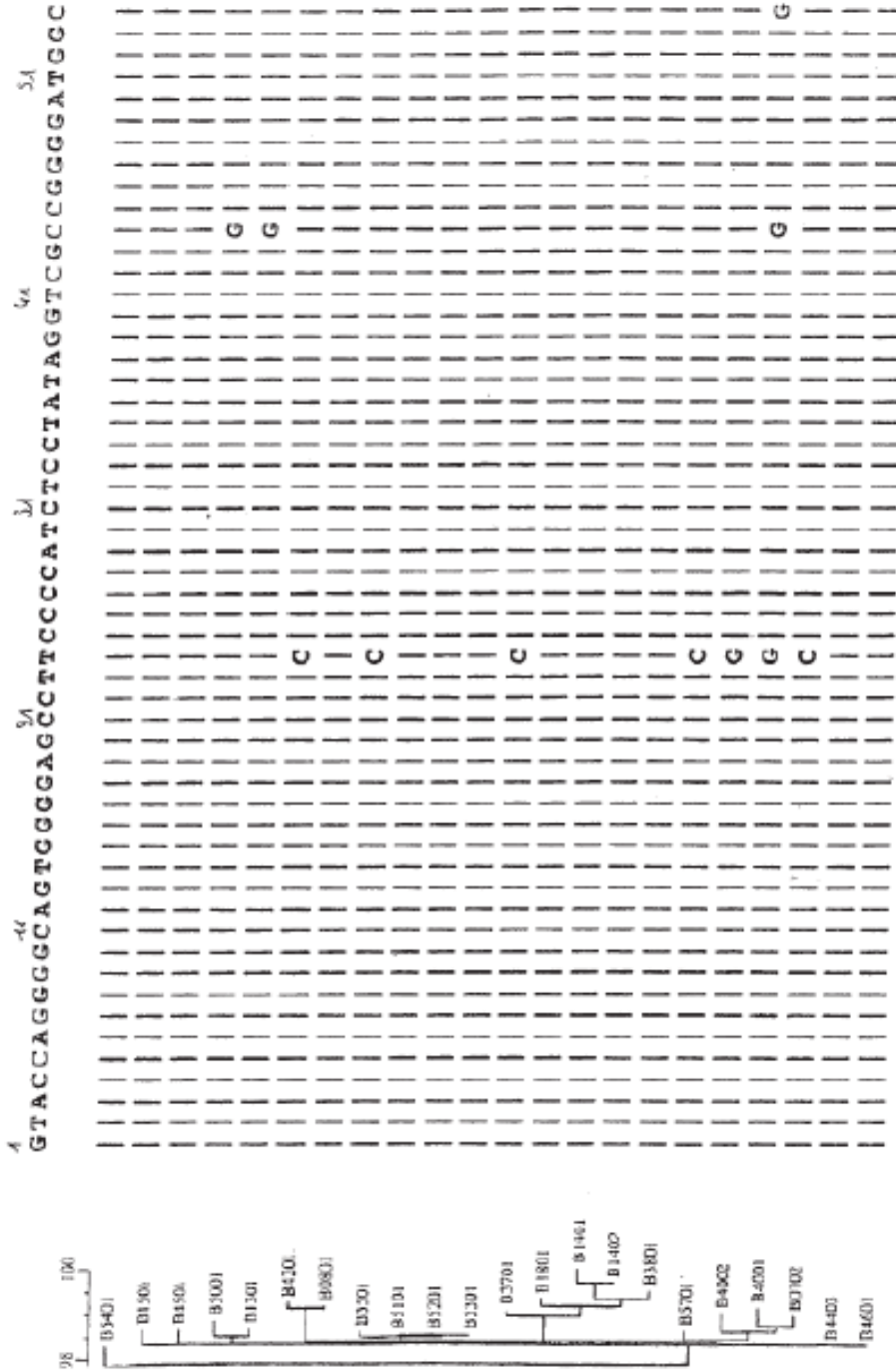


Figura 5

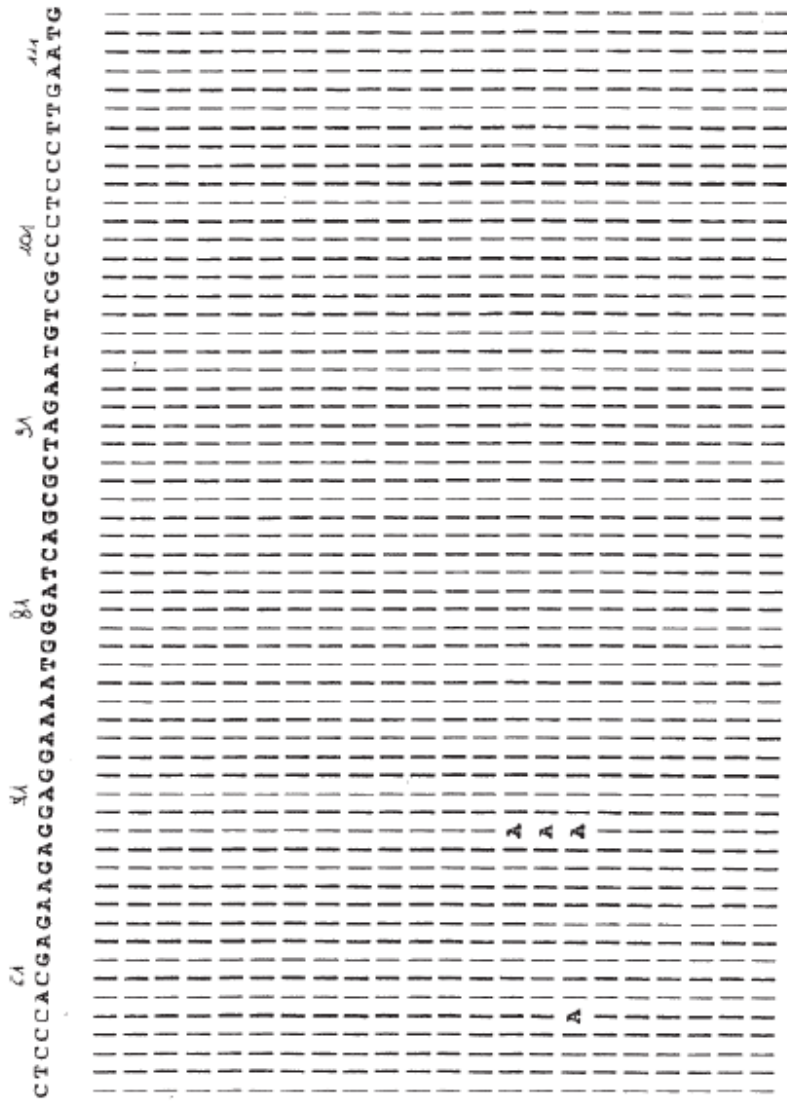


Figura 5 – cont. 1

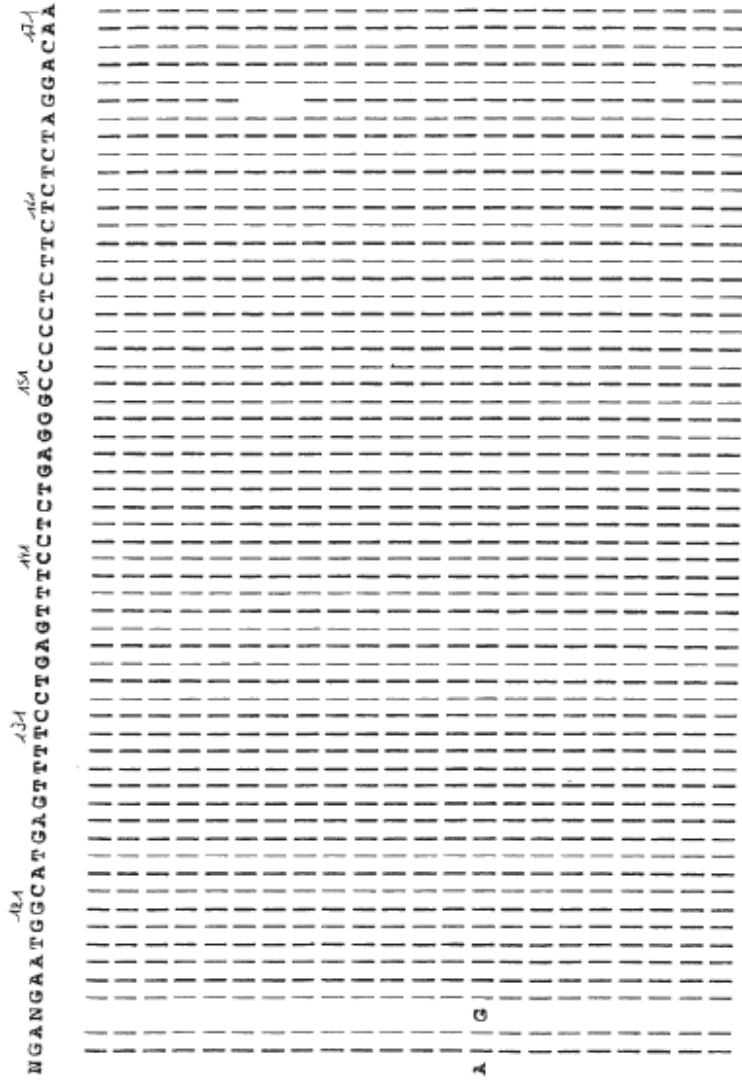


Figura 5 – cont. 2

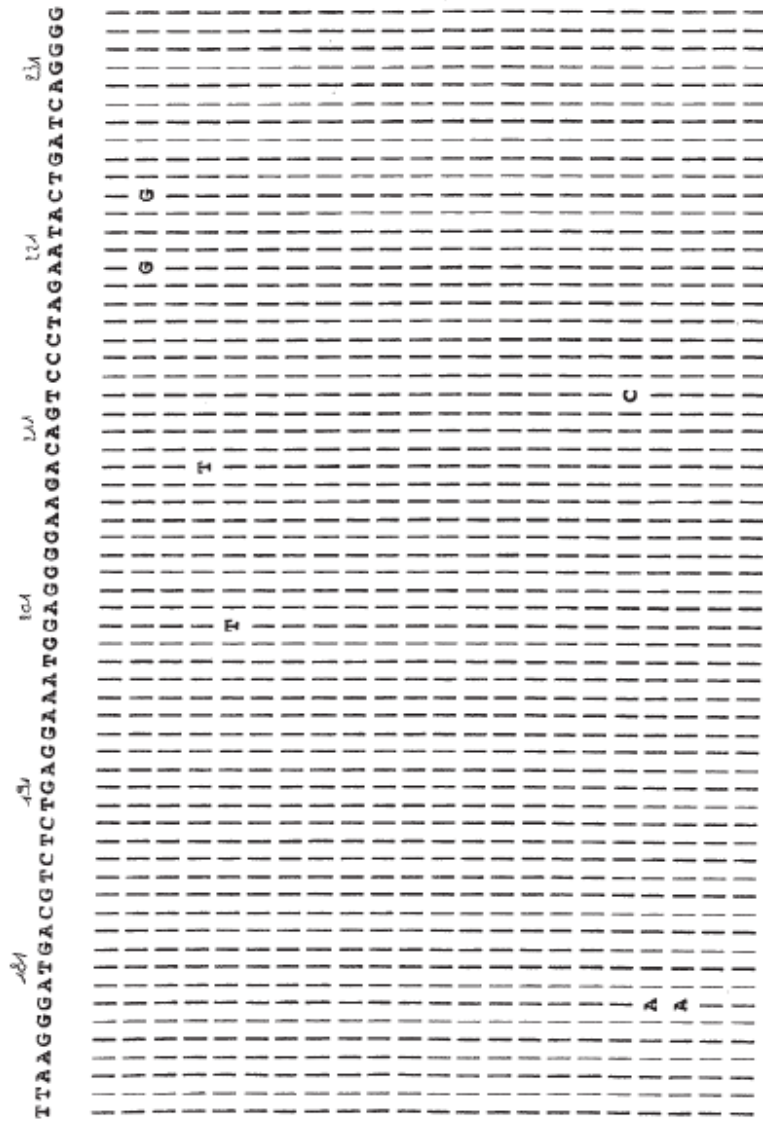


Figura 5 – cont. 3

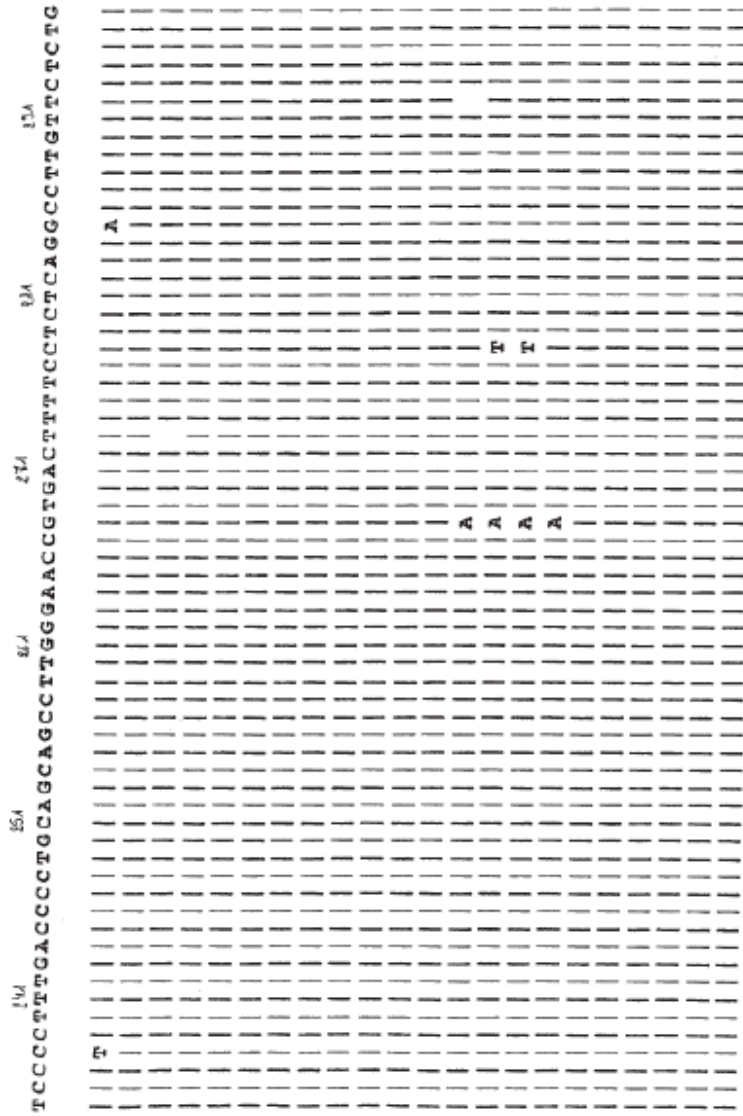


Figura 5 – cont. 4

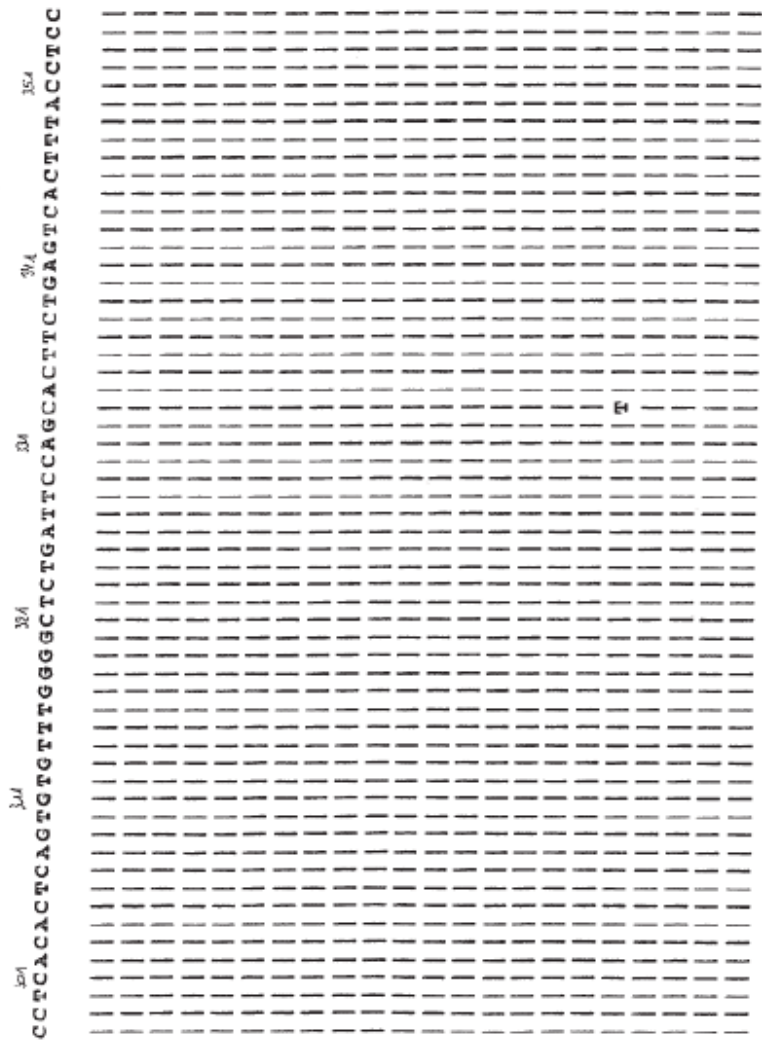


Figura 5 – cont. 5

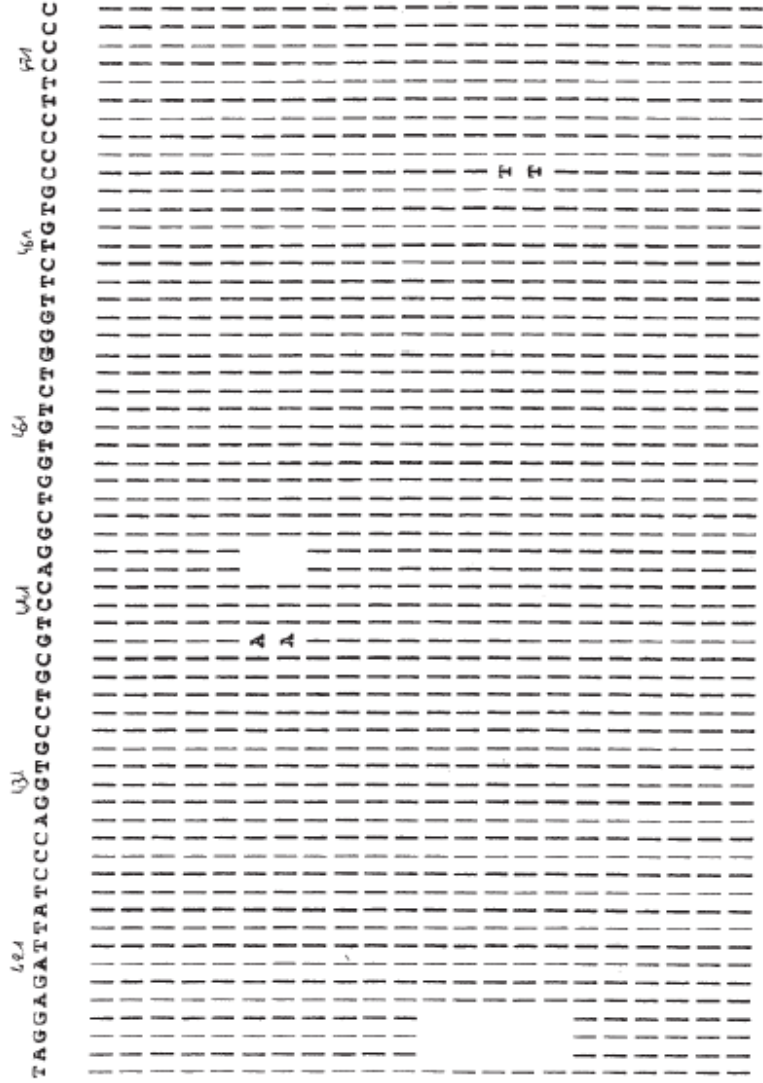


Figura 5 – cont. 7

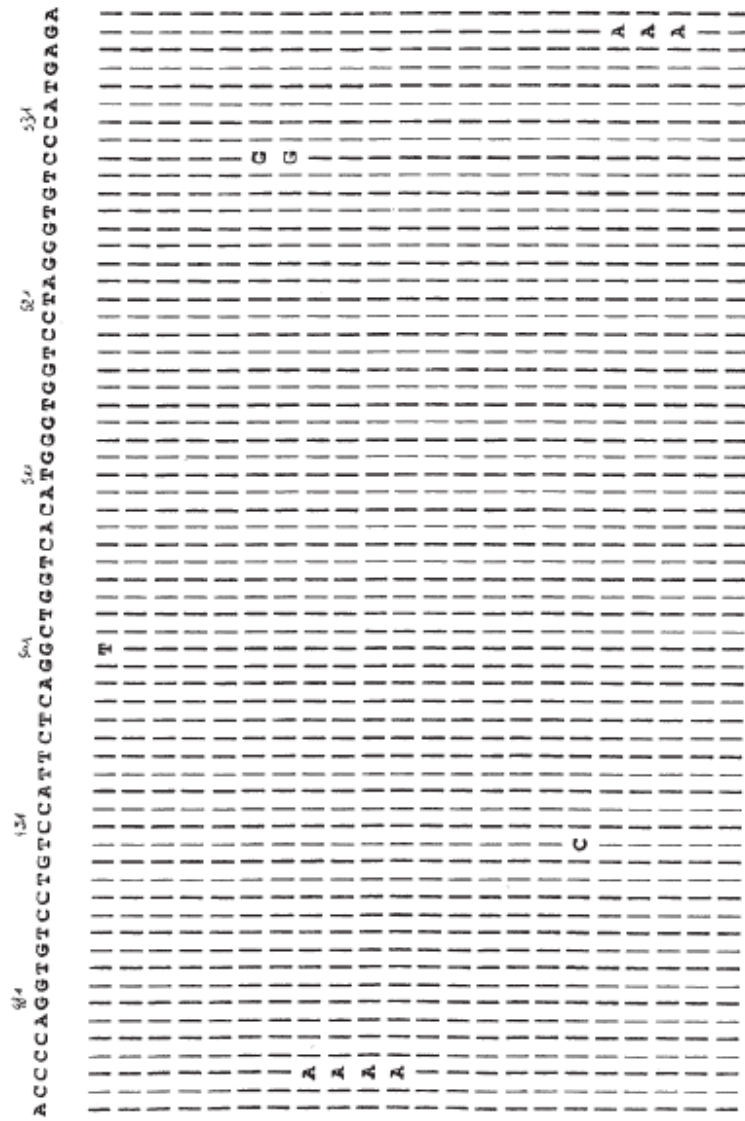


Figura 5 – cont. 8

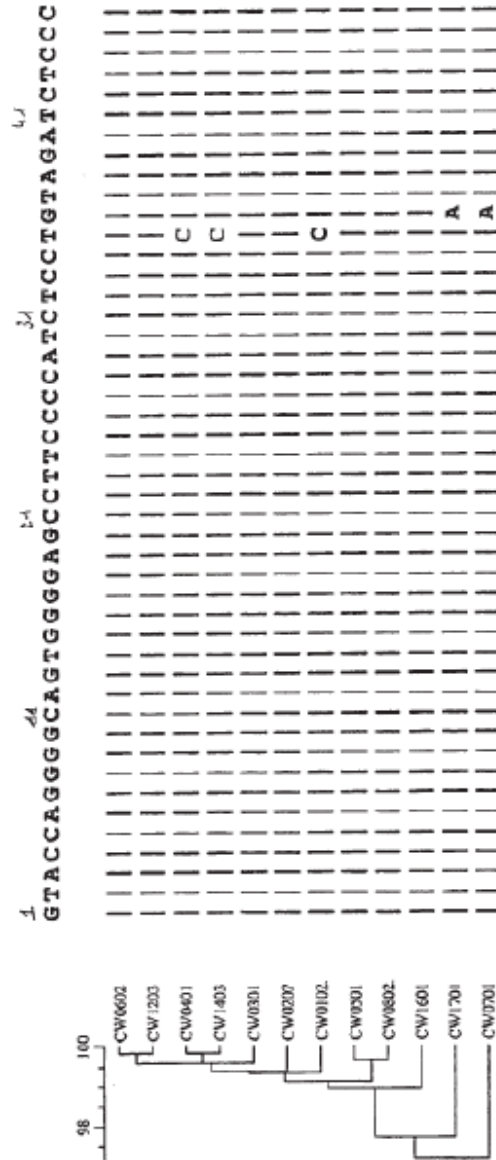


Figura 6

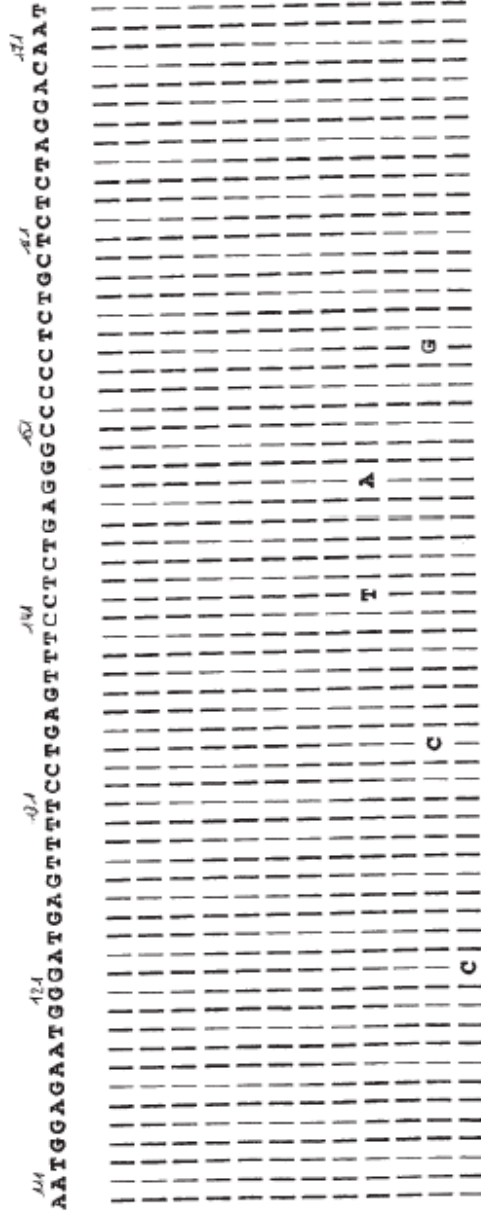


Figura 6 – cont. 2



Figura 6 – cont. 3

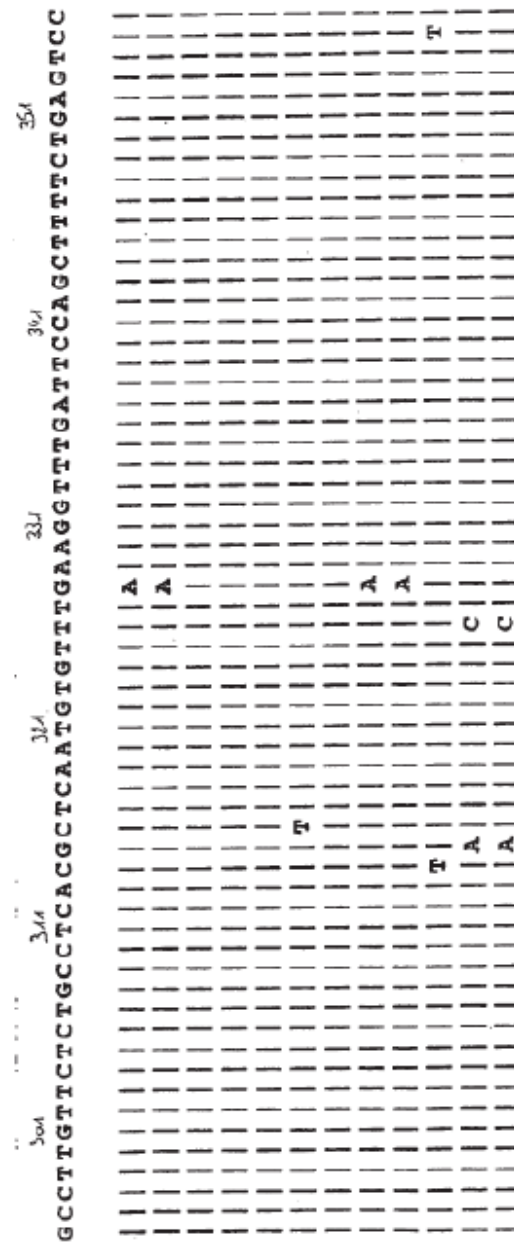


Figura 6 – cont. 5

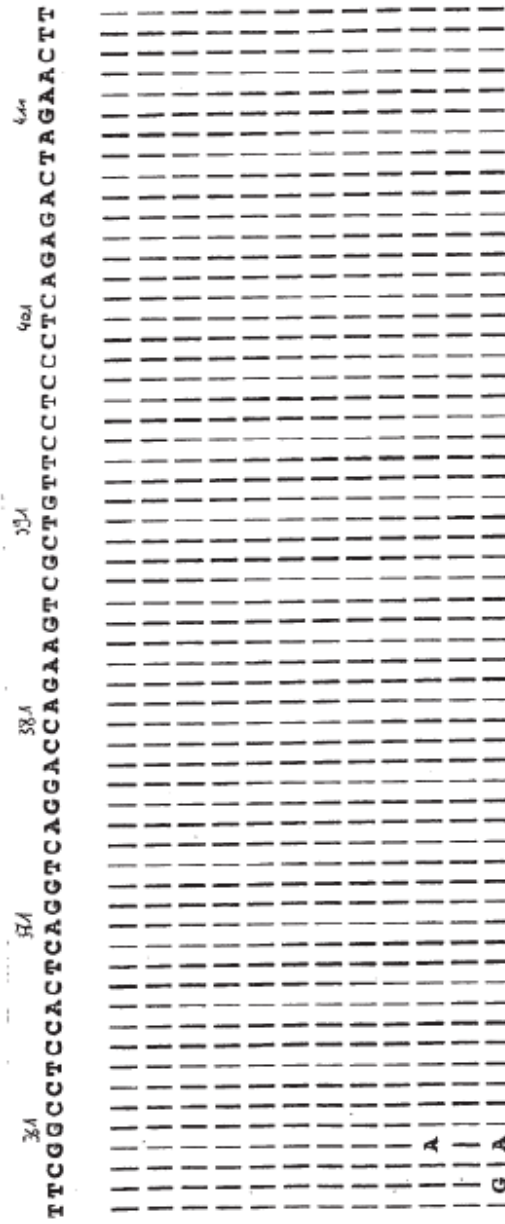


Figura 6 – cont. 6

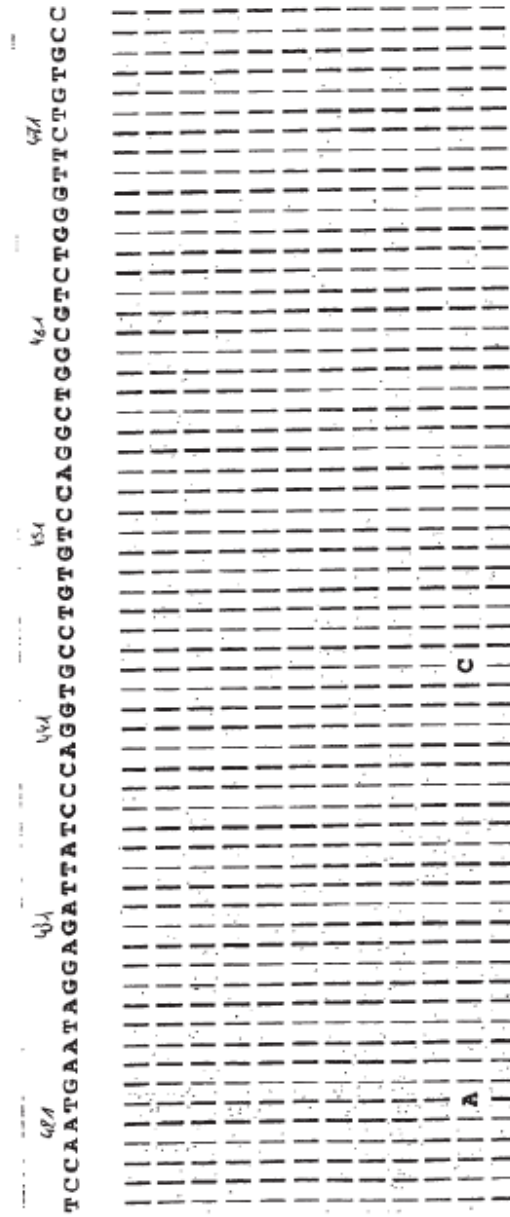


Figura 6 – cont. 7

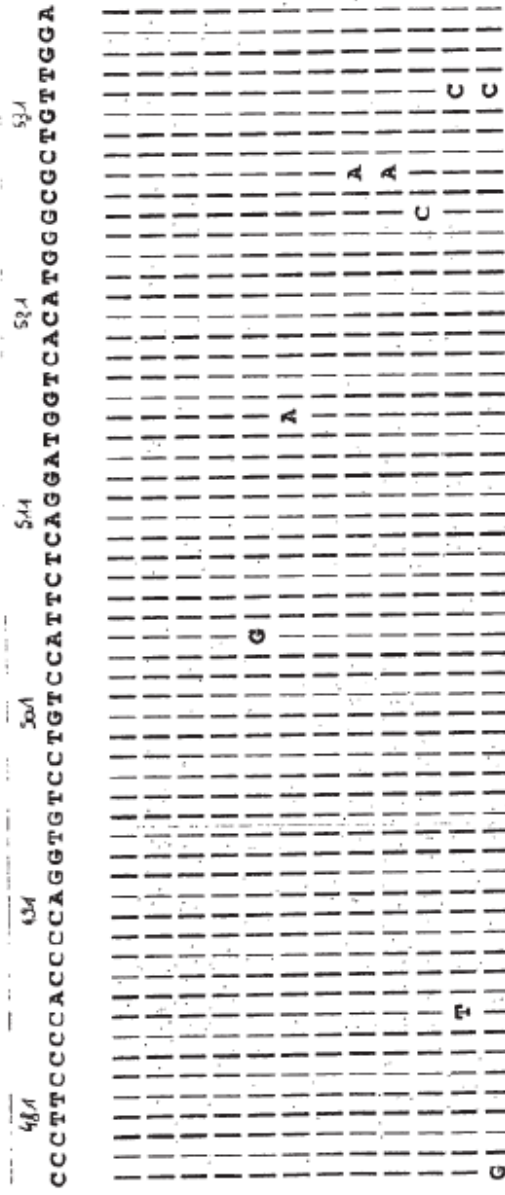


Figura 6 – cont. 8



Figura 7

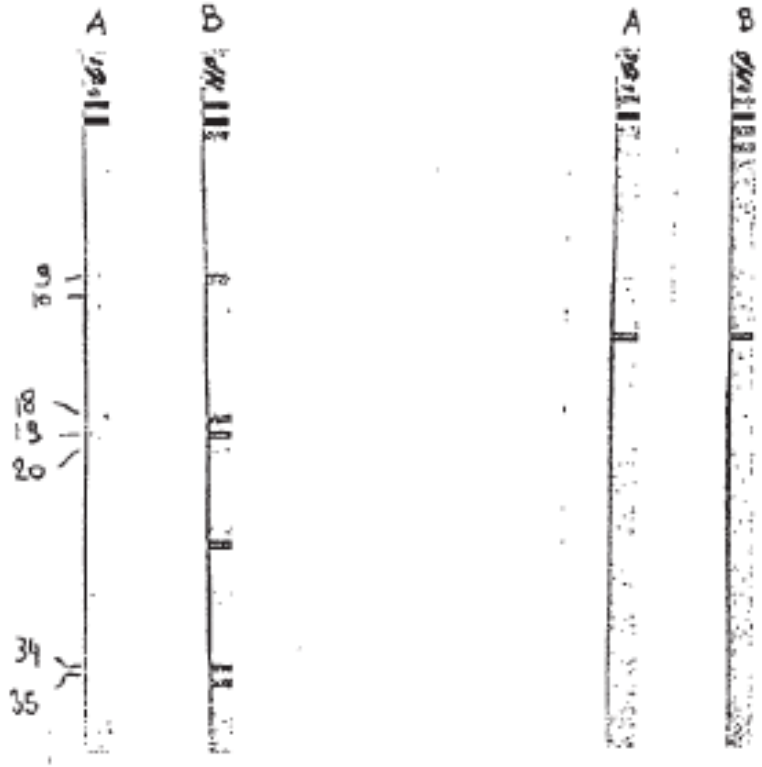


Figura 8