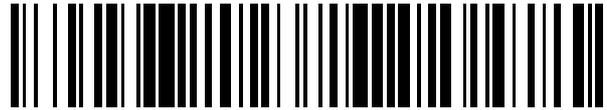


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 055**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2010 PCT/EP2010/005721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11035870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010 E 10757165 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2480683**

54 Título: **Determinación de haplotipos de KIR por amplificación de exones**

30 Prioridad:

22.09.2009 US 244821 P

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

27.03.2018

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BENTLEY, GORDON;
ERLICH, HENRY A.;
GOODRIDGE, DAMIAN;
LADNER, MARTHA y
TRACHTENBERG, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 661 055 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

Determinación de haplotipos de KIR por amplificación de exones

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a los procedimientos de diagnóstico molecular y, más específicamente, a la determinación de genotipos de individuos en los que se sabe que genotipos particulares están asociados a enfermedad.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La presente invención es un procedimiento para determinar las secuencias de genes que codifican los receptores de tipo inmunoglobulina de células NK o genes «KIR» (del inglés *natural killer cell immunoglobulin-like receptor*) en un único individuo o en cada uno de múltiples individuos sometidos a prueba simultáneamente.

15 **Células NK**

Las células NK (del inglés *natural killer*) o linfocitos citolíticos naturales son parte del sistema inmunitario innato y están especializadas en la defensa temprana contra infecciones y tumores. Las células NK se descubrieron por primera vez como resultado de su capacidad para destruir células tumorales. A diferencia de los linfocitos T citolíticos, las células NK pueden destruir dianas de forma no restringida al complejo mayor de histocompatibilidad (no-CMH). Como parte importante del sistema inmunitario innato, las células NK comprenden aproximadamente un 10 % de los linfocitos circulantes totales del organismo humano.

25 Debido a su capacidad para destruir otras células, las células NK normalmente se mantienen bajo un estricto control. Todas las células normales del organismo expresan las moléculas del CMH de clase I en su superficie. Estas moléculas protegen a las células normales de la destrucción por las células NK, ya que sirven como ligandos para muchos de los receptores que se encuentran en las células NK. Las células que carecen de suficiente CMH de clase I en su superficie son reconocidas como «anómalas» por las células NK y son destruidas. Al mismo tiempo que destruyen las células anómalas, las células NK también provocan una respuesta de las citocinas.

35 Las células NK constituyen una fuerza de respuesta rápida contra el cáncer y las infecciones víricas. Estos glóbulos blancos especializados se originan en la médula ósea, circulan por la sangre y se concentran en el bazo y otros tejidos linfoides. Las células NK regulan sus actividades en un subconjunto de las proteínas del antígeno leucocitario humano (HLA) que se producen en la superficie de las células sanas, pero de las que las células debilitadas por virus y cáncer se desprenden. Las proteínas de HLA están codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Cuando las células NK encuentran células que carecen de proteínas de HLA, las atacan y destruyen, impidiendo de este modo que las células propaguen aún más el virus o el cáncer.

40 Las células NK se distinguen de otras células del sistema inmunitario por la prontitud y la amplitud de su respuesta protectora. Otros glóbulos blancos entran en juego más lentamente y se dirigen a patógenos específicos (cánceres, virus o bacterias) en lugar de a células dañadas en general.

45 **Genes KIR**

La familia de genes que codifican los receptores de tipo inmunoglobulina de células NK o genes «KIR» (del inglés *natural killer cell immunoglobulin-like receptor*) es una de varias familias de receptores que codifican proteínas importantes que se encuentran en la superficie de las células NK. Un subconjunto de los genes KIR, concretamente los genes KIR inhibidores, interactúan con las moléculas de HLA de clase I, que son codificadas dentro del CMH humano. Dichas interacciones permiten la comunicación entre las células NK y otras células del organismo, incluidas células normales, células infectadas por virus o células cancerosas. Esta comunicación entre las moléculas de KIR en las células NK y las moléculas de HLA de clase I en todas las demás células ayuda a determinar si las células NK reconocen o no a las células del organismo como propias o no propias. Las células que se consideran «no propias» son seleccionadas para su destrucción por las células NK.

55 **Estructura de los genes KIR y sus proteínas**

La familia de genes KIR consiste en 16 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/S1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1* y *KIR3DP1*). El grupo de genes KIR se localiza dentro de una región de 100-200 kb del complejo de receptores leucocitarios (LRC) localizado en el cromosoma 19 (19q13.4) (Trowsdale J. (2001) Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, Sep;15(3):363-374). Se cree que el complejo génico ha surgido por eventos de duplicación génica que ocurrieron después de la división evolutiva entre mamíferos y roedores (Barten R., *et al.* (2001) Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol.*, Jan;22(1):52-57). Los genes KIR están dispuestos en una configuración de cabeza a cola, con solo 2,4 kb de secuencia separando los genes, a excepción de una secuencia de 14 kb entre 3DP1 y 2DL4. Debido a que los genes KIR

surgieron por duplicación génica, son muy similares en cuanto a su secuencia, mostrando una identidad de un 90-95 % entre ellos. Los individuos humanos difieren en el número y tipo de genes KIR que heredan; el genotipo de KIR de los distintos individuos y de los distintos grupos étnicos puede ser muy diferente (Parham P. (2005) Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Molecular immunology*, Feb;42(4):459-462; y Single RM, *et al.* (2007) Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA, *Nature genetics*, Sep;39(9):1114-1119). A nivel cromosómico, hay dos tipos distintos de haplotipos de KIR (véase la figura 1, adaptada de Martin *et al.* Immunogenetics. (2008) Dec;60(12):767-774). El haplotipo A no contiene genes estimuladores (2DS y 3DS1) distintos de 2DS4, ni genes 2DL5 ni genes 2DL2. El haplotipo B es más variable en cuanto a su contenido genético y diferentes haplotipos B contienen diferente número de genes estimuladores, uno o dos genes 2DL5, etc. (Martin MP, *et al.* (2008) KIR haplotypes defined by segregation analysis in 59 Centre d'Etude Polymorphisme Humain (CEPH) families. *Immunogenetics*, Dec;60(12):767-774.). La amplificación por PCR de la familia de genes se divulga en el documento WO 2005/046459.

Todas las proteínas KIR están ancladas a la membrana celular, con dos o tres dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina y una cola citoplasmática. Nueve genes KIR (*KIR2DL* y *KIR3DL*) codifican proteínas con colas citoplasmáticas largas que contienen motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM). Estas proteínas KIR pueden enviar señales de inhibición a la célula NK cuando el dominio extracelular ha entrado en contacto con su ligando. Los genes KIR restantes codifican proteínas con colas citoplasmáticas cortas. Estas proteínas envían señales de activación a través de moléculas adaptadoras como DAP 12. (Snyder MR *et al.* (2004) Stimulatory killer Ig-like receptors modulate T cell activation through DAP12-dependent and DAP12-independent mechanisms. *J Immunol.* Sep 15;173(6):3725-3731; y Carr WH *et al.* (2007) Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol.* Jan 15;178(2):647-651.)

La estructura de los receptores KIR y la identidad de los ligandos de HLA de clase I para cada receptor KIR se muestran en la figura 2 (adaptada de Parham P. *et al.*, Alloreactive killer cells: hindrance and help for hematopoietic transplants. *Nature Rev. Immunology.* (2003)3:108-122). La nomenclatura de los receptores de tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) describe el número de dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (2D o 3D) y la longitud de la cola citoplasmática (L para larga, S para corta). Cada dominio de tipo inmunoglobulina se representa como un bucle, cada motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) de la cola citoplasmática como una forma oblonga, y cada residuo cargado positivamente de la región transmembranaria como un rombo. Los KIR de estimulación se indican en *cursiva*. (Parham P. *et al.*, Alloreactive killer cells: hindrance and help for hematopoietic transplants. *Nature Rev. Immunology.* (2003)3:108-122).

La fuerza de las interacciones entre el KIR y sus ligandos de HLA de clase I puede depender tanto de la secuencia del KIR como de la secuencia del HLA. Mientras que la región de HLA se ha estudiado durante más de 40 años, las moléculas de KIR se describieron por primera vez (como NKB 1) a mediados de la década de 1990 (Lanier *et al.* (1995). The NKB1 and HP-3E4 NK cells receptors are structurally distinct glycoproteins and independently recognize polymorphic HLA-B and HLA-C molecules. *J Immunol.* Apr 1;154(7):3320-3327 y Litwin V. *et al.* (1994) NKB 1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med.* Aug 1;180(2):537-543). Los primeros años tras el descubrimiento se dedicaron principalmente a describir los diferentes genes KIR y se desarrollaron procedimientos para determinar genotipos de KIR individuales. Utilizando estos procedimientos, se han demostrado asociaciones de los genes KIR con enfermedades autoinmunitarias y con la supervivencia del receptor después de un alotrasplante de células hematopoyéticas (Parham P. (2005), MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews*, Mar;5(3):201-214). Ahora está claro que cada gen *KIR* tiene más de una secuencia; es decir, cada gen KIR tiene una secuencia variable debido a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), y en algunos casos, inserciones o deleciones dentro de la secuencia codificante. Los estudios han demostrado que el polimorfismo *KIR3DL1* puede afectar no solo a los niveles de expresión de *KIR3DL1* en células NK, sino también a la afinidad de unión de *KIR3DL1* por su ligando (Gardiner CM *et al.* (2001) Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol.* Mar 1; 166(5):2992-3001; Pando MJ *et al.* (2003) The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol.* Dec 15;171(12):6640-6649, O'Connor GM, *et al.* (2007) Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol.* Jan 1;178(1):235-241; y Thananchai H *et al.* (2007) Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* Jan 1;178(1):33-37).

La detección de genes KIR se describe en la técnica. Houtchens *et al.* (2007) *Immunogenetics*, 59(7):525-537 usan una espectrometría de masas MALDI-TOF, en la que las secuencias de los genes KIR se preamplifican mediante técnicas convencionales de PCR. En el presente documento se usan ácidos nucleicos cebadores que son específicos para cada gen individual, en los que cada par de cebadores abarca solo un SNP en un gen. En particular, el procedimiento divulgado no es adecuado para determinar los alelos de KIR, sino que solo se puede usar para determinar la presencia o ausencia de genes KIR específicos.

Ladner *et al.* (2009) Human Immunology, 70(Suppl. 1):107 divulga un procedimiento para analizar genes KIR en diversos locus. Sin embargo, el procedimiento no permite analizar siquiera un exón en todos los genes KIR, ya que ciertos locus se excluyen de su análisis, y tampoco proporciona ninguna divulgación sobre el tipo o estructura o siquiera sobre el número de cebadores utilizados para realizar el análisis.

5 En el documento WO2009/049889 se divulga un procedimiento para el genotipado ultrarrápido de HLA mediante secuenciación clonal. Sin embargo, el documento WO2009/049889 no divulga la posibilidad de amplificar exones de KIR de los 16 genes KIR en una sola amplificación.

10 El documento WO 2005/046459 divulga un procedimiento para detectar varios alelos de KIR específicos amplificando diferentes exones en diferentes genes KIR.

Asociación de los genes KIR con la enfermedad

15 Estudios diseñados para investigar el papel de KIR en la enfermedad humana han demostrado una relación entre diversos genes KIR e infecciones víricas tales como infecciones por CMV, VHC y VIH, enfermedades autoinmunitarias, cáncer y preeclampsia (Parham P. (2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. Nature reviews, Mar;5(3):201-214). En un estudio reciente sobre predisposición genética a la enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria intestinal autoinmunitaria, se encontró que los pacientes que son heterocigóticos para *KIR2DL2* y *KIR2DL3* y homocigóticos para el ligando C2 tienen predisposición a la enfermedad, mientras que el ligando C1 es protector. (Hollenbach JA *et al.* (2009) Susceptibility to Crohn's Disease is mediated by *KIR2DL2/KIR2DL3* heterozygosity and the HLAC ligand. Immunogenetics. Oct;61(10):663-71). Otros estudios sobre KIR y el trasplante de células hematopoyéticas (TCP) de donante no emparentado para la leucemia mieloide aguda (LMA) han demostrado una tasa de supervivencia global a los 3 años significativamente mayor y una mejoría global del 30 % en el riesgo de supervivencia sin recaída con donantes con haplotipo B/x en comparación con donantes con A/A (Cooley S, *et al.* (2009) Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. Blood. Jan 15;113(3):726-732; y Miller JS, *et al.* (2007) Missing KIR-ligands is associated with less relapse and increased graft versus host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. Blood, 109(11):5058-5061). Dichos estudios se han realizado con conocimiento del genotipo de KIR de pacientes y controles, pero no se han realizado para KIR a nivel alélico. Dado que muchos alelos de HLA específicos han demostrado que son importantes en enfermedades humanas (por ejemplo, asociación de HLA-DR3 y HLA-DR4 con la diabetes de tipo I y de HLA-DR8 con la artritis reumatoide juvenil), la posibilidad de genotipar KIR a nivel alélico refinará estudios que asocian KIR con enfermedades humanas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención es un procedimiento para determinar genotipos de KIR analizando uno y el mismo exón de los 16 exones para uno o más individuos en paralelo, como se define en la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento: para cada individuo, realizar una reacción de amplificación con un cebador directo y un cebador inverso, comprendiendo cada cebador una secuencia adaptadora, una secuencia de identificación individual y una secuencia de hibridación con KIR, para amplificar las secuencias de exones de los genes KIR que comprenden sitios polimórficos para obtener amplicones de KIR; combinar los amplicones de KIR de más de un individuo obtenidos en la primera etapa; realizar PCR en emulsión; determinar la secuencia de cada amplicón de KIR para cada individuo usando pirosecuenciación en paralelo; y asignar los alelos de KIR a cada individuo comparando la secuencia de los amplicones de KIR determinada en la etapa anterior con secuencias de KIR conocidas para determinar qué alelos de KIR están presentes en el individuo, en el que al menos uno de dichos cebadores es genérico para todos o para un subconjunto de genes KIR y en el que dichos cebadores se seleccionan de manera que cada uno de los al menos un exón en cada uno de los 16 genes KIR se amplifica con especificidad suficiente para permitir la determinación inequívoca del genotipo de KIR a partir de los amplicones.

En ciertos modos de realización, el procedimiento comprende además determinar los haplotipos de KIR presentes en cada individuo.

55 Se divulga que la primera etapa del procedimiento comprende además determinar la concentración de dichos amplicones de KIR. En ciertos modos de realización, al menos un cebador tiene la secuencia de la región de unión a KIR seleccionada de la tabla 2. En ciertos modos de realización, al menos un cebador tiene una etiqueta de identificación individual seleccionada de la tabla 3.

60 Se divulga que el procedimiento comprende además una etapa de determinar que el individuo está predispuesto a la preeclampsia o a enfermedades autoinmunitarias. En un modo de realización, el procedimiento comprende determinar que el individuo es un donante de células madre hematopoyéticas no emparentado adecuado cuando se han encontrado ciertos alelos de KIR en el individuo. En el presente documento, el procedimiento comprende además la etapa de determinar que el individuo está predispuesto a la preeclampsia cuando se ha encontrado el alelo KIRDL1 en la etapa de asignación.

65

5 Se divulga que el procedimiento comprende además la etapa de determinar que el individuo está predispuesto a enfermedades autoinmunitarias cuando se ha encontrado el alelo KIR2DS1 en la etapa de asignación. En aún otros modos de realización, el procedimiento comprende además la etapa de determinar que el individuo es un donante de células madre hematopoyéticas no emparentado adecuado cuando se han encontrado alelos de KIR del grupo B en la etapa de asignación.

En otros modos de realización, el procedimiento comprende además una etapa de determinar el genotipo de HLA del individuo.

10 Se divulga que, después de la etapa de determinar el genotipo de HLA del individuo, el procedimiento comprende además una etapa de determinar que el individuo está predispuesto a eliminar una infección por VHC, ralentizar la progresión de la infección por VIH a SIDA o enfermedad de Crohn cuando se han encontrado en el individuo ciertos alelos de KIR en combinación con ciertos alelos de HLA. En el presente documento, el procedimiento comprende además la etapa de determinar que el individuo está predispuesto a eliminar una
15 infección por VHC cuando se ha encontrado el alelo KIRDL1 en la etapa de asignación y se ha encontrado el alelo HLA-C1 en la etapa de genotipado de HLA.

20 Se divulga que el procedimiento comprende además la etapa de determinar que el individuo está predispuesto a la progresión lenta de la infección por VIH a SIDA cuando se ha encontrado el alelo KIR3DS1 en la etapa de asignación y se ha encontrado el alelo HLA-Bw4 en la etapa de genotipado de HLA. En aún otros modos de realización, el procedimiento comprende además la etapa de determinar que el individuo está predispuesto a la enfermedad de Crohn cuando se han encontrado los alelos KIR2DL2 y KIR2DL3 en la etapa de asignación y se ha encontrado el alelo HLA-C2 en la etapa de genotipado de HLA.

25 En otros modos de realización, la invención es un kit como se define en la reivindicación 6. En ciertos modos de realización del kit, al menos un cebador comprende una secuencia de hibridación con KIR seleccionada de la tabla 2. En ciertos modos de realización del kit, al menos un cebador comprende una etiqueta de identificación individual seleccionada de la tabla 3.

30 Se divulga que el kit comprende además una o más poblaciones de microesferas que tienen un cebador acoplado, siendo capaz dicho cebador de hibridar con las regiones adaptadoras en dichos cebadores directo e inverso.

35 En otros modos de realización, la invención es una reacción como se define en la reivindicación 8. En ciertos modos de realización de la mezcla de reacción, al menos un cebador comprende una secuencia de hibridación con KIR seleccionada de la tabla 2. En ciertos modos de realización de la mezcla de reacción, al menos un cebador comprende una etiqueta de identificación individual seleccionada de la tabla 3.

40 Se divulga que la mezcla de reacción comprende además una o más poblaciones de microesferas que tienen un cebador acoplado, siendo capaz dicho cebador de hibridar con las regiones adaptadoras en dichos cebadores directo e inverso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La figura 1 es una representación esquemática de los haplotipos de KIR.

La figura 2 es una representación esquemática de estructuras de los receptores KIR y de la identidad de sus ligandos de HLA de clase I.

50 La figura 3 ilustra una alineación de nucleótidos a través de la secuencia de la primera mitad del exón 5 de todos los genes KIR.

La figura 4 ilustra una alineación de nucleótidos a través de la secuencia de la segunda mitad del exón 5 de todos los genes KIR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

60 El término «alelo» se refiere a una variante de secuencia de un gen. Al menos una diferencia genética puede constituir un alelo. Para los genes KIR, múltiples diferencias genéticas típicamente constituyen un alelo.

El término «amplicón» se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene toda la secuencia de ácido nucleico diana o un fragmento de ella y que se forma como el producto de una amplificación *in vitro* mediante
65 cualquier procedimiento de amplificación adecuado.

- 5 El término «polimorfismo» se refiere a la condición en la que dos o más variantes de una secuencia de nucleótidos específica, o la secuencia de aminoácidos codificada, se puede encontrar en una población. Una posición polimórfica se refiere a un sitio en el ácido nucleico en el que se produce el nucleótido polimórfico que distingue las variantes. Un «polimorfismo de un solo nucleótido» o SNP se refiere a un sitio polimórfico que consiste en un solo nucleótido.
- 10 El término «haplotipo» se refiere a una combinación de alelos en diferentes lugares (locus o genes) en el mismo cromosoma de un individuo.
- 15 El término «genotipo» con respecto a un gen particular se refiere a una suma de los alelos del gen contenidos en un individuo o una muestra.
- El término «determinar el genotipo» de un gen KIR se refiere a determinar los polimorfismos presentes en los alelos individuales del gen KIR presente en un sujeto.
- 20 Los términos «región diana» o «secuencia diana» se refieren a una secuencia de polinucleótidos que se va a estudiar en una muestra. En el contexto de la presente invención, las secuencias diana son las secuencias de genes KIR contenidas en la muestra de un individuo.
- 25 El término «oligonucleótido» se refiere a un ácido nucleico corto, típicamente de diez o más nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos se preparan mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, síntesis química directa como se describe en Narang *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99; Brown *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151; Beaucage *et al.* (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862; Matteucci *et al.* (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191; o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.
- 30 El término «cebador» se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos a lo largo de una cadena complementaria de un ácido nucleico molde. Un cebador que es al menos parcialmente complementario de una subsecuencia de un ácido nucleico molde es típicamente suficiente para hibridar con el ácido nucleico molde para que se produzca la extensión. Aunque se utilizan opcionalmente otras longitudes de cebador, los cebadores comprenden típicamente regiones de hibridación que varían de aproximadamente 6 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y, lo más frecuentemente, de entre 15 y 35 nucleótidos de longitud. El diseño de cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia diana dada es bien conocido en la técnica y se describe en la bibliografía citada en el presente documento. El diseño de cebadores adecuados para amplificación y secuenciación clonales paralelas se describe, por ejemplo, en una publicación de solicitud de EE. UU. n.º 20100086914.
- 35 Una «ácido nucleico polimerasa termoestable» o «polimerasa termoestable» es una enzima polimerasa que es relativamente estable a temperaturas elevadas cuando se compara, por ejemplo, con polimerasas de *E. coli*. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en condiciones de termociclación típicas de la reacción en cadena de la polimerasa («PCR»).
- 40 El término «región adaptadora» de un cebador se refiere a la región de una secuencia de cebador en el extremo 5' que es universal para los amplicones de KIR obtenidos en el procedimiento de la presente invención y que proporciona secuencias que hibridan con un oligonucleótido presente en una micropartícula (es decir, microesfera) u otra superficie sólida para PCR en emulsión. La región adaptadora puede servir además como un sitio al que se une un cebador de secuenciación. La región adaptadora tiene típicamente de 15 a 30 nucleótidos de longitud.
- 45 El término «etiqueta de clave de genoteca» se refiere a la parte de una región adaptadora dentro de una secuencia de cebador que sirve para diferenciar un cebador específico de KIR de un cebador de control.
- 50 Los términos «etiqueta de identificación múltiple», «etiqueta de identificación individual» o «MID» se usan indistintamente para referirse a una secuencia de nucleótidos presente en un cebador que sirve como marcador del ADN obtenido de un sujeto o muestra particular.
- 55 El término «ácido nucleico» se refiere a polímeros nucleotídicos (por ejemplo, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, tanto naturales como no naturales), siendo dichos polímeros ADN, ARN y sus subcategorías, tales como ADNc, ARNm, etc. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario y generalmente contendrá enlaces 5'-3' fosfodiéster, aunque, en algunos casos, los análogos nucleotídicos pueden tener otros enlaces. Los ácidos nucleicos pueden incluir bases naturales (adenosina, guanosina, citosina, uracilo y timidina), así como bases no naturales. El ejemplo de bases no naturales incluye las descritas en, por ejemplo, Seela *et al.* (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. Ciertas bases usadas en análogos nucleotídicos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). Por ejemplo, algunas de estas incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5 990 303). Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-
- 60
- 65

aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitidina; 5-fluorocitidina; 5-clorocitidina; 5-yodocitidina; 5-bromocitidina; 5-metilcitidina; 5-propinilcitidina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

El término «nucleótido natural» se refiere a nucleótidos que contienen purina y pirimidina que se encuentran naturalmente en el ADN y ARN celulares: citosina (C), adenina (A), guanina (G), timina (T) y uracilo (U).

El término «nucleótido no natural» o «nucleótido modificado» se refiere a un nucleótido que contiene un grupo de base, azúcar o fosfato modificado, o que incorpora un resto no natural en su estructura. El nucleótido no natural se puede producir mediante una modificación química del nucleótido bien como parte del polímero de ácido nucleico o bien antes de la incorporación del nucleótido modificado al polímero de ácido nucleico. En otro abordaje, un nucleótido no natural se puede producir incorporando un nucleósido trifosfato modificado a la cadena polimérica durante la síntesis enzimática o química del ácido nucleico. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen didesoxinucleótidos y nucleótidos biotinilados, aminados, desaminados, alquilados, bencilados y marcados con fluoróforo.

El término «ácido nucleico polimerasas» o simplemente «polimerasas» se refiere a enzimas, por ejemplo, ADN polimerasas, que catalizan la incorporación de nucleótidos a un ácido nucleico. Las ADN polimerasas termoestables ejemplares incluyen las de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. ZO5* (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5 674 738) y mutantes de la polimerasa de *Thermus sp. ZO5* (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/873.896, presentada el 17 de octubre de 2007), *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, familia Hot Spring *Blclon 7*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosipho africanus*. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos completas para numerosas ADN polimerasas termoestables están disponible en las bases de datos públicas.

Los términos «condiciones de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa» o «condiciones de PCR» se refieren a condiciones en las cuales los cebadores que hibridan con un ácido nucleico molde se extienden mediante una polimerasa durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los expertos en la técnica apreciarán que dichas condiciones pueden variar y, en general, están influidas por la naturaleza de los cebadores y el molde. Diversas condiciones de PCR se describen en PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) en el capítulo 14; PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

El término «muestra» se refiere a cualquier composición que contenga o se sospeche que contiene ácido nucleico de un individuo. La muestra se puede obtener por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Dicha muestra puede ser una cantidad de tejido o líquido, o una fracción purificada de la misma, aislada de un individuo o individuos, incluyendo tejido o líquido, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre entera y componentes sanguíneos, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido peritoneal, líquido linfático, humor acuoso o vítreo, líquido sinovial, orina, lágrimas, semen, flujo vaginal, derrame pulmonar, líquido seroso, órganos, lavado broncoalveolar, tumores y tejidos incluidos en parafina. Las muestras también pueden incluir constituyentes y componentes de cultivos *in vitro* de células obtenidas de un individuo, que incluyen, pero sin limitación, medio acondicionado que resulta del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes y componentes celulares.

II. Introducción

Aunque un gran grupo de alelos de los genes KIR se ha descrito por procedimientos en los que genes KIR individuales se secuencian de uno en uno (Tabla 1: 335 alelos), no se han desarrollado procedimientos que permitan determinar todos los alelos de KIR presentes en muestras de pacientes de una manera rápida.

Tabla 1. Número de polimorfismos de KIR identificados hasta la fecha.

Gen KIR	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Alelos	25	11	9	25	21	12	12	9
Proteínas	18	7	8	12	11	8	6	3
Nulos	1	0	1	0	0	0	0	

Gen <i>KIR</i>	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Alelos	20	12	52	14	45	55	5	8
Proteínas	13	9	46	12	40	31	0	0
Nulos		0	1	1	0	0	0	0

La presente invención proporciona procedimientos de genotipado de *KIR* basados en el descubrimiento de que se puede usar un análisis de secuenciación clonal paralelo múltiple para genotipar al menos un exón en los 16 genes *KIR* de múltiples individuos al mismo tiempo. Los procedimientos de secuenciación de nueva generación denominados «secuenciación de amplicones altamente multiplexada» son capaces de propagar clonalmente en paralelo millones de moléculas de ácido nucleico que, a continuación, también se secuencian en paralelo. Recientemente, las longitudes de lectura obtenibles mediante dichos procedimientos de secuenciación de nueva generación han aumentado hasta > 400 nucleótidos usando química de titanio. Estas longitudes de lectura clonales permiten establecer la fase de los polimorfismos unidos dentro de un exón de un gen *KIR* y, por lo tanto, identificar cada alelo de cada uno de los genes *KIR*. En la presente invención, el sistema tiene un rendimiento lo suficientemente alto como para permitir el tipado de cada uno de los 9 exones (cada uno con múltiples polimorfismos) de cada uno de los 16 genes *KIR* para hasta 10 individuos en un único experimento de secuenciación.

El procedimiento de la presente invención utiliza la tecnología de secuenciación de alto rendimiento capaz de generar lecturas largas. Especialmente ventajoso es el uso de secuenciación de amplicones altamente multiplexada que utiliza la tecnología de pirosecuenciación. Esta tecnología se basa en detectar la incorporación de bases mediante la liberación de un pirofosfato y degradación enzimática de nucleótidos simultánea como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 6 274 320, 6 258 568 y 6 210 891. En algunos modos de realización, la tecnología implica el uso de PCR en emulsión (emPCR™) como se describe en detalle en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 20100086914.

Uno de los desafíos técnicos del tipado de *KIR* es la dificultad para establecer la fase de los muchos polimorfismos unidos. La presente invención resuelve el problema de la ambigüedad de fase mediante el uso de secuenciación clonal. Las reacciones de secuenciación larga, obtenidas clonalmente, son excepcionalmente capaces de unir un motivo distintivo del gen *KIR* a las secuencias más largas que contienen los sitios polimórficos y diferenciar el alelo de *KIR* particular de otras secuencias de *KIR*. Cuanto más larga sea la secuencia obtenida a partir de una reacción de secuenciación clonal, más fácil resultará identificar secuencias pertenecientes a cada gen *KIR*. La secuenciación de nueva generación proporciona un aumento de orden de magnitud en el número de lecturas de la secuencia contigua que se pueden obtener en un breve período de tiempo. La mayoría de las plataformas para secuenciación clonal logran longitudes de lectura de solo 25-60 pares de bases (pb) en la secuenciación de ambos extremos. Solo el procedimiento basado en pirosecuenciación clonal desarrollado por 454 Life Sciences (Branford, Connecticut) y descrito en Margulies M. *et al.*, (2005) (Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. Sep 15;437(7057):376-380) ha logrado longitudes de lectura de > 400 pb usando el sistema 454 GS FLX Titanium (454 Life Sciences, Branford, Conn., EE. UU.).

I. Cebadores

En el procedimiento de la presente invención, cada muestra de un individuo se puede amplificar en cada exón de *KIR*. Los cebadores para uso en el procedimiento de la presente invención contienen una región de cebado de *KIR* (también denominada región específica de *KIR*). La región específica de *KIR* hibrida con la secuencia de interés de *KIR*, tal como un exón, una parte de un exón o un exón y partes de un intrón. En otros modos de realización, los cebadores son genéricos para todos los genes *KIR*, es decir, son capaces de hibridar y soportar la amplificación del mismo exón en todos los genes *KIR*. En algunos modos de realización, los cebadores pueden contener partes de secuencia intrónica. En algunos casos, la secuencia intrónica es útil para determinar la identidad del gen *KIR* al que se debe asignar la secuencia. En algunos modos de realización se podría añadir un conjunto separado de cebadores para amplificar exones de un gen *KIR* que tiene una secuencia intrónica sustancialmente diferente de todos los otros genes *KIR*, por ejemplo, el gen *KIR2DL4*.

Por ejemplo, como se muestra en la tabla 2, en algunos modos de realización, los cebadores que se dirigen a los exones 1 y 2 de genes *KIR* son genéricos. En algunos modos de realización, entre los cebadores que se dirigen al exón 3 de los genes *KIR*, algunos cebadores son genéricos para todos los genes *KIR*, mientras que otros cebadores son genéricos para un subconjunto de genes *KIR*, mientras que algunos cebadores son específicos del gen. Los cebadores se seleccionan de manera que cada exón en cada uno de los genes *KIR* sometidos a

prueba se amplifica con suficiente especificidad para permitir la determinación inequívoca del genotipo de KIR a partir de la secuencia.

Los cebadores empleados en la reacción de amplificación incluyen secuencias adicionales: secuencias adaptadoras para PCR en emulsión y una secuencia de identificación que sirve como marcador para el ADN de un solo individuo. La descripción de elementos funcionales tales como etiquetas y adaptadores para cebadores usados en pirosecuenciación clonal se puede encontrar en las solicitudes de patente de EE. UU. n.º 10/767 894 (presentada el 28 de enero de 2004), 12/156 242 (presentada el 29 de mayo de 2008), 12/245 666 (presentada el 3 de octubre de 2008) y 12/380 139 (presentada el 23 de febrero de 2009).

Las partes de adaptador de las secuencias de cebador están presentes en el extremo 5' de los cebadores. Los adaptadores sirven como sitio de hibridación para los cebadores de secuenciación y también corresponden a secuencias presentes en el soporte sólido (tal como microesferas) usado en la PCR en emulsión, de modo que el amplicón puede hibridar con el soporte sólido.

Los cebadores para uso en los procedimientos de la presente invención comprenden además etiquetas identificadoras individuales o etiquetas MID. Las etiquetas MID están presentes en los cebadores entre la región adaptadora y la región de cebado de KIR. Estas etiquetas se utilizan para marcar los amplicones de KIR de cada individuo que se está sometiendo a prueba. Como resultado, todos los amplicones de KIR obtenidos del mismo sujeto se marcan con la misma etiqueta MID. Las etiquetas MID también se secuencian en la reacción de secuenciación.

Las etiquetas MID tienen típicamente al menos 4 nucleótidos de longitud, pero las etiquetas MID más largas, por ejemplo, 6, 8 o 10 o más nucleótidos de longitud, también son útiles. El uso de dichas secuencias es bien conocido en la técnica (véase Thomas, *et al.* (2006) *Nat. Med.*, 12:852-855; Parameswaran *et al.*, (2007) *Nucl. Acids Res.*, 35:e130; y Hofmann *et al.*, (2007) *Nucl. Acids Res.* 35:e91).

II. Amplificación y secuenciación

Los amplicones de KIR se pueden obtener usando cualquier tipo de reacción de amplificación. En la presente invención, los amplicones de KIR se preparan típicamente por PCR usando los pares de cebadores descritos anteriormente. Típicamente, es deseable usar una ácido nucleico polimerasa de «alta fidelidad», es decir, una polimerasa con una baja tasa de error, por ejemplo, tal como una Taq polimerasa de alta fidelidad (Roche Diagnostics).

Las amplificaciones para cada sujeto que se vaya a genotipar se realizan por separado. Los amplicones del sujeto individual se combinan a continuación para una posterior PCR en emulsión y un análisis de secuencia.

Las combinaciones resultantes de amplicones de KIR se unen a microesferas y se someten a PCR en emulsión. La PCR en emulsión es conocida en la técnica (véase la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 20100086914 y las referencias citadas en la misma). En la PCR en emulsión, el molde que se va a amplificar, en este caso un amplicón de KIR, se une a un soporte sólido, preferentemente una microesfera esférica, mediante hibridación con un cebador conjugado con dicha microesfera.

Después de la amplificación por PCR en emulsión, se aíslan las microesferas que tienen los amplicones. Los amplicones se secuencian a continuación usando la tecnología de secuenciación de ADN que se basa en la detección de la incorporación de bases mediante la liberación de un pirofosfato y la degradación enzimática de nucleótidos simultánea (como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 6 274 320, 6 258 568 y 6 210 891).

III. Determinación de la secuencia génica

Una vez se obtienen los datos de secuenciación de la molécula de ADN individual, se determina la secuencia inequívoca del exón. Para algunos genes conocidos, tales como HLA, la secuencia de alelos se puede establecer comparando los archivos de secuencias con una base de datos de secuencias de HLA. Sin embargo, en el caso de los genes KIR, la base de datos de secuencias está incompleta.

La presente invención describe un procedimiento mediante el cual uno o más exones de los genes KIR de múltiples pacientes se secuencian al mismo tiempo y los alelos de los genes KIR presentes se determinan mediante un programa informático.

El programa informático ejemplar para el procedimiento de la presente divulgación lo desarrolló Conexio Genomics Pty. Ltd. (Fremantle, Western Australia). El programa informático puede determinar inequívocamente la identidad de secuencia en esta familia de genes. Un programa informático típico útil en la divulgación importaría los datos de secuencias del dispositivo de secuenciación clonal. En algunas partes de la divulgación, los flujogramas también se pueden importar para mejorar la exactitud de la lectura automática de nucleótidos. En algunas partes de la divulgación es ventajoso consolidar las lecturas de secuencia para comprimir el conjunto de

datos. El programa informático identifica a continuación las etiquetas de las muestras (etiquetas MID) y los cebadores. El uso de etiquetas permite que varias muestras se analicen juntas en una sola placa. El programa informático se puede diseñar para permitir la omisión de bases o la inserción de bases dentro de los sitios de etiquetas y para garantizar que esto no dé lugar a una asignación incorrecta de etiquetas.

5 El programa informático es capaz de evaluar la homología de secuencia con el locus diana y los genes relacionados que se pueden coamplificar, para asignar la referencia apropiada a cada secuencia clonal. Dado que los clones de ADN de todos los locus diana y coamplificados se mezclan en la PCR en emulsión, es necesario identificar las secuencias sometiénolas a prueba contra cada uno de los locus que se pueden
10 amplificar, para obtener una asignación única. Este procedimiento puede estar asistido por el examen de secuencias de intrones, para distinguir entre locus.

15 El programa informático es además capaz de generar una secuencia consenso para cada locus diana. Esta secuencia contiene una combinación de bases de cada uno de los dos alelos en cada locus. En la etapa de emparejamiento inicial no se tienen en cuenta las relaciones de fase entre secuencias.

20 En algunas partes de la divulgación se puede realizar un tipado inicial basado en la secuencia procedente de cada locus. Esta etapa es necesaria cuando la genoteca de referencia está incompleta, y realizar un emparejamiento completo en las secuencias genómicas sesgará los resultados en favor de los alelos que no están referenciados en las regiones no codificantes. En algunas partes de la divulgación se puede acometer un segundo nivel de tipado, basado en la información en los intrones. Esto permite refinar el resultado del tipado inicial para proporcionar una mejor resolución.

25 En algunas partes de la divulgación, la información de fase de las secuencias clonales se puede usar para proporcionar coincidencias de alelos completas e inequívocas dentro de la región secuenciada. El programa informático tratará automáticamente los casos en los que las posiciones de secuencias heterocigóticas están demasiado separadas para permitir la resolución de fase completa a lo largo de todo el consenso.

30 El desarrollo de la secuenciación alélica de alto rendimiento del complejo de KIR como se enseña en la presente invención es útil en estudios de asociación con enfermedades. En algunos modos de realización, la secuenciación alélica de alto rendimiento del complejo de KIR permite pronosticar una enfermedad o afección en un individuo o predecir la respuesta de un individuo a un tratamiento basándose en la identidad de los alelos de los genes KIR presentes en la muestra del individuo.

35 **IV. Conjuntos y kits**

40 En una parte, la divulgación comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos para la secuenciación de KIR. El conjunto comprende cebadores que amplifican una parte particular de los genes KIR. Más específicamente, el conjunto incluye uno o más pares de cebadores adecuados para la amplificación de exones o partes de exones en genes KIR. En algunas partes de la divulgación, el conjunto incluye pares de cebadores para amplificar cada exón (o parte de cada exón) en cada gen KIR presente en un paciente. Los cebadores del conjunto son preferentemente (pero no necesariamente) genéricos para todos los genes KIR, es decir, pueden amplificar el mismo exón en todos los genes KIR. Los cebadores contienen además secuencias adicionales útiles para PCR en emulsión y secuenciación clonal de alto rendimiento. Las secuencias adicionales incluyen una
45 etiqueta de identificación individual (etiqueta MID) y un adaptador, que incluye una etiqueta de genoteca.

50 En algunos modos de realización, la invención es, como se define en la reivindicación 6, para amplificar y secuenciar los genes KIR. El kit de la invención típicamente comprende múltiples pares de cebadores adecuados para amplificar los exones o partes de exones de genes KIR. Los pares de cebadores comprenden un cebador directo, que comprende una región adaptadora, una etiqueta de identificación individual (etiqueta MID) y una región de hibridación con KIR; y un cebador inverso, que comprende una región adaptadora, una etiqueta de identificación individual (etiqueta MID) y una región de hibridación con KIR. El kit de la invención a menudo comprende pares de cebadores que amplifican más de un exón de más de un gen KIR de múltiples sujetos. A menudo, el kit de la invención comprende un número suficiente de pares de cebadores para determinar el genotipo de KIR para todos los genes KIR en múltiples individuos, por ejemplo, 12 o más individuos. Los
55 cebadores pueden ser genéricos para más de un gen KIR, como se ejemplifica en la tabla 2.

60 En algunas partes de la divulgación, un kit puede comprender adicionalmente una o más poblaciones de microesferas que se pueden usar en PCR en emulsión. Cada microesfera se conjuga con un cebador capaz de hibridar con regiones adaptadoras de cebadores de amplificación. En algunos modos de realización, un kit puede comprender uno o más recipientes con componentes de reacción, por ejemplo, enzimas, tampones, nucleótidos, polinucleótidos de control y similares. El kit también puede incluir reactivos adicionales necesarios para PCR en emulsión y pirosecuenciación, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 20100086914 y las referencias citadas en la misma.

65 **V. Mezclas de reacción**

En un modo de realización, la invención es una mezcla de reacción para KIR, como se define en la reivindicación 8. La mezcla de reacción comprende un conjunto de cebadores que amplifican una parte particular de los genes KIR. Los cebadores en la mezcla de reacción pueden contener secuencias adicionales útiles para PCR en emulsión y secuenciación clonal de alto rendimiento. Las secuencias adicionales pueden incluir la etiqueta MID, el adaptador y la etiqueta de la genoteca.

En algunas partes de la divulgación, la mezcla de reacción puede comprender adicionalmente una o más poblaciones de microesferas, estando cada microesfera conjugada con un cebador capaz de hibridar con una región adaptadora de los cebadores de amplificación. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción puede comprender enzimas, tampones y nucleótidos. La mezcla de reacción también puede incluir reactivos adicionales necesarios para PCR en emulsión y pirosecuenciación, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 20100086914 y las referencias citadas en la misma.

VI. Uso del genotipado de KIR para evaluar estados patológicos

En algunos modos de realización, la invención incluye un procedimiento para detectar la predisposición de un individuo a una enfermedad o afección mediante la detección del genotipo de KIR del individuo. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además determinar el genotipo de HLA del individuo, es decir, determinar qué alelos de HLA están presentes en el individuo. El genotipo de HLA se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, determinar el genotipo de HLA utilizando secuenciación de nueva generación, como se describe en Bentley *et al.*, (2009) *Tissue Antigens*, 74:393-403.

En algunas partes de la divulgación, el procedimiento incluye determinar el genotipo de KIR de una mujer como se describe en el presente documento y determinar que la mujer está predispuesta a desarrollar preeclampsia si se ha determinado que está presente un alelo KIR2DL1.

En otras partes de la divulgación, el procedimiento incluye determinar el genotipo de KIR de un individuo como se describe en el presente documento, y determinar que es probable que el individuo elimine una infección por VHC si se ha determinado que está presente un alelo KIR2DL3. En algunas partes de la divulgación, el procedimiento comprende además determinar el genotipo de HLA-C del individuo y determinar que es probable que el individuo elimine una infección por VHC si se ha determinado que está presente una combinación del alelo KIR2DL3 y el alelo HLA-C1.

En otras partes de la divulgación, el procedimiento incluye determinar el genotipo de KIR de un individuo como se describe en el presente documento y determinar que es menos probable que la infección por VIH del individuo evolucione a SIDA si se ha determinado que está presente un alelo KIR3DS1. En algunas partes de la divulgación, el procedimiento comprende además determinar el genotipo de HLA del individuo y determinar que es menos probable que la infección por VIH del individuo evolucione a SIDA si se ha determinado que está presente una combinación del alelo KIR3DS1 y el alelo HLA-Bw4.

En aún otras partes más de la divulgación, el procedimiento incluye determinar el genotipo de KIR de un individuo como se describe en el presente documento y determinar que el individuo está predispuesto a desarrollar una enfermedad autoinmunitaria si se ha determinado que está presente un alelo KIR2DS1.

En aún otros modos de realización, el procedimiento incluye determinar el genotipo de KIR de un individuo como se describe en el presente documento y determinar que el individuo está predispuesto a desarrollar la enfermedad de Crohn si se ha determinado que está presente la heterocigosis KIR2DL2/KIR2DL3. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además determinar el genotipo de HLA del individuo y determinar que el individuo está predispuesto a desarrollar la enfermedad de Crohn si se ha determinado que está presente una combinación de heterocigosis KIR2DL2/KIR2DL3 y alelo HLA-C2.

En aún otros modos de realización, el procedimiento incluye determinar el genotipo de KIR de un individuo como se describe en el presente documento y determinar si el individuo es un candidato adecuado para ser donante en un trasplante de células hematopoyéticas de donante no emparentado si se ha determinado que está presente un haplotipo de KIR del grupo B.

VII. Ejemplos

Ejemplo 1: Obtener las secuencias para el exón 5 en todos los genes KIR en la muestra de un individuo

Como ejemplo, 13 pares de cebadores adecuados para amplificación de los nueve exones de los genes KIR se enumeran en la tabla 2. Cada conjunto de cebadores amplifica un único exón de los genes KIR, más una secuencia intrónica adicional.

Tabla 2. Ejemplos de cebadores para KIR

EXÓN	CEBADOR	ESPECIFICIDAD	TAMAÑO DE AMPLICÓN (pb)	SECUENCIA 5' a 3'
1	KAP061F KAP063R	genérica genérica	136	CATCCTGTGYGCTGCTG ATTCCYTTCCAGGACTCACC
2	KAP064F KAP066R	genérica genérica	206	GTCCATCATGATCTTTCTTS GGTTTGGRGAAGGACTCACC
3	KAP067F KAP069R	genérica (excepto 2DL4) 2DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DP1	381	CCACATCCTCCTYTCTAAGG GGACAAGGAGAATCCMAGAC
3	KAP067F KAP070R	2DL1, 2DS1, 2DS3, 2DS4, 3DL1, 3DL3, 3DS1, 3DP1 genérica	381	CCACATCCTCCTYTCTAAGG GGACAAGGAGAAGCCCAGAC
3	KAP068F KAP070R	2DL4 genérica	381	CAACATACTCCTCTCTGAGG GGACAAGGAGAAGCCCAGAC
4	KAP071F KAP073R	genérica (excepto 3DL3) genérica	443	CATGGATGGGATGATAAAGAGAGA CCAAGTCSTGGATCATTCACTC
5	KAP085F KAP086R	genérica (excepto 2DL5) genérica	377	CCTCTTCTCCTTCCAGGTC GCAGGAAGCTCCTYAGCTA
5	KAP075F KAP086R	2DL5 genérica	377	CTGCCTCTTCTTCCAGGTC GCAGGAAGCTCCTYAGCTA
6	KAP092F KAP080R	genérica (excepto 2DL5) genérica	147	CTCCTGTCTCATGTTCTAGGAAAC GTTTCHACCTCCCCAGG
6	KAP093F KAP080R	2DL5 genérica	147	CTCCTGTCCTGTGTTCTAGGAAAC GTTTCHACCTCCCCAGG
7	KAP087F KAP082R	genérica genérica	243	AACTGCTATGATTAGCTTCTTA GCTMCCATCCTGCTTCC
8	KAP083F KAP084R	genérica genérica	143	CTTATGAAATGAGGRCCCAGAAG GGCCGAGGAGNACCTACC
9	KAP089F KAP090R	genérica genérica	327-347	CCTCACTCAGCATTTCCCTC CTTCAGATTCCAGCTGCTGG

Y: C o T, R: A o G, H: A, C o T, M: A o C, N: A, C, G o T

- 5 Cada cebador también comprende una secuencia identificadora específica de la muestra, denominada etiqueta identificadora múltiple (etiqueta MID), añadida en el extremo 5' de cada cebador. Los ejemplos de las etiquetas MID se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Ejemplos de etiquetas MID.

Cebador	MID (identificador múltiple)
1 directo 1 inverso	TCTCT TCTCA
2 directo 2 inverso	TGCAT TCTGA
3 directo 3 inverso	ATCAT TCAGA
4 directo 4 inverso	ATGAT TGAGA
5 directo 5 inverso	ATGCT ATGCA
6 directo 6 inverso	AGCAT AGAGA
7 directo 7 inverso	CTCAT CTGCA
8 directo 8 inverso	CTGAT CAGCA

5 Cada cebador también incluye una etiqueta de genoteca de 4 pb (no mostrada). Estas secuencias de cebadores adicionales no se muestran en la tabla 2. El tamaño de amplicón mostrado en la tabla 2 incluye las secuencias de cebador adicionales: la etiqueta de identificación individual de 5 pb (etiqueta MID) y la secuencia adaptadora de 15 pb, que incluye la etiqueta de la genoteca de 4 pb.

10 En el ejemplo, las secuencias de KIR de 8 muestras obtenidas del Programa nacional de donantes de médula ósea se amplificaron usando los cebadores que se muestran en la tabla 2. Los ácidos nucleicos amplificados se purificaron usando el sistema de purificación de ADN Agencourt (Beckman Coulter, Brea, Calif., EE. UU.). Los ácidos nucleicos purificados se cuantificaron y diluyeron a una concentración apropiada. Los ácidos nucleicos se combinaron a continuación para formar una combinación de todos los amplicones de todas las muestras. Se preparó una alícuota de esta mezcla para secuenciación usando el protocolo de pirosecuenciación de la plataforma 454 GS-FLX (454 Life Sciences, Branford, Conn., EE. UU.). Los datos de secuenciación se analizaron mediante el programa informático Conexio ATF (Conexio Genomics, Aus.).

20 Las figuras 3 y 4 muestran las secuencias del exón 5 para todos los genes KIR. Los nucleótidos en cursiva son exclusivos de un gen KIR particular en el exón 5; por lo tanto, cualquier secuencia unida a ese motivo de secuencia particular se distingue inmediatamente de otros genes KIR. Los nucleótidos en negrita se comparten entre varios de los genes KIR, pero no todos. Los nucleótidos en un cuadrado en gris son polimórficos en el gen KIR.

25 Los resultados ilustran que son necesarios experimentos de secuenciación más larga (300 pb) para diferenciar estos genes. Como se puede ver a partir de la figura 4, con experimentos de secuenciación que podían secuenciar solo de 50 a 60 pares de bases, como se hizo en la técnica anterior, no se habrían podido distinguir los genes KIR 2DL2, 2DL3, 2DS3, 2DS5 o 2DP1.

30 Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia a ejemplos específicos, será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance de la invención no debería estar limitado por los ejemplos descritos en el presente documento, sino por las reivindicaciones presentadas a continuación.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un procedimiento para determinar genotipos de KIR mediante el análisis de uno y el mismo exón en los 16 genes KIR para uno o más individuos en paralelo, comprendiendo el procedimiento:
- (a) para cada individuo, realizar una reacción de amplificación con al menos un par de cebadores que consisten en un cebador directo y un cebador inverso, comprendiendo cada cebador una secuencia adaptadora, una secuencia de identificación individual y una secuencia de hibridación con KIR, para amplificar las secuencias de exones de los genes KIR que comprenden sitios polimórficos para obtener amplicones de KIR;
- 10
- (b) combinar los amplicones de KIR de cada uno de los uno o más individuos obtenidos en la etapa (a);
- (c) realizar PCR en emulsión;
- 15
- (d) determinar la secuencia de cada amplicón de KIR para cada individuo usando pirosecuenciación en paralelo; y
- (e) asignar los alelos de KIR a cada individuo comparando la secuencia de los amplicones de KIR determinada en la etapa (d) con secuencias de KIR conocidas para determinar qué alelos de KIR están presentes en el individuo,
- 20
- en el que al menos uno de dichos cebadores es genérico para todos o para un subconjunto de genes KIR y en el que dichos cebadores se seleccionan de manera que cada uno de los al menos un exón en cada uno de los 16 genes KIR se amplifica con especificidad suficiente para permitir la determinación inequívoca del genotipo de KIR a partir de los amplicones.
- 25
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además determinar los haplotipos de KIR presentes en cada individuo.
- 30
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que al menos un cebador tiene la secuencia de la región de unión a KIR seleccionada de la tabla 2 y/o en el que al menos un cebador tiene una etiqueta de identificación individual seleccionada de la tabla 3.
- 35
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa (f) de determinar que el individuo es un donante de células madre hematopoyéticas no emparentado adecuado cuando se han encontrado alelos de KIR del grupo B en la etapa (e).
- 40
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa (f) de determinar el genotipo de HLA del individuo y la etapa (g) de determinar que el individuo está predispuesto a la enfermedad de Crohn cuando los alelos KIR2DL2 y KIR2DL3 se han encontrado en la etapa (e) y el alelo HLA-C2 se ha encontrado en la etapa (f).
- 45
6. Un kit para obtener amplicones de KIR para determinar genotipos de KIR mediante el análisis de al menos un exón en los 16 genes KIR en uno o más individuos en paralelo, que comprende al menos un par de cebadores que consisten en:
- un cebador directo que comprende una región adaptadora, una etiqueta de identificación individual y una región de hibridación con KIR;
- 50
- un cebador inverso que comprende una región adaptadora, una etiqueta de identificación individual y una región de hibridación con KIR;
- en el que ambos cebadores hibridan con todos los genes KIR y en el que dichos cebadores se seleccionan de manera que se amplifica uno y el mismo exón en cada uno de los 16 genes KIR.
- 55
7. El kit de la reivindicación 6, en el que al menos un cebador comprende una secuencia de hibridación con KIR seleccionada de la tabla 2 y/o en la que al menos un cebador comprende una etiqueta de identificación individual seleccionada de la tabla 3.
- 60
8. Una mezcla de reacción para obtener amplicones de KIR para determinar genotipos de KIR analizando al menos uno y el mismo exón en los 16 genes KIR en uno o más individuos en paralelo, que comprende al menos un conjunto de cebadores que incluye: un cebador directo que comprende una región adaptadora, una etiqueta de identificación individual y una región de hibridación con KIR; y un cebador inverso que comprende una región adaptadora, una etiqueta de identificación individual y una región de hibridación con KIR, y en el que ambos cebadores son genéricos para todos o para un subconjunto de genes KIR y en el
- 65

que dichos cebadores se seleccionan de manera que se amplifica cada exón en cada uno de los 16 genes KIR.

- 5 9. La mezcla de reacción de la reivindicación 8, en la que al menos un cebador comprende una secuencia de hibridación con KIR seleccionada de la tabla 2 y/o en la que al menos un cebador comprende una etiqueta de identificación individual seleccionada de la tabla 3.

FIGURA 2

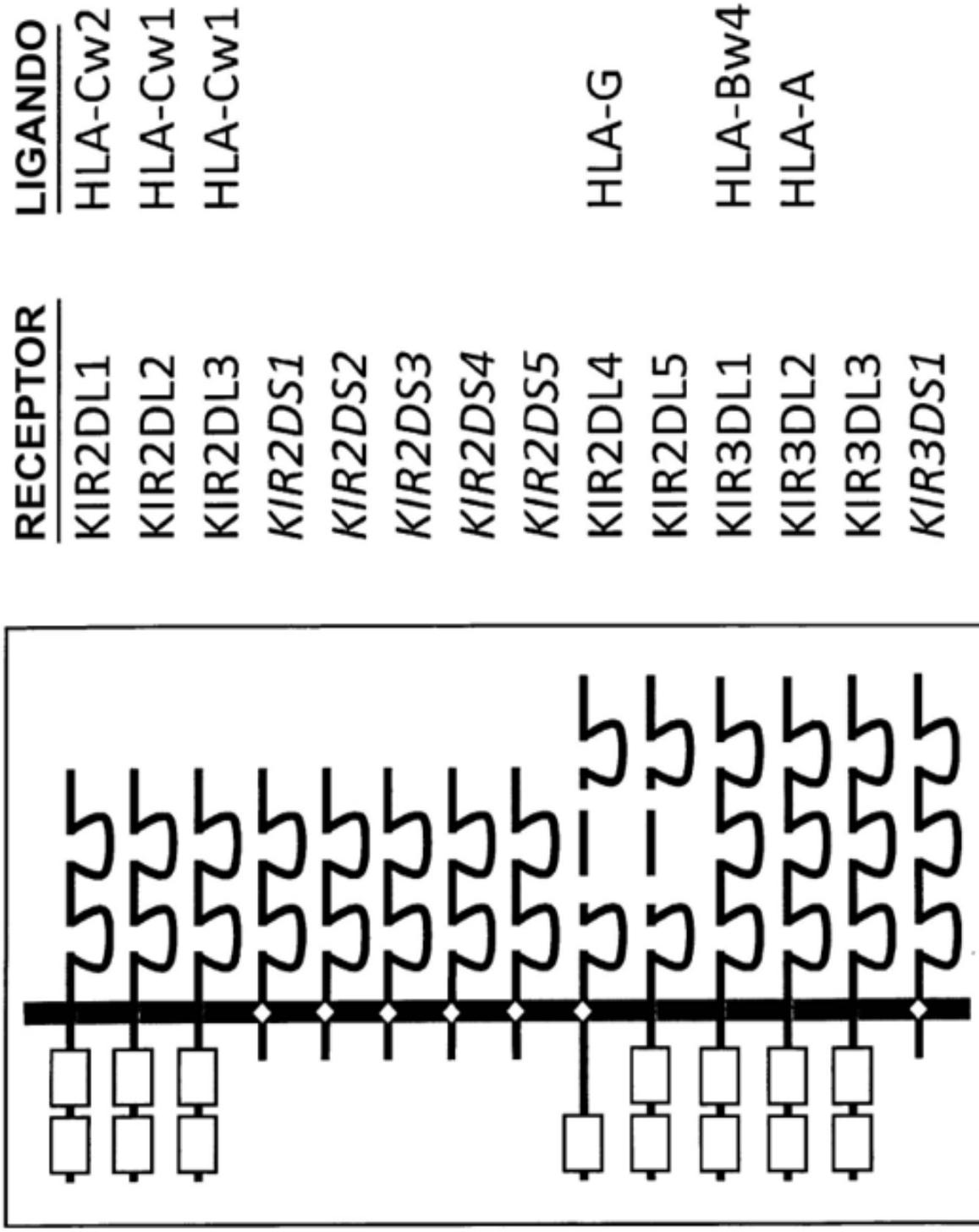


FIGURA 3

2DL1
 GTCTATA TGAGAA ACCTTCTCTCTCAGCCCAAGCCGGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAA TGTAGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCA

2DL2
 GTCTATA TGAGAA ACCTTCTCTCTCAGCCCAAGCCGGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGA A7GTAGGTTCTCTGCA

2DL3
 GTCTATA TGAGAA ACCTTCTCTCTCAGCCCAAGCCGGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGTTCTCTGCA

2DL4
 GTCTATA TGAGAA ACCTTCTCTCTCAGCCCAAGCCGGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAA CGGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCGGAGCTCCTTTGACATCTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACCTTAGGCTCCCTGCA

FIGURA 3 (cont.)

2DL5
 GTCTATTGGGAAACCTTC4CTCTCAGCCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCCGCACAGGAGAGAAACGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCAGGAGCTCAATTTGACATGTACCAATCTATCCAGGAGGGGAGGGCCCATGAACCTAGGCTCCCTGCA

2DS1
 GTCTATATGAGAAACCTTCTCTCAGCCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCTTGCCAGGAGAGAATGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCCGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGGTCCCCTGCA

2DS2
 GTCTATATGAGAAACCTTCTCTCAGCCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTTGGCAGGAGAGACCGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCCGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGAGGGGAGGCCCAATGAACGTAGGTTCTCTGCA

2DS3
 GTCTATATGAGAAACCTTCTCTCAGCCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCTTGCCAGGAGAGACCGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCATGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCACGGGAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGTTCTCTGCA

FIGURA 3 (cont.)

2DS4
 GTCTATAGAGAAACCTTCTCTCAGCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGAGAGAAATGTGACCCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCA

2DS5
 GTCTATAGAGAAACCTTCTCTCCAGCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCA

3DL1
 GTCCATATAGAGAAACCTTCTCTCAGCCAGCCGGGGCCCCAAGGTTTCAGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGTAG
 CTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCA

3DL2
 GTCTATAGAGAAACCTTCTCTCAGCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGAGAGAAACGTGACCTTGTCCCTGTAG
 CTCCTGGAGCTCCTATGACATCTACCATCTGTCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCA

FIGURA 3 (cont.)

3DL3
 GTCTATATGGGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGAGAGAATGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCTCGGAGCTTGTTGACATTTACCATCTATCCAGGGAGGCAGAGGCCGGTGAACCTTAGGCTC4ACTGCC

3DS1
 GTCTATATGAGAAACCTTCTCTCTCAGCCAGCCCGGGCCCCAAGGTTTCAGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGTAG
 CTCCCCGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGGAGCCCCATGAACGTAGGCTCCCTGCA

2DP1
 GTCTATATGAGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCTCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGGAGCCCCATGAACGTAGGTTCTCTGCA

3DP1
 GTCTATGTGGGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGGCCCCA7GGTTAAGGCAGGAGAGAGCGGTGACCTTGTCCCTGCAG
 CTCCTCGGAGCTCCTATGACATCTACCATCTATCAAGGGAAGGGGAGGC7CATGAACCTTAGGTTCCCTGCA

FIGURA 4

2DL1
GGG[C]CCAAAGGTCAACGGAAACAATTCCAGGC[T]GACTTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCAC[C]GGAGGGACCTACAGATGCTTTCG
GCTCTTTCC[A]TGACTCTCCATACGAGTGGTCAAAGTCAAGTGACCCCACTGCTTGTCTGTGCACAG

2DL2
GGGCCCAAGGTCAACGGAAACAATTCCAGGCCGACTTTCCCTCTGG[C]CCCTGCCACCCACCGGAGGAAC[C]TACAGATGCTTTCG
GCTCTTTCCG[T]GACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCCACTGCTTGTCTGTGCAT[A]G

2DL3
GGGCCCAAGGTCAACGGAAACAATTCCAGGCCGACTTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCACCGGAGG[A]ACCTACAGATGCTTTCG
GCTCTTTCCG[T]GACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCCACTGCTTGTCTGTGCACAG

2DL4
GTGCCCAGCATCAATGGAAACAATTCCAGGCCGACTTTCCCT[C]TGGGTCCTGCCACCCACCGGAGAGACCTACAGATGCTTTCG
GCTCTTTCCATGGATCTCCCTACGA[A]TGGTCAGAC[G]CGAGTGACCCCACTGCCCTGTTTCTGTGCACAG

FIGURA 4 (cont.)

2DL5
 GTGCCAAGCGTCAATGGAACATTCCAGGCTGACTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACACATGCTTCG
 GCTCTCTCCATGACTCACCCCTATGAGTGGTCAGACCCGAGTGACCCACTGCTTGTCTGTCTGTCCACAG

2DS1
 GGGACCAAGGTCAACGGAAACATTCCAGGCCAACTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCAAATGGAGGGACCTACAGATGCTTCG
 GCTCTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAAGTCAAGTGACCCACTGCTTGTCTGTCTGTCCACAG

2DS2
 GGGCCCAAGGTCAACGGAAACATTCCAGGCCGACTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACCTACAGATGCTTCG
 GCTCTTCCGTGACTCTCCCTATGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTCTGTCTGTCCACAG

2DS3
 GGGCCCAAGGTCAACGGAAACATTCCAGGCCGACTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCAAAGGAGGAACCTACAGATGCTTCG
 GCTCTTCCATGACTCTCCCTACGAGTGGTCAAAGTCAAGTGACCCACTGCTTGTCTGTCTGTCCACAG

FIGURA 4 (cont.)

2DS4
 GTGGCAGCATCAACGGAAACATTCCAGGCCGACTTCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACAGATGCTTCCG
 GCTCTTCCGTGACGCTCCCTACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGA7CCACTGCTTGTTCCTCCGTCACAG

2DS5
 GGGCCCAAGGTCAACAAGAACATTCCAGGCCGACTCTCCTCTGGACCCTGCCACCCACGGAGGGCCCTACAGATGCTTCCG
 GCTCTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAAGTCAAGTGACCCACTGCTTGTTCCTGTCACAG

3DL1
 GTGGCCAAGGTCAACAGAACATTCCAGGCAGATTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACAGATGCTTCCG
 GGTCTTTCCGGTCACTCTCCCTACGAGTGGTCAGACCCGAGTGACCCACTGCTTGTTCCTGTCACAG

3DL2
 GTGGCCAAAGGTCAACAGAACATTCCAGGCAGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACAGATGCTTCCG
 GCTCTTCCGTGCCCTGCCCTGCGGTGGTCAAACCTCAAGTGACCCACTGCTTGTTCCTGTCACAG

FIGURA 4 (cont.)

3DL3
 GTGCTGAGGGTCAAATGGAACATTTCCAGGCCAACTTCCCTCTGGGCCCTGTGACCCACGGAGGGAACTACAGATGCTTCG
 GCTCTTTCCGTGCCCTGCCCAAGCGTGGTCAAGACCCGAGTGACCCACTGCCCGTTTCTGTCCACAG

3DS1
 GTGGCAAGGTCAACAGAACATTCCAGGCAGATTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACAGATGCTTC
 GGCTCTTTCCGTCACCTCTCCCTACGAGTGGTTCAGACCCGAGTGACCCACTGGCTTGTCTGTCCACAG

2DPI
 GGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCTGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACTACAGATGCTTCG
 GCTCTTTCCGTGACTCTCCCTACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGGCTTGTCTGTCCACAG

3DPI
 GTGCCCAAGGTCAAATGGAACCTTCCAGGCCAACTTCCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACAGATGCTTCG
 GCTCTTTCCGTGACTCTCCCTACGAGTGGTTCAGACCC7TAGTGACCCACTGGCTTGTCTGTCCACAG