

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 935**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.1998** **E 10152068 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015** **EP 2186911**

54 Título: **Procedimiento para determinar el locus del antígeno de histocompatibilidad clase II**

30 Prioridad:

26.06.1997 EP 97110438

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

30.04.2015

73 Titular/es:

**BIO-RAD MEDICAL DIAGNOSTICS GMBH
(100.0%)**

**INDUSTRIESTRASSE 1
63303 DREIEICH, DE**

72 Inventor/es:

BLASCZYK, RAINER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 935 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar el locus del antígeno de histocompatibilidad clase II

La presente invención se refiere a procedimientos para determinar el tipo de HLA clase II de un sujeto, en los que se usan secuencias específicas para el grupo para diseñar las moléculas iniciadoras que pueden usarse en protocolos de amplificación que identifiquen exactamente el o los grupos de HLA y / o los alelos portados por el sujeto.

El complejo de antígeno leucocitario humano (HLA) clase II comprende los genes que codifican HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. El complejo comprende varios loci genéticos entre los que se mencionan especialmente: DRB1, DRB2, DRB3, DRB4, DRB5, DRB6, DRB7, DRB8, DRB9, DQA1, DQA2, DQB1, DQB2, DPA1, DPA2, DPB1, DPB2.

Los genes del HLA clase II son altamente polimórficos entre individuos. Esta variabilidad es de una particular relevancia cuando se contempla un trasplante de órganos o tejidos entre un donante y un receptor. Los antígenos de histocompatibilidad del donante y del receptor deberían ser tan similares como sea posible para evitar tanto el rechazo inmune del tejido transplantado como el síndrome del injerto contra el receptor. Por lo tanto es importante identificar exactamente los tipos de HLA del donante y del receptor. A la vista de las exigencias implícitas en el trasplante de tejidos, es deseable que la tipificación se realice tan exactamente como sea posible.

Se ha investigado mucho sobre los procedimientos para determinar los alelos del HLA en una muestra de un paciente a causa de la importancia funcional de estos genes en la compatibilidad de los tejidos y en las enfermedades autoinmunes en trasplantes. Las primeras pruebas desarrolladas usaban procedimientos inmunológicos para identificar epítomos expresados por diferentes loci del HLA. Estas pruebas (por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento, descrito por Terasaki y Mc Clelland, Nature, 204: 998 (1964)) identificaban amplias especificidades serológicas pero no eran capaces de diferenciar los miembros alélicos de un grupo y a veces identificaban grupos de forma completamente incorrecta. Desafortunadamente, incluso el más exacto de dichos ensayos de baja resolución no puede detectar y diferenciar todos los antígenos de trasplante funcionalmente significativos (Anasetti y colaboradores, Hum. Immunol., 29: 70 (1990)).

Las pruebas de alta resolución realizadas al nivel del ácido nucleico que diferencian los alelos de cada grupo han sido el foco de recientes investigaciones. Los procedimientos actuales de tipificación de alta resolución incluyen los siguientes.

La técnica de las sondas de oligonucleótidos específicas para la secuencia (SSOP), tal como se describe en la patente de EE.UU. núm. 5.451.512 cuya titularidad ostenta Hoffmann - La Roche, Inc., usa un formato de transferencia en mancha inversa, en el que se inmovilizan sondas de HLA-A sobre una membrana y el ADN diana etiquetado (muestra del paciente) se hibrida con la sonda unida a la membrana (tal como es descrito por Saiki y colaboradores, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 6230 - 6234). El modelo de hibridación para las sondas sobre transferencia en mancha da información relativa al tipo de HLA del individuo. Sin embargo, ya que la hibridación inherentemente no es suficientemente específica para descartar diferencias menores en la secuencia entre la sonda y la muestra del paciente, existe la posibilidad de que la muestra del paciente pueda contener una variante alélica que no se tenga en cuenta.

Otro ensayo basado en el ácido nucleico es el sistema de mutación refractaria por amplificación (ARMS) tal como se describe en el manual de referencia del "HLA Class I SSP ARMS - PCR Typing Kit", edición de junio de 1995, publicado por la Imperial Cancer Research Fund. Este ensayo se basa en la necesidad de complementariedad (emparejamiento) entre el terminal 3' de un iniciador de amplificación y una secuencia de ADN diana. En ausencia de tal emparejamiento, el iniciador no funcionará adecuadamente y no se amplificará ningún fragmento. La información de la secuencia se deduce determinando, para diferentes pares de iniciadores que actúan sobre un ADN diana de una muestra de un paciente, si el fragmento está o no amplificado con éxito. La exactitud de la técnica está limitada por el número de pares de iniciadores comprobados y por la posibilidad de que existan variaciones alélicas en regiones de ADN que descansen entre los iniciadores.

Para vencer los anteriores inconvenientes, se ha propuesto que la tipificación sea realizada mediante secuenciación directa de ADN (Santamaria y colaboradores, "HLA Class II typing: direct sequencing of DRB, DQB, and DQA genes", Hum. Immunol. 33, 69 - 81 (1992); Santamaria y colaboradores, "HLA Class I Sequence-Based Typing", Hum. Immunol. 37, 39 - 50 (1993); WO9219771; Pat. de EE.UU. 5.424.184). Sin embargo, mientras la secuenciación directa del locus del HLA Clase II del paciente puede ser conceptualmente más exacta, dicha secuenciación puede requerir un plazo inadecuado para la práctica clínica. Puede esperarse que el éxito de los procedimientos de secuenciación directa esté basado en el diseño de protocolos eficaces y las secuencias iniciadoras pertinentes.

Antes de la presente invención, los protocolos de secuenciación directa habían presentado un número de

desventajas. Por ejemplo, el procedimiento de Santamaria y colaboradores, supra, falla en el suministro de información suficiente ya que se centra en secuencias de ADNc (exón) que, en vista de la diversidad de secuencias del exón, ofrecen una selección muy limitada de sitios conservados de hibridación de iniciadores. Además, a causa de que los iniciadores de secuenciación de Santamaria hibridan dentro de un exón, no suministran la información sobre la secuencia de ADN en dirección 5' del iniciador que potencialmente es decisiva para diferenciar los alelos. Por otra parte, los sitios divulgados se determinaron antes del reciente descubrimiento de docenas de más alelos, que no es necesario que sean considerados en la identificación del tipo de HLA.

Secuencias de intrones podrían proporcionar los sitios de hibridación preferentes para la amplificación y secuenciación de iniciadores para genes de HLA clase II, ya que pueden suministrar la secuencia de ADN para el exón completo.

La existencia de intrones, que interrumpen las regiones codificantes de genes nucleares, es una característica típica del ADN genómico en eucariotas complejos. Los intrones son habitualmente mucho más largos que los exones y son responsables de la mayor parte de los genes estructurales. En la presente invención, especialmente las secuencias del intrón 1 y del intrón 2 que está situado en el terminal 5' y en el terminal 3', respectivamente, del exón 2 son especialmente importantes.

Un número de investigadores han hecho un uso limitado de los oligonucleótidos basados en intrones para aspectos limitados de la tipificación del HLA Clase I.

La solicitud de patente europea EP-A-90.309107.2 de GENETIPO AG divulga un procedimiento de análisis de secuencias de intrones para la detección de alelos de locus adyacentes y remotos como haplotipos. De acuerdo con este procedimiento, el ADN genómico se amplifica con un par de iniciadores que abarca una secuencia de una región no codificante (intrón). El par de iniciadores usado define una secuencia de ADN que está en enlace genético con un alelo a ser detectado.

Blasczyk y colaboradores (Tissue Antigens 1996: 47: 102 - 110) usaron iniciadores de amplificación basados en exones para determinar la especificidad de grupo del HLA clase I. Después de la amplificación, se usaron iniciadores de secuenciación universales situados en el intrón 2 para secuenciar el fragmento amplificado. El documento no divulga ningún motivo de secuencia de intrón del intrón 1 o 3 o de la región 5' no traducida.

Cereb y colaboradores (Tissue Antigens 1995: 45: 1 - 11) acometieron la identificación de las secuencias de intrones útiles para conjuntos de iniciadores de amplificación específicos para el locus para todos los genes Clase I. Estos conjuntos de iniciadores se diseñaron para amplificar todos los alelos del mismo locus. No se observaron ni se informó de iniciadores de amplificación específicos para el grupo. Además, los fragmentos amplificados fueron caracterizados mediante SSOP y no mediante secuenciación directa.

Li W. - H y colaboradores [Fundamentals of molecular evolution, Sunderland, MA; Sinauer Associates (1991)] han especulado, basándose en la información obtenida de otros genes, que intrones del HLA Clase II podrían tener incluso más variación que los exones debido a la falta de una presión selectiva que actúe sobre ellos. Ya que hay sólo una relación filogenética muy pequeña entre genes del HLA Clase I y Clase II no es posible predecir si cualquiera de las características estructurales halladas en los genes Clase I pueden estar también presentes en genes Clase II.

En el curso de la presente invención sorprendentemente se ha encontrado que el locus del antígeno de histocompatibilidad clase II puede determinarse de manera ventajosa usando un iniciador o una mezcla de iniciadores específicos para el grupo situado dentro del intrón 1 y otro iniciador situado en el terminal 3' del exón 2, mediante lo cual este iniciador antisentido debería ser muy bien conservado y preferentemente específico para el grupo, para permitir una tipificación de alta resolución de los genes del HLA Clase II.

Debería hacerse hincapié en que la presente invención hace uso de motivos específicos para el grupo dentro de los intrones DRB. Estos motivos de secuencias de HLB-DRB específicos para el grupo están dentro de las regiones no codificantes y pueden usarse de forma adecuada para amplificar el ADN genómico de una manera específica para el grupo, mediante lo cual el ADN amplificado puede usarse para investigaciones adicionales, especialmente para la secuenciación.

La presente invención se refiere a procedimientos para la tipificación de alta resolución, basados en el ácido nucleico del DR del antígeno HLA Clase II clásico. Esto se fundamenta, en parte, en el descubrimiento de motivos de secuencias específicos para el grupo, derivados del análisis de numerosas muestras de pacientes, que incluyen secuencias del intrón 1. Dichos motivos de secuencias pueden usarse para diseñar iniciadores de amplificación que pueden usarse para identificar el grupo o tipo de HLA de un sujeto. La invención también se basa, en parte, en la determinación de numerosas secuencias específicas para alelos que pueden usarse para confirmar el tipo alélico preciso de un sujeto.

En el curso de la presente invención se ha descubierto la diversidad remarcablemente conservada de los intrones del HLA Clase II que es específica para el linaje en vez de específica para los alelos. La diversidad sistemática relativa a la serología de las secuencias de intrones del HLA Clase II forma la base de la presente invención. Se ha comprobado que esta característica de los intrones del HLA Clase II es extremadamente beneficiosa para configurar estrategias de amplificación para la preparación de plantillas.

Un aspecto muy importante de la presente invención es que usando un par de iniciadores pueden amplificarse varios alelos. El término "grupo" se refiere a grupos tales que puedan distinguirse mediante procedimientos serológicos. En la presente invención los grupos DR1, DR2, DR3 y DR4 - DR18 son de especial importancia. Habitualmente en la serología de los grupos de HLA denominados antígenos principales han de diferenciarse de los denominados antígenos divididos. Los antígenos divididos últimamente descubiertos llevan epítomos específicos para el grupo y usando los epítomos divididos puede subdividirse un antígeno principal en dos antígenos divididos. Debería observarse que los antígenos principales se designan como DR1 - DR10, mientras que los antígenos divididos se designan por DR11 - DR18. Debería mencionarse la siguiente relación entre los antígenos:

DR5 puede subdividirse en grupos DR11 y DR12;

DR6 puede subdividirse en grupos DR13 y DR14;

DR2 puede subdividirse en grupos DR15 y DR16;

DR3 puede subdividirse en grupos DR17 y DR18.

Para los antígenos principales DR1, DR4, DR7, DR8, DR9 y DR10 no se conocen hasta ahora antígenos divididos.

Cada uno de los grupos antes mencionados puede diferenciarse de los demás mediante procedimientos serológicos. Con la ayuda de procedimientos genéticos moleculares, sin embargo, es posible identificar una pluralidad de alelos para cada grupo que tienen el mismo fenotipo que se corresponde con la misma apariencia serológica. El grupo DR11, por ejemplo, puede diferenciarse hasta el momento en aproximadamente 30 alelos que muestran la misma apariencia serológica.

Considerado a nivel molecular, un antígeno DR consta de dos cadenas de polipéptidos, las denominadas cadena α y cadena β . La forma polimórfica de los antígenos DR está situado exclusivamente en el dominio β 1 de la cadena β . Este dominio β 1 está codificado por el exón 2 del total de 6 exones que codifican la cadena β . La cadena α no es polimórfica. El gen que codifica la cadena α es el gen DRA y la cadena β está codificada por el gen DRB. Los genes simples que codifican DRB tienen números y actualmente se designan como DRB1 - DRB9. Ya que los genes DRB2, 6, 7, 8 y 9 no son pseudo-genes expresados, solamente se expresan DRB1, DRB3, DRB4 Y DRB5. Cada cadena de polipéptidos de cada uno de esos genes DRB se asocia con la misma cadena α codificada por el gen DRA.

Un heterodímero de las cadenas de polipéptidos DRA y DRB1 muestra las especificidades serológicamente diferenciables DR1-DR18. Un heterodímero de las cadenas de polipéptidos DRA y DRB3 muestra la especificidad serológicamente diferenciable DR52. Un heterodímero de cadenas de polipéptidos DRA y DRB4 muestra la especificidad serológicamente diferenciable DR53 y un heterodímero que consta de las cadenas de polipéptidos de DRA y DRB5 muestra la especificidad serológicamente diferenciable DR51. Los antígenos DR51, DR52 y DR53 son moléculas DR separadas sobre la superficie de las células. Esas moléculas están solamente presentes cuando también están presentes ciertas moléculas DR1-DR18. Por ejemplo, el antígeno DR51 está presente solamente si también están presentes DR15 o DR16. DR52 está presente solamente si están presentes DR3, 11, 12, 13 o 14 y DR53 está presente solamente si también están presentes DR4, 7 o 9.

Mediante el uso del término "grupo asociado" debe entenderse que por ejemplo el grupo DR52 comprende también los antígenos DR3, DR11, DR12, DR13 y DR14.

La base de datos de secuencias de los genes del HLA-DRB se deriva principalmente del análisis del ARNm o se ha concentrado sobre el segundo exón polimórfico. De acuerdo con la presente invención, se usan las características estructurales de las secuencias de intrones de los genes del HLA-DRB1, 3, 4 y 5.

Se divulga una compilación de secuencias del HLA-DRB1, 3, 4 y 5 de los 3.500 pb adyacentes al exón 2 del primer intrón de 8.500 pb y un fragmento de 300 pb en el terminal 5' del intrón 2.

Las secuencias usadas en la presente invención se derivaron de líneas celulares bien definidas y de muestras clínicas tipificadas mediante PCR. Representan todos los grupos serológicamente definidos y sus subtipos más frecuentes. Aparte de los múltiples motivos de secuencias específicas para los genes, las secuencias de intrones

de HLA-DRB exhiben una diversidad remarcablemente conservada que es específica del linaje en vez de específica de los alelos. La presente invención permite por lo tanto prospecciones adicionales dentro de la relación genética entre diferentes alelos de genes del HLA-Clase II y abre la posibilidad de nuevas estrategias de tipificación basadas en la PCR usando iniciadores de amplificación situados en intrones. La diversidad intrónica conservada suministrará una mejora para establecer sistemas de tipificación que prometen no demandar actualizaciones regulares cuando se descubran nuevos alelos.

La presente invención suministra ácidos nucleicos substancialmente purificados que son capaces de hibridarse selectivamente con motivos de secuencias específicos para el grupo en regiones no traducidas de HLA-D y específicamente los genes del HLA-DRB1, 3, 4 y 5. Dichos ácidos nucleicos, que pueden estar comprendidos en un equipo, pueden usarse solos o en conjunción con iniciadores basados en exones para determinar la especificidad de grupo de dichos alelos contenidos en una muestra de un paciente y para identificar los alelos específicos presentes.

En realizaciones particulares, la presente invención suministra procedimientos para establecer el tipo de HLA de Clase II de un sujeto que comprenden la realización de una reacción de amplificación que identifica el tipo de grupo del sujeto y una segunda reacción de amplificación que produce ácidos nucleicos específicos para los alelos para la secuenciación.

En la presente invención se usan las siguientes definiciones:

“Alelo” significa una de las formas alternativas del gen en cuestión.

“Amplificación” significa el proceso de incrementar la abundancia relativa de uno o más genes específicos o fragmentos de genes en una mezcla de reacción con respecto a otros genes. Un procedimiento de amplificación que es bien conocido por aquellos expertos en la materia es la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) según se describe en las patentes de EE.UU. núm. 4.683.194, 4.683.195 y 4.683.202, que se incorporan en el presente documento por referencia. El proceso de la PCR comprende el uso de pares de iniciadores, uno por cada filamento complementario del ADN bicatenario (donde el filamento codificante se denomina “filamento sentido” y su filamento complementario se denomina como “filamento antisentido”), que se hibridará en un sitio situado cerca de una región de interés en un gen. Entonces se lleva a cabo la polimerización de extensión de cadena (sin un nucleótido de terminación de cadena) en ciclos repetitivos para incrementar el número de copias de la región de interés muchas veces. Los oligonucleótidos amplificados se separan entonces de la mezcla de reacción y se usan como la mezcla de inicio para la reacción de secuenciación. Gelfand y colaboradores han descrito una enzima termo-estable “Taq polymerase” derivada del organismo “Thermus aquaticus” que es útil en este proceso de amplificación (consulte las patentes de EE.UU. núm. 5.352.600 y 5.079.352 que se incorporan en el presente documento por referencia).

“Grupo” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un subconjunto de alelos de un locus, todos los cuales comparten características de secuencias que los distinguen de otros grupos. Por ejemplo, la reactividad serológica del grupo (en un ensayo de linfocitotoxicidad) es la base convencional para la nomenclatura de alelos de HLA. Los primeros dos dígitos de un alelo se refieren a su grupo serológico; por ejemplo, la designación DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0103 son todos miembros del grupo DR1. Además, normalmente la nomenclatura se refiere al grupo serológico de división.

Ya que solamente los genes DRB son polimórficos, aquí son sólo alelos diferentes. Estos alelos se denominan, por ejemplo, para el grupo DR11: DRB1*1101, 1102, 1103... hasta DRB1*1130 actualmente. Los primeros dos dígitos se refieren al grupo serológicamente diferenciable que se corresponde en la mayoría de los casos con el antígeno dividido. El tercer y cuarto dígitos describen el subtipo que, sin embargo, puede distinguirse solamente mediante procedimientos genéticos moleculares y significa el alelo pertinente. Debe mencionarse que hay también un quinto, sexto y séptimo dígitos mediante los cuales el quinto dígito describe mutaciones en los exones que no resultan en un cambio de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, DRB1*11011 o DRB1*11012). El sexto y séptimo dígitos del nombre del alelo describen variaciones en las regiones no codificantes del gen DRB, nominalmente las regiones flanqueantes de la región 5' y / o 3' y los intrones.

“Motivo de secuencia específico para el grupo” significa una secuencia, generalmente corta, de 1 - 25 nucleótidos (“nt”) de ácido nucleico que se encuentra solamente en uno o unos pocos grupos. Cuando un motivo es compartido con varios grupos en una región del locus del HLA, motivos de secuencias específicos para el grupo en otras regiones del locus pueden servir como características de distinción de grupos. El motivo puede compartir uno o más nucleótidos con la secuencia de consenso para la región.

“Haplotipo” significa un alelo presente en un cromosoma.

“Heterocigoto” significa la presencia de al menos dos alelos diferentes de un gen.

“Homocigoto” significa la presencia de una especie de alelo de un gen.

“Locus” significa un gen, tal como HLA-DRB1 o HLA-DRB3.

“Específico para el locus” significa un evento o cosa asociado solamente con un locus.

5 “Muestra de paciente” significa una muestra recogida de un paciente que necesite tipificación del HLA que contiene una cantidad y calidad suficientes de ácido nucleico (preferentemente ADN) para la realización de una reacción de amplificación. Un ejemplo no limitativo de una fuente adecuada son los linfocitos de la sangre periférica, el tejido (incluyendo cultivos celulares derivados de los mismos), frotis de mucosas, médula esplénica y ósea.

“Iniciador” significa un polinucleótido generalmente de 5 - 50, preferentemente 12 - 28, nucleótidos de longitud que puede servir para iniciar una reacción de extensión de cadena.

10 “Secuenciación” o “secuenciación de ADN” significa la determinación del orden de los nucleótidos en al menos una parte de un gen. Un procedimiento de secuenciación bien conocido es el procedimiento de “terminación de cadena” descrito en principio por Sanger y colaboradores, Proc. Nat'l Acad. Sci. (EE.UU.) 74(12):5463 - 5467 (1977) (recientemente elaborado en el documento EP-B1-655506, y Sequenase 2.0 product literature (Amersham Life Sciences, Cleveland) incorporado en el presente documento por referencia). Básicamente, en este proceso, se
15 aísla el ADN a secuenciar, se convierte en monofilamentoso y se coloca dentro de cuatro vasos. En cada vaso están los componentes necesarios para replicar el filamento de ADN, incluyendo una polimerasa de ADN dependiente de la plantilla, una molécula iniciadora corta complementaria de una región conocida del ADN a secuenciar y trifosfatos de nucleótidos individuales en un neutralizador conductor para la hibridación entre el iniciador y el ADN a secuenciar y la extensión de cadena del iniciador hibridado. En una tercera serie de
20 realizaciones no limitativas, pueden usarse los iniciadores específicos para el grupo para amplificar un fragmento que luego es identificado mediante una sonda de oligonucleótidos específicos para la secuencia. Además, cada vaso contiene una pequeña cantidad de un tipo de trifosfato de dideoxinucleótido etiquetado opcionalmente detectable, por ejemplo, trifosfato de dideoxiadenosina (“ddA”), trifosfato de dideoxiguanosina (“ddG”), trifosfato de dideoxicitosina (“ddC”) o trifosfato de dideoxitimidina (“ddT”). En cada vaso, cada trozo de ADN aislado se hibrida
25 con un iniciador. Entonces se extienden los iniciadores, una base cada vez, para formar un nuevo polímero de ácido nucleico complementario con los trozos de ADN aislados. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido dentro del polímero de extensión, éste finaliza el filamento del polímero y evita que sea adicionalmente extendido. Consecuentemente, en cada vaso, se forma un conjunto de polímeros extendidos de longitudes específicas que son indicativos de las posiciones del nucleótido que se corresponde con el ácido dideoxinucleico de ese vaso.
30 Estos conjuntos de polímeros se evalúan entonces usando electroforesis de gel para determinar la secuencia.

“Hibridación específica” significa hibridación de un filamento de un ácido nucleico con su complemento.

“Secuencia diana” significa el sitio preferente para la hibridación específica de un iniciador.

35 “Región no traducida” se refiere a una parte de un locus del HLA que puede ser parte del ARN maduro, pero no se traduce en proteína. Ejemplos de regiones no traducidas son las regiones flanqueantes 5' y 3' y las secuencias de intrones. Por ejemplo, la región flanqueante 5' ni se transcribe ni se traduce y la secuencias de intrones se transcriben pero no se traducen.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 La figura 1 A es una ilustración del principio para una estrategia de secuenciación del HLA Clase II. Se usan iniciadores específicos para el grupo para la amplificación de PCR y se usan iniciadores de superposición de grupos situados en el intrón 1 cerca del segundo exón y en el terminal 3' del exón 2 para la secuenciación.

La figura 1B muestra esquemáticamente la posición de los iniciadores en donde unos iniciadores está situados en el intrón 1 cerca del exón 2 y los otros iniciadores está situados en el terminal 5' del intrón 2.

45 La figura 2A-E muestra un alineamiento del 486 pb del intrón 1 de los genes HLA-DRB1, 3, 4 y 5 en dirección 5' del exón 2 en comparación con la secuencia de consenso del HLA-DRB. Los números encima de la secuencia se refieren a la posición de los nucleótidos dentro de la región no codificante. Los puntos indican identidad con el consenso, los asteriscos indican eliminaciones en la secuencia. El terminal 5' del segundo exón está marcado como un área gris.

50 La figura 2G-J muestra un alineamiento del intrón 2, que está situado adyacente con el terminal 3' del exón 2. En la figura 2G - J puede verse que hay un polimorfismo específico para el grupo. La divulgación de la figura 2G - J puede usarse para deducir secuencias de iniciadores. Con la ayuda de esas nuevas secuencias y con iniciadores adecuados situados dentro del intrón 1 puede amplificarse el exón 2 completo mediante PCR. La

ventaja del uso de iniciadores dentro del intrón 2 es que puede usarse el exón 2 completo para ensayos adicionales, por ejemplo, de secuenciación.

La figura 3A muestra la secuencia y la localización de iniciadores de PCR para la amplificación específica para el grupo de diferentes loci genéticos, especialmente HLA-DRB1, 3, 4 y 5. En la figura 3B se muestran los iniciadores para la secuenciación.

Los nombres de los iniciadores de secuenciación muestran para qué grupo pueden usarse. Por ejemplo, el iniciador de secuenciación DR2 puede usarse para secuenciar el grupo DR2. El iniciador de secuenciación DR3, 5, 6, 8, 10, B4 puede usarse con los grupos DR3, DR5 (DR11 y DR12), DR6 (DR13 y DR14), DR8, DR10 del gen DRB1 y para DR53 (la codificación del gen polimórfico se denomina por lo tanto DRB4). El iniciador de secuenciación DRB3.2 es exclusivamente relevante para el gen DRB3 y se ha designado DRB3.2 para diferenciar este iniciador de secuenciación del iniciador de amplificación DRB3.1.

La figura 3C muestra iniciadores de amplificación que están situados dentro del intrón 1 y sobre el otro extremo dentro del intrón 2. Cuando se usan los iniciadores mostrados en la figura 3C pueden usarse los iniciadores de secuenciación de la figura 3B.

La figura 4A muestra la especificidad de las mezclas de iniciadores para la producción de plantillas. La selección de la mezcla de iniciadores para la secuenciación se ha efectuado sobre la base de una baja pretipificación discriminativa. La designación de la mezcla de iniciadores se selecciona de acuerdo con los grupos serológicamente definidos DR1-10, DR12-14 y DR51-53.

Los iniciadores usados muestran una clara especificidad para el grupo que se refiere a los grupos serológicamente definidos. Esta especificidad se expresa en el nombre de la mezcla de iniciadores. La mezcla de iniciadores que tiene el nombre 1, por ejemplo, puede usarse para amplificar los alelos del gen DRB1 lo que provoca la especificidad serológica DR1.

Un ejemplo más complicado es la mezcla de iniciadores que tiene el nombre 5. Esta mezcla de iniciadores puede usarse para amplificar alelos de la especificidad serológica DR5, nominalmente el subgrupo DR11. Además, esta mezcla de iniciadores amplifica, no obstante, los subgrupos DR3, DR13 y DR14.

La especificidad para los grupos se basa en la especificidad del iniciador 5' situado en el primer intrón (por ejemplo, DRB01-DRB05). Todas las mezclas de iniciadores contienen el iniciador antisentido en el terminal 3' denominado DRBAS. Este iniciador está situado dentro de la secuencia del extremo del exón 2 que no tiene variabilidad. Esta secuencia es común para todos los genes DRB (DRB1, 3, 4 y 5).

Ya que todas las mezclas de iniciadores cubren la variabilidad del exón 2 es posible determinar, mediante la secuenciación de los productos obtenidos en la PCR, el alelo exacto del gen DRB.

Como alternativa a la longitud del fragmento puede usarse, como criterio para la identificación de un producto de amplificación individual, la hibridación de una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia. La detección de la hibridación de los oligonucleótidos puede conseguirse mediante diferentes técnicas bien establecidas en el campo. La aproximación puede ser útil si dos posibles productos tienen la misma longitud pero una secuencia diferente o si la amplificación específica para el grupo es parte de un sistema de tipificación que trabaja mediante hibridación.

Se ha hallado que en el extremo del intrón 1 no hay secuencia universal que permita el diseño de un iniciador de secuencias que pueda ser usado por todos los grupos. Esto representa una diferencia esencial con respecto a la situación del HLA Clase I. Por lo tanto, tienen que usarse iniciadores de secuenciación específicos para el grupo lo que, sin embargo, tiene la ventaja de que se mejora la calidad de secuenciación. El iniciador de secuenciación (tal como el mostrado en la figura 3B) tiene nombres que se corresponden con los grupos para los que son específicos.

La figura 4B muestra la especificidad de mezclas de iniciadores para la producción de plantillas, donde los iniciadores sentido están situados dentro del intrón 1 y los iniciadores antisentido están situados dentro del intrón 2.

La figura 5 muestra mezclas de iniciadores que pueden usarse para la pretipificación. Los iniciadores están situados en el exón 2.

La figura 6 muestra las secuencias de nucleótidos de los iniciadores mencionados en la figura 5.

La figura 7 muestra esquemáticamente la estructura del gen HLA-DRB. Anteriormente se ha descrito en detalle la secuenciación del exón 2. Por lo tanto es posible usar las enseñanzas de la presente invención para amplificar también otros exones.

La figura 8 muestra esquemáticamente la amplificación de secuencias más largas. Para conseguir fragmentos de ADN más largos que contengan no solo el intrón 1, el exón 2 y el intrón 2, el iniciador antisentido tiene que situarse dentro del siguiente intrón, por ejemplo el intrón 3, 4 o 5 ó la región flanqueante 3'. Usando los iniciadores sentido descritos en el intrón 1 usando, por ejemplo, un iniciador antisentido situado dentro del intrón 3, podría extenderse la amplificación desde el terminal 3' del intrón 1 a lo largo del exón 2, el intrón 2 y el exón 3 hasta el intrón 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos que pueden usarse para determinar exacta y eficientemente el tipo de HLA Clase II de una muestra derivada de primates humanos y no humanos, especialmente seres humanos, por ejemplo donantes, para trasplantes y propósitos forenses.

La presente invención se basa, en parte, en la determinación de motivos de secuencias específicos para el grupo en ciertas regiones, especialmente en regiones de intrones de loci del HLA Clase II. Estos motivos pueden usarse para diseñar oligonucleótidos que pueden usarse como iniciadores específicos para el grupo en reacciones de amplificación del ácido nucleico. Alternativamente estos motivos pueden usarse para el diseño de sondas que son preferentemente específicas para el grupo. La presente invención también se basa, en parte, en la determinación de las secuencias de regiones de una amplia variedad de alelos de loci del HLA Clase II; dichas secuencias pueden usarse para diferenciar un alelo de otro. Se suministran secuencias del intrón 1 de genes del HLA-DRB y se ponen de manifiesto en la figura 2.

En general, los procedimientos de la invención pueden describirse como sigue. La comparación de secuencias de nucleótidos de un locus del HLA entre miembros de un grupo de HLA Clase II, que descansan en cualquiera de las regiones no traducidas o de exón, pueden usarse para identificar secuencias de motivos específicos para el grupo. La identificación de los grupos puede hacerse estableciendo relaciones serológicas o usando información filogenética. Basándose en secuencias de motivos específicos para el grupo, pueden diseñarse, sintetizarse y usarse iniciadores de oligonucleótidos para amplificar una parte del locus del HLA. Los oligonucleótidos usados de esta forma se denominan en el presente documento "iniciadores específicos para el grupo" y, en particular, "iniciadores de regiones no traducidas específicos para el grupo".

En realizaciones preferentes no limitativas de la invención, los iniciadores se corresponden con regiones no traducidas del locus del HLA Clase II ("iniciadores de regiones no traducidas específicos para el grupo"). Por ejemplo, el iniciador 5' hibrida con un motivo específico para el grupo en el primer intrón, mientras que un iniciador 3' específico para el gen se usa en el terminal 3' del segundo exón fuera de la región variable de este exón.

Los iniciadores específicos para el grupo pueden usarse en varios procedimientos diferentes de acuerdo con la invención. En una primera serie de realizaciones no limitativas, los iniciadores específicos para el grupo pueden usarse en forma de diagnóstico para identificar qué grupos alélicos están presentes en una muestra de un paciente. En una segunda serie de realizaciones no limitativas, los iniciadores específicos para el grupo pueden usarse para amplificar cantidades suficientes de un fragmento alélico particular que luego se expone a secuenciación directa de nucleótidos usando iniciadores de secuenciación adecuados.

De acuerdo con la primera serie de realizaciones, la presente invención suministra un procedimiento para determinar el tipo de grupo de HLA Clase II que es parte del locus de HLA-DRB1, HLA-RB3, HLA-DRB4 o HLA-DRB5 de un sujeto, que comprende

(i) la combinación de un par de iniciadores específicos para el grupo con una muestra de ADN diana de un sujeto bajo condiciones tales que pueda producirse la amplificación basada en los iniciadores del ADN diana; y

(ii) la determinación de si se produce un producto de ácido nucleico mediante la amplificación; en donde la capacidad de un par de iniciadores para producir un producto de ácido nucleico se asocia con un tipo de grupo de HLA particular,

caracterizado porque el iniciador sentido es un iniciador específico para el grupo situado dentro del intrón 1, y el iniciador antisentido está situado en el terminal 3' del exón 2 y fuera de la región variable del exón 2.

El primer procedimiento puede usarse para suministrar información de diagnóstico útil. Por ejemplo, la determinación del tipo de grupo puede servir como un primer nivel de comparación para un análisis de histocompatibilidad, incluso sin la identificación del o de los alelos específicos involucrados. Por ejemplo, si un donante potencial y un receptor tienen que ser evaluados para un trasplante de tejido, y, si se encuentra que sus tipos de grupos no coinciden, no se necesitan más comparaciones. Si, alternativamente, sus tipos coinciden, pueden ser deseables análisis adicionales, por ejemplo mediante secuenciación directa.

De acuerdo con la segunda serie de realizaciones, la presente invención suministra un procedimiento para determinar el tipo alélico del HLA Clase II de un sujeto, que comprende

- 5 (i) la combinación de un par de iniciadores de oligonucleótidos específicos para el grupo con una muestra de ADN diana de un sujeto bajo condiciones tales que pueda producirse esa amplificación basada en los iniciadores del ADN diana, en donde los iniciadores son como se define en las reivindicaciones;
- (ii) la recogida del producto de ácido nucleico de la amplificación; y
- (iii) la determinación de la secuencia del ácido nucleico del producto.

10 El par de iniciadores específicos para el grupo usado puede determinarse basándose en el tipo de grupo del sujeto, tal como se determina usando el primer procedimiento anteriormente descrito. En realizaciones preferentes de la invención, pueden usarse iniciadores de regiones no traducidas específicos para el grupo que abarcan una región del locus del HLA que contiene una secuencia específica para el alelo. Si un sujeto es heterocigótico, se realizan reacciones de amplificación separadas para cada grupo identificado. La secuenciación puede realizarse usando iniciadores de secuenciación para los grupos que se superponen que funcionarán para varios grupos.

15 De acuerdo con la tercera serie de realizaciones, la presente invención suministra un procedimiento para determinar el tipo de grupo del HLA Clase II que es parte del locus HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 o -DRB5, o el tipo alélico de un sujeto, que comprende

- (i) la combinación de un par de iniciadores de oligonucleótidos específicos para el grupo con una muestra de ADN diana de un sujeto bajo condiciones tales que pueda producirse esa amplificación basada en el iniciador del ADN diana, en donde los iniciadores son como se define en las reivindicaciones;
- 20 (ii) la hibridación del producto de ácido nucleico de la amplificación con una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia;
- (iii) la determinación de si la sonda de oligonucleótidos se ha hibridado con el producto de amplificación; y
- (iv) la asignación, dependiendo del oligonucleótido específico, de un grupo o tipo alélico al producto de amplificación.

25 En una realización adicional preferente de la presente invención es posible usar un par de iniciadores de regiones de intrones que son específicos para varios loci. Por ejemplo es posible diseñar pares de iniciadores que sean específicos para varios loci, preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en -DRB1, -DRB3, -DRB4 y / o -DRB5. Alternativamente, también es posible usar un par de iniciadores de regiones intrónicas que sea específico para un solo locus.

30 La sonda de oligonucleótidos que se usa para la hibridación con el producto de amplificación es preferentemente específica para el grupo, mediante lo cual pueden usarse cualquiera de los motivos derivados de un exón o de los motivos derivados del intrón o intrones correspondientes.

35 A continuación se da una descripción más detallada de la invención. La mayoría de los alelos de los loci clásicos de los genes del HLA Clase II (que constan esencialmente de genes del HLA-DRB) pueden diferenciarse basándose solamente en el exón 2. En una realización no limitativa, un procedimiento de la invención se aprovecha de este hecho y emplea la estrategia anteriormente descrita de forma general, usando el ejemplo del HLA-DRB.

40 Se prepara una muestra de ADN genómico a partir de una muestra del paciente de acuerdo con técnicas bien conocidas. Entonces pueden hacerse reaccionar alícuotas del ADN genómico de forma separada con un par de iniciadores de regiones de exones específicos para el grupo, en donde la amplificación exitosa de un fragmento de ADN se asocia con un tipo de grupo en particular.

45 Cada par de iniciadores en el combinado amplificará solamente grupos alélicos seleccionados ya que al menos uno de ellos se hibrida específicamente con los motivos de las secuencias de intrones específicos para el grupo. Entre ellos, bajo condiciones adecuadas de reacción de la cadena de polimerasa (PCR), el combinado puede amplificar todos los grupos HLA-DR o HLA-DRB conocidos, teniendo cada producto de amplificación específica para el grupo una longitud diferente. Cuando se separan los productos de reacción sobre un gel de agarosa, el o los grupos presentes en la muestra del paciente pueden identificarse mediante su longitud.

50 Opcionalmente, una vez que se determina la especificidad del grupo, puede determinarse la secuencia directa de alelos para una identificación alélica precisa. Una parte adicional del ADN de la muestra del paciente puede tratarse bajo condiciones de PCR con un par de iniciadores que sean específicos para el grupo previamente

determinado; preferentemente dichos iniciadores son iniciadores de regiones no traducidas específicos para el grupo, que abarcan mayores distancias del locus. Si se detectasen dos grupos, entonces se realizan dos reacciones separadas. A la finalización de la segunda amplificación, los productos de reacción son secuenciados usando un "iniciador de secuenciación" basado en el intrón que hibrida una secuencia de intrón que puede conservarse entre los alelos de varios grupos. Aunque teóricamente es posible usar un iniciador de secuenciación que sea específico solamente para el grupo amplificado, se ha hallado que el uso de un iniciador de superposición del grupo simplifica el procedimiento y la preparación de un equipo. Se suministran específicamente diferentes iniciadores de secuenciación de superposición de grupos que hibridan, respectivamente, con las secuencias de intrones que flanquean el terminal 5' del exón 2 y el terminal 3' del intrón 2.

La principal ventaja de procedimiento de la invención es que la amplificación inicial específica para el grupo permite una separación basada en la PCR de haplotipos en un 95 % de muestras de pacientes. La separación de los haplotipos es la principal consecución de este protocolo ya que permite la resolución de enlaces cis / trans de resultados heterocigotos de secuenciación y no puede conseguirse con otros protocolos. Con la presente invención, puede conseguirse una separación de los haplotipos en muestras heterocigóticas serológicas con mezclas de iniciadores de secuenciación ("PM") usando amplificación específica para el grupo que se corresponda con las familias serológicas. La selección de las PM usadas para la secuenciación depende de los modelos de amplificación de la precedente tipificación de baja resolución de PCR-SSP. Los iniciadores se diseñan para trabajar dentro de un protocolo de un solo ciclo incluyendo, aunque no en sentido limitativo, un protocolo PCR sobre un Perkin Elmer System 9600, manteniendo las capacidades de tipificación del laboratorio. Todos los productos de la PCR llevan información de secuencia suficiente para una subtipificación completa. Esta aproximación es superior a un sistema de tipificación que use un único par de iniciadores genéricos siguiendo con la secuenciación directa o la hibridación SSO, incluso si la estrategia de amplificación es específica para el locus. La ventaja substancial de la tipificación basada en la secuenciación (SBT) es la definición del enlace cis / trans de motivos de secuencias. La SBT después de la amplificación genérica de la PCR no puede definir el enlace cis / trans de motivos de la secuencia y por lo tanto la oligotipificación de miméticos. El número rápidamente creciente de alelos recientemente identificados confirma que los nuevos alelos surgen principalmente de eventos de conversión de genes que habitualmente han tenido lugar entre diferentes alelos del mismo locus. Los alelos recientemente identificados no se caracterizan por nuevos motivos de secuencias sino por una nueva combinación de motivos de secuencias ya existentes. A partir de esta observación debe concluirse que la cantidad de alelos en cada locus puede representar, en teoría, todas las combinaciones posibles de motivos de secuencias conocidos. Por supuesto, algunos de ellos caerán víctimas de una selección negativa. Sin embargo, puede esperarse que todavía estén sin identificar una enorme cantidad de alelos. Las estrategias de subtipificación de PCR-SSP que usan un número restringido de oligonucleótidos que no cubren todos los posibles motivos de secuencias sufren de esta limitación. Si no está definido el enlace cis / trans de las regiones polimórficas analizadas, nuevos alelos pueden ser erróneamente tipificados como una combinación heterocigótica de alelos conocidos. Esto tiene consecuencias con respecto a las estrategias de la SBT. Un resultado de tipificación ambiguo de la SBT después de una amplificación de PCR genérica es solamente ambiguo con respecto al banco de datos de secuencias de HLA actualmente conocidas.

En general, los iniciadores específicos para el grupo se diseñan, de forma deseable, para facilitar la hibridación de sus dianas previstas. Debe tenerse en cuenta que puede existir homología entre grupos diferentes, y sin duda entre motivos específicos para el grupo. Consecuentemente en realizaciones preferentes de la invención, un iniciador puede diseñarse de manera que hibride con su diana de grupo bajo condiciones relativamente rigurosas. Por ejemplo, uno o más residuos desemparejados pueden modificarse genéticamente dentro de dominio 3' de la molécula. Además, el iniciador puede diseñarse de manera que no sólo se diferencie de cualquier secuencia de consenso o que se produzca de manera natural, sino que tenga desemparejamientos insertados que sirvan para reducir adicionalmente la hibridación del iniciador con el ADN diana de un grupo diferente del grupo diana previsto. Bajo ciertas circunstancias, pueden introducirse uno o más desemparejamientos en el terminal 5' para desestabilizar las horquillas internas; generalmente no se espera que tales cambios mejoren la eficiencia del iniciador.

Las secuencias de ácido nucleico con SEQ ID NOS: 2 - 23 y 70 - 86 tal como se dan en la figura 3 pueden estar comprendidas en iniciadores de regiones no traducidas específicos para el grupo para el HLA-DRB, que son específicos para los grupos que se indican en la figura 4.

En general, los anteriores iniciadores específicos para el grupo pueden modificarse mediante adición, eliminación o sustitución de bases, para producir iniciadores funcionalmente equivalentes con básicamente la misma especificidad, es decir, de manera que no se eliminen el o los polimorfismos específicos para el grupo. Dichas modificaciones pueden estar constreñidas por diferentes parámetros. Primero, el emparejamiento exacto en el terminal 3' es particularmente importante para la extensión del iniciador. Preferentemente, al menos 5 nt son complementarios con el ADN diana. Cuando la región exactamente conservada es corta, por ejemplo, inferior a 10

nt, no es aconsejable cambiar las secuencias del iniciador. El iniciador es preferentemente inferior a un 50 % G o C. También los iniciadores deberían diseñarse para evitar la hibridación específica con pseudogenes. En los ejemplos que siguen, la temperatura de fusión de todos los iniciadores usados fue de aproximadamente de 62 °C para asegurar condiciones uniformes de aplicación.

- 5 En una realización adicional preferente de la presente invención se realiza una pretipificación. En el curso de esta pretipificación se comprueba qué grupos están presentes en el paciente. A causa de los cromosomas diploides, solo son posibles dos grupos. Si fuera posible usar todas las mezclas de iniciadores en ensayos paralelos con una sonda y posteriormente se comprobase qué mezcla de iniciadores ha dado como resultado un producto de amplificación, entonces este producto podría secuenciarse. En una realización preferente, se efectúa una
- 10 pretipificación usando mezclas de iniciadores situadas dentro del segundo exón. Esas mezclas de iniciadores amplifican sólo un pequeño fragmento del exón 2 específico para el grupo. Estas mezclas de iniciadores, sin embargo, no son adecuadas para la secuenciación ya que contienen sólo una pequeña parte de la variabilidad del exón y mediante secuenciación no se obtiene información adicional. Los iniciadores se muestran en la figura 5. Las secuencias de los iniciadores divulgados en la figura 5 se muestran en la figura 6.
- 15 En esta realización de la presente invención, se efectúa una pretipificación usando los iniciadores situados en el exón y en un segundo paso se usa la mezcla de iniciadores mostrada en la figura 4 para la preparación de la plantilla. Esto es posible ya que hay una correlación estricta entre las secuencias intrónicas y las secuencias exónicas.
- 20 La selección de iniciadores de secuenciación universales y adecuados está constreñida por varias reglas incluyendo las siguientes. Los sitios de hibridación de los iniciadores de secuenciación deben descansar dentro del fragmento amplificado por los iniciadores de amplificación específico para el grupo. Todos los iniciadores se seleccionan adecuadamente para suministrar una secuencia informativa y no empezar demasiado lejos en dirección 5' de la secuencia útil. Los iniciadores preferentes hibridan con los sitios conservados cerca de los límites de los exones / intrones.
- 25 Un asunto importante de la secuenciación directa para los genes del HLA Clase II es la generación de un producto específico de PCR, lo que es bastante complicado debido a las homologías de las secuencias extensivas entre los diferentes loci del HLA Clase II que incluyen varios pseudogenes. Si se ha generado un producto de PCR adecuado, sería aplicable cualquier química de secuenciación.
- 30 En el caso normal, ya que las amplificaciones específicas para el grupo tienen lugar antes de la secuenciación, solamente se secuencia un alelo a la vez, obteniéndose resultados ambiguos de secuenciación homocigótica. En estos casos, los alelos son relativamente fáciles de identificar, incluso sin software.
- 35 Sin embargo, en aproximadamente el 5 % de los casos, ambos alelos vienen del mismo grupo, pero la secuencia muestra heterocigosidad. En la práctica, cuando se ve mediante un sistema de detección de fluorescencia, la muestra aparece como una secuencia normal de bases con, esporádicamente, dos bases en un sitio, cada una con la mitad del peso pico. Este resultado viene del alto grado de similaridad compartida entre todos los alelos de cada gen del HLA; la heterocigosidad de la secuencia se deriva de las sustituciones de bases. La laboriosa tarea de determinar qué alelos están presentes en la secuencia de ensayo puede simplificarse usando análisis informáticos. Un programa de software, por ejemplo GeneLibrarian (que puede obtenerse en Visible Genetics) compara rápidamente la secuencia de ensayo con una base de datos que incluye todas las posibles combinaciones de
- 40 homocigotos y heterocigotos de los alelos. El programa identifica aquellas secuencias almacenadas que coinciden con más exactitud con la secuencia de ensayo. El operador puede determinar entonces qué par alélico está en la muestra de ensayo. Si ningún par alélico presenta una concordancia exacta, el software permite que el operador revise la secuencia de ensayo para determinar si errores en la llamada a la base u otros dispositivos están interfiriendo con el análisis.
- 45 El orden de las reacciones de secuenciación puede ser seleccionado por el operador. Cada exón de cada locus puede ser secuenciado sobre el filamento sentido o sobre el filamento antisentido. Un procedimiento preferente es obtener la secuencia de un filamento a partir del exón. Si los resultados contienen ambigüedades, entonces se resecuencia el amplicón usando el otro iniciador para el mismo exón. La disponibilidad de ambos iniciadores de secuenciación suministra redundancia para asegurar resultados consistentes.
- 50 En algunos casos, puede ser ventajoso emplear una mezcla equimolar de dos o más especies de oligonucleótidos. Pueden seleccionarse mezclas de oligonucleótidos de manera que entre ellas inicien de forma efectiva las reacciones de secuenciación para todos los alelos del locus en el mismo sitio.

En una técnica alternativa, en vez de usar terminadores coloreados, puede emplearse un iniciador etiquetado con colorante. En este caso, los iniciadores de secuenciación seleccionados están etiquetados sobre el terminal 5' con

una etiqueta detectable, usando técnicas de fosforamidita o de ésteres de NHS / colorante, bien conocidas en la técnica. La etiqueta seleccionada depende del instrumento de detección empleado. La etiqueta para su uso con un sistema OpenGene (Visible Genetics Inc., Toronto, ON) es el fluoróforo Cy5.5 (Amersham Life Sciences, Cleveland, OH). Puede usarse para la detección fluorescein-isotio-cianato con el secuenciador automático ALF Automated Sequencer (Pharmacia, Piscataway, NJ). En este procedimiento que es bien conocido por aquellos expertos en la materia, la mezcla de la reacción de secuenciación se cambia ligeramente para incluir solamente un ddNTP por mezcla de reacción. Para la detección de los productos de la reacción, la muestra puede mezclarse con un volumen igual de neutralizador de carga (5 % de ficoll más un tinte coloreado). Puede cargarse 1,5 µl de estas muestras en cada carril de una casete de electroforesis de MicroGel cargada en un secuenciador automático de ADN MicroGene Blaster (Visible Genetics Inc., Toronto). La muestra puede sufrir un procedimiento de electroforesis y ser leída.

Los resultados pueden mostrarse y analizarse con software GeneObjects. Puede determinarse la secuencia de bases e identificarse entonces el alelo del HLA con el cual se corresponde la secuencia. Este proceso puede realizarse en cada locus (HLA - DRB1 - 5) y los resultados pueden ser comunicados al archivo del paciente.

Es bien conocido en la técnica que pueden emplearse diferentes variaciones de química de secuenciación con diferentes instrumentos de secuenciación automática del ADN. Instrumentos de colorante único, tales como el OpenGene System (Visible Genetics Inc., Toronto), el ALF Express (Pharmacia, Uppsala, Suecia) o el Li-Cor 4000L (Lincoln City, Nebraska) generalmente usan iniciadores etiquetados con colorantes. En estos sistemas se emplea una mezcla de reacción de secuenciación de terminación de cadena simple por cada carril.

Secuenciadores de múltiples colorantes, tales como el Prism 377 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California) detectan múltiples colorantes en un solo carril. Esta tecnología emplea convenientemente química de terminador coloreado, en la que los nucleótidos de terminación de cadena están ellos mismos etiquetados con fluoróforos (consulte la patente de EE.UU. núm. 5.332.666, de Dupont de Nemours and Company). En este caso, los productos de reacción que llevan cuatro etiquetas diferentes pueden emplearse en un solo carril.

Puede emplearse química bien de colorante único o bien de colorantes múltiples de acuerdo con la presente invención junto, con otras químicas de secuenciación.

Los ácidos nucleicos anteriormente descritos pueden estar incluidos en un equipo para su uso en la puesta en práctica de los procedimientos de la invención. Además de los iniciadores específicos para el grupo y de los pares de iniciadores presentados, dichos equipos pueden comprender además neutralizadores, radiactivos y enzimas, tales como enzimas de amplificación incluyendo, aunque no en sentido limitativo, TaqPolimerasa. En realizaciones específicas no limitativas, el equipo puede comprender iniciadores de regiones de exones específicos para el grupo (por ejemplo, en forma de un "combinado" que comprenda una pluralidad de iniciadores) así como iniciadores de regiones no traducidas específicos para el grupo; dichos iniciadores pueden estar contenidos en tubos individuales. Procedimientos de tipificación de alta resolución se detallan a continuación en los ejemplos, dichos ejemplos se proponen para ejemplificar el procedimiento de la invención y no limitan su alcance de ningún modo.

Los genes del HLA - DRB tienen un tamaño de aproximadamente 12 KB. Aproximadamente el 93 % de los genes está constituido por secuencias no codificantes, mientras que solo 801 pb desde el exón 1 hasta el exón 6 llevan la información codificante, representando menos del 7 % de nucleótidos de los genes. El polimorfismo de la región codificante está exclusivamente restringido al dominio β1 que codifica el exón 2 que representa la realización preferente de la presente invención.

Basándose en la diversidad de este exón 2 pueden distinguirse 216 alelos del HLA - DRB1, 3, 4 y 5 de acuerdo con al menos el último informe de nomenclatura WHO [Tissue Antigens (1997), vol 49, pág. 297–321]. Esto da una gran comprensión de la capacidad que presenta el péptido de la población humana y puede esperarse la identificación de un tremendo número de alelos en el futuro.

A pesar del profundo conocimiento de las diferentes regiones codificantes nada se sabe acerca de las secuencias de intrones intervinientes.

Las secuencias de intrones del HLA - DRB no están caracterizadas por mutaciones puntuales aleatorias sino por una alta diversidad sistemática, reflejando los diferentes linajes del DRB. Con unas cuantas menos excepciones que en el HLA Clase I, la variabilidad se detiene al nivel de la diversidad serológica sin casi variaciones de secuencias entre los subtipos del mismo grupo serológico.

Las pocas variaciones intragrupo detectadas en DRB1*15 (1502 y 1503), DRB1*13 (1302, 1303, 1305) y DRB1*08 (0803) así como en los alelos DRB4 y 5 lo son con las excepciones en DRB1*13 (nucleótidos 54 y 370) y DRB4*0101 (posición 61 del nucleótido), todas mutaciones de punto único que no pueden explicarse mediante eventos de recombinación intrónicos o interlinajes. Estas desviaciones no afectan a los motivos de los sintrones

específicos para el grupo. Las diferencias halladas en los alelos de DRB3 se incorporan con el carácter relacionado con la serología de la diversidad intrónica, mostrando diferencias de secuencias de entre DR52a, 52b y 52c, pero no entre dos alelos que pertenecen a DR52b (DRB3*0201 y 0202).

5 En el curso de la presente invención no se han hallado evidencias de que eventos de recombinación que diversifican los exones estén involucrados en las regiones de los intrones. Sin embargo, esto no puede excluirse completamente.

10 La sorprendente conservación dentro de cada linaje ancestral sugiere que esas mutaciones de punto se han seleccionado negativamente. Consecuentemente puede asumirse que los intrones llevan una relevancia funcional y que no están tan sujetos a las fuerzas de diversificación evolucionaria como los exones. Basándose en los hallazgos de la presente invención puede esperarse que los motivos relacionados con la serología en las regiones no codificantes sean altamente conservados, incluso si no están disponibles las secuencias de intrones de todos los alelos. Cualquiera que sea su función mantiene estrictamente la variabilidad, que se relaciona con los exones, de las secuencias de intrones.

15 Los hallazgos de la presente invención tienen consecuencias substanciales para las estrategias de tipificación basadas en la PCR. Nuevos alelos a menudo provocan diseños de amplificación ambiguos en protocolos de PCR basados en exones y por lo tanto demandan una actualización regular del sistema de tipificación. Esto se ha experimentado en el HLA Clase I y en la tipificación durante los últimos años y seguramente continuará con la detección permanente de nuevos alelos.

20 El procedimiento de amplificación restringido a los intrones de la presente invención no padecerá probablemente estas limitaciones. Basándose en los datos de los intrones ahora disponibles, se asume que los nuevos alelos se corresponderán con los motivos de secuencias de intrones ya descritos. Por lo tanto, estos motivos se seleccionan como sitios de iniciación para la amplificación por PCR específica para el grupo.

Ejemplo 1

En los ejemplos que ilustran la presente invención se usaron las siguientes condiciones:

25 a) Muestras de ADN

Se preparó ADN genómico mediante un procedimiento de remoción de sales estándar. Se analizó un conjunto de 25 líneas de células B linfoblastoides en su mayoría bien definidas del noveno y décimo taller de histocompatibilidad internacional y 191 muestras clínicas tipificadas mediante PCR, que representaban todos los antígenos serológicos del HLA - DRB de diferentes entornos étnicos y sus subtipos más frecuentes.

30 b) PCR e iniciadores de secuenciación

35 Para la secuenciación de las regiones no codificantes, se llevó a cabo una preparación de plantilla basada en la PCR, específica para el haplotipo, mediante el uso de un iniciador genérico de ubicación intrónica (19mer, 5'AgC ggA gTg gAg Agg TCT g 3' [SEQ ID No. 1] e iniciadores específicos para el grupo o los alelos en el segundo exón. El diseño del iniciador genérico 5' recayó sobre el muy limitado número de secuencias del intrón 1 disponibles en el banco de datos EMBL. Los productos resultantes llevaban, dependiendo del alelo amplificado, aproximadamente 600 pb del primer intrón de un alelo simple flanqueado por extensiones variables de secuencias del segundo exón. Los iniciadores de la PCR y varios iniciadores anidados se aplicaron como iniciadores de secuenciación.

c) Condiciones de la PCR

40 La mezcla de reacción de la PCR en un volumen final de 50 µl constaba de 500 ng de ADN genómico, neutralizador de PCR [60 mM Tris-HCL, pH 9,5; 3,5mM MgCl₂; 15mM (NH₄)SO₄], 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP y 2.0 U de ADN Taq polimerasa (Amplitaq®, Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza). Para secuenciar el primer intrón se generaron productos de PCR biotinilados usando 10 p mol de iniciador genérico 5' biotinilado y 15 p mol de iniciadores 3' no etiquetados. Las amplificaciones de la PCR se efectuaron en un GeneAmp System 9600 (Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT). Todas las mezclas de iniciadores trabajaron con el mismo perfil de PCR.

45 Después del paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 20 minutos, las mezclas se expusieron a 15 ciclos de dos temperaturas, cada uno de los cuales consistía de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento y extensión a 65 °C durante 50 segundos, seguidos por 20 ciclos de 3 temperaturas con una temperatura de alineamiento disminuida de 61 °C y una extensión a 72 °C durante 30 segundos. Para la visualización, se procesaron 8 µl del producto de amplificación sobre un 2 % de gel de agarosa pretintado con bromuro de etidio (0,2 µg/ml).

50

d) Secuenciación de productos de la PCR

La secuenciación de los productos de la PCR se realizó usando química de secuenciación de ciclo FS de polimerasa de ADN Amplitaq® y reactivos de terminación de dideoxinucleótidos etiquetados con fluorescencia específicos de base (terminadores colorantes).

Los productos de la PCR se purificaron mediante microesferas Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna, Oslo, Noruega) paramagnéticas revestidas de streptavidina. El producto biotinilado se unió a estas microesferas incubando 40 µl del producto de la PCR durante 15 minutos con 400 µg de Dynabeads a 40 °C. Las microesferas habían sido previamente lavadas y suspendidas en 40 µl de neutralizador de unión y lavado (B&W) (2 x neutralizador: 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 1 mM EDTA). Después de la incubación, los productos de la PCR se lavaron dos veces en neutralizador B&W y se resuspendieron en 20 µl de dH₂O. Para la reacción de secuenciación, 1 µl de producto purificado de la PCR se mezcló con 3 pmoles de iniciador de secuenciación y 8 µl de Terminador Ready Reaction Mix que contenía ddNTP y alfa-tio dNTP etiquetados (Applied Biosystems Foster City, CA). El final de la reacción se ajustó a 20 µl con dH₂O. La secuenciación de ciclos se efectuó en un GeneAmp PCR System 9600 durante 25 ciclos. Después de un paso de desnaturalización inicial a 96 °C durante 10 segundos, se hizo descender rápidamente la temperatura hasta 50 °C y se mantuvo durante 5 segundos, siguiendo con el paso de extensión a 60 °C durante 4 minutos. Durante la eliminación subsiguiente de los nucleótidos etiquetados con colorante se usaron columnas Sphadex G-50 ADN grado F (Columnas MicroSpin G50, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El sedimento se secó en un centrifugador de vacío y se resuspendió en 4 µl de neutralizador de carga que contenía formaldehído desionizado / 25 mM EDTA; pH 8.0 (5:1) y dextran Blue (solución de 50 mg/ml). Las muestras se calentaron durante 2 minutos a 90 °C para desnaturalizarlas y se cargaron 1,5 µl sobre un gel de urea de poli(acrilamida - 7M al 5 % de 0,2 mm de grueso. La electroforesis se efectuó a 48 vatios constantes durante 8 horas en un secuenciador de ADN automático ABI 377 (Applied Biosystems, versión de software 2.1.1).

Ejemplo 2

Alineamiento de las primeras secuencias de intrones

Se secuenciaron todas las líneas celulares y muestras clínicas para las regiones investigadas en ambas direcciones. Cada uno de los grupos serológicos definidos se analizó varias veces en muestras no relacionadas según se indica en la figura 1 (parte primera). Los alelos raros solo pudieron secuenciarse una o dos veces debido a su limitada disponibilidad. La figura 1 muestra, desde el intrón 1 con un tamaño de 6.400 pb, el alineamiento de secuencia del fragmento del terminal 3' de 486 pb directamente en dirección 5' del exón 2 y del consenso deducido de los loci codificantes del HLA-DRB. El acuerdo de los nucleótidos con el consenso se indica mediante un guión (-), los asteriscos (*) se introducen para conseguir un alineamiento máximo. Los números por encima de las secuencias se refieren a las posiciones de los nucleótidos y el inicio del terminal 5' del fragmento secuenciado del intrón 1 de 6400 pb.

Las secuencias intrónicas resultaron ser altamente polimórficas. Aparte de las homologías extensivas, pudieron identificarse numerosos sitios específicos para el grupo y para el locus incluyendo extensiones de eliminaciones de nucleótidos. La mayoría de los motivos polimórficos o eliminaciones están relacionados con familias serológicas. Esta especificidad del linaje es la característica más remarcable de las secuencias intrónicas. Más allá de esto, hay relaciones estrechas entre los alelos HLA-DRB1 que pertenecen al mismo grupo de haplotipos, es decir los alelos de los grupos asociados DR51, DR52 y DR53. La similitud más alta de secuencias se ha encontrado en los alelos asociados DR51 de DRB1*15 y 16. En los grupos asociados DR53 DRB1*0701 y DRB1*0901 están más cerca entre sí que uno de ellos con DRB1*04. Los alelos asociados DR52 exhiben fuertes homologías con la excepción de DRB1*12 que exhibe numerosos motivos individuales. Los alelos DRB1*11 y DRB1*13 están más cerca entre sí que uno de ellos con los alelos DRB1*14.

Con dos excepciones, para los grupos serológicos se ha identificado al menos un motivo de secuencia único no compartido por ningún otro grupo. Los alelos DRB1*11 no exhiben ningún motivo que sea más específico que los motivos comunes del grupo DRB1 asociado con DR52. Los motivos individuales en DRB1*16 son compartidos con los alelos DRB1*04 en la posición 141 y con los alelos DRB5 en la posición 181.

Las secuencias resultaron tener una estabilidad extensiva con cada linaje. Los motivos de secuencia individuales de alelos que pertenecen al mismo grupo DRB1 serológicamente definido son excepciones a la regla. Se han hallado diferencias alélicas simples de nucleótidos en el grupo DRB1*15 entre las posiciones 211 - 220. En el grupo DRB1*13, el DRB1*1302 soporta la secuencia de consenso en la posición 54 y un motivo único en la posición 328, el DRB1*1302 y 1305 carecen del motivo específico DR13 en la posición 370. En el grupo DRB1*08 el DRB1*0803 tiene un motivo único en la posición 342.

Los alelos DRB3 siguen la misma regla con homologías completas de las secuencias intrónicas dentro de los grupos serológicamente definidos DR52a, b y c, pero diferencias claramente únicas entre ellos. Dentro del grupo

DRB4, algunos motivos individuales podrían estar definidos en el alelo DRB4*0101 (posiciones 2, 27, 61 y 412). Entre los dos alelos DRB5 secuenciados hasta el momento (DRB5*0101 y 0202) para su primer intrón pueden identificarse cuatro diferencias (posiciones 49, 287, 305 y 438).

La figura 3 muestra iniciadores diferentes que se usaron preferentemente para la amplificación y secuenciación de los especímenes a clasificar. La figura 4 muestra una compilación de diferentes iniciadores y su uso en la determinación de genes del HLA Clase II o de genes del HLA-DRB diferentes.

Ejemplo 3

Para tipificar el grupo de un paciente, en un primer paso se aísla el ADN de una muestra de sangre. El ADN aislado se comprueba en el primer paso con un sistema de tipificación de baja resolución que contiene 24 mezclas de iniciadores (según se muestra en la figura 5). Este procedimiento puede denominarse "PCR - SSP". La abreviatura "SSP" significa iniciador específico para la secuencia ya que el iniciador es específico para ciertos motivos de secuencias y solamente si están presentes esas secuencias en el ADN obtenido del paciente se obtiene una amplificación del ADN. La información obtenida por este tipo de amplificación se obtiene por lo tanto de forma simple a partir de la presencia o ausencia de un producto de amplificación que puede obtenerse realizando las diferentes amplificaciones en paralelo.

En el presente ejemplo se obtuvo una amplificación usando la mezcla de iniciadores 1.1, 15 y 24. Esto significa que el paciente muestra el tipo serológicamente equivalente HLA-DR1, 15; DR51.

En el siguiente paso, han de determinarse los alelos de DRB1*01, DRB1*15 y DRB5*. Por lo tanto, se usan mezclas de iniciadores adecuadas como las presentadas en la figura 4 para preparar productos adecuados para la secuenciación. En el presente ejemplo se usaron mezclas de iniciadores números 1, 2 y 13. Después de la amplificación se usaron los iniciadores de secuenciación mostrados en la figura 4.

Usando este procedimiento pudo obtenerse del paciente el siguiente tipo: HLA - DRB1*0102; 1501; DRB5*0202.

Una tipificación tal como se describe en el presente ejemplo tiene la ventaja de que el enlace cis / trans de las mutaciones en el exón 2 puede ser identificado. Muchos alelos diferentes del gen RB no están caracterizados por motivos de secuencias específicos sino por una compilación diferente seleccionada entre un conjunto de motivos de secuencias. Si no se amplifican los alelos simples en lotes simples sino ambos alelos juntos (en el presente ejemplo DRB1*0102 y 1501) se obtienen diferentes posiciones heterocigotas mediante secuenciación. A partir de estos resultados no puede concluirse qué posiciones están enlazadas sobre un cromosoma y qué posiciones pertenecen al otro cromosoma. En estos casos la tipificación se hace usando software adecuado que comprueba todos los enlaces cis / trans posibles con el banco de datos de secuencias más reciente. En el caso de que posteriormente se descubran nuevos alelos puede ocurrir que el tipo ya no sea correcto ya que el banco de datos de secuencias futuro que comprende alelos adicionales puede no encontrar ahora tampoco posibles enlaces cis / trans. Este es un problema muy común de las técnicas de secuenciación conocidas y también el problema de la "PCR-SSO". El término "SSO" significa hibridación con oligonucleótidos específicos para la secuencia. En este procedimiento el producto de la PCR obtenido después de una amplificación específica para el locus que comprenda habitualmente al menos dos alelos, se comprueba con muchos oligonucleótidos diferentes sobre la base de los motivos de secuencias así obtenidos y basándose en el banco de datos de secuencias se deduce una tipificación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biotest AG

<120> Procedimiento para la determinación del locus del antígeno de histocompatibilidad clase II.

<130> 159/EP-DIV

<150> EP97110438.5

<151> 1997-06-26

<160> 95

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 1
 10 agcggagtgg agaggtctg 19

<210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

<400> 2
 tcccaggagg aggcggga 18

<210> 3
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

<400> 3
 25 agcgcccgca ccccgct 17

<210> 4
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> ADN

<400> 4
 aaaagcctgg ggatcagaag t 21

<210> 5
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

<400> 5
 45 gccctgggc tgcgtgtt 18

<210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ADN

 <400> 6
 10 tggtagggcgt tgcggcg 17

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> ADN

 <400> 7
 agtgtcttct caggaggcca 20

 20 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> ADN

 <400> 8
 tgggagctttg cggcgggc 18

 30 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> ADN

 <400> 9
 gagcccctgg gctgcaga 18

 40 <210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 45 <400> 10
 gcgggtgggg ccgggtc 17

 <210> 11
 <211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> ADN

 <400> 11
 agcgcaggcc aggcacaaa 19

 <210> 12
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> ADN

 <400> 12
 ggatggtggc gtctctgtt 19

 <210> 13
 <211> 17
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 25 <400> 13
 ggcgttgccg gtgggcg 17

 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 <400> 14
 35 ccccgttcgc ctcaggaaa 19

 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> ADN

 <400> 15
 cctcaggaag actgaggac 19

 45 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

5 <400> 16
 ccagaatagg ctggaggcg 19

<210> 17
 <211> 20
 10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ADN

<400> 17
 gccgctgcac tgtgaagctc 20

<210> 18
 <211> 18
 20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

25 <400> 18
 gcccggtgta ccggatcc 18

<210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

35 <400> 19
 ccgccctgtg accggatg 18

<210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> ADN

<400> 20
 ggatcgttcg tgtccccac 19

45 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> ADN

<400> 21
 ccggaggccg cttctgta 18

 5 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

 10 <223> ADN

 <400> 22
 cgcccctgtg accggatc 18

 15 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> ADN

 <400> 23
 gctgtcagtg tcttctcagg 20

 25 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 30 <400> 24
 cttgtggcag cctaagttg aa 22

 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 <400> 25
 40 cctgtggcag cctaagagg 19

 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> ADN

 <400> 26
 agtactctac gggtgagtg t 21

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ADN
 <400> 27
 10 gagtactcta cgggtgagtg tt 22
 <210> 28
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 20 <400> 28
 gacggagcgg gtgcgga 18
 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 <400> 29
 30 cgggtgcggt tctggag 18
 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> ADN
 <400> 30
 gtttcttga gcaggtaaa ca 22
 40 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> ADN
 <400> 31
 ggtgcagttc ctggaaagac t 21
 50 <210> 32
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN

5 <400> 32
gtttcttgga gtactctacg tc 22

<210> 33

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

<220>
15 <223> ADN

<400> 33
cataaccagg aggagctcc 19

<210> 34
<211> 22
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN

25 <400> 34
ggacagatac ttccataacc ag 22

<210> 35
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN

<400> 35
35 ggagagatac ttccataacc ag 22

<210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> ADN

<400> 36
cttcataac caggaggagt t 21

45 <210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

 <400> 37
 acagcacgtt tcttgagct 20

 5 <210> 38
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> ADN

 <400> 38
 gtgcggttcc tgcacagag 19

 <210> 39
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 20 <400> 39
 gttcctggac agatacttct atc 23

 <210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 <400> 40
 30 ggttcttgg agtactctac gt 22

 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> ADN

 <400> 41
 gatcgttcgt gtccccacag 20

 40 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> ADN

 <400> 42
 cacagcacgt ttcttgagg 20

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ADN
 <400> 43
 10 acggagcggg tgcggttc 18
 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> ADN
 <400> 44
 ccgcctctgc tccaggag 18
 20 <210> 45
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> ADN
 <400> 45
 cccgctcgtc ttccaggat 19
 30 <210> 46
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> ADN
 <400> 46
 tccaccgcgg cccgcgc 17
 <210> 47
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 45 <400> 47
 taggtgtcca ccgcggcg 18
 <210> 48
 <211> 19
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN

5 <400> 48
 tgcagtaggt gtccaccag 19

10 <210> 49
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ADN

 <400> 49
 tccaccgcgg cccgctc17

20 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

25 <400> 50
 tctgcagtag ttgtccaccc 20

30 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

35 <400> 51
 accccgtagt tgtgtctgca cac 23

40 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 <400> 52
 ctgttcaggt actcggcgct 20

45 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

<400> 53
 ctgcactgtg aagctctcac 20

5

<210> 54
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> ADN

<400> 54
 ctggctgttc cagtactcct 20

15

<210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> ADN

<400> 55
 ctgcactgtg aagctctcca 20

25

<210> 56
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

30

<400> 56
 cccgcctgtc tccaggat 19

<210> 57
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> ADN

<400> 57 18
 ccgcgcctgc tccaggat 18

40

<210> 58
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> ADN

<400> 58 19
 cccgcctgtc ttccaggaa 19

 <210> 59
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 10 <400> 59 19
 cccgctcgtc ttccaggaa 19

 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 20 <400> 60 20
 ctcgctgttc cagtactcgg 20

 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> ADN

 <400> 61 21
 tctcgctgtt ccagtactca g 21

 30 <210> 62
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> ADN

 <400> 62
 cacctcggcc cgcctcc 17

 <210> 63
 40 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> ADN

 <400> 63
 caccgcggcc cgcctct17

<210> 64
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ADN
 <400> 64
 gtccaccgcg gcgcgctt 18
 10
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> ADN
 <400> 65
 ctgcagtagg tgtccaccag 20
 20
 <210> 66
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> ADN
 <400> 66
 ctgttcagtg gctccgcag 19
 30
 <210> 67
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 35
 <400> 67
 cgtagttgtg tctgcagtaa t 21
 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 40
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 <400> 68
 45 ctccacaacc ccgtagttgt a 21
 <210> 69
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> ADN
 <400> 69
 ccgctgcact gtgaagctct 20
 <210> 70
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 15 <400> 70
 tccagtgcc cgcaccct 18
 <210> 71
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 <400> 71
 25 ggtgggtgct gttgaaggt 19
 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> ADN
 <400> 72
 agcactaagg aagggttcag 20
 35 <210> 73
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> ADN
 <400> 73
 gggatcagag gtagttttc ca 22
 <210> 74
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN

 <400> 74
 aacaggctgg aggtaggac 20

 5 <210> 75
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> ADN

 <400> 75
 tggtaggcgt tgcggcg 17

 <210> 76
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 20 <400> 76
 gtgggcgttg cggcggc 17

 <210> 77
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 30 <400> 77
 gtttccgc ctggtcct 19

 <210> 78
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> ADN

 <400> 78
 cggcgctgct gtcagtgtt 19

 40 <210> 79
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> ADN

 <400> 79
 agcgaggcc aggcacaaa 19

<210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 10 <400> 80
 cagttaaggt tccagtcca 20

 <210> 81
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 20 <400> 81
 tttcaggtga agactcccag a 21

 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> ADN

 <400> 82
 gatgagagaa ggagcagaga t 21

 30 <210> 83
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> ADN

 <400> 83
 ggcgttgccg gtgggcg 17

 <210> 84
 40 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> ADN

 <400> 84
 cacaaggtca tcactaagaa ag 22

 <210> 85
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> ADN

 <400> 85
 agcactaagg aagggtcac 20

 10 <210> 86
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> ADN

 <400> 86
 gtttcccgct ctggtcccc 19

 20 <210> 87
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> ADN

 <400> 87
 acacactcag attctccgct t 21

 30 <210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 35 <400> 88
 acacacacac tcagattctc c 21

 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN

 <400> 89
 45 tcagattccc agctcggaga 20

 <210> 90
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<223> ADN
 <400> 90
 caggccccgc cccccga 17
 5
 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN
 <400> 91 21
 15 acacacacac tcagattccc a 21
 <210> 92
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> ADN
 <400> 92
 25 acacacatac acagattccc c 21
 <210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> ADN
 <400> 93 21
 35 acacacagag tcagattccc a 21
 <210> 94
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> ADN
 <400> 94 21
 45 cacacacaca ctctcagatt t 21
 <210> 95
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> ADN
 <400> 95 19
 55 tgtcacctcc ccacagagt 19

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar el tipo de grupo del HLA Clase II que es parte del locus HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 o HLA-DRB5 de un sujeto que, comprende los siguientes pasos:
 - 5 i) combinar un par de iniciadores específicos para el grupo con una muestra de ADN diana de un sujeto bajo condiciones tales que pueda producirse la amplificación basada en los iniciadores del ADN diana; y
 - ii) determinar si se produce un producto de ácido nucleico mediante la amplificación,
 - 10 en donde la capacidad del par de iniciadores para producir un producto de ácido nucleico se asocia a un tipo de grupo de HLA en particular, **caracterizado porque** el iniciador sentido es un iniciador específico para el grupo situado dentro del intrón 1, y el iniciador antisentido está situado en el terminal 3' del exón 2 y fuera de la región variable del exón 2.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende el paso de
 - ii) determinar la secuencia de ácido nucleico del producto de ácido nucleico del paso (ii)
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el iniciador antisentido está situado en el extremo del exón 2 que no tiene variabilidad
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el iniciador antisentido tiene la secuencia nucleotida como se muestra en la SEQ ID NO: 17
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que iniciador sentido se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 hasta la 16 y la 70 hasta la 86.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el paso (iii) comprende el uso de un iniciador de secuenciación seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID. NO: 18 a 23.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el par de iniciadores se selecciona de los pares de iniciadores como se muestra en la figura 4A.
8. Un procedimiento para determinar el tipo de grupo del HLA Clase II o del tipo de alelo, que es parte del locus HLA - DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 o HLA-DRB5 de un sujeto, que comprende:
 - 25 (i) la combinación de un par de iniciadores de oligonucleótidos específicos para el grupo con una muestra de ADN diana del sujeto bajo condiciones tales que pueda producirse esa amplificación basada en el iniciador del ADN diana;
 - (ii) la hibridación del producto de ácido nucleico de la amplificación con una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia;
 - 30 (iii) la determinación de si la sonda de oligonucleótidos se ha hibridado con el producto de amplificación; y
 - (iv) la asignación, dependiendo del oligonucleótido específico, de un grupo o tipo alélico al producto de amplificación.
 - 35 **caracterizado porque** el iniciador sentido es un iniciador específico para el grupo situado dentro del intrón 1, y el iniciador antisentido está situado en el terminal 3' del exón 2 y fuera de la región variable del exón 2.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el iniciador antisentido está situado en el extremo del exón 2 que no tiene variabilidad.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el iniciador antisentido tiene la secuencia nucleotida como se muestra en la SEQ ID NO: 17.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que iniciador sentido se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 hasta la 16 y la 70 hasta la 86.
12. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el par de iniciadores se selecciona de los pares de iniciadores como se muestra en la figura 4A.

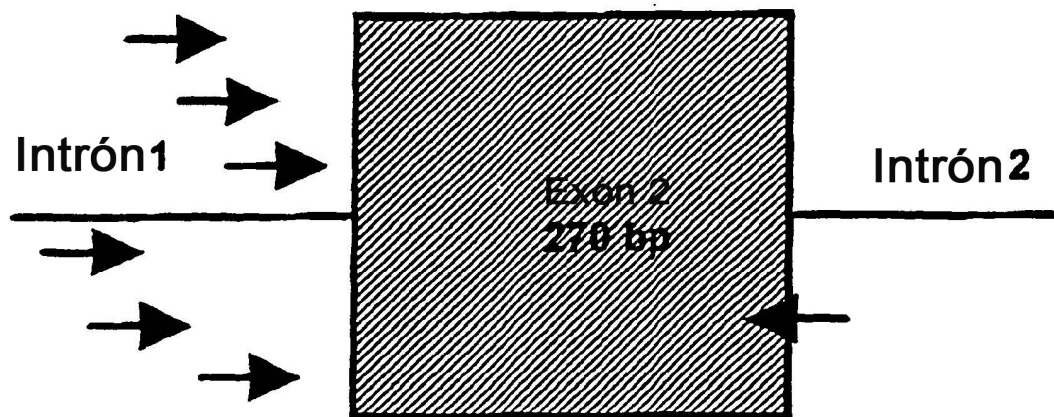
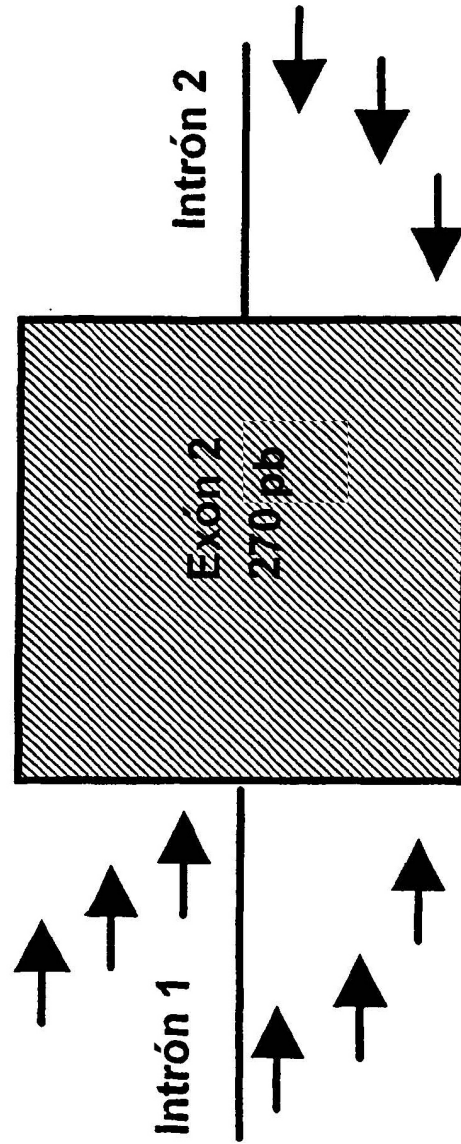


Fig. 1 A

Figura 1 B

Tipificación basada en la secuenciación del HLA-DRB1,3,4,5

Iniciador de secuenciación específico para el grupo



Iniciadores de amplificación específicos para el grupo en intrón 1 e intrón 2

[illegible]

Fig. 2 A

Intrón 1, parte II

	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Consensus	CCTGT	*****	GGATGAGAGAAGGAGCAGAGATGCTTTTGGGGTGGAGGCTCCAGAGAGGCGGCGGCTGCGGTGCTGGGGGATCCTC								
DRB1*0101	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0102	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0103	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1501	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1502	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1503	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1601	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1602	-C-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0301	-A-	*****	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0401	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0402	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0403	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0404	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0405	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0407	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0408	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1101	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1103	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1104	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1107	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1201	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1202	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1301	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1302	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1303	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1305	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1401	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1404	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1408	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0701	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0801	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0802	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0803	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0804	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*0901	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB1*1001	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB3*0101	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB3*0201	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB3*0202	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB3*0301	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB4*0101	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB4*0102	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB4*0103	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB5*0101	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****
DRB5*0202	-C-T-AAATGGTAAA	---T---	*****	*****	T	*****	*****	GA	*****	*****	*****

Fig. 2 B

Intrón 1, parte III

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Consensus	CTCCAGCTCCTGCTG	TTGGAGGTCTC	CAGAACAGGCTG	GAGGAGGGA*GGGGGGTCC	CAAAAGCTGGGGATC	CAGAAAGTGT	TTTCCCGCCTGGT	CCCCCA			
DRB1*0101					*	*		G	G	A	
DRB1*0102					*	*		G	G	A	
DRB1*0103					*	*		G	G	A	
DRB1*1501					*	*		G	G	A	
DRB1*1502					*	*		G	G	A	
DRB1*1503					*	*		G	G	A	
DRB1*1601					*	*		G	G	A	
DRB1*1602					*	*		G	G	A	
DRB1*0301					*	*		G	G	A	
DRB1*0401					*	*		G	G	A	
DRB1*0402					*	*		G	G	A	
DRB1*0403					*	*		G	G	A	
DRB1*0404					*	*		G	G	A	
DRB1*0405					*	*		G	G	A	
DRB1*0407					*	*		G	G	A	
DRB1*0408					*	*		G	G	A	
DRB1*1101					*	*		G	G	A	
DRB1*1103					*	*		G	G	A	
DRB1*1104					*	*		G	G	A	
DRB1*1107					*	*		G	G	A	
DRB1*1201					*	*		G	G	A	
DRB1*1202					*	*		G	G	A	
DRB1*1301					*	*		G	G	A	
DRB1*1302					*	*		G	G	A	
DRB1*1303					*	*		G	G	A	
DRB1*1305					*	*		G	G	A	
DRB1*1401					*	*		G	G	A	
DRB1*1404					*	*		G	G	A	
DRB1*1408					*	*		G	G	A	
DRB1*0701					*	*		G	G	A	
DRB1*0801					*	*		G	G	A	
DRB1*0802					*	*		G	G	A	
DRB1*0803					*	*		G	G	A	
DRB1*0804					*	*		G	G	A	
DRB1*0901					*	*		G	G	A	
DRB1*1001					*	*		G	G	A	
DRB3*0101					*	*		G	G	A	
DRB3*0201					*	*		G	G	A	
DRB3*0202					*	*		G	G	A	
DRB3*0301					*	*		G	G	A	
DRB4*0101					*	*		G	G	A	
DRB4*0102					*	*		G	G	A	
DRB4*0103					*	*		G	G	A	
DRB5*0101					*	*		G	G	A	
DRB5*0202					*	*		G	G	A	

Fig. 2 C

Fig. 2 D

Intrón 1, parte V

	401	410	420	430	440	450	460	470	480
Consensus	CGCCCAKGGAGCCCGGATGGTGGCGTCCGCTGTACAGTCTCTCTCAGGAGGCCGCCCTGTGTACCCGATCGTTCTGTCGCCACACAGCACCGTTT								
DRB1*0101	T					T	C	C	
DRB1*0102	T					T	C	C	
DRB1*0103	T					T	C	C	
DRB1*1501	T					T	C	C	
DRB1*1502	T					C	C	G	
DRB1*1503	T					C	C	G	
DRB1*1601	T					C	C	G	
DRB1*1602	T					C	C	G	
DRB1*0301	A					C	C	T	
DRB1*0401	*****					C	C	T	
DRB1*0402	*****					C	C	T	
DRB1*0403	*****					C	C	T	
DRB1*0404	*****					C	C	T	
DRB1*0405	*****					C	C	T	
DRB1*0407	*****					C	C	T	
DRB1*0408	*****					C	C	T	
DRB1*1101	G					C	C	T	
DRB1*1103	G					C	C	T	
DRB1*1104	G					C	C	T	
DRB1*1107	G					C	C	T	
DRB1*1201	A					A	A	T	
DRB1*1301	G					C	C	T	
DRB1*1302	G					C	C	T	
DRB1*1303	G					C	C	T	
DRB1*1305	G					C	C	T	
DRB1*1401						A	A	T	
DRB1*1404						A	A	T	
DRB1*1408						A	A	T	
DRB1*0701	T					T	TC	C	
DRB1*0801	G					A	A	T	
DRB1*0802	G					A	A	T	
DRB1*0803	G					A	A	T	
DRB1*0804	G					A	A	T	
DRB1*0901						T	T	C	
DRB1*1001	A					C	C	T	
DRB3*0101	A					C	C	C	
DRB3*0201	G					C	C	C	
DRB3*0202	G					C	C	C	
DRB3*0301	A					A	A	C	
DRB4*0101						G	T	T	
DRB4*0102						T	G	T	
DRB4*0103						T	G	T	
DRB5*0101						C	C	T	
DRB5*0202						C	C	T	

Exón 2

Fig. 2 E

Intrón 2, parte I

[illegible]

Figura 2 G

[illegible]

Figura 2 H

Intrón 2, parte III

201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CTGAGGCGACAGGTGTGTGTAGAGTGTGATTTGCTGTCGTCGTCGAGGCTGTGTGGAGGCGAGGACAGGAGGG*CTGCTTCTTATTCCTTGAGG	---	A---	A---	G-A---	****	---	---	A---	C---	A---
Consensus	---	A---	A---	G-A---	****	---	---	A---	C---	A---
DRB1*0101	---	A---	A---	G-A---	****	---	---	A---	C---	A---
DRB1*0102	---	A---	A---	G-A---	****	---	---	A---	C---	A---
DRB1*0103	---	A---	A---	G-A---	****	---	---	A---	C---	A---
DRB1*1501	---	A---	A---	T-T---	T-T---	---	---	T---	C---	A---
DRB1*1502	---	A---	A---	T-T---	T-T---	---	---	T---	C---	A---
DRB1*1503	---	A---	A---	T-T---	T-T---	---	---	T---	C---	A---
DRB1*1601	---	A---	A---	T-T---	T-T---	---	---	T---	C---	A---
DRB1*1602	---	A---	A---	T-T---	T-T---	---	---	T---	C---	A---
DRB1*0301	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0302	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0401	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0402	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0403	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0404	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0405	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0407	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1101	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1103	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1104	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1111	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1121	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1201	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1202	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1301	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1302	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1303	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1305	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1314	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1401	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1404	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0701	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0801	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0802	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0803	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0804	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*0901	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB1*1001	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB3*0101	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB3*0202	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB3*0301	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB4*0101	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB4*0102	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB4*0103	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB5*0101	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB5*0202	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB6*0101	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB6*0201	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---
DRB7*0101	---	A---	A---	---	---	---	---	---	---	---

Figura 2 I

Intrón 2, parte IV

	301	310	320	330	340
Consensus	CCTCTGTGGGAGGTGACAAGGAGGTGGTCTGGGGC				
DRB1*0101					
DRB1*0102					
DRB1*0103					
DRB1*1501					
DRB1*1502					
DRB1*1601					
DRB1*1602					
DRB1*0301	A				G-C
DRB1*0302	A				G-C
DRB1*0401	-T				
DRB1*0402	-T				
DRB1*0403	-T				
DRB1*0404	-T				
DRB1*0405	-T				
DRB1*0407	-T				
DRB1*1101	A				G-C
DRB1*1103	A				G-C
DRB1*1104	A				G-C
DRB1*1111	A				G-C
DRB1*1121	A				G-C
DRB1*1201					
DRB1*1202					
DRB1*1301	A				G-C
DRB1*1302	A				G-C
DRB1*1303	A				G-C
DRB1*1305	A				G-C
DRB1*1314	A				G-C
DRB1*1401	A				G-C
DRB1*1404	A				G-C
DRB1*0701			GT	G	A-A
DRB1*0801					
DRB1*0802					
DRB1*0803					
DRB1*0804					
DRB1*0901			GT	G	A-A
DRB1*1001		C			AC-A
DRB3*0101	-T	A			G-C
DRB3*0202	-T	A		C	G-C
DRB3*0301	-T	A	A		G-C
DRB4*0101		CA	T		TA
DRB4*0102		CA	T		TA
DRB4*0103		CA	T		TA
DRB5*0101					A
DRB5*0202			T		A
DRB6*0101			T		A
DRB6*0201			T		A
DRB7*0101			T	A	A

Figura 2 J

iniciador de amplificación

Denominación	Secuencia	N	Tf °C	Posición	Núm. Id sec
DRB01	S 5' TCC CAg gAg gAg gCg ggA 3'	18	62	167-174	2
DRB02	S 5' AgC gCC CgC ACC CCg CT 3'	17	62	388-404	3
DRB03	S 5' AAA AgC CTg ggg ATC AgA AgT 3'	21	62	258-278	4
DRB04	S 5' gCC CCT ggg CTg CgT gTT 3'	18	62	335-352	5
DRB05	S 5' Tgg Tgg gCg TTg Cgg Cg 3'	17	64	351-368	6
DRB12	S 5' AgT gTC TTC TCA ggA ggC CA 3'	20	62	435-454	7
DRB13	S 5' Tgg gCg TTT gCg gCg ggC 3'	17	60	354-370	8
DRB14	S 5' gAg CCC CTg ggC TgC AgA 3'	18	62	333-350	9
DRB07	S 5' gCg ggT ggg gCC ggg TC 3'	17	62	363-378	10
DRB08	S 5' AgC gCA ggC CAg gCA CAA A 3'	19	62	19-37	11
DRB09	S 5' ggA Tgg Tgg CgT CTC TgT T 3'	19	60	316-334	12
DRB10	S 5' ggC gTT gCg ggT ggg Cg 3'	17	62	366-374	13
DRB3.1	S 5' CCC CgT TCg CCT CAg gAA A 3'	19	62	305-323	14
DRB4	S 5' CCT CAg gAA gAC TgA ggA C 3'	19	62	314-332	15
DRB5	S 5' CCA gAA TAg gCT ggA ggC g 3'	19	62	224-242	16
DRBAS	AS 5' gCC gCT gCA CTg TgA AgC TC 3'	20	66	248-267	17

Fig. 3 A

Iniciador de secuenciación

Denominación	Secuencia	N	Tf °C	Posición	Núm. Id. Sec.
DR1	S 5' gCC CgT gTg ACC ggA TCC 3'	18	62	454-471	18
DR2	S 5' CCg CCC TgT gAC Cgg ATg 3'	18	62	452-470	19
DR3.5.6.8.10.B4	S 5' ggA TCg TTC gTg TCC CCA C 3'	19	62	466-484	20
DR4	S 5' CCg gAg gCC gCT TCT gTA 3'	18	60	445-462	21
DR7.9.B5	S 5' CgC CCC TgT gAC Cgg ATC 3'	18	62	453-470	22
DRB3.2	S 5' gCT gTC AgT gTC TTC TCA gg 3'	20	62	429-448	23

Fig. 3 B

Figura 3 C

Secuencia, longitud, temperatura de fusión (Tf) y localización de los iniciadores usados para la preparación de plantillas.

Iniciador	Orientación	Secuencia	Longitud	Tf	Localización	NÚM ID SEC.
I1-SD1	sentido	5' TCC CAG TGC CCG CAC CCT 3'	18	62	384-401	intrón 1 70
I1-SD3	sentido	5' ggT ggg TgC TgT TgA Agg T 3'	19	60	72-90	intrón 1 71
I1-SD5	sentido	5' AgC ACT AAg gAA ggg TTC Ag 3'	20	60	41-60	intrón 1 72
I1-SD6	sentido	5' ggg ATC AgA ggt AgT TTT TCC A 3'	22	62	267-288	intrón 1 73
I1-SD8	sentido	5' AAC Agg CTg gAg gTA ggg AC 3'	20	64	228-248	intrón 1 74
I1-SD9	sentido	5' Tgg Tgg gCg TTg Cgg Cg 3'	17	60	351-368	intrón 1 75
I1-SD10	sentido	5' gTg ggc gTt gCg gCg gC 3'	17	62	353-370	intrón 1 76
I1-SD11	sentido	5' gTt TTC CCG CCT ggt CCC T 3'	19	62	280-298	intrón 1 77
I1-SD12	sentido	5' Cgg Cgt Cgc Tgt Cag Tgt T 3'	19	62	422-440	intrón 1 78
I1-SD14	sentido	5' AgC gCA ggc Cag gCA CAA A 3'	19	62	19-37	intrón 1 79
I1-SD15	sentido	5' CAg TTA Agg TTC Cag Tgc CA 3'	20	60	374-394	intrón 1 80
I1-SD20	sentido	5' TTT CAg gTg AAg ACT CCC AgA 3'	21	62	143-162	intrón 1 81
I1-SD21	sentido	5' gAT gAg AgA Agg AgC AgA gAT 3'	21	62	118-138	intrón 1 82
I1-SD22	sentido	5' ggc gTt gCg ggt ggg Cg 3'	17	62	356-374	intrón 1 83
I1-SD25	sentido	5' CAC AAg gTc ATC ACT AAg AAA g 3'	22	62	32-53	intrón 1 84
I1-SD40	sentido	5' AgC ACT AAg gAA ggg TTC AC 3'	20	60	41-60	intrón 1 85
I1-SD41	sentido	5' gTt TTC CCG CCT ggt CCC C 3'	19	64	280-298	intrón 1 86
I2-SD2	AS	5' ACA CAC TCA gAT TCT CCG CTT 3'	21	62	36-56	intrón 2 87
I2-SD7	AS	5' ACA CAC ACA CTC AgA TTC TCC 3'	21	62	40-60	intrón 2 88
I2-SD13	AS	5' TCA GAT TCC CAG CTC gga gA 3'	20	62	31-50	intrón 2 89
I2-SD27	AS	5' CAg gcc CCG CCC CCC gA 3'	17	64	10-26	intrón 2 90
I2-SD28	AS	5' ACA CAC ACA CTC AgA TTC CCA 3'	21	62	40-60	intrón 2 91
I2-SD30	AS	5' ACA CAC ATA CAC AgA TTC CCC 3'	21	62	40-60	intrón 2 92
I2-SD35	AS	5' ACA CAC AgA gTc AgA TTC CCA 3'	21	62	40-60	intrón 2 93
I2-SD36	AS	5' CAC ACA CAC ACT CTC AgA TTT 3'	21	60	43-60	intrón 2 94
I2-SD39	AS	5' Tgt CAC CTC CCC ACA gag T 3'	19	60	301-119	intrón 2 95

Mezcla de iniciadores		Iniciador sentido	Iniciador antisentido	Especificidad del HLA-DRB	Iniciador de secuenciación
Núm.	Nombre				
1	1	DRB01	DRBAS	DRB1*0101-0104	DR1
2	2	DRB02	DRBAS	DRB1*1501-1506, 1601-1608	DR2
3	3	DRB03	DRBAS	DRB1*0301-0311	DR3,5,6,8 10,B4
4	4	DRB04	DRBAS	DRB1*0401-0424	DR4
5	5	DRB05	DRBAS	DRB1*0301-0311, 1101-1130 DRB1*1301-1330, 1401-1429	DR3,5,6,8 10,B4
6	12	DRB12	DRBAS	DRB1*1201-1205	DR3,5,6,8 10,B4
7	13	DRB13	DRBAS	DRB1*1301,1302 u.a.	DR3,5,6,8 10,B4
8	14	DRB14	DRBAS	DRB1*1401-1429	DR3,5,6,8 10,B4
9	7	DRB07	DRBAS	DRB1*0701	DR7,9,B5
10	8	DRB08	DRBAS	DRB1*0801-0816	DR3,5,6,8 10,B4
11	9	DRB09	DRBAS	DRB1*0901	DR7,9,B5
12	10	DRB10	DRBAS	DRB1*1001	DR3,5,6,8 10,B4
13	51	DRB5	DRBAS	DRB5*0101-0204	DR7,9,B5
14	52	DRB3.1	DRBAS	DRB3*0101-0301	DRB3.2
15	53	DRB4	DRBAS	DRB4*0101-0301	DR3,5,6,8 10,B4

Fig. 4 A

Mezclas de iniciadores para PCR-SBT de HLA-DRB

Mezcla de iniciadores Núm Nombre		Iniciador sentido	Iniciador antisentido	Tamaño del producto	Iniciador de secuenciación	Especificidad del HLA-DR
1	1	I1-SD1	I2-SD2	427bp	DR1	DR1
2	2	I1-SD3	I2-SD28	720bp	DR2	DR2
3	3	I1-SD5	I2-SD28	760bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR3
4	4	I1-SD6	I2-SD7	492bp	DR4	DR4
5	11.1	I1-SD9	I2-SD28	465bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR 3,11,13,14
6	11.2	I1-SD40	I2-SD39	1018bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR11,13,14 (sin DR3)
7	11.3	I1-SD41	I2-SD39	793bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR3,11,13 (sin DR14)
8	12	I1-SD8	I2-SD28	586bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR12
9	13	I1-SD10	I2-SD28	463bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR13 (1301/1302)
10	14	I1-SD11	I2-SD28	535bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR14
11	7	I1-SD12	I2-SD13	384bp	DR7, 9, B5	DR7
12	8	I1-SD14	I2-SD28	784bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR8
13	9	I1-SD15	I2-SD28	442bp	DR7, 9, B5	DR9
14	10	I1-SD22	I2-SD35	459bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DR10
15	52	I1-SD25	I2-SD27	738bp	DR3.2	DRB3 (DR52)
16	53	I1-SD20	I2-SD30	671bp	DR3, 5, 6, 8, 10, B4	DRB4 (DR53)
17	51	I1-SD21	I2-SD28	695bp	DR7, 9, B5	DRB5 (DR51)

Figura 4 B

Fig. 5

Mezclas de iniciadores para PCR-SSP de "baja resolución" de HLA-DR, versión 1.0

Mezcla de iniciadores número nombre	Iniciador sentido	Iniciador antisentido	Tamaño del producto	Especificidad del HLA-DRB
1 1.1	RB01	RB02	196 bp	B1*0101,0102,0104
2 1.2	RB01	RB03	197 bp	B1*0103
3 15	RB04	RB05	207 bp	B1*1501-1505
4 16	RB04	RB06/07	213,218 pb	B1*1601-1605
5 1317	RB08a	RB09	203 bp	B1*1317
6 3.1	RB10	RB45	130 bp	B1*0301,0304,0305, B1*0306
7 3.2	RB12	RB13	174 bp	B1*0302,0303
8 4	RB46a	BAMP-B	205 bp	B1*0401-0423
9 7	RB16	RB17	231 bp	B1*0701
10 8	RB08	RB07/18	165,216 pb	B1*0801-0814,1415
11 9	RB10	RB17	195 bp	B1*0901
12 10	RB60	RB20	268 bp	B1*1001
13 11	RB64	RB23	150 bp	B1*1101-1127,0415, B1*1411
14 12	RB24	RB25	183 bp	B1*1201-1204
15 13.1	RB49m 22	RB03/26/27	203,202 pb	B1*1301-04,1306, B1*1308-10,1312,1315, B1*1316,1319,1322, B1*1323 B1*1102,1114,1116, B1*1118-21,1416
16 13.2	RB21a	RB09/28/29	201,211 pb	B1*1301,1302,1304, B1*1307-08,1311, B1*1314-16,1318-24 B1*1101-04,1106, B1*1109-12,1114-16, B1*1120-22,1125,1416
17 14.1	RB49m 22	30am18 31am18	177 pb	B1*0301-0306,1301, B1*1316,1318-24, B1*1402,1403,1405, B1*1406,1409,1412, B1*1413,1414,1417-21, B1*1423,1424
18 14.2	RB08/ 21a	RB32	209,200 pb	B1*1401,1404,1405, B1*1407,1408,1411, B1*1414,1418,1113, B1*1117
19 14.3	RB33/ 34	RB35/36m6	146,145 pb	B1*1402,1406,1409, B1*1413,1417,1419, B1*1420,1421,1310
20 14.4	RB49m 22 RB37	RB38	224,150 pb	B1*1403,1412,1415, B1*1125,1318,0809
21 14.5	RB49m 22 RB14	RB39	173 bp	B1*1401,1407,1410, B1*1416,1422,1425

15-11-1999

Mezcla de iniciadores núm. nombre	Iniciador sentido	Iniciador antisentido	Tamaño del producto	Especificidad del HLA-DRB
---	----------------------	--------------------------	------------------------	---------------------------

22	52	RB40	RB41	241 pb	B3*0101,0201-0205, B3*0301
23	53	RB52	RB55	268 pb	B4*0101,0102-0104
24	51	RB44	RB06/27	147,164 pb	B5*0101-0105, B5*0201-0203

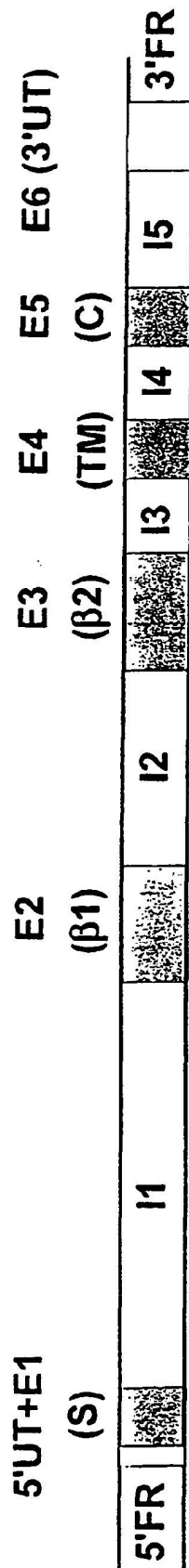
Iniciador de HLA-DRB

Nombre	Secuencia	N	Tf	Orientación	Núm. Id. Sec.
DRB01S	5' CTT gTg gCA gCT TAA gTT TgA A 3'	22	62°C	sentido	24
DRB04S	5' CCT gTg gCA gCC TAA gAg g 3' I	9	62°C	sentido	25
DRB08S	5' AgT ACT CTA Cgg gTg AgT gTT 3'	21	62°C	sentido	26
DRB08aS	5' gAg TAC TCT ACg ggT gAg TgT T 3'	22	66°C	sentido	27
DRB10S	5' gAC ggA gCg ggT gCg gTA 3'	18	62°C	sentido	28
DRB12S	5' Cgg gTg Cgg TTC CTg gAg 3'	18	62°C	sentido	29
DRB14S	5' gTT TCT Tgg AgC Agg TTA AAC A 3'	22	62°C	sentido	30
DRB16S	5' ggT gCA gTT CCT ggA AAg ACT 3'	21	64°C	sentido	31
DRB21aS	5' gTT TCT Tgg AgT ACT CTA CgT C 3'	22	64°C	sentido	32
DRB24S	5' CAT AAC CAg gAg gAg CTC C 3'	19	60°C	sentido	33
DRB33S	5' ggA CAg ATA CTT CCA TAA CCA g 3'	22	62°C	sentido	34
DRB34S	5' ggA gAg ATA CTT CCA TAA CCA g 3'	22	62°C	sentido	35
DRB37S	5' CTT CCA TAA CCA ggA ggA gTT 3'	21	62°C	sentido	36
DRB40S	5' ACA gCA CgT TTC TTg gAg CT 3'	20	60°C	sentido	37
DRB44S	5' gTg Cgg TTC CTg CAC AgA g 3'	19	62°C	sentido	38
DRB46aS	5' gTT CCT ggA CAg ATA CTT CTA TC 3'	23	66°C	sentido	39
DRB49m22S	5' ggT TTC TTg gAg TAC TCT ACg T 3'	22	64°C	sentido	40
DRB52S	5' gAT CgT TCg TgT CCC CAC Ag 3'	20	64°C	sentido	41
DRB60S	5' CAC AgC ACg TTT CTT ggA gg 3'	20	62°C	sentido	42
DRB64S	5' ACg gAg Cgg gTg Cgg TTC 3'	18	62°C	sentido	43
DRB02AS	5' CCg CCT CTg CTC CAg gAg 3'	18	62°C	antisentido	44
DRB03AS	5' CCC gCT CgT CTT CCA ggA T 3'	19	62°C	antisentido	45
DRB05AS	5' TCC ACC gCg gCC CgC gC 3'	17	64°C	antisentido	46
DRB06AS	5' TAg gTg TCC ACC gCg gCg 3'	18	62°C	antisentido	47
DRB07AS	5' TgC AgT Agg TgT CCA CCA g 3'	19	60°C	antisentido	48

Fig. 6

Nombre	Secuencia	N	Tf	Orientación	Núm. Id. Sec.
DRB09AS	5' TCC ACC gCg gCC CgC TC 3'	17	62°C	antisentido	49
DRB13AS	5' TCT gCA gTA gTT gTC CAC CC 3'	20	62°C	antisentido	50
DRB17AS	5' ACC CCg TA g TTg TgT CTg CAC AC 3'	23	62°C	antisentido	51
DRB18AS	5' CTg TTC CAg TAC TCg gCg CT 3'	20	64°C	antisentido	52
DRB20AS	5' CTg CAC TgT gAA gCT CTC AC 3'	20	62°C	antisentido	53
DRB23AS	5' CTg gCT gTT CCA gTA CTC CT 3'	20	62°C	antisentido	54
DRB25AS	5' CTg CAC TgT gAA gCT CTC CA 5'	20	62°C	antisentido	55
DRB26AS	5' CCC gCC TgT CTT CCA ggA T 3'	19	62°C	antisentido	56
DRB27AS	5' CCg CgC CTg CTC CAg gAT 3'	18	62°C	antisentido	57
DRB28AS	5' CCC gCC TgT CTT CCA ggA A 3'	19	62°C	antisentido	58
DRB29AS	5' CCC gCT CgT CTT CCA ggA A 3'	19	62°C	antisentido	59
DRB30am18AS	5' CTC gCT gTT CCA gTA CTC gg 3'	20	64°C	antisentido	60
DRB31am18AS	5' TCT CgC TgT TCC AgT ACT CAg 3'	21	64°C	antisentido	61
DRB32AS	5' CAC CTC ggC CCg CCT CC 3'	17	62°C	antisentido	62
DRB35AS	5' CAC CgC ggC CCg CCT CT 3'	17	62°C	antisentido	63
DRB36m6AS	5' gTC CAC CgC ggC gCg CTT 3'	18	64°C	antisentido	64
DRB38AS	5' CTg CAg TA gTg TCC ACC Ag 3'	20	64°C	antisentido	65
DRB39AS	5' CTg TTC CAg TgC TCC gCA g 3'	19	62°C	antisentido	66
DRB41AS	5' CgT AgT TgT gTC TgC AgT AAT 3'	21	60°C	antisentido	67
DRB55AS	5' CTC CAC AAC CCC gTA gTT gTA 3'	21	64°C	antisentido	68
DRBAMP-BAS	5' CCg CTg CAC TgT gAA gCT CT 3'	20	64°C	antisentido	69

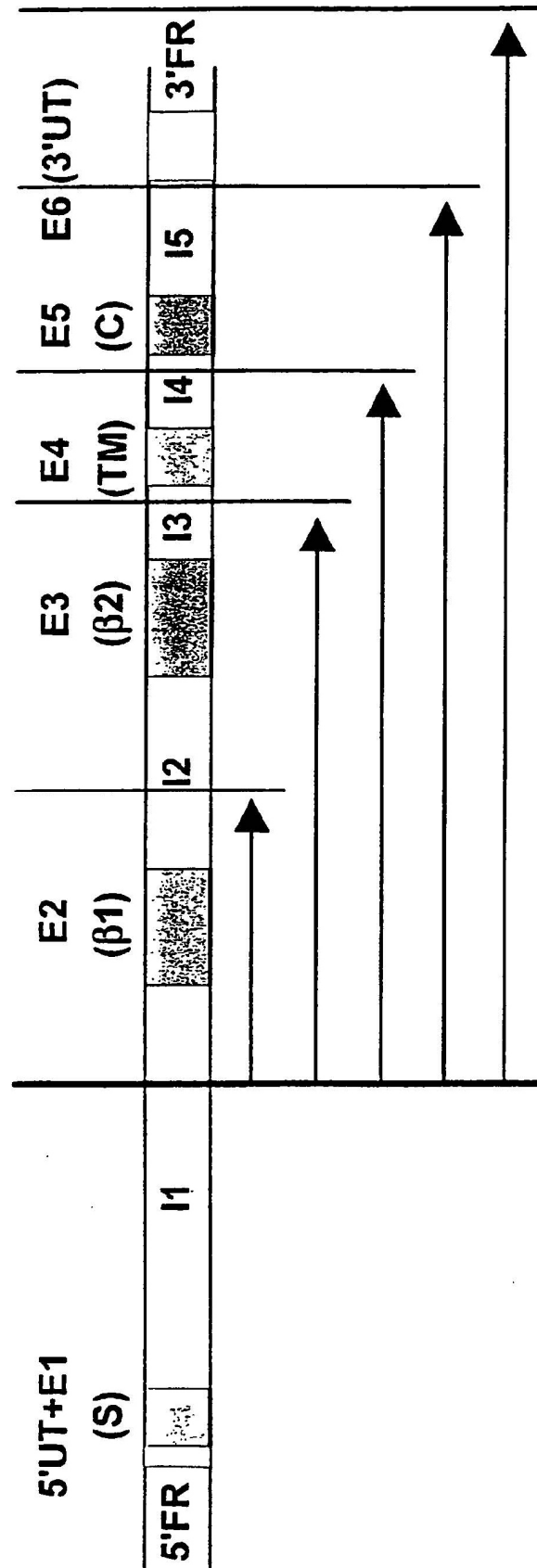
Figura 7



Regiones no codificantes	Tamaño (pb)	Región transcrita (ARNm)	Tamaño (pb)	Posición de los aminoácidos
Promoter	> 200	5' UT	62	
Intrón 1	8500	Exón 1	100	-29 - +4
Intrón 2	2250 - 2740	Exón 2	270	5 - 94
Intrón 3	700	Exón 3	282	95 - 188
Intrón 4	470	Exón 4	111	189 - 225
Intrón 5	300 - 840	Exón 5	24	226 - 233
		Exón 6	14	234 - 238
		3' UT	> 365	
Total size	12,4-13,5 kb		1,2 kb	238 AA

Tamaño total del gen	13,6 - 14,7 kb
Tamaño total del polipeptido	238 AA

Figura 8



Productos de la PCR de diferentes tamaños, todos empezando en el Intrón 1.