

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 842**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2005 E 05816073 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1805326**

54 Título: **Método de tipado de ácido nucleico para seleccionar donantes registrados para determinar la compatibilidad cruzada con receptores de transfusión**

30 Prioridad:

**22.10.2004 US 621196 P**

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

**01.04.2015**

73 Titular/es:

**BIOARRAY SOLUTIONS LTD (50.0%)  
35 Technology Drive  
Warren, NJ 07059, US y  
REID, MARION E. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SEUL, MICHAEL;  
HASHMI, GHAZALA;  
PIERCE, MICHAEL y  
REID, MARION E.**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 532 842 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 de tipado de ácido nucleico para seleccionar donantes registrados para determinar la compatibilidad cruzada con receptores de transfusión

5

### Antecedentes

La identificación de anticuerpos y la provisión de sangre negativa para antígenos forma la base para una transfusión sanguínea segura minimizando el riesgo de reacciones transfusionales adversas, desencadenadas cuando los anticuerpos que circulan en el torrente sanguíneo del paciente se encuentran con los antígenos presentados en los eritrocitos de un donante. La práctica actual en la medicina transfusional prevé el tipado serológico y el marcado de toda la sangre del donante para los antígenos ABO y RHD para facilitar la compatibilidad de los componentes de glóbulos rojos con el grupo sanguíneo del receptor. La reducción adicional de la aloinmunización sigue siendo un problema clínico importante, y por tanto sería sumamente deseable ser compatible con antígenos de grupos sanguíneos adicionales. Sin embargo, esta práctica queda descartada por la ausencia de antisueros apropiados y la complejidad de protocolos de tipado serológico que requieren mucha mano de obra, particularmente cuando se encuentran múltiples aloanticuerpos. Como resultado, la mayoría de los centros de donantes sólo seleccionan cohortes seleccionadas de donantes y mantienen un inventario limitado de unidades negativas para antígenos. Esta práctica puede introducir retrasos en el tratamiento y por tanto crear un gasto adicional significativo en el cuidado de los pacientes, y también puede agravar las situaciones de urgencia.

El tipado de ADN de donante exhaustivo de donantes, tal como se describió recientemente (véase Reid *et al.*, Transfusion, mayo de 2005) permitirá a los centros de donantes mantener un registro de posibles donantes, e inventarios grandes y diversos de productos sanguíneos completamente caracterizados disponibles para su envío instantáneo. Además, el análisis de genes de grupo sanguíneo a nivel de ADN proporciona una idea detallada de la diversidad alélica subyacente a la variabilidad fenotípica, un enfoque que ayuda a abordar problemas clínicos que no pueden abordarse mediante técnicas serológicas, tales como determinación de tipos de antígeno para los que los anticuerpos disponibles apenas son reactivos, el análisis de pacientes que han recibido recientemente una transfusión, o la identificación de fetos que corren el riesgo de sufrir enfermedad hemolítica del recién nacido. Aunque el genotipo puede no reflejar el fenotipo, un análisis de ADN identificará el que es potencialmente negativo para antígenos que, si se desea, puede confirmarse mediante hemaglutinación clásica. El tipado de ADN exhaustivo también puede extenderse a receptores y de hecho puede aplicarse a toda la población recurriendo a metodologías prácticas, preferiblemente eMAP™, realizada en una plataforma BeadChip™ (véase el documento US-2004/0002073 A1)

35

### Compatibilidad cruzada genética

Una compatibilidad, o casi compatibilidad, entre marcadores seleccionados identificados en un receptor, y en donantes candidatos de sangre transfundida (correspondiendo los marcadores a sitios polimórficos ubicados en genes que codifican para antígenos de grupo sanguíneo e incluyendo específicamente antígenos de grupo sanguíneo minoritario) minimizará generalmente el riesgo de inmunización del receptor y, en receptores inmunizados, el riesgo de reacciones inmunitarias adversas mediadas por aloanticuerpos tras transfusión. Es decir, si se selecciona el conjunto de marcadores para determinar mediante sonda los alelos relevantes asociados con reacciones hemolíticas a transfusión clínicamente significativas ("alorreacciones"), entonces una comparación de marcadores de receptor y donante permitirá la selección de donantes que son genéticamente compatibles con un receptor dado. Por ejemplo, cada uno de un conjunto de gemelos monocigóticos, genéticamente idénticos, sería el donante ideal para el otro. En el caso de transfusión, el requisito de identidad genética (o casi identidad) de receptor y donante candidato se limita a un conjunto de genes relevantes que, cuando se expresan, codifican para determinados antígenos eritrocitarios humanos (HEA) presentados en células portadas por la sangre frente a los que el receptor o bien ya ha producido (en base a una exposición anterior) anticuerpos ("aloanticuerpos") o puede producir anticuerpos. Por tanto, los marcadores que se correlacionan con antígenos eritrocitarios humanos (HEA) incluyen los antígenos "mayores" (A, B y Rh) así como varios antígenos "menores" clínicamente relevantes (por ejemplo, Duffy, Kell, Kidd, MNS, Dombrock y otros).

El beneficio de un procedimiento de compatibilidad cruzada genética de este tipo será minimizar o reducir no sólo el riesgo de reacciones inmunitarias adversas, sino también el riesgo de inmunizar receptores en primer lugar, eliminar la necesidad de y permitir la rápida selección de productos sanguíneos para transfusión de un grupo de donantes registrados y completamente caracterizados, denominado también en el presente documento registro de donantes. Una vez completamente implementada, implementada de manera genética, la compatibilidad cruzada genética eliminará el cuello de botella limitante creado por el coste creciente de los reactivos serológicos y los protocolos complejos y que requieren mucha mano de obra así como la necesidad de repetir pruebas.

### Sumario

Se dan a conocer un método y un algoritmo para la compatibilidad cruzada genética basándose en la comparación de genotipos de receptor y donante (y las combinaciones subyacentes de alelos y haplotipos). Preferiblemente, tal

como se ha descrito, en una solicitud en tramitación junto con la presente, titulada "Multiplexed Analysis of Polymorphic Loci by Concurrent Interrogation and Enzyme-Mediated Detection", presentada el 10/15/2002, documento US 2004/0002073 A1, los genotipos se determinan en una única prueba ("multiplexada") para permitir un tipado rápido y a gran escala. El método de la invención, en vez de centrarse en la predicción del fenotipo tal como se recomienda en los procedimientos convencionales, se basa en su lugar en una comparación de variantes genéticas identificadas en el receptor y los donantes disponibles, cuya información se compilará preferiblemente en un registro de donantes ampliamente disponible, para maximizar la compatibilidad molecular. El uso, por ejemplo, de un formato BeadChip™ tal como se da a conocer en el presente documento, para permitir, a un coste razonable, el genotipado exhaustivo a gran escala de antígenos de transfusión clínicamente relevantes, realizado preferiblemente en un contexto de examen neonatal, permitiría que el genotipo de antígeno de transfusión ("TAG") (e información genética relacionada) pasara a formar parte de informes médicos individuales que podrían almacenarse en un formato fácilmente accesible tal como chips implantables, u otras etiquetas electrónicas portadas, por ejemplo, en pulseras.

### 15 Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B ilustran el uso de múltiples sondas codificadas para resolver la ambigüedad a través de determinación de fase.

### 20 Descripción detallada

Para los presentes propósitos, se define un genotipo como una sucesión de marcadores en sitios polimórficos seleccionados (también denominados en el presente documento alelos); es decir, valores que proporcionan la configuración de marcadores de ácido nucleico diana ubicados dentro de uno o más genes de interés. Preferiblemente, cada sitio designado se estudia con un par de sondas de elongación de las que una está diseñada para detectar el alelo normal (N), la otra para detectar un alelo variante (V) específico, en condiciones que garantizan que se produce la elongación de sonda catalizada por polimerasa para sondas apareadas, es decir las apareadas con el alelo en el extremo 3'-terminal, pero no para las sondas con apareamiento erróneo. El patrón de intensidades de señal de ensayo que representa el rendimiento de reacciones de elongación de sonda individuales según este formato eMAP™ (véase el documento US 2004/0002073 A1, citado anteriormente), se convierte en un patrón de reacción diferenciado, mediante la aplicación de umbrales preestablecidos, a razones (u otras combinaciones) de intensidades de señal de ensayo asociadas con sondas dentro de un par de sondas dirigidas contra cada marcador.

Entonces, un genotipo se representa mediante una sucesión,  $G = \{(NV)_{ik}\}$  en la que  $i$  enumera los genes en el conjunto de genes de interés seleccionados, y  $k$  enumera sitios polimórficos designados dentro del gen  $i$ -ésimo, y en el que el par (NV) puede asumir valores de AA, AB (o BA) y BB. En una realización preferida, las intensidades de señal asociadas con un par de sondas dirigidas hacia el mismo marcador, preferiblemente corregidas eliminando contribuciones no específicas ("de fondo"), y una intensidad de este tipo,  $i_N$ , que representa la cantidad de alelo normal, y la otra intensidad de este tipo,  $i_V$ , que representa la cantidad de alelo variante en la muestra, se combinan para formar el parámetro de discriminación  $\Delta = (i_N - i_V)/(i_N + i_V)$ , una cantidad que varía entre -1 y 1. Para una muestra dada, un valor de  $\Delta$  por debajo de un umbral inferior preestablecido indica una denominación de homocigótico normal, un valor de  $\Delta$  por encima de un umbral superior preestablecido indica una denominación de homocigótico variante, y un valor de  $\Delta$  por encima del umbral inferior y por debajo del umbral superior indica una denominación de heterocigótico. Un genotipo de antígeno de transfusión está representado por una sucesión,  $G = \{\Delta_{ik}\}$ , en la que, como anteriormente,  $i$  enumera los genes en el conjunto de genes de interés seleccionados, y  $k$  enumera marcadores polimórficos designados dentro del gen  $i$ -ésimo. Por consiguiente, un genotipo de antígeno de transfusión se designa en el presente documento o bien con la representación AA, AB (o BA) y BB o bien, de manera equivalente, con la representación 1, 0, -1.

*Asignación de alelos: descomposición del genotipo en haplotipos* – Los determinantes antigénicos expresados reflejan las combinaciones alélicas específicas de los genes codificantes. Un genotipo representa generalmente una combinación de dos secuencias de haplotipos constituyentes, denominadas en este caso H1 y H2, cada una en forma de una sucesión ternaria de modo que H1 OR H2 genera el genotipo. Todas las combinaciones de 2 sucesiones compatibles se determinan en un proceso denominado también en el presente documento asignación de alelos o análisis de alelos automatizado ("AAA"), realizado preferiblemente de manera automática, usando un programa tal como el programa AAA para análisis de alelos automatizado, elaborado en la solicitud en tramitación junto con la presente, titulada: "Automated Analysis of Multiplexed Probe Target Interaction Patterns: Pattern Matching and Allele Identification", presentada el 8/2/2004, documento US-7.848.889 B2.

Esta solicitud también da a conocer un método de "corrección de errores" en el que un patrón de reacción (de sondas-dianas) generado a partir de un ensayo se compara, dígito a dígito, con los posibles patrones de reacción, es decir, sucesiones que representan combinaciones de 2 alelos de alelos conocidos; una lista de tales sucesiones de referencia se denomina también en el presente documento tabla de resultados positivos. Para los dígitos que no coinciden, la corrección de errores es por medio del cambio de dígitos individuales en la sucesión según se

considere necesario con el fin de producir una coincidencia con una sucesión de referencia válida (generada a partir de combinaciones de alelos conocidas).

5 Varias combinaciones de alelos o haplotipos pueden ser generalmente compatibles con un único genotipo, tal como se ilustra en un ejemplo más adelante, y este asunto se aborda en el presente documento mediante la aplicación de la metodología de “determinación de fase” dada a conocer anteriormente en el documento US-2004/0002073 A1, citado anteriormente.

10 *Registro de donantes* – Asumiendo, sin pérdida de la generalidad, la aplicación de la realización preferida de determinación del genotipo mediante múltiplex, se determinan genotipos de posibles donantes según el formato eMAP. En una realización preferida, el genotipo, y el conjunto de combinaciones de alelos o haplotipos constituyentes, se almacenan en forma de una lista de registros, en un formato de base de datos apropiado, tal como MicroSoft Access o SQL, tal como sigue:

15  $\{G = \{(N,V)_{ik}; \{Combinaciones\ de\ haplotipos\}; 1 \leq i \leq \Gamma; 1 \leq k \leq M(i); p\}, o$

$\{G = \{\Delta_{ik}; \{Combinaciones\ de\ haplotipos\}; 1 \leq i \leq \Gamma; 1 \leq k \leq M(i); p\},$

20 donde  $\Gamma$  indica el número de genes seleccionados, tales como los que codifican para antígenos de grupo sanguíneo,  $M(i)$  indica el número de marcadores en el gen  $i$ -ésimo y  $p$  indica la dirección (“puntero”) asociada con una ubicación de memoria, por ejemplo en una base de datos tal como un inventario, que contiene una lista de donantes de un genotipo dado. Dentro del inventario, los donantes compatibles pueden clasificarse mediante criterios adicionales tal como fecha de recogida de la muestra, lo completo que se haya caracterizado (por ejemplo, conocimiento de tipos de antígenos adicionales tales como HLA o HPA), edad, género, etc.

25 *Selección de sitios polimórficos designados y tabla de pesos asociados* – Un apareamiento erróneo entre alelos o haplotipos de paciente y de donante puede conducir a inmunización, o a reacciones inmunitarias adversas de diferente gravedad, mediadas por anticuerpos que circulan dentro del suero del paciente que reconocen epítomos expresados que se codifican por alelos de marcador de donante (o determinantes antigénicos). Para representar este grado de significación, la invención introduce un conjunto de pesos numéricos,  $w_{ik}$ , asociados con el marcador designado como  $k$ -ésimo en el gen  $i$ -ésimo de interés. La magnitud relativa de estos pesos refleja la gravedad de reacciones transfusionales conocidas o anticipadas asociadas con un apareamiento erróneo en el sitio correspondiente, y la alorreacción/las alorreacciones asociada(s) con un apareamiento erróneo de los fenotipos correspondientes. Tal como se ilustra en las tablas 1 y 2, los pesos pueden elegirse para que reflejen medidas empíricas de significación clínica tal como NINGUNA (0), LEVE (1), DE LEVE A SEVERA (3), SEVERA (5). Mutaciones de silenciamiento que producen un fenotipo nulo en el donante potenciarán generalmente la compatibilidad dada la ausencia del antígeno correspondiente. Si se han identificado aloanticuerpos, al antígeno relacionado correspondiente y a los marcadores asociados se les proporciona un peso elevado, lo que refleja la significación clínica del anticuerpo, tal como se muestra en la tabla 4.

40 *Compatibilidad de alelos de receptor y donante genotípicamente idénticos: Dombrock*

45 Este ejemplo usa tres marcadores en el sistema Dombrock, asociados con  $Do^a/Do^b$ , concretamente:  $M_1$  (378 C > T);  $M_2$  (624 T > C);  $M_3$  (793 A > G) para ilustrar la compatibilidad de un receptor y un posible donante genotípicamente idénticos.

50 Un patrón de reacción que representa la interacción de un conjunto de pares de sondas y diana (en el que una sonda en un par puede indicar la presencia de un alelo “normal”, y la otra sonda en el par indica la presencia de un alelo “variante”) puede generarse usando, por ejemplo, el formato de ensayo eMAP con un conjunto de pares de sondas que pueden aparearse con genes Dombrock (o amplicones o dianas derivados de genes Dombrock mediante aplicación por PCR o de otro modo). Para los tres marcadores seleccionados, un posible patrón de reacción es: AB AB AB, es decir, un patrón de reacción: 0, 0, 0. En un genoma diploide, un patrón de reacción particular corresponde a una combinación de al menos dos alelos. Por tanto, este patrón de reacción se descompone en primer lugar en los patrones representados por combinaciones de alelos, en este caso cualquiera de los siguientes (véase la tabla 4):

55 AB AB AB = AAA OR BBB; es decir DoA o DoB

alternativamente:

60 AB BA AB = AB BA BA = ABB OR BAA; es decir Hy o Jo

65 donde “A” designa un alelo normal y “B” designa el variante. A continuación, se construye una “matriz de apareamiento erróneo” que indica, mediante la aplicación de pesos, la gravedad de los desenlaces clínicos adversos que resultan de un apareamiento erróneo. En el presente caso:

	AAA	BBB	BAA	ABB
AAA	0	w <sub>3</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>2</sub> +w <sub>3</sub>
BBB		0	w <sub>2</sub> +w <sub>3</sub>	w <sub>2</sub>
BAA			0	w <sub>3</sub>
ABB				0

aplicándose una ponderación a un apareamiento erróneo en el alelo (del gen de interés, en ese caso Dombrock). Estos pesos, preferiblemente en una tabla de consulta separada, pueden ser, w<sub>1</sub> =1, w<sub>2</sub> = 5, w<sub>3</sub> = 5 (u otros valores preestablecidos, que se notifican mediante conocimiento empírico relativo a la significación clínica).

*Resolución de ambigüedades alélicas mediante “determinación de fase”*

Múltiples combinaciones bialélicas pueden ser compatibles con un genotipo específico determinado sobre un conjunto de marcadores seleccionados. La compatibilidad de un receptor con un genotipo conocido, G<sub>R</sub>, con un donante compatible del mismo genotipo requiere la compatibilidad del conjunto de alelos (o haplotipos) subyacente real. Éstos pueden establecerse mediante la siguiente estrategia de determinación de fase que establece correlaciones de dos puntos (véase también la publicación estadounidense n.º 2004/0002073 A1). La estrategia implica examinar mediante sondas productos de elongación presentados en perlas usando sondas de hibridación etiquetadas, o bien de una en una (en múltiples rondas de apareamiento y desapareamiento) o en un proceso paralelo, que implica preferiblemente múltiples colores de detección, no estando, preferiblemente en tal caso, etiquetado el propio producto de elongación.

Esto se ilustra en las figuras 1A y 1B, en las que los marcadores M1, M2 y M3 (con sitios polimórficos que pueden ser C, T o A, respectivamente, como en el primero alelo (correspondiente a DoA), o C, C, G, respectivamente, como en el segundo alelo (correspondiente a Hy), u otros nucleótidos) se estudian usando sondas etiquetadas. Se usan sondas extensibles etiquetadas de diferente manera para la detección de un primer alelo, teniendo la sonda “1N” (dirigida hacia el marcador M1) un nucleótido “G” en el extremo 3'-terminal, teniendo la sonda “1V” (dirigida también hacia el marcador M1) un nucleótido “A” en el extremo 3'-terminal, teniendo la sonda “2N” (dirigida hacia el marcador M2) un nucleótido “A” nucleótido en el extremo 3'-terminal, teniendo la sonda “2V” (dirigida también hacia el marcador M2) un nucleótido “G” en el extremo 3'-terminal. Dependiendo de las combinaciones de marcadores M1, M2 y M3, se elongan diferentes combinaciones de las sondas, generando diferentes patrones de intensidad de señal a medida que los productos de interacción interaccionan con sondas etiquetadas, tal como se muestra en las figuras 1A y 1B. Por tanto, si se encuentra DoA (figura 1A), la sonda 1N se elonga y se tiñe mediante el apareamiento de una sonda fluorescente al producto de elongación en la posición de marcador M2; a la inversa, si se encuentra Hy (figura 1B), la sonda 2V se elonga y se tiñe mediante el apareamiento de una sonda fluorescente al producto de elongación en la posición de marcador M3. El patrón de intensidad de señal producido por la adición de sondas fluorescentes (dirigidas hacia los marcadores M2 y/o M3, tal como se muestra) o bien identifica DoA y por tanto DoA OR DoB como la combinación representada por el patrón de reacción 0, 0, 0, o bien identifica Hy y por tanto Hy OR Jo como la combinación representada por el patrón de reacción 0,0,0. Es decir, la determinación de fase resuelve la ambigüedad.

*Compatibilidad cruzada genética: distancia entre haplotipos* – Dado un genotipo de receptor, preferiblemente en la representación que representa al menos una sucesión de genotipos de donante disponibles (de uno o más donantes de genotipo idéntico al del receptor), se identifican mediante la coincidencia de (sucesión de) haplotipos. En este caso, el haplotipo de receptor comprende preferiblemente al menos el conjunto de alelos de marcador representados en el haplotipo correspondiente de donantes disponibles. En una realización, cada una de las sucesiones, H<sub>2</sub>, H<sub>R</sub> se compara con el conjunto de sucesiones, {H}, en una base de datos de donantes, y las coincidencias se clasifican en el orden de una distancia de Hamming ponderada creciente, en la que los pesos están preestablecidos para reflejar la gravedad clínica, tal como se comenta en relación con el análisis de la matriz de apareamiento erróneo. Por ejemplo, asumiendo que hay M alelos apareados erróneamente, una posible función de distancia es:  $\Pi^2 = (1/M) \sum_{alelos\ apareados\ erróneamente} W^2$

*Implementación* – Preferiblemente se usan un programa informático que implementa un algoritmo de compatibilidad de sucesiones para realizar la compatibilidad cruzada genética automáticamente, para listar los donantes disponibles en el orden de  $\Pi^2$  creciente (o función de distancia equivalente) hasta una distancia máxima entre las sucesiones de paciente y donador.

El pseudocódigo a continuación resume el algoritmo de compatibilidad de sucesiones (los términos “alelo” y “haplotipo” se usan de manera intercambiable). Para optimizar la velocidad de ejecución en el manejo de grandes bases de datos de interés, la implementación, tal como aquélla en wAAA™ (documento US-7.848.889 B2, citado anteriormente), emplea estructuras de datos adecuadas y recurre a aritmética de números enteros.

```

SelectCompatibleDonors(DonorRegistry, RecipientHaplotypes);
{
    AssignAlleles(RecipientHaplotypes, DonorHaplotypes);
}

```

```

AssignAlleles AlleleArray1, AlleleArray2, ReactionStr, hitTable);
{

```

```

    /*
    ** para cada alelo en la tabla de resultados positivos, determinar el
    ** apareamiento erróneo con el patrón de reacción de interés, Allele0
    ** es la primera entrada de alelo en la tabla de resultados positivos,
    ** AlleleN es la última entrada de alelo en la tabla de resultados positivos
    */

    minMismatch = 30;

    /* iniciar en un número mayor
    */

    FOR (A1=Allele0; A1≤AlleleN; A1++)
    {
        A1Hit = getHitStr(A1, hitTable); /* recuperar de la tabla de
                                         resultados positivos la sucesión
                                         que representa el alelo A1 */

        FOR(A2=A1; A2≤AlleleN; A2++)
        {

```

```

    A2Hit = getHitStr(A2, hitTable);

    combStr = OR(A1Hit, A2Hit);    /* construir combinación
                                   de alelos aplicando la
                                   operación OR */

    /*
    ** evaluar el grado de apareamiento erróneo entre hitStr y reactionStr;
    ** acelerar: si el apareamiento erróneo supera minMismatch + 2,
    ** salir del bucle
    */

    nMismatch = Compare(combStr, reactionStr, minMismatch);

    if(nMismatch < minMismatch)
    {
        minMismatch = nMismatch;
        /*eliminar resultado antiguo */
        clearResult(AlleleArray1, AlleleArray2);
    }
        /*guardar resultado nuevo */
        writeResult (A1, A2, AlleleArray1, AlleleArray2);
    }
}

/*
** resultado tras el proceso:
** contar número de dígitos cambiados, hacer una designación de
grupo, clasificar asignaciones de candidatos, etc.
*/

PostProcessAlleleResult(AlleleArray1, AlleleArray2);
}

/* Compatibilidad cruzada genética */
main()
{

    /*
    ** Generar patrón de reacción digitalizando un patrón de interacción
    ** experimental que comprende alelos de marcadores seleccionados
    */

    ReactionPattern = GenerateRecipientGenotype(ExpIntPattern, Thresholds);

```

```

/*
** Asignar haplotipos calculando todas las combinaciones bialélicas de
** alelos posibles o conocidos; los patrones de reacción de tales alelos con
** las sondas en el conjunto seleccionado se guardan ** en una HitTable;
** devolver un puntero a una lista de todos los alelos o haplotipos
** compatibles
*/
AssignAlleles(AlleleArray1, AlleleArray2, ReactionStr, HitTable);

```

```

/*
** Aplicar coincidencia de sucesiones (opcionalmente con función de
** distancia ponderada) para seleccionar ** todos los donantes compatibles
*/
SelectCompatibleDonors(DonorRegistry, RecipientHaplotypes);

```

}

Tabla 1. Composición de panel de HEA que muestra grupos sanguíneos y SNP asociados

Grupo sanguíneo	Fenotipo	Polimorfismo
Colton	Co <sup>a</sup> /Co <sup>b</sup>	134C>T
Diego	Di <sup>b</sup> /Di <sup>a</sup>	2561C>T
Duffy	Fy <sup>a</sup> /Fy <sup>b</sup>	125G>A
	Fy <sup>x</sup> [Fy(b+ <sup>w</sup> )]	265C>T
	GATA (Fy(a-b-))	-33T>C
Dombrock	Do <sup>a</sup> /Do <sup>b</sup>	378C>T
		624T>C
		793A>G
	Hy+/Hy-	323G>T
	Jo(a+)/Jo(a-)	350C>T
Kidd	Jk <sup>a</sup> /Jk <sup>b</sup>	838G>A
Kell	K/k	698T>C
Landsteiner-Wiener	LW <sup>a</sup> /LW <sup>b</sup>	308A>G
Lutheran	Lu <sup>a</sup> /Lu <sup>b</sup>	230A>G
MNS	GYPA (M/N)	59C>T
	GYPB (S/s)	143T>C
Scianna	Sc1/Sc2	169G>A
Rh	S68N (C/c)	203 A>G
Rh	A226P (E/e)	676 G>C
Hemoglobina S	HbS	173A>T

5 Tabla 2. Composición de panel de Rh que muestra cambio de AA y SNP asociados

Exón	Cambio de aminoácido	Polimorfismo
1	W16C	48 G>C
2	L60I	178 C>A
2	S68N	203 A>G
2	P103S	307 C>T
3	N152T	455 A>C
4		37 pb dup.-ins.*
5	F223V	667 T>G
5	A226P	676 G>C
5	E233Q	697 G>C
5	L245V	733 G>C
7	G336C	1006 G>T

\* conocido como "pseudoD"

En la lista de secuencias adjunta, para los diversos exones 1, 2, 3, 5 ó 7, la secuencia de cebador del cebador directo y/o inverso (según se indique) se indica con una marca de "visto" en la lista de secuencias, y la secuencia del otro cebador en el conjunto (directo o inverso, según sea aplicable) se muestra en la tabla 3, tal como sigue:

TABLA 3

Exón 1: cebador inverso: Rh CE 5' GCT ATT TGC TCC TTT GAC CAC 3' (SEQ ID NO.:1)  
 Exón 2: cebador directo RhD: TCT CCC CAC AGA GCA GTT (SEQ ID NO.:2)  
 Exón 3: cebador inverso Rh CE: CCT CAA GTG ATC TGC CTT CCT CAG (SEQ ID NO.:3)  
 Exón 5: cebador inverso Rh CE: TGC TCA CCA TTC TGA TCT TCC T (SEQ ID NO.:4)  
 Exón 7: cebador inverso Rh CE: CAT CTC CGT CAG GCA CTC CAT (SEQ ID NO.:5)

5 También pueden someterse a ensayo otros varios marcadores y alelos usando los métodos descritos en el presente documento, incluyendo HpA.

10 *Dombrock: dos alelos nuevos* – Examinando mediante sonda cinco mutaciones comunes en las posiciones Do-793, Do-624, Do-378, Do-350 y Do-323, usando, por ejemplo, análisis de RFLP, hasta la fecha se han identificado cuatro alelos (tabla 4):

Tabla 4

	DO-793	DO-624	DO-378	DO-350	DO-323
<i>DoA</i>	A	A	A	A	A
<i>DoB</i>	B	B	B	A	A
<i>Hy</i>	B	B	A	A	B
<i>Jo</i>	A	A	B	B	A

15 *Diseño de eMAP BeadChip* - Según el formato de análisis de polimorfismos multiplexado mediado por elongación (eMAP), se diseñaron pares de sondas de elongación codificadas para estudiar la diana en las cinco posiciones designadas, seleccionando, en cada par, una sonda que coincide con el valor normal esperado (“tipo natural”) y una  
 20 segunda sonda que difiere de la primera en o cerca del extremo 3'-terminal y que coincide con el valor variante anticipado. Se usan cebadores para generar amplicones que sirven como secuencias diana para un análisis de elongación posterior, en el que los amplicones o bien incluyen subsecuencias correspondientes o complementarias a las subsecuencias en, y proximales a los sitios polimórficos designados, o que corresponden o son complementarias  
 25 en su totalidad con tales subsecuencias. Alternativamente, es posible generar una concentración suficiente del ADN genómico en la muestra sin amplificación para permitir su selección como diana, hibridación y elongación, usando sondas complementarias y condiciones de elongación apropiadas. Se usó un diseño de eMAP que incorpora en un único BeadChip pares de sondas para las cinco mutaciones de interés, para analizar un subconjunto de 63 muestras, seleccionadas de una cohorte de ~430 controles y muestras clínicas. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 5

Tabla 5

DO-793	DO-624	DO-378	DO-350	DO-323		Casos	Frec.
-1	-1	-1	1	1	<b>DoB/DoB</b>	14	0,22
-1	-1	0	1	0	<b>DoB/Hy</b>	17	0,27
-1	-1	0	1	1	<b>DoB/Sh</b>	3	0,05
-1	-1	1	1	-1	Hy/Hy	1	0,02
-1	-1	1	1	0	<b>Hy/Sh</b>	1	0,02
-1	-1	1	1	1	Sh/Sh	0	0
0	0	-1	0	1	<b>DoB/Jo</b>	2	0,03
0	0	-1	1	1	<b>DoB/Ha</b>	5	0,08
0	0	0	1	1	DoA/DoB	11	0,17
0	0	0	1	1	Hy/Ha		
0	0	0	1	1	Ha/Sh		
0	0	0	0	1	Jo/Sh	0	0
0	0	0	0	0	Hy/Jo	0	0
0	0	1	1	0	DoA/Hy	1	0,02
0	0	1	1	1	DoA/Sh	0	0
1	1	-1	-1	1	Jo/Jo	0	0
1	1	-1	0	1	Jo/Ha	0	0
1	1	-1	1	1	Ha/Ha	0	0
1	1	0	0	1	DoA/Jo	5	0,08
1	1	0	1	1	<b>DoA/Ha</b>	2	0,03
1	1	1	1	1	DoA/DoA	1	0,02
						63	

30 Son evidentes cuatro combinaciones de alelos nuevas, resaltadas en negrita en la tabla 5 (DoB/Sh; Hy/Sh; DoB/Ha; DoA/Ha), indicando 1, 0 y -1 respectivamente las combinaciones de alelos AA, AB o BA y BB.

TABLA 6

	DO-793	DO-624	DO-378	DO-350	DO-323
Ha	A	A	B	A	A
Sh	B	B	A	A	A

Se muestra fácilmente que estas cuatro combinaciones, que se han confirmado secuenciando los amplicones correspondientes, representan la combinación de alelos conocidos con dos alelos nuevos, concretamente (tabla 6): es decir, Ha difiere de DoA, y Sh difiere de DoB, por la sustitución de, respectivamente, A por B y B por A en la posición Do-378. Como resultado, la combinación de Ha y Sh genera la misma sucesión (“palabra”), concretamente 00011, que la combinación DoA/DoB; de manera similar, Hy/Ha también genera la misma sucesión. Esta degeneración puede ser la responsable de la frecuencia relativamente alta de aparición de esa sucesión, lo que sugiere que la observación de 000 en un primer pase de análisis puede atribuirse erróneamente a la aparición de DoA/DoB. Sin embargo, las dos sucesiones de 5 letras permanecen degeneradas, y la resolución de esta ambigüedad debe recurrir al análisis de marcadores adicionales.

Los seis alelos Dombrock incluyendo los dos alelos nuevos identificados en el presente documento generan las siguientes 21 combinaciones.

Tabla 7

	DoB	Hy	Sh	Jo	Ha	DoA
DoB	-1 -1 -1 1 1	-1 -1 0 1 0	-1 -1 0 1 1	0 0 -1 0 1	0 0 -1 1 1	0 0 0 1 1
Hy		-1 -1 1 1 -1	-1 -1 1 1 0	0 0 0 0 0	0 0 0 1 1	0 0 1 1 0
Sh			-1 -1 1 1 1	0 0 0 0 1	0 0 0 1 1	0 0 1 1 1
Jo				1 1 -1 -1 1	1 1 -1 0 1	1 1 0 0 1
Ha					1 1 -1 1 1	1 1 0 1 1
DoA						1 1 1 1 1

Tal como se indica en la tabla 7, en la resolución proporcionada por los tres primeros polimorfismos de Dombrock, concretamente DO-793, -624 y -378, varias de las combinaciones de alelos de 3 letras están degeneradas. La resolución completa de la degeneración de las combinaciones de alelos requerirá la determinación de polimorfismos más allá de los cinco actuales.

**Mutaciones de silenciamiento: Duffy y GATA** – La expresión de un antígeno puede verse afectada por mutaciones de silenciamiento, por ejemplo en la caja GATA del gen que codifica para Duffy (Fy). Por tanto, establecer combinaciones de alelos de los marcadores Fy 125 T>C y GA-33 T>C, especialmente en el caso de un marcador GA heterocigótico, puede requerir la determinación de fase, tal como se describe a continuación.

**Asignación de alelos automatizada: Tabla de resultados positivos** – El proceso de selección de combinaciones de alelos que coinciden o coinciden parcialmente con un patrón experimental particular producido por eMAP emplea preferiblemente una tabla de resultados positivos (tal como la tabla 8 a continuación) para los cinco polimorfismos de Dombrock descritos anteriormente. Usando la tabla de resultados positivos junto con una lista de alelos conocidos, puede aplicarse un algoritmo de coincidencia de patrón para seleccionar, de manera automatizada, combinaciones de alelos coincidentes o parcialmente coincidentes que pueden revisarse y editarse en un entorno de software integrado tal como el proporcionado por el programa de asignación de alelos automatizada (AAA), descrito en el documento US-7.848.889. En la tabla 8, “8” indica una señal de ensayo positiva, lo que indica, por ejemplo, una elongación de sonda, y “1” indica una señal de ensayo negativa, lo que indica, por ejemplo, ausencia de elongación de sonda.

Tabla 8

TABLA DE RESULTADOS POSITIVOS		N	V	N	V	N	V	N	V	N	V
	DoA	8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
	DoB	1	8	1	8	1	8	8	1	8	1
	Hy	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8
	Jo	8	1	8	1	1	8	1	8	8	1
	Ha	8	1	8	1	1	8	8	1	8	1
	Sh	1	8	1	8	8	1	8	1	8	1
<b>REGLAS</b>		8 == apareamiento, 1 == apareamiento erróneo 8 OR 8 = 8, 1 OR 1 = 1, 8 OR 1 = 1, 1 OR 8 = 8									
<b>Ejemplo</b>		DoB/Sh									
Patrón de reacción	DoB/Sh	1	8	1	8	8	8	8	1	8	1
Combinación de alelos		-1		-1		0		1		1	

*Determinación de haplotipos con determinación de fase* – Un método para distinguir haplotipos (combinaciones de alelos en el mismo homólogo) es el uso de determinación de fase, tal como se da a conocer en la solicitud internacional n.º WO03034029. La determinación de fase implica generar un producto de elongación a partir de una sonda que puede detectar un primer sitio diana polimórfico, y luego determinar si los homólogos de otros sitios polimórficos designados están presentes dentro de ese producto de elongación. En caso afirmativo, esto indica que los dos marcadores que incluyen tanto el primer como los otros sitios polimórficos designados pertenecen al mismo alelo.

Más particularmente, la determinación de fase se lleva a cabo usando sondas de elongación codificadas que presentan perlas, que de ese modo identifican tanto las sondas como los productos de elongación, y luego apareando al producto de elongación sondas de oligonucleótidos etiquetadas para determinar si hay homólogo(s) de sitios polimórficos adicionales o no presentes dentro del producto de elongación. Estudiando los productos de elongación generados a partir de sondas dirigidas hacia una serie de sitios polimórficos designados sucesivos, puede determinarse la fase de la combinación de alelos que genera un patrón de reacción.

**Lista de secuencias**

- 5 <110> Michael Seul  
Marion E. Reid  
20 Ghazala Hashmi  
Michael Pierce
- 25 <120> Método de tipado de ácido nucleico para seleccionar donantes registrados para determinar la compatibilidad cruzada con receptores de transfusión
- 30 <130> BLDXMX-US
- 35 <150> documento 60/621196  
<151> 22/10/2004
- 40 <160> 5
- 45 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 50 <210> 1  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> Cebador artificial
- 60 <400> 1  
gctatttgct cctttgacca c 21
- 65 <210> 2  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 70 <220>  
<223> Cebador artificial
- 75 <400> 2  
tctcccaca gagcagtt 18
- 80 <210> 3  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 85 <220>  
<223> Cebador artificial
- 90 <400> 3  
cctcaagtga tctgccttcc tcag 24

# ES 2 532 842 T3

<210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador artificial

10 <400> 4  
tgctcacat tctgatctc ct 22

<210> 5  
<211> 21  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador artificial

20 <400> 5  
catctccgctc aggactcca t 21

## REIVINDICACIONES

1. Método de selección de un donante de transfusión mediante la determinación de la compatibilidad con un receptor comparando combinaciones de marcadores polimórficos en un conjunto de tales marcadores, de donantes candidatos y un receptor en el que dicha determinación se realiza tras someter material genómico/ADN de donantes candidatos y el receptor a amplificación para generar de ese modo productos amplificados, en el que los productos amplificados se someten a un ensayo de hibridación o a un ensayo de elongación mediado por captura o a ambos, en el que se genera una señal de ensayo por los eventos de hibridación o elongación individuales, según sea aplicable, mediante pares de sondas en las que los miembros del par son complementarios, en su totalidad o en parte, a las subsecuencias de los productos amplificados que son los mismos que y/o que son complementarios a los marcadores polimórficos en el conjunto;
- en el que se genera un patrón de intensidad de señal de ensayo a partir de eventos de hibridación o elongación, de modo que cada marcador en el conjunto está representado por un par de intensidades de señal de ensayo particulares, comprendiendo el método:
- determinar el patrón de intensidad de señal de ensayo generado a partir de dicho ensayo de hibridación o elongación y formar, para cada par de sondas, una combinación de intensidades de señal asociadas con los miembros del par;
- generar a partir de dichas combinaciones de intensidades de señal una serie de valores, cada valor en la serie seleccionado de uno de tres posibles valores, que indican respectivamente un estado homocigótico normal, heterocigótico u homocigótico variante para formar de ese modo un patrón de reacción;
- determinar las combinaciones de marcadores polimórficos representadas por dichos patrones de reacción; y
- seleccionar de los donantes candidatos un donante que tiene dicha combinación de marcadores polimórficos idéntica a la del receptor,
- en el que la combinación de intensidades de señal de miembros se representa de modo que una intensidad de este tipo,  $i_N$ , se correlaciona con la cantidad de marcador normal en la muestra, y la otra intensidad de este tipo,  $i_V$ , se correlaciona con la cantidad de marcador variante en la muestra, y dichas intensidades se combinan para formar un parámetro de discriminación  $\Delta = (i_N - i_V)/(i_N + i_V)$  que varía entre -1 y 1.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el patrón de reacción se genera designando valores del parámetro de discriminación por debajo de un primer umbral como valor inferior, designando valores del parámetro de discriminación por encima de un segundo umbral como valor superior, y designando valores del parámetro de discriminación por debajo del segundo umbral pero por encima del primer umbral como valor intermedio.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el ensayo es un ensayo de hibridación en el que el patrón de intensidad de señal se convierte en el patrón de reacción formando razones de intensidades de señal asociadas con un par y designando la muestra como homocigótica para el marcador para razones por encima de un primer umbral y designando la muestra como homocigótica para el marcador para un alelo variante para razones por debajo de un segundo umbral y designando la muestra como heterocigótica para las razones de marcador por debajo del primer umbral y por encima del segundo umbral.
4. Método de identificación de un donante de transfusión analizando un conjunto de marcadores polimórficos que comprende:
- someter material genético del donante a un ensayo en el que pares de sondas generan una señal de ensayo;
- medir las señales de ensayo y formar una combinación de intensidades de señal para una pluralidad de los pares de sondas;
- generar, a partir de las combinaciones de intensidades de señal, un patrón de reacción de una serie de valores que representan homocigótico normal, homocigótico variante o heterocigótico;
- determinar combinaciones de marcadores polimórficos representadas por el patrón de reacción; y
- identificar el donante de transfusión que tiene combinaciones de marcadores polimórficos compatibles con combinaciones de marcadores polimórficos de un receptor;

- 5 en el que el ensayo es un ensayo de hibridación, un ensayo de elongación mediado por captura o ambos, y dichas sondas son complementarias, en su totalidad o en parte, a los marcadores polimórficos, en el que la combinación de intensidades de señal comprende una primera intensidad,  $i_N$ , que representa la cantidad de marcador normal, y una segunda intensidad,  $i_V$ , que representa la cantidad de marcador variante, y un parámetro de discriminación de  $\Delta=(i_N-i_V)/(i_N+i_V)$  se calcula a partir de la combinación de intensidades de señal.
- 10 5. Método según la reivindicación 4, en el que el patrón de reacción se genera designando valores del parámetro de discriminación por debajo de un primer umbral como homocigótico normal, designando valores del parámetro de discriminación por encima de un segundo umbral como homocigótico variante, y designando valores del parámetro de discriminación por debajo del segundo umbral pero por encima del primer umbral como heterocigótico.

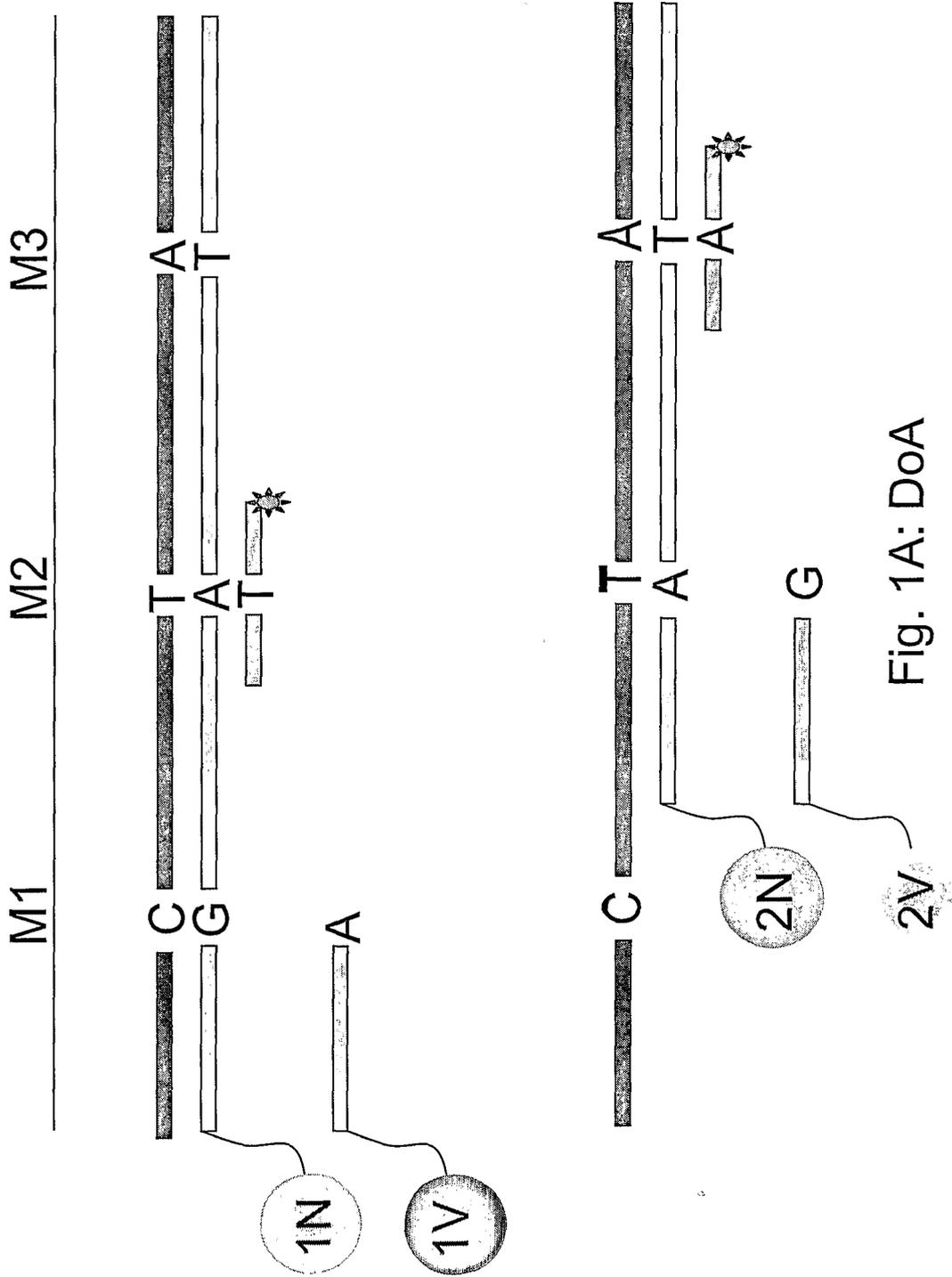


Fig. 1A: DoA

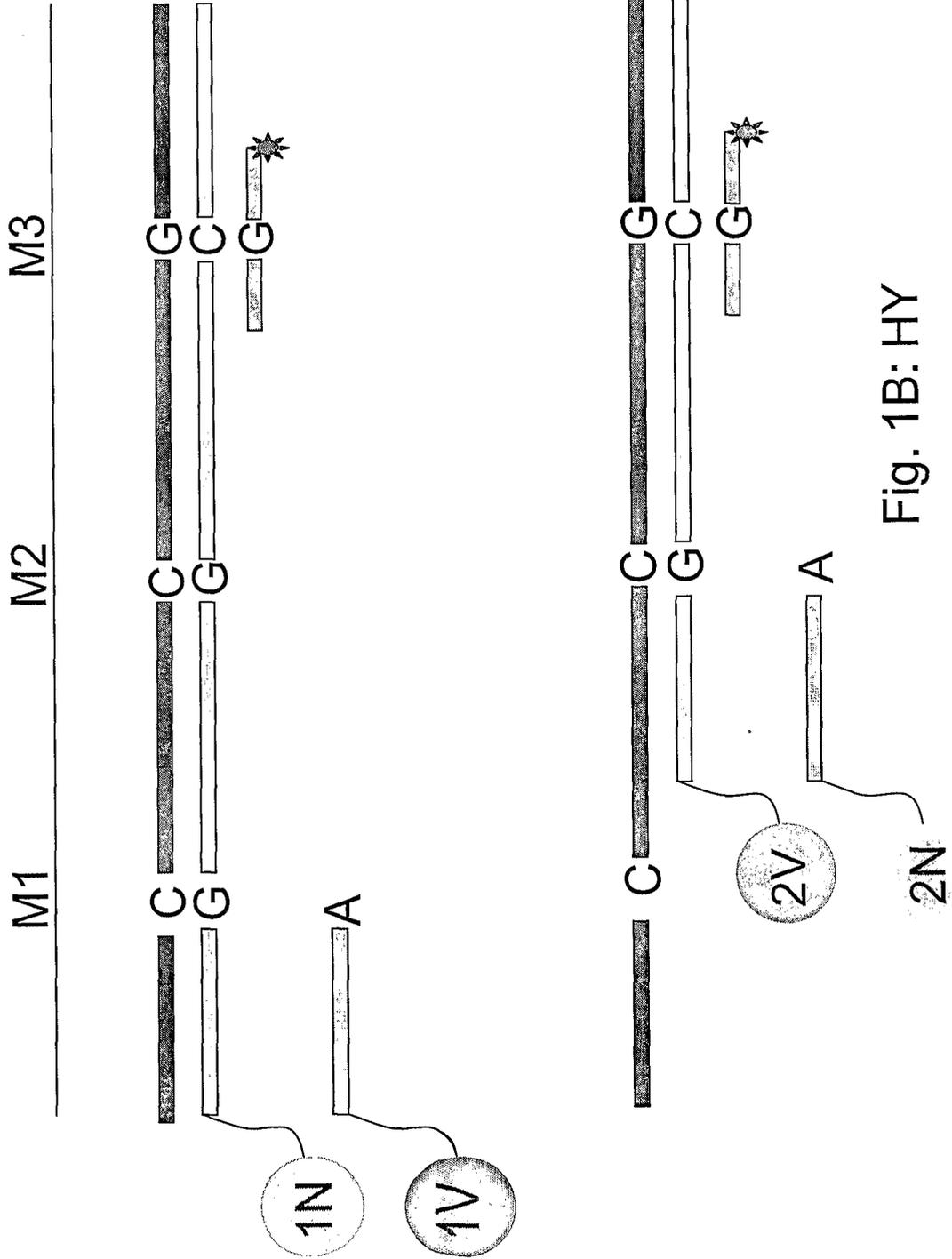


Fig. 1B: HY