

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 162**

51 Int. Cl.:

C07K 16/34 (2006.01)

C12Q 1/6827 (2008.01)

C12Q 1/6881 (2008.01)

C12N 15/113 (2010.01)

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2013 PCT/EP2013/070403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 13773677 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2904107**

54 Título: **Métodos para la determinación del grupo sanguíneo Vel**

30 Prioridad:

01.10.2012 SE 1251099

30.11.2012 US 201261731556 P

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

20.05.2019

73 Titular/es:

LU LICENSE AB (100.0%)

Box 117

221 00 Lund, SE

72 Inventor/es:

STORRY, JILL R.;

JÖUD, MAGNUS;

NILSSON, BJÖRN y

OLSSON, MARTIN L.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 713 162 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

Métodos para la determinación del grupo sanguíneo Vel

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo técnico de la determinación del grupo sanguíneo, en particular a la determinación del grupo sanguíneo Vel y específicamente a herramientas y métodos para distinguir entre individuos Vel positivos y Vel negativos.

10

Antecedentes

Además de los sistemas de grupos sanguíneos humanos, existen antígenos de eritrocitos que no cumplen aún la definición de un sistema de grupo sanguíneo. La mayoría de estos antígenos o bien son casi universales en sangre humana (antígenos de alta prevalencia) o extremadamente raros (antígenos de baja prevalencia). Los reactivos para ensayar para estos antígenos son difíciles de encontrar y muchos no se pueden comprar comercialmente hasta la fecha.

15

La identidad genética molecular de muchos antígenos de grupo sanguíneo está bien establecida y existen una variedad de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su detección. Muchos laboratorios han desarrollado protocolos internos o adoptado los sistemas de prueba de otros para predecir antígenos de grupo sanguíneo por determinación de ácido desoxirribonucleico (ADN) en una base rutinaria.

20

Los ensayos basados en ADN pueden determinar fácilmente la homocigosidad y heterocigosidad, y en algunos casos, la hemicigosidad de un alelo de grupo sanguíneo, que está más allá de la capacidad de la serología convencional. Otro beneficio añadido de la determinación de grupo sanguíneo basado en ADN más allá de las capacidades de la serología tradicional es la posibilidad de determinar el grupo sanguíneo fetal ensayando ADN derivado de células fetales en líquido amniótico o biopsias de vellosidades coriónicas, o crecientemente común incluso de ADN fetal sin células en plasma materno.

25

30

Es una gran frustración para usuarios finales y fabricantes por igual que el factor limitante en proporcionar información sobre el fenotipo en pacientes, donantes de sangre y glóbulos rojos (GR) reactivos sea la disponibilidad de antisueros fiables.

35

Hay anticuerpos monoclonales hacia muchos antígenos de grupo sanguíneo y por tanto el suministro está de alguna manera asegurado. Sin embargo, para especificidades para las que no se han generado anticuerpos monoclonales, los fabricantes aún tienen que confiar en anticuerpos policlonales humanos como reactivos de determinación. Muchos de estos escasean cada vez más, con frecuencia son solo débilmente y/o variablemente reactivos, y son costosos de producir. Para algunos grupos sanguíneos, se han inmunizado voluntarios contra cierto antígeno de grupo sanguíneo para uso reactivo o médico, pero generar anticuerpos contra un antígeno de alta prevalencia, por ejemplo, Vel como se describe en Issit et al (1968) Vox Sang. 15: 125-132, no es una opción en voluntarios humanos porque las unidades de sangre que carecen del antígeno correspondiente son raras y el procedimiento podría, por tanto, constituir una amenaza de seguridad.

40

45

El antígeno del grupo sanguíneo Vel, primero descrito por Sussman y Miller (Rev. Hematol. 1952;7:368-71), se expresa en GR y es uno de los varios denominados antígenos de grupo sanguíneo huérfanos para los que la base molecular es desconocida.

50

Entre los grupos sanguíneos huérfanos, Vel se considera uno de los más relevantes clínicamente, ya que los pacientes Vel negativos, que han sido inmunizado después de una transfusión o embarazo, y posteriormente son transfundidos con glóbulos rojos de donantes Vel positivos están en riesgo de efectos secundarios graves incluyendo hemólisis intravascular aguda. Tal caso se describe, por ejemplo, en Storry y Mallory (1994) [6] y en Sandler et al. (1979) [].

55

Actualmente hay una falta global de donantes de sangre Vel negativos disponibles para fines de medicina de transfusión. Según esto es deseable proporcionar una prueba que pueda seleccionar de forma rápida y eficaz donantes Vel negativos.

60

El contexto molecular de Vel hasta la fecha ha sido desconocido y por tanto la única posibilidad para identificar donantes de sangre que carecen de Vel ha sido a través de fenotipado usando antisueros de pacientes inmunizados, un enfoque subóptimo desde una perspectiva ética, de seguridad y calidad. Las herramientas para el cribado genético son deseables ya que facilitan el cribado a gran escala, rentable de donantes de sangre para la ausencia de Vel, para aumentar la disponibilidad de sangre Vel negativa.

65

La identificación de un gen del que es dependiente la expresión del grupo sanguíneo Vel permitiría el posible desarrollo de un ensayo de cribado que podría identificar donantes de sangre Vel negativa, y también significa determinar

pacientes en riesgo de producir un anticuerpo indeseado contra el antígeno Vel, o sospechosos de haber fabricado tales anticuerpos.

Compendio

5 Casi todos los seres humanos portan el antígeno de grupo sanguíneo Vel en la superficie de sus glóbulos rojos (GR). Los individuos que carecen de Vel pueden formar anticuerpos anti-Vel que pueden producir reacciones hemolíticas graves tras transfusión sanguínea, y también producen enfermedad hemolítica del feto y recién nacido en embarazos raros.

10 Según esto, es esencial identificar individuos Vel negativos antes de la transfusión sanguínea para evitar dichas reacciones graves. Como se ha discutido en el presente documento anteriormente, para algunos grupos sanguíneos, se han inmunizado voluntarios contra un cierto antígeno de grupo sanguíneo para uso reactivo o médico. Sin embargo, generar anticuerpos contra un antígeno de alta prevalencia no es una opción en voluntarios humanos porque las unidades de sangre que carecen del antígeno correspondiente son raras y el procedimiento podría, por tanto, constituir una amenaza de seguridad. Los presentes inventores han abordado el problema aplicando ensayos basados en ADN al grupo sanguíneo Vel, para llenar los huecos dejados por la no disponibilidad de antisueros reactivos apropiados.

15 Los presentes inventores han descubierto la base genética de Vel y han encontrado una mutación (específicamente, una delección de 17 pares de bases) en un gen previamente no caracterizado (proteína integral de membrana pequeña 1; Símbolo génico oficial *SMIM1*, previamente *LOC388588*; *Entrez Gene ID 388588*), para la que todos los individuos Vel negativo ensayados eran homocigotos, verificado por controles genealógicos Vel negativo y Vel positivo. La expresión del antígeno de grupo sanguíneo Vel en GR depende de la expresión del gen *SMIM1*, cuyo ARNm codifica una proteína transmembrana de tipo 1. El fenotipo Vel negativo se produce cuando esta proteína no se puede expresar.

20 Estos resultados revelan el mecanismo molecular previamente desconocido por el que el antígeno del grupo sanguíneo Vel se expresa. Los presentes resultados demuestran que el grupo sanguíneo Vel de un individuo está determinado por *SMIM1*, localizado en un bloque haplotipo de 97 kb en el cromosoma 1p36.32.

30 Este gen codifica una proteína de membrana evolutivamente conservada de tipo 1 que se coexpresa con genes conocidos de GR y contiene sitios de unión para factores de transcripción unidos con desarrollo eritroide.

35 Todos los individuos Vel negativos examinados (n=36) en el estudio eran homocigotos para una delección de 17 pares de bases en el exón 3 que cambia el marco de lectura 5' de la región que codifica el dominio transmembrana, lo que produce un fenotipo nulo donde los antígenos Vel no se expresan.

40 La ausencia de un producto proteico de *SMIM1* en membranas de GR de portadores homocigotos de la delección se confirmó usando inmunotransferencia usando anticuerpos generados contra el dominio N-terminal de la proteína.

45 La sobreexpresión de *SMIM1* de tipo salvaje después de la transfección de células hematopoyéticas aumentó la reactividad con sueros que contienen anti-Vel, mientras que el alelo mutante no.

El cribado genético molecular para la delección entre donantes de sangre del sur de Suecia reveló que 1/17 son portadores heterocigotos, correspondiente a una frecuencia de homocigotos de aproximadamente 1/1150.

50 En un aspecto principal la presente divulgación se refiere a un método de identificar el fenotipo Vel de un individuo, dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo por análisis en una muestra biológica de dicho individuo la composición del gen *SMIM1*, en donde al menos un gen *SMIM1* intacto es indicativo de un fenotipo Vel positivo, y en donde un gen *SMIM1* que comprende una mutación resultante en expresión de proteína abolida, o en expresión de una proteína no funcional, es indicativo de un fenotipo Vel negativo.

55 El gen *SMIM1* típicamente se define por una secuencia polinucleotídica que comprende SEQ ID NO. 1, o una variante de secuencia de la misma. El concepto gen *SMIM1* puede, sin embargo, comprender también elementos reguladores naturales tal como, pero no limitados a, promotores y potenciadores.

60 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de detección y/o cuantificación de una variante de ajuste de *SMIM1* en una muestra, el método comprende hacer ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm) en la muestra, amplificar el ADNc entero o las partes correspondientes al gen *SMIM1*, tal como SEQ ID NO. 3, 4, 35 o 36, o partes de las mismas y detectar y cuantificar el ADNc amplificado para detectar o cuantificar la variante de ajuste.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de identificar un individuo Vel positivo, que comprende las etapas:

- 5 a) realizar la amplificación de un polinucleótido del sujeto poniendo en contacto un polinucleótido de una célula del sujeto con un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia que es complementaria a al menos 10 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que codifica el antígeno Vel;
 b) detectar un amplicón de la etapa (a), mediante lo cual la detección del amplicón identifica el sujeto como un individuo Vel positivo.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de identificar un individuo Vel negativo, que comprende las etapas:

- 10 a) realizar la amplificación de un polinucleótido del sujeto poniendo en contacto un polinucleótido de una célula del sujeto con un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia que es complementaria a al menos 10 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que codifica el antígeno Vel;
 b) detectar un amplicón de la etapa (a), mediante lo cual la detección del amplicón identifica el sujeto como un individuo Vel negativo.

15 En otro aspecto la presente divulgación se refiere a un método de detectar en una muestra, una célula que expresa un antígeno Vel que comprende detectar en la muestra un polinucleótido que codifica un antígeno Vel.

20 El gen *SMIM1* que típicamente comprende SEQ ID NO. 1 o una variante de secuencia de la misma codifica un polipéptido que se asocia con el antígeno Vel.

25 La expresión del antígeno del grupo sanguíneo Vel en GR depende de la expresión del gen *SMIM1*, cuyo ARNm codifica una proteína transmembrana de tipo 1. El fenotipo Vel negativo se produce cuando esta proteína no se puede expresar, por ejemplo, debido a la delección de 17 pares de bases.

30 Hasta ahora, la única manera de identificar individuos Vel negativo ha sido por ensayos de fenotipado celulares que implican antisuero de pacientes inmunizados, cuyo suministro está severamente limitado. En contraste, el ensayo genético del presente método se puede realizar en números virtualmente ilimitados de individuos a bajo coste, lo que permite el cribado de grandes poblaciones de donantes de sangre para identificar más donantes Vel negativos y facilitar la obtención de unidades de sangre Vel negativas para pacientes en necesidad.

Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para transfusión sanguínea que comprende las etapas:

- 35 a) aplicar el método de distinción entre pacientes Vel negativos y Vel positivos definido en el presente documento;
 b) elegir de un banco de donantes o sangre i) sangre Vel positiva si el método de a) determina que el paciente es Vel positivo, o ii) sangre Vel negativa si el método de a) determina que el paciente es Vel negativo;
 c) transfundir el paciente con la sangre elegida en b).

40 En un aspecto de la presente divulgación, el método para la transfusión de sangre es aplicable a un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con eritrocitos, tal como, pero no limitado a anemia.

45 Las mujeres embarazadas Vel negativas (madres) pueden portar fetos Vel positivos. Cuando eritrocitos del feto Vel positivo se transfieren a la madre Vel negativa, esto puede producir una respuesta inmunitaria de la madre, generando de esta manera anticuerpos anti-Vel contra los eritrocitos Vel positivos. Esto es potencialmente letal para el feto, especialmente durante un segundo o posterior embarazo de la mujer Vel negativa. Según esto, en un aspecto la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento profiláctico de una mujer embarazada Vel negativa que comprende:

- 50 a) identificar un individuo Vel negativo aplicando el método definido en el presente documento anteriormente, y
 b) administrar a dicha mujer embarazada Vel negativa una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-Vel, neutralizando de esta manera los eritrocitos Vel positivos originarios del feto Vel positivo portado por dicha mujer embarazada Vel negativa.

55 La base para el método de la presente divulgación es el descubrimiento por los presentes inventores de la base molecular que distingue individuos Vel negativos y Vel positivos, respectivamente. Según esto, en un aspecto importante, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de SEQ ID NO. 1, o un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de una secuencia que es complementaria a dicha SEQ ID NO. 1, en donde la variante de secuencia comprende al menos una mutación o polimorfismo, y en donde la mutación o polimorfismo produce transcripción y/o traducción de proteína abolida y/o ausencia de la proteína en la superficie celular.

65 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de SEQ ID NO. 1, o un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de una secuencia que es complementaria a dicha SEQ ID NO. 1, en donde la variante de secuencia comprende al menos una mutación

o polimorfismo, en donde la mutación o polimorfismo produce traducción de un antígeno Vel que tiene un epítipo alterado, en donde el epítipo alterado no es reconocido por anticuerpos anti-Vel.

Los presentes inventores han desarrollado herramientas para realizar los análisis necesarios para distinguir de forma apropiada entre muestras Vel positivas y Vel negativas. Una de tales herramientas importantes incluye cebadores oligonucleotídicos para la producción de un amplicón que se puede detectar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel. En un aspecto semejante, la presente divulgación se refiere a un oligonucleótido aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, así como el uso de dicho oligonucleótido aislado en el método definido en el presente documento.

Los inventores han identificado que el antígeno Vel es dependiente de y, por tanto, está representado por el polipéptido que tiene SEQ ID NO. 5 o una variante de secuencia o un fragmento de la misma. El polipéptido es una herramienta útil en los métodos de la presente divulgación. Según esto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido aislado que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 5, o un fragmento o una variante de la misma, en donde dicho fragmento comprende al menos 20 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante comprende al menos un residuo de serina y/o treonina, y en donde al menos un residuo de serina y/o treonina de dicha SEQ ID NO. 5 o dicho fragmento o variante de la misma, está O-glucosilado.

Fragmentos polipeptídicos importantes que definen el antígeno Vel son fragmentos de SEQ ID NO. 5. Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un péptido aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10.

Un polinucleótido aislado, que codifica tras la expresión un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10 también es un aspecto de la presente divulgación.

Los presentes inventores han generado anticuerpos capaces de reconocer los fragmentos peptídicos definidos anteriormente. Según esto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo capaz de reconocer un epítipo de un antígeno Vel, en donde el epítipo se define por una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10, o una secuencia peptídica O-glucosilada seleccionada de SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo capaz de reconocer un epítipo de un antígeno Vel, en donde el epítipo se define por un péptido que tiene la SEQ ID NO. 5, o un fragmento o variante de la misma, en donde la variante es al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99% idéntica a dicha SEQ ID NO. 5, o una variante O-glucosilada de SEQ ID NO. 5, tal como al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99% idéntica a una variante O-glucosilada de SEQ ID NO. 5.

Además, la presente divulgación también se refiere a un método de hacer un anticuerpo policlonal, el método comprende:

- a) inmunizar un mamífero con el polipéptido o péptido como se ha definido en el presente documento anteriormente, en condiciones para provocar una respuesta de anticuerpos;
- b) aislar anticuerpos de dicho mamífero;
- c) cribar los anticuerpos aislados con el polipéptido o fragmento polipeptídico identificando de esta manera un anticuerpo policlonal que se une específicamente al polipéptido o fragmento polipeptídico de la etapa a).

En un aspecto adicional la divulgación se refiere a un método de hacer un anticuerpo monoclonal, el método comprende:

- a) inmunizar un mamífero con el polipéptido o péptido como se ha definido en el presente documento anteriormente, en condiciones para provocar una respuesta de anticuerpos;
- b) i) aislar células que producen anticuerpos del mamífero, o ii) clonar la secuencia codificante del anticuerpo y expresarla en otras células haciéndolas células productoras de anticuerpo;
- c) fusionar las células productoras de anticuerpo con células inmortalizadas en cultivo para formar células de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal;
- d) cultivar las células de hibridoma;
- e) aislar del cultivo anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al polipéptido o fragmento polipeptídico de la etapa a).

Está dentro del ámbito de la presente divulgación proporcionar herramientas fáciles de usar tal como kits, adecuadas para distinguir entre muestras de individuos Vel negativos y Vel positivos.

En otro aspecto semejante la divulgación se refiere a un kit para detectar un antígeno Vel y/o distinguir entre muestras de individuos Vel negativos y Vel positivos, dicho kit comprende al menos dos cebadores oligonucleotídicos aislados seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

5 En una forma de realización la presente divulgación se refiere a un oligonucleótido que es complementario a los cebadores oligonucleotídicos definidos anteriormente en el presente documento, en donde dicho cebador oligonucleotídico es un cebador oligonucleotídico que es complementario a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

10 En una forma de realización de la presente divulgación, el cebador oligonucleotídico es un cebador directo de un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

15 En otra forma de realización de la presente divulgación, el cebador oligonucleotídico es un cebador inverso de un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

20 En otra forma de realización de la presente divulgación, el cebador oligonucleotídico es un cebador sentido de un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

25 En otra forma de realización de la presente divulgación, el cebador oligonucleotídico es un cebador antisentido de un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

La presente divulgación es adecuada para adaptación a escala de alto rendimiento aplicando oligonucleótidos, péptidos o anticuerpos a una superficie, formando de esta manera un dispositivo para detectar antígenos Vel o moléculas asociadas a antígenos Vel.

30 En un aspecto semejante la presente divulgación se refiere a un kit que comprende una matriz de microchip que comprende uno o más polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 32, 33, 34, 35 y 36 o uno o más fragmentos de dicho polinucleótido.

35 En otro aspecto semejante la divulgación se refiere a un kit que comprende una matriz de microchip que comprende uno o más péptidos o polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9 y 10, o uno o más fragmentos de dicho péptido o polipéptido en donde dicho fragmento comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

40 Para ciertos fines, tal como aplicaciones de citología incluyendo, pero no limitadas a inmunohematología y detección de anticuerpos, puede ser útil proporcionar células que presenten un antígeno Vel. Por tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a un kit que comprende células que presentan un antígeno Vel.

45 En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido aislado, que tras expresión codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o un fragmento o variante de la misma, como un medicamento o como un marcador diagnóstico.

Descripción de los dibujos

50 **Figura 1:** Organización genómica de *SMIM1*. Los exones se muestran como cajas mientras que la secuencia intrónica se representa como una línea. El gris oscuro representa exones no codificantes, excepto para el exón alternativo 1 (marcado exón 1a en la figura) que está en gris claro; el negro representa el marco abierto de lectura. Las posiciones de los cebadores de amplificación del ADN genómico se muestran mediante las flechas.

55 **Figura 2.** PCR-RFLP del exón 3 de *SMIM1* usando Styl. El amplicón de tipo salvaje se digiere en dos fragmentos; mientras que el amplicón mutado no es digerido por la enzima. Además, este amplicón se puede distinguir en el gel por tamaño, basado en la diferencia de 17 pb.

60 **Figura 3.** PCR específica de alelo (ASP) de ADN genómico de individuos determinados por secuenciación que son w/w, w/m o m/m. La banda control se genera por amplificación de una región de *SMIM1* que abarca la delección de 17 pb en ausencia de amplificación específica de alelo.

Figura 4. PCR específica de gen (GSP). La amplificación de la región que rodea la delección de 17 pb permite la determinación de muestras w/w, w/m y m/m en gel de agarosa al 3% basado solamente en el tamaño de la banda.

65 **Figura 5.** Cribado de medio rendimiento. Se desarrolló un ensayo para detectar seis polimorfismos de grupo sanguíneo clínicamente relevantes para amplificar ADN directamente de sangre completa. Estos alelos se diferencian por el

tamaño del amplicón y se pueden identificar fácilmente mediante electroforesis en gel (mostrado aquí) o por análisis de fragmentos usando sondas marcadas (datos no mostrados). Los cebadores que amplifican *SMIM1* de tipo salvaje se han incorporado en el ensayo y el ADN de individuos Vel- no es amplificado por los cebadores de *SMIM1* como se indica en el carril 4.

5 **Figura 6.** El panel A es una inmunotransferencia que muestra la capacidad de distinguir el antígeno Vel muy específica del anti-péptido 1 de conejo (péptido 1 = SEQ ID NO. 6). El panel B muestra la misma membrana lavada y vuelta a ensayar con anti-GAPDH como un control de carga. Las muestras Vel positivas son homocigotos genotípicamente de tipo salvaje; las muestras Vel negativas con homocigotos genotípicamente mutantes. La muestra Vel débilmente positiva (^W) era un heterocigoto de tipo salvaje/mutante genotípicamente determinado que expresa *SMIM1* débilmente.

10 **Figura 7.** Análisis de citometría de flujo del antígeno Vel con anti-Vel policlonal humano. 7a: Histograma que muestra la variación natural en la expresión del antígeno Vel en GR normales homocigotos para *SMIM1* de tipo salvaje. Las líneas negras representan diferentes ejemplos de GR Vel positivos (marcados AK1, AK8, AK10, AK11), ensayados con anti-Vel, seguido por un anti-IgG humana marcado con FITC (2º anticuerpo). Los histogramas sombreados indican reactividad de los GR AK1 ensayados con anti-IgG humana solo (izquierda), y con anti-Vel (derecha). 7b: Figura para mostrar la influencia de la cigosidad de *SMIM1* en la expresión del antígeno Vel. 7c: La sobreexpresión de *SMIM1* (denominado LOC aquí) en células K562 demostró fuerte expresión de antígeno Vel comparada con las construcciones transfectadas vacía (control) y mutante (Vel negativo). El eje y muestra el número relativo de células Vel positivas, donde el porcentaje de células positivas en el control se ajustó a 1.

15 **Figura 8.** Visión general de sangre negativa para antígeno de alta incidencia solicitada durante el periodo de 2005 a 2010 del Programa Americano de Donantes Raros. La barra de sangre Vel negativa está encerrada por claridad. La sangre Vel negativa es el tipo de sangre más frecuentemente solicitada negativo para un grupo sanguíneo huérfano, es decir, donde la determinación, selección y confirmación no se puede hacer por métodos basados en ácidos nucleicos.

20 **Figura 9.** Resultados de la atenuación génica de *SMIM1* en la línea celular HEL que expresa establemente *SMIM1*. 9a muestra la expresión relativa de ARNm después de la transducción de células HEL con controles de transducción (HEL wt y -ve) y con el ARNhc clon G a una MOI (multiplicidad de infección) de 0,5 U (G0,5-M). La figura 9b muestra la inmunotransferencia con el anti-*SMIM1* de conejo policlonal de células HEL después de la transducción con un control de transducción (HEL wt), y con ARNhc clon G a una MOI de 0,5 U, 1,0 U, 2,0 U, 3,0 U, 4,0 U. La atenuación tanto del transcrito de ARNm como de proteína se demuestra claramente.

25 **Descripción detallada**

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier forma de realización que no esté en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

30 **Gen *SMIM1***

El antígeno del grupo sanguíneo Vel está localizado en los glóbulos rojos (GR) y es uno de los varios denominados antígenos de grupo sanguíneo huérfanos para los que la base molecular es desconocida. Es clínicamente importante y por tanto la identificación de la molécula portadora permitiría el desarrollo de un ensayo de cribado para identificar donantes de sangre apropiados para la donación para pacientes Vel negativo/negativo inmunizados, y también para pacientes en riesgo de producir un anticuerpo indeseado.

35 Los presentes inventores proporcionaron entendimiento de la base molecular y genética del antígeno del grupo sanguíneo Vel. Esto se ha alcanzado mediante una gama de investigaciones serológicas y bioquímicas, incluyendo investigaciones de genes candidatos. Estas investigaciones produjeron estimaciones del tamaño de la proteína del glóbulo rojo que lleva el antígeno Vel y una posible configuración de homodímero.

Una hipótesis de que el gen que codifica el antígeno del grupo sanguíneo Vel podría potencialmente triangularse a través cribado genómico del genoma entero usando micromatrices de polimorfismo de nucleótido único (SNP) se basó en tres observaciones:

- 40 (a) se cree que el genotipo Vel negativo es más común en Suecia (1:1700, comparado con aprox. 1:4000 en otras poblaciones),
 (b) el fenotipo Vel negativo se hereda de una manera aparentemente autosómica recesiva, y
 45 (c) el gen que codifica el antígeno Vel, como varios otros genes de grupos sanguíneos, se podría expresar preferentemente en eritrocitos.

En conjunto, estas observaciones hicieron a los inventores sugerir que el fenotipo Vel negativo podría estar causado por una única mutación fundadora en la población sueca, en cuyo caso un cribado genético de todo el genoma podría tener éxito a pesar del número relativamente limitado de muestras de ADN de individuos Vel negativos disponibles.

Según esto, se recogieron perfiles SNP en todo el genoma de donantes Vel negativos usando micromatrices Illumina Human Omni 2.5M-Quad. Usando una estrategia computacional concebida y ejecutada en colaboración por los presentes inventores, se identificó una región en el cromosoma 1 que contiene 5 genes.

5 Después de la revisión de las características de estos genes, se determinó que *SMIM1* era el más prometedor porque:

- (a) su estructura predicha correspondía a una proteína transmembrana,
- (b) su tamaño predicho coincidía con las estimaciones de tamaño de los estudios bioquímicos anteriores del inventor,
- 10 (c) los análisis de datos de micromatrices de expresión génica preexistentes recuperados de bases de datos públicas indicaban que se expresaba preferentemente en precursores de glóbulos rojos.

Con esta información en mano, los inventores determinaron la secuencia de ADN de *SMIM1* en donantes Vel negativos y encontraron una delección de 17 pares de bases que se predice que destruye el dominio transmembrana de la proteína, proporcionando suficiente explicación para un denominado fenotipo nulo o inactivado.

15 Estudios genéticos posteriores han identificado la misma delección exacta de 17 pares de bases en todos los 36 mutantes Vel negativos de Suecia, RU y los EE UU ensayados hasta la fecha, lo que sugiere que es en efecto la causa predominante del fenotipo Vel negativo. Esto ha sentado las bases para la identificación de donantes de sangre Vel negativos por ensayo genético.

20 La base para el método de la presente divulgación es el descubrimiento por los presentes inventores de la base molecular que distingue individuos Vel negativos y Vel positivos, respectivamente. Según esto, en un aspecto importante, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de SEQ ID NO. 1, o un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de una secuencia que es complementaria a dicha SEQ ID NO. 1, en donde la variante de secuencia comprende al menos una mutación sin sentido, y en donde la mutación sin sentido produce transcripción y/o traducción de proteína abolida, lo que produce de esta manera la ausencia de la proteína en la superficie celular.

25 En una forma de realización de la presente divulgación la mutación sin sentido es una delección, tal como una delección de entre 1 y 100 nucleótidos, tal como entre 2 y 90 nucleótidos, tal como entre 3 y 80 nucleótidos, tal como entre 4 y 70 nucleótidos, tal como entre 5 y 60 nucleótidos, tal como entre 6 y 50 nucleótidos, tal como entre 7 y 40 nucleótidos, tal como entre 8 y 30 nucleótidos, tal como entre 9 y 25 nucleótidos, tal como entre 10 y 20 nucleótidos, tal como entre 15 y 19 nucleótidos, tal como entre 16 y 18 nucleótidos, tal como 17 nucleótidos.

30 En una forma de realización importante de la presente divulgación, la delección es una delección de 17 nucleótidos.

35 En una forma de realización de la presente divulgación, la variante de secuencia del nucleótido anteriormente definido es entre el 60% y el 99,9% idéntica, tal como entre el 70% y el 99,8% idéntica, tal como entre el 80% y el 99,7% idéntica, tal como entre el 90% y el 99,8% idéntica, tal como entre el 95% y el 99,56% idéntica, tal como entre el 96% y el 99,55% idéntica, tal como entre el 97% y el 99,54% idéntica, tal como entre el 98% y el 99,9% idéntica, tal como al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%, tal como al menos el 99,1, al menos el 99,9%, tal como el 100% idéntica a SEQ ID NO. 1 o una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO. 1 o una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO. 1.

40 En una forma de realización de la presente divulgación, la variante de secuencia del polinucleótido aislado anterior tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 2 y 4 o una secuencia que es complementaria a SEQ ID No. 2 o 4.

45 En una forma de realización de la presente divulgación, el polinucleótido aislado tiene la secuencia de SEQ ID NO. 31, y en otra forma de realización de la presente divulgación el polinucleótido aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO. 31.

55 **Herramientas para amplificar *SMIM1***

Los presentes inventores han desarrollado herramientas para realizar los análisis necesarios para distinguir de forma apropiada entre muestras Vel positivas y Vel negativas, métodos que se describen a continuación en el presente documento. Una herramienta importante útil en dichos métodos incluye cebadores oligonucleotídicos para la producción de un amplicón (una secuencia polinucleotídica amplificada) que se puede detectar por métodos convencionales, por ejemplo, electroforesis en gel. En un aspecto semejante, la presente divulgación se refiere a un oligonucleótido aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, así como el uso de dicho oligonucleótido aislado en el método definido en el presente documento.

Métodos para la distinción Vel negativo/Vel positivo

El descubrimiento de la delección de 17 pb descrita en el presente documento anteriormente es clínicamente muy importante ya que la única manera para identificar donantes de sangre Vel negativos antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud han sido ensayos de fenotipado celulares basados en suero o plasma de pacientes inmunizados, cuyo suministro y calidad están gravemente limitados.

En contraste, el ensayo genético se puede realizar en números virtualmente ilimitados de pacientes a bajo coste, lo que permite el cribado de grandes poblaciones de donantes de sangre para identificar más donantes Vel negativos y facilitar la obtención de unidades de sangre Vel negativa para pacientes en necesidad.

Es un objeto global de la presente divulgación proporcionar un método que comprende:

- a) detectar un alelo que comprende una variación en el gen *SMIM1*;
- b) determinar si la variación de a) es homocigota o heterocigota;
- c) determinar si la variación de a) y b) es Vel negativa o Vel positiva.

El análisis se puede realizar usando cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. Los ejemplos no limitantes de métodos adecuados incluyen electroforesis en gel, PCR en tiempo real, espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF), extensión de oligonucleótido marcado con fluorocromo, amplificación específica de secuencia marcada con fluorocromo (por ejemplo, tecnología xMAP), secuenciación incluyendo secuenciación con terminación de colorante, y otras técnicas de secuenciación de siguiente generación que incluyen, pero no están limitadas a, pirosecuenciación, secuenciación por ligación (SOLiD) y secuenciación de semiconductor Ion Torrent.

Un individuo Vel negativo según la presente divulgación tiene un fenotipo Vel negativo. Un individuo Vel positivo según la presente divulgación tiene un fenotipo Vel positivo. Según esto las expresiones individuo Vel negativo y fenotipo Vel negativo se usan de forma intercambiable en el presente documento, cuyo significado es bien conocido para el experto en la materia.

Los métodos proporcionados en la presente divulgación tienen el fin de caracterizar el fenotipo del antígeno Vel de un individuo tal como donante de sangre o receptor de sangre (paciente que recibe sangre, por ejemplo, a través de transfusión). Un fenotipo de antígeno de grupo sanguíneo se define por la presencia o ausencia de antígenos de grupo sanguíneo en la superficie del eritrocito. Los antígenos de grupo sanguíneo son diferencias estructurales únicas, heredadas, encontradas en las proteínas, glucoproteínas y glucolípidos que forman la superficie externa del eritrocito. Todos los antígenos de grupo sanguíneo se han identificado por anticuerpos específicos presentes en el plasma de diferentes individuos. Con la excepción de algunos anticuerpos "naturales", la mayoría de los anticuerpos hacia antígenos de grupo sanguíneo se han hecho como respuesta a la introducción, por ejemplo, mediante transfusión o embarazo, de eritrocitos que portan un antígeno de grupo sanguíneo que está ausente de los eritrocitos del paciente. Estos anticuerpos persisten en la circulación y pueden producir secuelas clínicas tal como reacción a transfusión, o enfermedad hemolítica del recién nacido. Sin embargo, mientras que muchos anticuerpos hacia antígenos de grupo sanguíneo tienen el potencial para producir supervivencia acelerada de eritrocitos y hemólisis, muy pocos anticuerpos hacia antígenos de grupo sanguíneo se encuentran en el marco de transfusión rutinaria.

Se han identificado más de 300 antígenos de grupo sanguíneo. La mayoría de estos se catalogan en uno de los 33 sistemas de grupo sanguíneo, según el componente de membrana del GR en que reside el antígeno. Los antígenos que no pertenecen a un sistema de grupo sanguíneo se asignan a una de seis colecciones de grupo sanguíneo (201 series) o a cualquiera de las 700 series (antígenos de baja frecuencia) o de las 901 series (antígenos de alta frecuencia) definidas por el Partido de Trabajo en Inmunogenética de Glóbulos Rojos y Terminología de Grupos Sanguíneos de la Sociedad Internacional Para la Transfusión de Sangre (ISTB).

Por tanto, si un individuo se describe como que porta el fenotipo Vel negativo, esto significa que los eritrocitos del individuo carecen del antígeno del grupo sanguíneo Vel. También se puede usar fenotipo para resumir los antígenos conocidos en los eritrocitos de una persona, por ejemplo, el fenotipo del paciente A era D+C-E+c+e+, K-, Fy(a+b+). Esto significa que los eritrocitos del paciente A expresaban los antígenos de grupo sanguíneo E, c, e, Fy^a y Fy^b, pero no expresaban los antígenos C o K.

En un aspecto principal, la presente divulgación se refiere por tanto a un método de identificar el fenotipo Vel de un individuo, dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo analizando en una muestra biológica de dicho individuo la composición del gen *SMIM1*, en donde al menos un gen *SMIM1* intacto es indicativo de un fenotipo Vel positivo, y en donde un gen *SMIM1* que comprende una mutación que produce expresión de proteína abolida, o expresión de una proteína no funcional, es indicativo de un fenotipo Vel negativo.

La mutación descrita en el presente documento anteriormente puede ser cualquier mutación, sin embargo, en una forma de realización preferida de la presente divulgación la mutación es una delección, tal como una delección de SEQ ID NO: 31 del gen *SMIM1* de tipo salvaje. La mutación también puede ser un fragmento o variante de dicha SEQ ID

NO: 31, en donde dicho fragmento comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos de dicha SEQ ID NO: 31, y en donde en dicha variante, no más de 5 nucleótidos se han alterado a 5 nucleótidos diferentes.

5 En una forma de realización de la presente divulgación, la mutación es un SNP, tal como un intercambio de dinucleótido 2907t>c y 2908g>a de SEQ ID NO: 1.

En una forma de realización de la presente divulgación el gen *SMIM1* comprende múltiples mutaciones tal como una combinación de dicha delección y dichos SNP.

10 Una alteración heterocigota del *SMIM1* produce un fenotipo Vel positivo, aunque ese individuo solo tendría expresión débil de *SMIM1*. Los fenotipos Vel negativos son por tanto homocigotos para una alteración en el gen *SMIM1*.

En una forma de realización de la presente divulgación el método según la presente divulgación comprende las etapas:

- 15
- a) proporcionar una muestra,
 - b) detectar en la muestra un alelo que comprende *SMIM1*,
 - c) determinar si la muestra es de un sujeto homocigoto o heterocigoto,
 - d) determinar si la muestra es de un sujeto con un fenotipo Vel positivo o Vel negativo.

20 En un aspecto la presente divulgación se refiere a un método de determinar el fenotipo del grupo sanguíneo Vel de un individuo, dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo analizando en una muestra biológica la composición de:

- 25
- a) un gen *SMIM1*, y/o
 - b) un transcrito de un gen *SMIM1*, y/o
 - c) un polipéptido codificado por un gen *SMIM1*.

30 En una forma de realización la presente divulgación se refiere a un método de identificar un fenotipo Vel negativo dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo analizando en una muestra biológica la composición de:

- 35
- a) un gen *SMIM1*, y/o
 - b) un transcrito de un gen *SMIM1*, y/o
 - c) un polipéptido codificado por un gen *SMIM1*.

En otra forma de realización la presente divulgación se refiere a un método de identificar un fenotipo Vel positivo dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo analizando en una muestra biológica la composición de:

- 40
- a) un gen *SMIM1*, y/o
 - b) un transcrito de un gen *SMIM1*, y/o
 - c) un polipéptido codificado por un gen *SMIM1*.

45 *SMIM1* se define típicamente por una secuencia polinucleotídica que comprende SEQ ID NO. 1 o una variante de secuencia de la misma. El concepto gen *SMIM1* puede, sin embargo, comprender elementos reguladores naturales tal como, pero no limitados a, promotores y potenciadores.

50 En un aspecto la presente divulgación comprende detectar marcadores genéticos asociados a *SMIM1* localizados antes o después de SEQ ID NO. 1 en el genoma. Esto se puede realizar aplicando cualquiera de los métodos de la presente divulgación donde el método de amplificación se puede realizar:

- 55
- i) proporcionando una muestra biológica que comprende ADN genómico,
 - ii) poniendo en contacto la muestra que comprende ADN genómico con un primer y un segundo cebador oligonucleotídico de PCR,

en donde dicho primer cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos localizados antes (5') de la posición 1 de nucleótido de SEQ ID NO. 1, y

60 en donde dicho segundo cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos localizados después (3') de la posición 3195 de nucleótido de SEQ ID NO. 1,

con la condición de que dicho primer y dicho segundo cebador no se seleccionen ambos de una secuencia que sea complementaria a SEQ ID NO. 31;

- 65
- iii) obtener un amplicón;
 - iv) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de la etapa iii);

comparando la longitud del amplicón, con al menos un control Vel positivo, en donde una longitud que se diferencia del control Vel positivo indica que la muestra es Vel negativa.

5 En una forma de realización de la presente divulgación el gen *SMIM1* comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante de secuencia de la misma en donde la variante de secuencia es entre al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%, tal como entre el 99,1 y el 99,9%, tal como entre el 99,4 y el 99,6%, tal como el 100% idéntica a SEQ ID NO. 1 o una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO. 1.

15 En una forma de realización de la presente divulgación el gen *SMIM1* comprende la secuencia que es complementaria a SEQ ID NO: 1 o una variante de secuencia de la misma en donde la variante de secuencia es entre al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%, tal como entre el 99,1 y el 99,9%, tal como entre el 99,4 y el 99,6%, tal como el 100% idéntica a la secuencia que es complementaria a SEQ ID NO. 1.

20 El método de la presente divulgación se puede aplicar en principio a cualquier material genético que se origina de cualquier organismo, sin embargo, la presente divulgación es particularmente útil para detectar sangre Vel negativa. Por tanto, en una forma de realización el método de la presente divulgación es para la detección de sangre Vel negativa.

25 En una forma de realización el método de la presente divulgación es para la detección o identificación de un sujeto Vel negativo tal como un ser humano.

La delección de 17 pb en el exón 3 de *SMIM1* produce que la mayoría de los individuos Vel negativos porten un gen *SMIM1* que comprende SEQ ID NO. 2 más que SEQ ID NO. 1 que es el caso para individuos Vel positivos ensayados.

30 Por tanto, en una forma de realización de la presente divulgación el método para distinguir entre muestras, o individuos, Vel negativas y Vel positivas, analizando la composición de *SMIM1* comprende identificar sujetos cuyo genoma comprende SEQ ID NO. 1, dichos sujetos son Vel positivos, y sujetos cuyo genoma comprende SEQ ID NO. 2, o un fragmento o variante de la misma, en donde la variante es al menos el 90% idéntica a dicha SEQ ID NO. 2, dichos sujetos son Vel negativos.

35 En una forma de realización de la presente divulgación el método para distinguir entre muestras, o individuos, Vel negativas y Vel positivas, analizando la composición de *SMIM1* comprende identificar sujetos cuyo genoma comprende SEQ ID NO. 1, 3 o 35, dichos sujetos son Vel positivos, y sujetos cuyo genoma comprende SEQ ID NO. 2, 32, 33, 34 o 36, o un fragmento o variante de las mismas, en donde la variante es al menos el 90% idéntica a dicha SEQ ID NO. 2, 32, 33, 34 o 36, dichos sujetos son Vel negativos.

45 Antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud, la única manera conocida para identificar donantes de sangre Vel negativa era por ensayos de fenotipado celulares basados en suero o plasma de pacientes inmunizados, cuyo suministro está gravemente limitado. Por contraste, el ensayo genético del presente método se puede realizar en números virtualmente ilimitados de individuos a bajo coste, lo que permite el cribado de grandes poblaciones de donantes de sangre para identificar más donantes Vel negativos y facilitar la obtención de unidades de sangre Vel negativa a pacientes en necesidad.

50 Los métodos de la presente divulgación se basan en el descubrimiento de los presente inventores de la base molecular para la negatividad de Vel. En principio, cualquier método que utilice las diferencias en el código de ADN del gen *SMIM1* se pueden aplicar a distinguir entre individuos Vel negativos y Vel positivos. Esto también incluye preprocesar el ADN genómico (ADNg) antes de realizar el análisis, así como preparar ADNc a partir de ARNm transcrito.

55 Según esto, en una forma de realización el método de la presente divulgación que comprende distinción por análisis de la composición de *SMIM1* comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra;
- b) preparar ADNc;
- 60 c) identificar muestras en donde el ADNc tiene la secuencia de SEQ ID NO. 3 o 35, o un fragmento de las mismas, en donde el fragmento comprende al menos el polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 31;
- d) identificar las muestras en donde el ADNc se diferencia del ADNc de SEQ ID NO. 3 o 35 en al menos un nucleótido;
- e) comparar c) y d),
en donde la muestra de c) es de un sujeto Vel positivo, y
en donde la muestra de d) es de un sujeto Vel negativo.

65 En otra forma de realización el método de la presente divulgación comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica que comprende un polinucleótido de *SMIM1*,
- b) amplificar al menos un fragmento del polinucleótido de *SMIM1*, en donde el polinucleótido de *SMIM1* tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, y 36 o un fragmento o variante de las mismas en donde la variante es al menos el 90% idéntica a dicha secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, y 36,
- c) obtener un amplicón,
- d) analizar la longitud de amplicón, y
- e) distinguir entre fragmentos de polinucleótidos Vel negativos y Vel positivos amplificados basado en la longitud del polinucleótido.

Está dentro del ámbito de la presente divulgación aplicar los métodos anteriormente mencionados a cualquier polinucleótido de *SMIM1* o relacionado con *SMIM1* tal como un polinucleótido que es al menos el 50% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 55% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, y 36, por ejemplo, al menos el 60% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 65% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 70% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 75% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 80% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 81% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 82% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 83% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 84% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 85% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 86% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 87% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 88% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 89% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 90% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 91% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 92% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 93% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 94% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 95% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 96% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 97% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 98% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, al menos el 99% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, tal como el 100% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36.

También está dentro del ámbito de la presente divulgación aplicar los métodos anteriores a cualquier polinucleótido que sea complementario a un polinucleótido de *SMIM1* o relacionado con *SMIM1* tal como un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 50% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 55% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, y 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 60% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 65% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 70% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 75% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 80% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 81% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 82% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 83% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 84% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 85% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 86% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 87% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 88% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 89% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 90% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 91% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 92% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 93% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 94% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un

- 5 polinucleótido que es al menos el 95% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 96% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 97% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 98% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que es al menos el 99% idéntico a dicha SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, o 36, por ejemplo, un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35, y 36.
- 10 El método de distinguir entre individuos Vel negativos y Vel positivos como se ha esbozado anteriormente puede utilizar cualquier herramienta adecuada o método conocido en la técnica, herramienta o método que sea adecuado para analizar biomoléculas tal como ADN, ARN y proteínas. En una forma de realización de la presente divulgación, el método usado para analizar la composición de *SMIM1* de un individuo o una muestra se lleva a cabo mediante un proceso que se puede seleccionar del grupo que consiste en: PCR específica de gen, PCR específica de alelo, PCR-RFLP, hibridación de sonda específica de alelo, extensión de cebador específico de alelo, amplificación específica de alelo, secuenciación, digestión con 5' nucleasa, ensayo de balizas moleculares, ensayo de ligación de oligonucleótidos, análisis de tamaño, y polimorfismo de conformación de cadena sencilla.
- 15 En una forma de realización de la presente divulgación el método para distinguir muestras o individuos Vel positivos y Vel negativos es PCR específica de gen.
- 20 En una forma de realización de la presente divulgación el método de PCR específica de gen comprende las etapas de:
- 25 i) proporcionar una muestra biológica,
 ii) amplificar un polinucleótido de *SMIM1* aplicando un primer y un segundo cebador oligonucleotídico, obteniendo así un amplicón,
 iii) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de *SMIM1* obtenido en la etapa ii), y
 30 iv) comparar la longitud del amplicón, con al menos un control Vel positivo, en donde una longitud que se diferencia del control Vel positivo indica que la muestra es de un sujeto Vel negativo.
- Cualquier par de cebadores oligonucleotídicos adecuados capaces de hibridar con el polinucleótido diana están dentro del ámbito de la presente divulgación.
- 35 En una forma de realización de la presente divulgación, el primer cebador oligonucleotídico es al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97% idéntico, más preferiblemente al menos el 98% idéntico, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente el menos el 100% idéntico a SEQ ID NO: 22 (LOCex3f_screen),
- 40 y el segundo cebador oligonucleotídico es al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97% idéntico, más preferiblemente al menos el 98% idéntico, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente el menos el 100% idéntico a SEQ ID NO: 23 (LOCex3r_screen). En condiciones de hibridación muy rigurosas, dicho primer y dicho segundo cebador oligonucleotídico son capaces de hibridar con dicho polinucleótido de *SMIM1*.
- 45 En otra forma de realización de la presente divulgación el método para distinguir muestras o individuos Vel positivos y Vel negativos es por PCR específica de alelo.
- 50 En una forma de realización de la presente divulgación el método de PCR específica de alelo comprende las etapas de:
- i) proporcionar una muestra biológica,
 ii) amplificar un polinucleótido de *SMIM1* aplicando un primer y un segundo cebador oligonucleotídico, obteniendo así un amplicón,
 55 iii) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de *SMIM1* obtenido en la etapa ii), y
 iv) comparar la longitud del amplicón, con al menos un control Vel positivo, en donde una longitud que se diferencia del control Vel positivo indica que la muestra es de un sujeto Vel negativo.
- 60 En una forma de realización de la presente divulgación, los cebadores oligonucleotídicos del anterior método de PCR específica de alelo, se seleccionan del grupo que consiste en cebadores oligonucleotídicos que son al menos el 80%, preferiblemente el menos el 90%, más preferiblemente el menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97% idénticos, más preferiblemente al menos el 98% idénticos, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente al menos el 100% idénticos a SEQ ID NO: 15 (388588int2f), SEQ ID NO: 19 (388588int3R2), SEQ ID NO. 20 (388588wtex3f), y SEQ ID NO. 21 (388588mutex3f), en donde, en condiciones de hibridación muy rigurosas, dichos cebadores oligonucleotídicos son capaces de hibridar con dicho polinucleótido de *SMIM1*.
- 65

En otra forma de realización de la presente divulgación el método para distinguir muestras o individuos Vel positivos y Vel negativos es por PCR-RFLP de alelo.

5 En una forma de realización de la presente divulgación el método de PCR-RFLP específica de gen comprende las etapas de:

- i) amplificar un polinucleótido de *SMIM1* aplicando al menos dos cebadores oligonucleotídicos,
- ii) digerir el amplicón de la etapa i) mediante una enzima de restricción,
- 10 iii) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón digerido de la etapa ii), y
- iv) comparar la longitud del amplicón(es) digerido(s), con al menos un control Vel positivo, en donde una longitud que se diferencia del control Vel positivo indica que la muestra es de un sujeto Vel negativo.

15 Se puede usar cualquier restricción adecuada. En una forma de realización de la presente divulgación la enzima de restricción es Styl.

En una forma de realización de la presente divulgación, los cebadores oligonucleotídicos del anterior método de PCR-RFLP, el primer cebador oligonucleotídico es al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97% idéntico, más preferiblemente al menos el 98% idéntico, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente el menos el 100% idéntico a SEQ ID NO: 15 (388588int2f), y el segundo cebador oligonucleotídico es al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97% idéntico, más preferiblemente al menos el 98% idéntico, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente el menos el 100% idéntico a SEQ ID NO: 19 (388588int3R2). En condiciones de hibridación muy rigurosas, dicho primer y dicho segundo cebador oligonucleotídico son capaces de hibridar con dicho polinucleótido de *SMIM1*.

30 Como se ha mencionado en el presente documento anteriormente, el método de la presente divulgación se basa en la distinción molecular entre individuos Vel negativos y Vel positivos o muestras de tales individuos. Por tanto, en una forma de realización el método de la presente divulgación comprende las etapas:

- i) proporcionar una muestra biológica que comprende ADN genómico,
- ii) poner en contacto la muestra que comprende ADN genómico con un primer y un segundo cebador oligonucleotídico de PCR,

35 en donde dicho primer cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1 y localizados antes (5') del nucleótido en posición 2667 de SEQ ID NO. 1, y

40 en donde dicho segundo cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1 y localizados después (3') del nucleótido en posición 2649 de SEQ ID NO. 1,

45 con la condición de que dicho primer y dicho segundo cebador no se seleccionen ambos de una secuencia que sea complementaria a SEQ ID NO. 31;

- iii) obtener un amplicón;
- iv) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de la etapa iii);
- 50 v) comparar la longitud del amplicón, con al menos un control Vel positivo, en donde una longitud que se diferencia del control Vel positivo indica que la muestra es Vel negativa.

El análisis cualitativo y/o cuantitativo realizado en el método de la presente divulgación se puede hacer por cualquier herramienta adecuada o método conocido por los expertos en la materia.

55 En una forma de realización de la presente divulgación el análisis cualitativo y/o cuantitativo se realiza por electroforesis en gel.

60 El control de referencia usado en el método de la presente divulgación puede ser cualquier marcador molecular adecuado, tal como un marcador molecular basado en Mw. En una forma de realización de la presente divulgación, el control de referencia es una composición de referencia de polinucleótido que comprende uno o más polinucleótidos seleccionados de polinucleótidos que consisten en 161 y 178 nucleótidos. En una forma de realización de la presente divulgación el control Vel positivo es un polinucleótido que comprende el exón 3 (SEQ ID NO. 30) de *SMIM1*.

65 Es un objeto de la presente divulgación amplificar parte del gen *SMIM1* de un individuo Vel negativo, parte que comprende una mutación sin sentido que produce un antígeno Vel no funcional. Esto significa que el tamaño del amplicón puede variar dependiendo de cómo se seleccionan los cebadores oligonucleotídicos. En una forma de

realización de la presente divulgación el material genético amplificado (amplicón) tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 4000 nucleótidos de longitud, tal como entre 10 y 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 17 nucleótidos de longitud.

5 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de detección y/o cuantificación de una variante de ajuste de *SMIM1* en una muestra, el método comprende hacer ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm) en la muestra, amplificar el ADNc entero o porciones correspondientes al gen *SMIM1*, tal como SEQ ID NO. 3 o 4, o partes del mismo y detectar y cuantificar el ADNc amplificado para detectar o cuantificar la variante de ajuste.

10 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de identificar un sujeto que presenta un antígeno Vel, que comprende las etapas:

- 15 a) realizar amplificación de un polinucleótido del sujeto poniendo en contacto un polinucleótido de una célula del sujeto con un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia que es complementaria a al menos 10 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que codifica el antígeno Vel;
- b) detectar el amplicón de la etapa (a), mediante lo cual la detección de un amplicón identifica el sujeto como un antígeno Vel.

20 En otro aspecto la presente divulgación se refiere a un método de detectar en una muestra una célula que expresa un antígeno Vel, que comprende la detección en la muestra de un polinucleótido que codifica un antígeno Vel.

25 En una forma de realización de la presente divulgación el método de detección y/o cuantificación de una variante de ajuste de *SMIM1* en una muestra, comprende hacer ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm) en la muestra, amplificar porciones del ADNc correspondientes al gen *SMIM1* o partes del mismo y detectar y cuantificar el ADNc amplificado para detectar o cuantificar la variante de ajuste.

30 Los presentes inventores han generado datos que caracterizan adicionalmente la proteína codificada por el gen *SMIM1* (LOC388588) así como la distribución demográfica de la mutación que produce el fenotipo Vel negativo. Hasta ahora, no se han encontrado homólogos génicos a la proteína Vel humana. Sin embargo, el gen parece estar evolutivamente conservado ya que tiene homólogos ortólogos en otras especies, de primates a pez cebra.

35 El gen *SMIM1* que típicamente comprende SEQ ID NO. 1 o un fragmento o variante de secuencia de la misma, codifica un polipéptido que se asocia con el antígeno Vel. La expresión del antígeno del grupo sanguíneo Vel en glóbulos rojos depende de la expresión del gen *SMIM1*, cuyo ARNm codifica una proteína transmembrana de tipo 1. El fenotipo Vel negativo se produce cuando esta proteína no se puede expresar, por ejemplo, debido a la delección de 17 pb. Mientras que un aspecto principal de la presente divulgación es evitar métodos serológicos tradicionales laboriosos y caros para identificar muestras o individuos Vel negativos, el descubrimiento de los presentes inventores de la relación entre *SMIM1* y el antígeno Vel proporciona un número de aplicaciones de anticuerpos y celulares que son útiles para, por

40 ejemplo, fines de ensayos in vitro.

45 El método según la presente divulgación se puede, en principio, aplicar a cualquier muestra biológica que comprenda material genético. Por tanto, la muestra puede ser de raspados celulares, un tejido de biopsia o un fluido corporal tal como, pero no limitado a, sangre, médula ósea, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, semen, esputo, orina y heces.

Antígeno Vel y anticuerpos anti-Vel

50 Los presentes inventores han proporcionado el nexo molecular entre el gen *SMIM1* y el antígeno Vel.

Después de este descubrimiento, los inventores también han diseñado y ensayado péptidos correspondientes a la proteína putativa y ensayado GR Vel positivos y Vel negativos con anticuerpos de conejo generados hacia estos péptidos. Uno de tal anticuerpo demuestra especificidad exquisita para GR Vel positivos por la técnica de inmunotransferencia.

55 En una forma de realización de la presente divulgación, el anticuerpo que se detecta por dicho método es anti-Vel, y el antígeno es un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

60 El antígeno Vel identificado por los presentes inventores está representado por el polipéptido que tiene SEQ ID NO. 5, o una variante de secuencia o fragmento de la misma. El antígeno es una herramienta útil en los métodos de la presente divulgación. Según esto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido aislado que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 5, o un fragmento o una variante de la misma, en donde dicho fragmento comprende al menos 20, tal como al menos 25, tal como al menos 30, tal como al menos 35, tal como al menos 40, tal como al menos 45, tal como al menos 50, tal como al menos 55, tal como al menos 60, tal como al menos 65, tal como al menos 70, tal como al menos 75 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante comprende al menos un residuo de serina y/o

treonina, y en donde al menos un residuo de serina y/o treonina de dicha SEQ ID NO. 5 o dicho fragmento o variante de la misma, está O-glucosilado.

La expresión del antígeno del grupo sanguíneo Vel en glóbulos rojos depende de la expresión del gen *SMIM1*, cuyo ARNm codifica una proteína transmembrana de tipo 1. El fenotipo Vel negativo se produce cuando esta proteína no se puede expresar, por ejemplo, debido a la delección de 17 pb como se ha discutido anteriormente en el presente documento. Fragmentos polipeptídicos importantes asociados con el antígeno Vel incluyen fragmentos de SEQ ID NO. 5. Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un péptido aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10, o un fragmento o variante de las mismas, en donde la variante es al menos el 50%, preferiblemente al menos el 55%, preferiblemente al menos el 60%, preferiblemente al menos el 65%, preferiblemente al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, preferiblemente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, preferiblemente al menos el 82%, preferiblemente al menos el 83%, preferiblemente al menos el 84%, preferiblemente al menos el 85%, preferiblemente al menos el 86%, preferiblemente al menos el 87%, preferiblemente al menos el 88%, preferiblemente al menos el 89%, preferiblemente al menos el 90%, preferiblemente al menos el 91%, preferiblemente al menos el 92%, preferiblemente al menos el 93%, preferiblemente al menos el 94%, preferiblemente al menos el 95%, preferiblemente al menos el 96%, preferiblemente al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10.

En un aspecto la presente divulgación se refiere a un homodímero que comprende dos cadenas polipeptídicas idénticas, cada una tiene la secuencia de SEQ ID NO. 5, o un fragmento o una variante de la misma, en donde dicho fragmento comprende al menos 20 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante el al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, preferiblemente al menos el 82%, preferiblemente al menos el 83%, preferiblemente al menos el 84%, preferiblemente al menos el 85%, preferiblemente al menos el 86%, preferiblemente al menos el 87%, preferiblemente al menos el 88%, preferiblemente al menos el 89%, preferiblemente al menos el 90%, preferiblemente al menos el 91%, preferiblemente al menos el 92%, preferiblemente al menos el 93%, preferiblemente al menos el 94%, preferiblemente al menos el 95%, preferiblemente al menos el 96%, preferiblemente al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO. 5.

En una forma de realización de la presente divulgación el fragmento polipeptídico que define el antígeno Vel es un polinucleótido aislado, que codifica tras la expresión un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10 es también un aspecto de la presente divulgación.

El antígeno puede en ciertas circunstancias estar glucosilado, típicamente O-glucosilado en un residuo de serina o treonina. Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido aislado que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 5, o un fragmento o variante de la misma, en donde dicho fragmento comprende al menos 20 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante el al menos el 80%, preferiblemente al menos el 81%, preferiblemente al menos el 82%, preferiblemente al menos el 83%, preferiblemente al menos el 84%, preferiblemente al menos el 85%, preferiblemente al menos el 86%, preferiblemente al menos el 87%, preferiblemente al menos el 88%, preferiblemente al menos el 89%, preferiblemente al menos el 90%, preferiblemente al menos el 91%, preferiblemente al menos el 92%, preferiblemente al menos el 93%, preferiblemente al menos el 94%, preferiblemente al menos el 95%, preferiblemente al menos el 96%, preferiblemente al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante comprende al menos un residuo de serina y/o treonina, y en donde al menos un residuo de serina y/o treonina de dicha SEQ ID NO. 5 o dicho fragmento o variante de la misma, está O-glucosilado.

En una forma de realización de la presente divulgación al menos un residuo de serina y/o treonina del polipéptido anterior está O-glucosilado.

En una forma de realización adicional de la presente divulgación la O-glucosilación del al menos un residuo de serina y/o treonina se selecciona individual e independientemente del grupo que consiste en:

antígeno Tn (GalNAc α Ser/Thr),
 antígeno sialil-Tn (Sia α 2-6GalNAc α Ser/Thr),
 STn/sialil-Tn (Neu5Ac α 2-6GalNAc- α -Ser/Thr),
 ST/sialil-T (Neu5Ac α 2-3Gal β 3GalNAc-Ser/Thr),
 Core 1 o antígeno T (Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr),
 Core 2 (GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr),
 Core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr),
 Core 4 (GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr),
 Core 5 (GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr),
 Core 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr),
 Core 7 (GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr), y
 Core 8 (Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr).

Como se ha mencionado en el presente documento anteriormente, es un aspecto principal de la presente divulgación proporcionar herramientas y métodos para la determinación de grupo sanguíneo genéticamente basado del grupo sanguíneo Vel. Las herramientas para tales fines incluyen anticuerpos, antígenos y fragmentos de antígenos, así como células presentadoras de dichos antígenos o fragmentos de antígenos.

5 Según esto, en un aspecto semejante, la presente divulgación se refiere a un método de detectar en una muestra un anticuerpo dirigido contra un antígeno Vel, que comprende las etapas:

- 10 a) poner en contacto glóbulos rojos que tienen antígeno Vel con la muestra;
 b) detectar aglutinación de los glóbulos rojos, por lo cual la aglutinación de los glóbulos rojos indica la presencia en la muestra de un anticuerpo hacia el antígeno Vel.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de detectar en una muestra un anticuerpo dirigido hacia un antígeno Vel, que comprende las etapas:

- 15 a) poner en contacto la muestra con un péptido o polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9 y 10, o una secuencia peptídica O-glucosilada seleccionada de SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
 b) detectar la interacción entre i) dicho polipéptido o péptido y ii) un anticuerpo anti-Vel, mediante lo cual la interacción indica la presencia en la muestra de un anticuerpo hacia un antígeno Vel.

20 En una forma de realización de la presente divulgación la interacción se detecta estudiando la aglutinación. En otra forma de realización de la presente divulgación la interacción se detecta por BIACORE. En otra forma de realización de la presente divulgación la interacción se detecta por métodos basados en ELISA. Todos los métodos anteriores de detectar la interacción los conocen bien los expertos en la materia.

25 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de detectar un antígeno Vel en glóbulos rojos, que comprende las etapas:

- 30 a) poner en contacto los glóbulos rojos con un anticuerpo dirigido contra el antígeno Vel;
 b) detectar aglutinación de los glóbulos rojos, por lo cual la aglutinación de los glóbulos rojos indica la presencia del antígeno Vel.

En otro aspecto la presente divulgación se refiere a un método de detectar en una muestra un antígeno Vel, que comprende las etapas:

- 35 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo dirigido contra el antígeno Vel;
 b) detectar un complejo antígeno/anticuerpo, mediante lo cual la detección del complejo antígeno/anticuerpo indica la presencia del antígeno Vel en la muestra.

40 En otro aspecto la presente divulgación se refiere a un método de identificar un sujeto que presenta un antígeno Vel, que comprende las etapas:

- 45 a) realizar la amplificación de un polinucleótido del sujeto poniendo en contacto un polinucleótido de una célula del sujeto con un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia que es complementaria a al menos 10 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que codifica el antígeno Vel;
 b) detectar el amplicón de la etapa (a), mediante lo cual la detección de un amplicón identifica el sujeto como un antígeno Vel.

50 En aún otro aspecto la presente divulgación se refiere a un método de detectar en una muestra una célula que expresa un antígeno Vel que comprende detectar en la muestra un polinucleótido que codifica un antígeno Vel.

También está dentro del ámbito de la presente divulgación proporcionar anticuerpos para ensayos in vitro, así como la verificación de los métodos genéticos esbozados anteriormente. Por tanto, en un aspecto la presente divulgación se refiere a un anticuerpo capaz de reconocer un epítipo de un antígeno Vel, en donde el epítipo se define por una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 y 10, o una secuencia peptídica O-glucosilada seleccionada de SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 y 10.

60 En una forma de realización de la presente divulgación el anticuerpo es capaz de reconocer una secuencia peptídica O-glucosilada seleccionada de SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 y 10 que comprende al menos un residuo de serina y/o treonina en donde el al menos un residuo de serina y/o treonina individual e independientemente está O-glucosilado con un glicano seleccionado del grupo que consiste en:

- 65 antígeno Tn (GalNAc α Ser/Thr),
 antígeno sialil-Tn (Sia α 2-6GalNAc α Ser/Thr),
 STn/sialil-Tn (Neu5Ac α 2-6GalNAc- α -Ser/Thr),
 ST/sialil-T (Neu5Ac α 2-3Gal β 3GalNAc-Ser/Thr),

Core 1 o antígeno T (Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr),
 Core 2 (GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr),
 Core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr),
 Core 4 (GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr),
 Core 5 (GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr),
 Core 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr),
 Core 7 (GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr), y
 Core 8 (Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr).

10 El anticuerpo es monoclonal o policlonal.

La presente divulgación también se refiere a un método de hacer un anticuerpo policlonal, el método comprende:

- 15 a) inmunizar un mamífero con el polipéptido o péptido como se ha definido en el presente documento anteriormente, en condiciones para provocar una respuesta de anticuerpos;
 b) aislar anticuerpos de mamífero;
 c) cribar los anticuerpos aislados con el polipéptido o fragmento polipeptídico identificando de esta manera un anticuerpo policlonal que se une específicamente al polipéptido o fragmento polipeptídico de la etapa a).

20 La presente divulgación también se refiere a un método de hacer un anticuerpo monoclonal, el método comprende:

- a) inmunizar un mamífero con el polipéptido o péptido como se ha definido en el presente documento anteriormente, en condiciones para provocar una respuesta de anticuerpos;
 b) aislar las células productoras de anticuerpo del mamífero;
 25 c) fusionar las células productoras de anticuerpo con células inmortalizadas en cultivo para formar células de hibridoma que producen anticuerpo monoclonal;
 d) cultivar las células de hibridoma;
 e) aislar del cultivo anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al polipéptido o fragmento polipeptídico de la etapa a).

30

Transfusión de sangre

El método de la presente divulgación es particularmente útil en un marco clínico que implica transfusiones de sangre. Por tanto, en una forma de realización de la presente divulgación los métodos anteriores comprenden además las etapas de:

35

- a) elegir de un banco de donantes o sangre i) sangre Vel positiva si el método de a) determina que el paciente es Vel positivo, o ii) sangre Vel negativa si el método como se ha definido en el presente documento anteriormente determina que el paciente es Vel negativo;
 40 b) transfundir el paciente con la sangre elegida en a).

En un aspecto la presente divulgación se refiere a un método de transfusión de sangre que comprende las etapas:

- a) aplicar el método como se ha definido en el presente documento anteriormente a un paciente;
 45 b) elegir de un banco de donantes o sangre i) sangre Vel positiva si el método de a) determina que el paciente es Vel positivo, o ii) sangre Vel negativa so el método como se ha definido en el presente documento anteriormente determina que el paciente es Vel negativo;
 c) transfundir el paciente con la sangre elegida en b).

50 Las transfusiones de sangre son útiles en el tratamiento de trastornos sanguíneos. La presente divulgación es particularmente útil durante la terapia en relación al tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con eritrocitos en donde la divulgación se refiere a un método que comprende las etapas:

- a) aplicar el método de detección/identificación definido en el presente documento anteriormente a un paciente;
 55 b) elegir de un banco de donantes o sangre i) sangre Vel positiva si el método de a) determina que el paciente es Vel positivo, o ii) sangre Vel negativa so el método como se ha definido en el presente documento anteriormente determina que el paciente es Vel negativo;
 c) transfundir el paciente con la sangre elegida en b).

Tratamiento profiláctico de mujeres embarazadas

Las mujeres embarazadas Vel negativas (madres) pueden portar fetos Vel positivos. Si eritrocitos del feto Vel positivo se transfieren a la madre Vel negativa, esto puede producir una respuesta inmunitaria de la madre, generando de esta manera anticuerpos anti-Vel contra los eritrocitos Vel positivos. Esto es potencialmente letal para el feto, especialmente durante un segundo o posterior embarazo de la mujer Vel negativa.

65

Según esto, en un aspecto la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento profiláctico de una mujer embarazada Vel negativa que comprende:

- 5 a) identificar un individuo Vel negativo aplicando el método definido en el presente documento anteriormente, y
- b) administrar a dicha mujer embarazada Vel negativa una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-Vel, neutralizando de esta manera los eritrocitos Vel positivos originarios del feto Vel positivo portado por dicha mujer embarazada Vel negativa.

De forma similar, la presente divulgación también se refiere a un anticuerpo anti-Vel para uso en un método de tratamiento profiláctico de una mujer embarazada Vel negativa que comprende:

- 10 a) identificar un individuo Vel negativo aplicando el método definido en el presente documento anteriormente, y
- 15 b) administrar a dicha mujer embarazada Vel negativa una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-Vel, neutralizando de esta manera los eritrocitos Vel positivos originarios del feto Vel positivo portado por dicha mujer embarazada Vel negativa.

Plataformas de cribado

20 El uso principal de la presente divulgación es en campo de la medicina de transfusión donde la delección de nucleótidos descrita se usará como una base para el cribado de donantes de sangre para identificar sangre compatible para pacientes que han desarrollado anticuerpos hacia el antígeno Vel. Existen plataformas de genotipado de alto rendimiento para ensayo de donantes en el laboratorio rutinario hoy y, por tanto, en una forma de realización la presente divulgación se incorpora en estas plataformas.

25 Según esto, en un aspecto la presente divulgación se refiere a un kit para detectar un antígeno Vel, o distinguir entre muestras Vel negativas y Vel positivas, en donde dicho kit comprende el anticuerpo como se ha definido en el presente documento anteriormente. El kit típicamente comprende una matriz de microchip en donde los anticuerpos definidos anteriormente están conjugados a la matriz de microchip.

30 En un aspecto la presente divulgación se refiere a un kit para detectar un antígeno Vel y/o distinguir entre muestras de individuos Vel negativos y Vel positivos, dicho kit comprende al menos dos cebadores oligonucleotídicos aislados seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

35 En otro aspecto la divulgación se refiere a un kit que comprende una matriz de microchip que comprende uno o más polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 32, 33, 34, 35 y 36 o uno o más fragmentos de dicho polinucleótido.

40 El kit incluyendo o excluyendo la matriz de microchip puede incluir una combinación de uno o más polinucleótidos, oligonucleótidos, péptidos y polipéptidos definidos en el presente documento.

45 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un kit que comprende una matriz de microchip que comprende uno o más péptidos o polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9, y 10, o uno o más fragmentos de dicho péptido o polipéptido en donde dicho fragmento comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha SEQ ID NO. 5, 6, 7, 8, 9, y 10.

50 En una forma de realización de la presente divulgación del kit definido en el presente documento anteriormente al menos un residuo de serina y/o treonina de dicho péptido en dicho kit está O-glucosilado, tal en donde al menos uno de dichos residuos de serina y/o treonina está independiente y opcionalmente O-glucosilado por un glicano seleccionado del grupo que consiste en:

- 55 antígeno Tn (GalNAc α Ser/Thr),
- antígeno sialil-Tn (Sia α 2-6GalNAc α Ser/Thr),
- STn/sialil-Tn (Neu5Ac α 2-6GalNAc- α -Ser/Thr),
- ST/sialil-T (Neu5Ac α 2-3Gal β 3GalNAc-Ser/Thr),
- Core 1 o antígeno T (Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr),
- Core 2 (GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr),
- Core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr),
- Core 4 (GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr),
- Core 5 (GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr),
- 60 Core 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr),
- Core 7 (GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr), y
- Core 8 (Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr).

65 En un aspecto de la presente divulgación, el kit descrito en el presente documento anteriormente comprende glóbulos rojos que presentan un antígeno Vel.

En ciertos aspectos la divulgación se refiere a las siguientes formas de realización.

Forma de realización 1: Un método de determinar el fenotipo Vel de un individuo, dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo analizando en una muestra biológica la composición de:

5

- a) un gen *SMIM1*, y/o,
- b) un transcrito de un gen *SMIM1*, y/o
- c) un polipéptido codificado por un gen *SMIM1*.

10 Forma de realización 2: El método según la forma de realización 1 de la presente divulgación, en donde el gen *SMIM1* comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante de secuencia de la misma en donde la variante de secuencia es entre al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%, tal como entre el 99,1 y el 99,9%, entre el 99,4 y el 99,6%, tal como el 100% idéntica a i) SEQ ID NO. 1 o ii) una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO. 1.

15

Forma de realización 3: El método según cualquiera de las formas de realización precedentes de la presente divulgación, en donde la distinción analizando la composición de *SMIM1* comprende identificar:

20

- sujetos cuyo genoma comprende SEQ ID NO. 1, dichos sujetos son Vel positivos,
- y
- sujetos cuyo genoma comprende SEQ ID NO. 2,
- o un fragmento o variante de la misma,
- en donde la variante es al menos el 90% idéntica a dicha SEQ ID NO. 2, dichos sujetos son Vel negativos.

25

Forma de realización 4: El método según la forma de realización 1 de la presente divulgación, en donde el método comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica que comprende un polinucleótido de *SMIM1*,
- 30 b) amplificar al menos un fragmento del polinucleótido de *SMIM1*, en donde el polinucleótido de *SMIM1* tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35 y 36 o un fragmento o variante de la misma en donde la variante es al menos el 90% idéntica a dicha secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 32, 33, 34, 35 y 36;
- c) obtener un amplicón,
- 35 d) analizar la longitud del amplicón, y
- e) distinguir entre fragmentos de polinucleótidos Vel negativos y Vel positivos amplificados basado en la longitud del polinucleótido.

40 Forma de realización 5: El método según la forma de realización 1 de la presente divulgación que comprende las etapas:

- i) proporcionar una muestra biológica que comprende ADN genómico,
- 45 ii) poner en contacto la muestra que comprende ADN genómico con un primer y un segundo cebador oligonucleotídico de PCR,
- en donde dicho primer cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1 y localizados antes (5') de la posición de nucleótido 2667 de SEQ ID NO. 1, y
- 50 en donde dicho segundo cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1 y localizados después (3') de la posición de nucleótido 2649 de SEQ ID NO. 1,
- con la condición de que dicho primer y dicho segundo cebador no se seleccionen ambos de una secuencia que sea complementaria a SEQ ID NO. 31;
- 55 iii) obtener un amplicón;
- iv) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de la etapa iii).

60 Forma de realización 6: Un método de detección y/o cuantificación de una variante de ajuste de *SMIM1* en una muestra, el método comprende hacer ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm) en la muestra, amplificar porciones del ADNc correspondientes al gen *SMIM1* o partes del mismo y detectar y cuantificar el ADNc amplificado para detectar o cuantificar la variante de ajuste.

65 Forma de realización 7: Un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de SEQ ID NO. 1, o un polinucleótido aislado que comprende una variante de secuencia de una secuencia que es complementaria a dicha

SEQ ID NO. 1, en donde la variante de secuencia comprende al menos una mutación, en donde la mutación produce transcripción y/o traducción de proteínas abolida y/o ausencia de un polipéptido codificado por SEQ ID NO. 1 en la superficie de un eritrocito.

5 Forma de realización 8: El polinucleótido aislado según la forma de realización 7 de la presente divulgación, en donde la variante de secuencia tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 2 y 4.

10 Forma de realización 9: Un polipéptido aislado que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 5, o un fragmento o una variante del mismo, en donde dicho fragmento comprende al menos 20 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO. 5, y en donde dicha variante comprende al menos un residuo de serina y/o treonina, y en donde al menos un residuo de serina y/o treonina de dicha SEQ ID NO. 5 o dicho fragmento o variante del mismo, está O-glucosilado.

15 Forma de realización 10: Un péptido aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6, 7, 8, 9 y 10.

Listado de Secuencias

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Secuencias

SEQ ID NO. 1: gen *SMIM1*

ES 2 713 162 T3

1 cagagacgcg gggacacagg tgaggcgcgc ggggtccggg ctgcgcttc cgggtgcggc
61 cgcagtgggc aggtgcgact gtgcgcggcc tcgctggctg agaactggcg ggggtggggg
121 cgtgccctgg actgaccccc accggcctaa cccgcggtgc ggggccaggg ccggaactgc
181 ccgcccggct ccttgcccgg ctcccttggtg ctgctgggga cccccgacac cagccacttt
241 cccttcccgg cccttagcaa gatcggettc tccggtcacc tttatttttt taggctcgag
301 gggctgcccg cacctcagcc caagacctgc cccgctggga ggtgcgggcc gctggccagg
361 ccctgaccgc aacctggccc agaggcccca gccctcaggc aaggttctcc gggtaagtgt
421 ggggccctga ggcgctgtgg ggtgaagagg tctatggagg ggcgctgtg tacctagggc
481 cttctgcac tcacaagccc ccaggaggtg ccaggatccg ggagcctccc agggcctgga
541 ggggagtccc tgatgggttc ctgccgccac acctgtgacc atcacatgag tgtggagaga
601 cgtttactga gcaagtgagg gaggccagcc tcaagggccg gctctggtgg ctgtgcaccg
661 ggggtgacttg ggaacaacgt gttctacgtc agcaagacag gaacctatga tcccagagtt
721 gaacacactg ggcttgacct ctcccaccgg gaggcccatg gtgggctgct gctgtggact
781 tggagcctca gactcccga gactaatgct gcgtggatgt cgggttgcaa ggcggctgct
841 gcagctccag cagctccagc catcacgtcg agtctggaag aaggaggtgg ctgctgctgc
901 tttcacagaa gcaaactctc ccatcccctg ctgcaccctg gctcctggac cccagctggg
961 tgacttgagg aagcaggggt ggtggtatta agcttgtctt acccgggtca tggctgttac
1021 ctggggctgg cacattgctg ctgggaccag aatgggattc tgcacaccag gcaagagggc
1081 gtgaacctcg ggtaggcagc tgaccgctcc acatgctccg ggaaaacagc acccatactc
1141 cagtagaggc tgggctctc cgggctgag tgccaggctg cactgagcca gggctcccac
1201 cgaaggcaca ctttatggct ttgagacagc tccttctgcc tctctgggct ttgggggaag
1261 gcagacatgg aagtgcgggg agtctcagaa ctgcctgggg cctgagtttc tgagctggct
1321 tcttgacagg gagtggctgc tgtgcctta ggcctctgtg ccgatgacct gggaggaagg
1381 tcagccttcc ccgctggagg gggcccagca aagcctcagc tcctagaagt gaggggcctg
1441 ccattgctg cccgaggacc ccactcctgg gggccagatg ctgagagggg aactggggg
1501 cccagcagac cagagagctg accccagtcc cacagcctgg gtgggttgtc aacttctcgt

ES 2 713 162 T3

1561 gccccctcca actcctccac cccacacccc ccttaggtaa ataggaggtc gaaacagagg
 1621 ccagagggta aaggagggtc ttagagtccg ggttggtca ggccggccgg gcagctgtgc
 1681 tagtgcttgg agttcctgct cagtccccgt ggtctcctcg cccctctggg cacttgggct
 1741 gccaggcacc gagctgagtg ccgagatgca aagatgagtc ccaggctctgc aggagttgga
 1801 gccagcaggg gagctggcct tggggccggg cccctcctgc tctgggcagc caccagccc
 1861 tacgaccctc ctgtctctgt agggcctccc caaggccttg aatccacccc ggccccgtgc
 1921 tcagtgcata atgccccca agccccagcc ctctagagg tgtgggtggg ggaggggctg
 1981 caaccacac aggctgagga cacagctgct gccactgctt ggggccagcc acgcatcctc
 2041 ccagacaggg gaccggctca gctgtaccag ccgctgcccc ggacctgtct cctgccccca
 2101 cccccccctc ccttgccag cctccccaga ggccagaagg cgccttatcg ggcaggggta
 2161 aggaggggga cagttatcag gggctgcagc ctagattggg ccacaatgtc ctcgctctct
 2221 gaggggtggc ggctgtgcag gctccctgat aaaagcaccg ggggaaggag gctcctggag
 2281 tgtgctgga gaaacactg gcctcccaca tgctgaggt cagggtctgg cctgagatgg
 2341 aattctcgtc tgggtccatc ctcccggcct gacctgggc aatgactct accactttgt
 2401 gtctaggta cctgttaagt caggcgacag acccggtagg ggagtcagcc cccgaccctt
 2461 agtccccctc tctaacagc agcctcagag ggggtcttga ctgccgccct ccatccgctt
 2521 gttttacagt gaagccacag cctggccacc tgtcttgatc tccccaccga gaaggccccg
 2581 cccctcccgc tgcagcccc aagcatgcag cccagggaga gccacgtcca ctatagtagg
 2641 tgggaggacg gcagcagggg cggagtcagc **ctaggggctg** **tgtccagcac** agaagaggcc
 2701 tcacgctgcc gcaggtgagg ggctgaggg cagcctgcca gccatagcag gctgggtgtct
 2761 cctccagag acgctgccc taaccctgct taccggcccc atcacctcc accccatcct
 2821 ggetgggagc ccacggctca gcagctcagc aaaccgcagc ctttgccctt cctctggtt
 2881 ggetgtggc ggggagagct tctct**tgac** tccagcagag cgeccaggcc cctccccctg
 2941 acccagacca acggccacag tccaactagg gggccccca tgcggccctg gctggggct
 3001 cacctccagt tggttctcac cccaggtatc cccagaggct gtgcacgggc aagctgggca
 3061 tggccatgaa ggtgctgggc ggcgtggccc tctctggat catcttcate ctgggctacc
 3121 tcacaggcta ctatgtgac aagtgcaaat aatgctgcc ccgcatgcac gcggggggct
 3181 ggccgca

5 El gris indica exones; el subrayado indica los codones de inicio y terminación; la cursiva negra indica la delección de 17 pb identificada en el fenotipo mutante humano en el exón 3 y también los nucleótidos polimórficos en el intrón 3 (c.110+193t/c y c.100+194g/a; nucleótidos 2907 & 2908 en la secuencia anterior) ambos de los cuales están invariablemente mutados en el fenotipo mutado.

SEQ ID NO. 2: fenotipo mutante de *SMIM1* (delección de 17 pb)

ES 2 713 162 T3

1 cagagacgcg gggacacagg tgagggcgcg ggggtccggg ctgcccgttc ccggtgcggc
61 cgcagtgggc aggtgcgact gtgcccggcc tcgctggctg agaactggcg ggggtggggg
121 cgtgccctgg actgaccccc accggcctaa cccgcggtgc ggggccaggg ccggaactgc
181 ccgcccggct ccttgcccgg ctccctgtgg ctgctgggga cccccgacac cagccacttt
241 cccttcccgg cccttagcaa gatcggcttc tccggtcacc tttatttttt taggctcgag
301 gcgctcgcgg cacctcagcc caccgactgc cccgctggga ggtgcccggc gctggccagg
361 ccctgaccgc aacctggccc agaggcccca gccctcaggc aaggttctcc gggtaagtgt
421 ggggccctga ggcgctgtgg ggtgaagagg tctatggagg ggcgctgtg tacctagggc
481 ctctctgca cacaagccc ccaggagggt ccaggatccg ggagcctccc agggcctgga
541 ggggagtccc tgatgggttc ctgcccacc acctgtgacc atcacatgag tgtggagaga
601 cgtttactga gcaagtgagg gaggccagcc tcaagggccg gctctgggtg ctgtgcaccg
661 gggtgacttg ggaacaacgt gttctacgtc agcaagacag gaacctatga tcccagagtt
721 gaacacactg ggcttgacct ctcccaccgg gaggcccatg gtgggctgct gctgtggact
781 tggagcctca gactcccga gactaatgct gcgtggatgt cggggtgcaa ggcggctgct
841 gcagctccag cagctccagc catcacgtcg agtctggaag aaggagggtg ctgctgctgc
901 tttcacagaa gcaactctc ccatcccctg ctgcaccctg gctcctggac cccagctggg
961 tgacttggga aagcaggggt ggtggtatta agcttgtctt acccgggtca tggtgttac
1021 ctggggctgg cacattgctg ctgggaccag aatgggattc tgcacaccag gcaagagggc
1081 gtgaacctcg ggtaggcagc tgaccgctcc acatgctccg ggaaaacagc acccactc
1141 cagtagaggc tgggcctctc cgggcctgag tgccaggctg cactgagcca gggctcccac
1201 cgaaggcaca ctttatggct ttgagacagc tccttctgcc tctctgggct ttgggggaag
1261 gcagacatgg aagtgcgggg agtctcagaa ctgcctgggg cctgagtttc tgagctgget
1321 tcttgcaagg gagtggtgct tgtgccttta ggcctctgtg ccgatgacct gggaggaagg
1381 tcagccttcc ccgctggagg gggcccagca aagcctcagc tctagaagt gaggggcctg
1441 ccattgctg cccgaggacc ccaactcctgg gggccagatg ctgagagggg aactggggg
1501 cccagcagac cagagagctg accccagtcc cacagcctgg gtgggttgtc aacttctcgt
1561 gccccctcca actcctccac ccccacacce ccttaggtaa ataggaggtc gaaacagagg

ES 2 713 162 T3

1621 ccagagggta aaggaggtgc ttagagtccg ggctggctca ggccggccgg gcagctgtgc
 1681 tagtgcttgg agttcctgct cagtccccgt ggtctcctcg ccctctggg cacttgggct
 1741 gccaggcacc gagctgagtg ccgagatgca aagatgagtc ccaggtctgc aggagtggga
 1801 gcccagcagg gagctggcct tggggccggg ccctcctgc tctgggcage caccagccc
 1861 tacgaccctc ctgtctctgt agggcctccc caaggccttg aatccacccc ggccccgtgc
 1921 tcagtgcac atgccccca agccccagcc ctctagagg tgtgggtggg ggaggggctg
 1981 caaccacac aggctgagga cacagctgct gccactgcct ggggccagcc acgcatcctc
 2041 ccagacagg gaccggtcta gctgtaccag ccgctgcccc ggacctgctg cctgcccc
 2101 cccccccctc ccctggccag cctccccaga ggccagaagg cgccttatcg ggcagggtta
 2161 aggaggggga cagttatcag gggctgcage ctagattggg ccacaatgct ctcgtctctt
 2221 gaggtggca ggctgtgcag gctccctgat aaaagcaccg ggaagggag gctcctggag
 2281 tgtgtggaa gaaacactg gcctcccaca tgcctgaggt cagggttgg cctgagatgg
 2341 aattctcgtc tggteccatc ctccggcct gacctgggc aatgactct accacttgt
 2401 gtctaggtea cctgttaagt caggcgacag acccggtgag ggagtcagcc cccgaccctt
 2461 agtccccctc tctaacagc agcctcagag ggggtcttga ctgccccct ccatccgctt
 2521 gttttacagt gaagccacag cctggccacc tgtcttgatc tccccaccga gaaggccccg
 2581 ccctccccg tcagcccc cagcatgcag cccaggaga gccacgtcca ctatagtagg
 2641 tgggaggacg gcagcaggga cggagtc cagcac agaagaggcc
 2684 tcacgctgcc gcaggtgagg ggcctgaggg cagcctgcca gccatagcag gctggtgtct
 2744 ccctccagag acgctgccc taaccctgc taccggcccc atcacctcc acccatcct
 2804 ggctgggagc ccacggtcca gcagctcage aaaccgcage ctttggcctt ccctctggtt
 2864 ggetgtgggc ggggagagct tctctcaac tccagcagag cggccaggcc cctccccctg
 2924 acccagacca acggccacag tccacttagg gggccctca tgcggcctg gctggggct
 2984 cacctccagt tggttctcac ccaggatct cccagaggct gtgcacgggc aagctgggca
 3044 tcgccatgaa ggtgctgggc ggcgtggccc tctctggat catcttcate ctgggctacc
 3104 tcacaggcta ctatgtgcac aagtgcaaat aatgctgcc ccgatgcac gcgggggct
 3164 ggccgca

El gris indica exones basados en la estructura de tipo salvaje, sin embargo, la delección extiende el marco abierto de lectura y la secuencia en azul indica la potencial nueva secuencia traducida hasta el siguiente codón de terminación en el mismo marco de lectura. El subrayado indica los codones de inicio y terminación. La cursiva negra indica los nucleótidos polimórficos en el intrón 3 que están invariablemente mutados (c.110+193t/c y c.100+194g/a) en el fenotipo mutante.

Los nucleótidos (SNP) 2872 y 2873 están invariablemente asociados con Vel negativo, pero individualmente no están restringidos a Vel negativo.

SEQ ID NO. 3: ADNc basado en SEQ ID NO. 1

ES 2 713 162 T3

```

1 GGTGAGGCGC GCGGGGTCCG GGCTGCGGCT TCCCGGTGCG GCCGCAGTGG GCAGGCTCGA
61 GCGCTCTGCC GCACCTCAGC CCACGACCTG CCCCGCTGGG AGGTGCGGGC CGCTGGCCAG
121 GCCCTGACCG CAACCTGGCC CAGAGGCCCC AGCCCTCAGG CAAGGTTCTC CGGTGAAGCC
181 ACAGCCTGGC CACCTGTCTT GATCTCCCCA CCGAGAAGGC CCCGCCCTC CCGCTGCAGC
241 CCCACAGCAT GCAGCCCCAG GAGAGCCACG TCCACTATAG TAGGTGGGAG GACGGCAGCA
301 GGGACGGAGT CAGCCTAGGG GCTGTGTCCA GCACAGAAGA GGCCTCACGC TGCCGCAGGA
361 TCTCCAGAG GCTGTGCACG GGCAAGCTGG GCATCGCCAT GAAGGTGCTG GGCGGCGTGG
421 CCCTCTTCTG GATCATCTT ATCCTGGGCT ACCTCACAGG CTACTATGTG CACAAGTGA
481 AATAAAATGCT GCCCCGCATG CACGCGGGGG GCTGGCCGCA AAAAAAAAAA

```

5 Nota: Esta secuencia de ARNm de longitud completa se ha determinado experimentalmente por 3' RACE. La cursiva negra indica la delección identificada en la secuencia genómica de todos los individuos Vel negativos secuenciados hasta la fecha. El subrayado indica los codones de inicio y terminación.

SEQ ID NO. 4: ADNc basado en SEQ ID NO. 2 (la delección de 17 pb no está presente)

```

1 GGTGAGGCGC GCGGGGTCCG GGCTGCGGCT TCCCGGTGCG GCCGCAGTGG GCAGGCTCGA
61 GCGCTCTGCC GCACCTCAGC CCACGACCTG CCCCGCTGGG AGGTGCGGGC CGCTGGCCAG
121 GCCCTGACCG CAACCTGGCC CAGAGGCCCC AGCCCTCAGG CAAGGTTCTC CGGTGAAGCC
181 ACAGCCTGGC CACCTGTCTT GATCTCCCCA CCGAGAAGGC CCCGCCCTC CCGCTGCAGC
241 CCCACAGCAT GCAGCCCCAG GAGAGCCACG TCCACTATAG TAGGTGGGAG GACGGCAGCA
301 GGGACGGAGT CCAGCACAGA AGAGGCCTCA CGCTGCCGCA GGATCTCCA GAGGCTGTGC
361 ACGGCAAGC TGGGCATCGC CATGAAGGTG CTGGGCGGCG TGCCCTCTT CTGGATCATC
421 TTCATCCTGG GCTACCTCAC AGGCTACTAT GTGCACAAGT GCAAATAAAAT GCTGCCCCGC
481 ATGCACGCGG GGGGCTGGCC GCAAAAAAAAA AAA

```

10

SEQ ID NO. 5: Proteína SMIM1 traducida

```

MQPQESHVHYSRWEDGSRDGVSLGAVSSTEEASRCRRISQRLCTGKLGIAMKVLGG
VALFWIIFILGYLTGYVHKCK

```

15 El gris indica dominio predicho que atraviesa la membrana, predicho por TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)

SEQ ID NO. 6: Péptido 1

MQPQESHVHYSRWED

20

SEQ ID NO. 7: Péptido 2

SRWEDGSRDGVSLGA

25

SEQ ID NO. 8: Péptido 3

GVSLGAVSSTEEASR

SEQ ID NO. 9: Péptido 4

30

EASRCRRISQRLCTG

SEQ ID NO. 10: Péptido 5 (péptido 1 mezclado)

35

CPESWHSYMRVQHEQD

SEQ ID NO. 11: Cebador de ADNc 388588cDNaf

CGCACCTCAGCCCACGAC

5 SEQ ID NO. 12: Cebador de ADNc 388588cDNAr

TCCAGGCCTGTGCTCTCAC

SEQ ID NO. 13: Cebador de PCR Vel negativoF

10 GCCGAATTCGCCACCATGCAGCCCCAGGAGAGC

SEQ ID NO. 14: Cebador de PCR Vel negativoR2

15 GCCGGATCCCCCTTATTTGCACTTGTGCACATA

SEQ ID NO. 15: 388588int2f Cebador de PCR

20 TCTCCTAACAGCAGCCTCAG

SEQ ID NO. 16: 388588ex4r Cebador de PCR

TGTCTCCAGGCCTGTGCTC

25 SEQ ID NO. 17: 388588int3f Cebador de PCR

CAGCTCAGCAAACCGCAGC

SEQ ID NO. 18: 388588int3r Cebador de PCR

30 GGCGCTCTGCTGGAGTCA

SEQ ID NO. 19: 388588int3r2 Cebador de PCR

35 CTGGGCGCTCTGCTGGAG

SEQ ID NO. 20: Cebador de PCR específica de alelo – 388588wtex3f

40 CGGAGTCAGCCTAGGGGC

SEQ ID NO. 21: Cebador de PCR específica de alelo – 388588mutex3f

GGACGGAGTCCAGCACAG

45 SEQ ID NO. 22: LOCex3f_screen cebador de PCR

ACAGCCTGGCCACCTGTCTTG

SEQ ID NO. 23: LOCex3r_screen cebador de PCR

50 CTGCGGCAGCGTGAGGC

SEQ ID NO. 24: Cebador de RACE Vel 59F

55 GGCCGCAGTGGGCAGGCTC

SEQ ID NO. 25: Cebador de RACE Vel 176F

CTCAGGCAAGGTTCTCCGGTGA

60 SEQ ID NO. 26: Cebador de RACE Vel 280F

AGGAGAGCCACGTCCACTATAG

SEQ ID NO. 27: Cebador de RACE Vel 332R

5 GCAGCGTGAGGCCTCTTCTGTG

SEQ ID NO. 28: Cebador de RACE Vel 355R

10 CACAGCCTCTGGGAGATCCTGC

SEQ ID NO. 29: Cebador de RACE Vel 376R

GATGCCCAGCTTGCCCCTGC

15 SEQ ID NO. 30: Exón 3 de *SMIM1*

TGAAGCCAC AGCCTGGCCA CCTGTCTTGA TCTCCCCACC GAGAAGGCC CGCCCCTCCC
GCTGCAGCCC CACAGCATGC AGCCCCAGGA GAGCCACGTC CACTATAGTA GGTGGGAGGA
CGGCAGCAGG GACGGAGTCA **GCCTAGGGGC TGTGTCCAGC** ACAGAAGAGG CCTCACGCTG
CCGCAG

20 SEQ ID NO. 31: Delección de 17 pb

AGCCTAG GGGCTGTGTC

SEQ ID NO. 32: Fenotipo mutante de *SMIM1* extendido al posterior codón de terminación

1 ggtgagggcgc gcggggtccg ggctgcggct tcccgggtgcg gccgcagtgg gcaggtgcga
61 ctgtgcgcgg cctcgtctggc tgagaactgg cgggggtggg ggcgtgccct ggactgacct
121 ccaccggcct aaccgcgggt gcggggccag ggccggaact gcccgcccg ctccttgccc
181 ggctccttgt ggctgctggg gacccccgac accagccact tccccttccc ggcccttagc
241 aagatcggt tctccggtca ctttatttt ttaggctcg aggcgtctgc cgcacctcag
301 cccacgacct gccccgctgg gaggtgcggg ccgctggcca ggccctgacc gcaacctggc
361 ccagagggccc cagccctcag gcaaggttct ccgggtaagt gtggggccct gaggcgtgt
421 ggggtgaaga ggtctatgga ggggcgctg tgtacctagg gccttctctg actcacaagc
481 ccccaggagg tgccaggatc cgggagcctc ccagggcctg gaggggagtc cctgatgggt
541 tctgcccgc acacctgtga ccatcacatg agtgtggaga gacgtttact gagcaagtga
601 gggaggccag cctcaagggc cggctctggt ggctgtgcac cggggtgact tgggaacaac
661 gtgttctacg tcagcaagac aggaacctat gatcccagag ttgaacacac tgggcttgac
721 cctcccacc gggaggccca tgggtggctg ctgctgtgga cttggagcct cagcactccc
781 gagactaatg ctgctggat gtcgggttgc aaggcggctg ctgcagctcc agcagctcca
841 gccatcacgt cgagtctgga agaaggaggt ggctgctgct gctttcacag aagcaaactc
901 tcccatcccc tgctgcacc tggctcctgg accccagctg ggtgacttgg gaaagcaggg
961 gtggtggtat taagcttgc ttaccgggt catggctggt acctggggct ggcacattgc
1021 tgctgggacc agaatggat tctgcacacc aggcaagagg gcgtgaacct cgggtaggca
1081 gctgaccgct ccacatgctc cgggaaaaca gacccatac tccagtagag gctgggctc
1141 tccgggctg agtgcaggc tgcactgagc cagggctccc accgaaggca cactttatgg
1201 ctttgagaca gctcctctg cctctctggg ctttggggga aggcagacat ggaagtgcc
25 1261 ggagtctcag aactgcctgg ggcctgagtt tctgagctgg cttcttgacg gggagtggct

ES 2 713 162 T3

1321 gctgtgcctt taggcctctg tgccgatgac ctgggaggaa ggtcagcctt ccccgtgga
1381 gggggcccag caaagcctca gtcctagaa gtgaggggce tgccattgcc tgcccagagga
1441 ccccactcct gggggccaga tgctgagagg ggacactggg ggcccagcag accagagagc
1501 tgaccccagt cccacagcct ggggtgggtg tcaacttctc gtgccccctc caactcctcc
1561 acccccacac ccccttaggt aaataggagg tcgaaacaga ggccagaggg taaaggaggt
1621 gcttagagtc cgggctggct caggccggcc gggcagctgt gctagtgtt ggagttcctg
1681 ctcagtcccc gtggtctcct cgcccctctg ggcacttggg ctgccaggca ccgagctgag
1741 tgccgagatg caaagatgag tcccaggctc gcaggagtgg gagcccagca gggagctggc
1801 cttggggccg ggcccctcct gctctgggca gccaccagc cctacgacc tctgtctct
1861 gtagggcctc cccaaggcct tgaatccacc ccggcccgt gctcagtgca tcatgcccc
1921 caagccccag cctcctaga ggtgtgggtg ggggagggc tgcaaccac acaggtgag
1981 gacacagctg ctgccactgc ctggggccag ccacgcatcc tccccagaca gggaccggtc
2041 tagctgtacc agccgtgcc cgggacctgc tgccctgcc cccccccc tcccctggcc
2101 agcctccca gaggccagaa ggcgccttat cgggcagggt taaggagggg gacagtatc
2161 aggggtgca gcttagattg ggccacaatg tctctgtctc ttgaggggtg caggctgtgc
2221 aggctccctg ataaaagcac cggggaaggg aggctcctgg agtgtgtctg aaggaaacac
2281 tggcctccca catgcctgag gtcaggctt ggctgagat ggaattctcg cttggtcca
2341 tctcccggc ctgacctgg gcaaatgact ctaccacttt gtgtctaggt cacctgttaa
2401 gtcaggcgac agaccgggtg agggagtcag cccccgacc ttagtgccc tctcctaaca
2461 gcagcctcag aggggtctt gactgccgc ctccatccgc ttgttttaca **gtgaagccac**
2521 **agcctggcca cctgtcttga tctcccacc gagaaggccc cgcccctcc gctgcagccc**
2581 **cacagcatgc agccccagga gagccacgtc cactatagta ggtgggagga cggcagcagg**
2641 **gacggagtcc agcacagaag aggcctcag ctgccgagg** tgagggcct gaggcagcc
2701 tgccagccat agcaggctgg tgtctccctc cagagacgcc tgccctaacc cctgctaccg
2761 gcccatac cctccacccc atcctggctg ggagcccacg gtccagcagc tcagcaaac
2821 gcagcctttg gccttccctc tggttggctg tgggcgggga gagcttctc **tca**actccag
2881 cagagcggc aggccctcc cctgacca gaccaacggc cacagtccac ttagggggcc
2941 cctcatgcgg cctggcctg gggctcacct ccagttggt ctcaccag **gactcaccag**
3001 **aggctgtgca cgggcaagct gggcatgcc atgaaggtgc tggggggcgt ggcctcttc**
3061 **tggatcatct tcatcctggg ctacctaca ggctactatg tgcaaaagt caataaatg**
3121 **ctgcccgcga tgcacgggg gggctggccg cacacgtgag agcacaggcc tggagacaca**
3181 cccctgttac acatggacc cccacagac acggaccctg cggcacacac agcgcacagg
3241 gcacacgcgc tggcagccag gcacacgaag acaccagggt cacagctgtc atcggcccca
3301 cacgggggcg cacaaacacc tggcacacag ccttcaaag gacctacaaa cagctgggca
3361 cacgtggctg ggaggcctgg gccagcctc agcaggagct gcaggacaca cccaggctgg
3421 gccctgcggc ctggagcccc cagctacagc ctctctctc ccagggcca gcccttccc
3481 ttgtgaaggc caggatgagg ggttccttca gggacaaaac cgagcccacc tccctggcag
3541 cccccgggg tgggatcctc ccggtgctt tctccgtgg gagcagtgtg cagagctgtg
3601 tggcctggg caggccctg tctctctgg gcctttctga ctctggttt tgtaaggggtg
3661 gctatgtgtc cccgcctt gtctcagatg caccatctc **tccttag**taa gtgggcacag
3721 ttcttctag gcagcccacc acgcgcagag gctgggtgtg tccctcttgg ggccggcg..

En esta secuencia mutante, el codón de terminación wt está abolido y la premisa es que el transcrito se extiende hasta el siguiente codón de terminación predicho; en este caso 590 pb después del codón de terminación de tipo salvaje.

5

SEQ ID NO. 33: var 1 de *SMIM1* (chr1:3691980 A/G)

ES 2 713 162 T3

1 ggtgagggcg gcgggggccg ggctgcccgt tcccgggtgg gccgcagtgg gcaggtgcga
 61 ctgtgcgcgg cctcgcctgg tgagaactgg cgggggtggg ggcggtgccct ggactgacct
 121 ccaccggcct aaccgcgggt gcggggccag ggccggaact gcccgcccgg ctccttgccc
 181 ggctccttgt ggctgctggg gacccccgac accagccact ttccttccc gcccttagc
 241 aagatcggct tctccgtca ctttatttt ttaggctcg aggcgtctgc cgcacctcag
 301 cccacgacct gccccgctgg gaggtgcggg ccgctggcca ggcctgacc gcaacctggc
 361 ccagaggccc cagccctcag gcaaggttct ccgggtaagt gtggggccct gaggcgctgt
 421 ggggtgaaga ggtctatgga ggggcgctg tgtacctagg gccttctgc actcacaagc
 481 cccagaggag tgccaggatc cgggagcctc ccagggcctg gaggggagtc cctgatgggt
 541 tctgcccgc acacctgtga ccatcacatg agtgtggaga gacgttact gagcaagtga
 601 gggaggccag cctcaagggc cggctctggg ggctgtgcac cggggtgact tgggaacaac
 661 gtgttctacg tcagcaagac aggaacccat gatcccagag ttgaacacac tgggcttgac
 721 cctcccacc gggagggcca tgggtggctg ctgctgtgga cttggagcct cagcactccc
 781 gagactaatg ctgctggat gtcgggtgc aaggcggctg ctgcagctcc agcagctcca
 841 gccatcacgt cgagtctgga agaaggagggt ggctgctgct gctttcacag aagcaaacctc
 901 tcccatcccc tgctgcacc tggctcctgg accccagctg ggtgacttg gaaagcaggg
 961 gtgggtggtat taagcttgc ttaccgggt catggctgtt acctggggct ggcacattgc
 1021 tgctgggacc agaatgggat tctgcacacc aggcaagagg gcgtgaacct cgggtaggca
 1081 gctgaccgct ccacatgctc cgggaaaaca gcaccatac tccagtagag gctgggcctc
 1141 tccgggctg agtgccaggc tgcactgagc cagggctccc accgaaggca cactttatgg
 1201 ctttgagaca gctcctctg cctctctggg ctttggggga aggcagacat ggaagtgccg
 1261 ggagtctcag aactgcctgg ggcctgagtt tctgagctgg cttcttgag gggagtggct
 1321 gctgtgcctt taggcctctg tgccgatgac ctgggaggaa ggtcagcctt ccccgtgga
 1381 gggggcccag caaagcctca gctcctagaa gtgaggggccc tgccattgcc tgcccagga
 1441 cccactcct gggggccaga tgctgagagg ggacactggg ggcccagcag accagagagc
 1501 tgaccccagt cccacagcct ggggtgggtg tcaacttctc gtgccccctc caactcctcc
 1561 acccccacac ccccttaggt aaataggagg tcgaaacaga ggccagaggg taaaggagggt
 1621 gcttagagtc cgggctgget caggccggcc gggcagctgt gctagtgctt ggagtctctg
 1681 ctcagtcccc gtggtctcct cggccctctg ggcacttggg ctgccaggca ccgagctgag
 1741 tgccgagatg caaagatgag tcccaggctc gcaggagtgt gagcccagca gggagctggc
 1801 cttggggccg ggcccctcct gctctgggca gccaccagc cctacgacc tctgtctct
 1861 gtagggcctc cccaaggcct tgaatccacc ccggccccgt gctcagtgca tcatgcccc
 1921 caagccccag cctcctaga ggtgtgggtg ggggaggggc tgcaaccac acaggtgag
 1981 gacacagctg ctgccactgc ctggggccag ccacgcatcc tcccagaca gggaccggtc
 2041 tagctgtacc agccgctgcc ccggacctgc tgccctgccc cccccccc tcccctggcc

ES 2 713 162 T3

2101 agcctcccca gagccagaa ggcgccttat cgggcagggt taaggagggg gacagtatc
 2161 aggggctgca gcctagattg ggccacaatg tcctcgtctc ttgaggggtg caggctgtgc
 2221 aggtccctg ataaaagcac cggggaaggg aggtcctgg agtgtgctgg aaggaacac
 2281 tggcctccca catgcctgag gtcagggtt ggctgagat ggaattctcg cttggtccca
 2341 tcctccggc ctgacctgg gcaaatgact ctaccacttt gtgtctaggt cacctgttaa
 2401 gtcaggcgac agaccgggtg agggagtcag ccccgacce ttagtgccc tctcctaaca
 2461 gcagcctcag agggggtctt gactgcgcgc cccatccgc ttgttttaca gtgaagccac
 2521 agcctggcca cctgtcttga tctccccacc gagaaggccc cccccctccc gctgcagccc
 2581 cacagcatgc agcccagga gagccacgtc cactatagta ggtgggagAa cggcagcagg
 2641 gacggagtca gcctaggggc tgtgtccagc acagaagagg cctcacgctg ccgcaggtga
 2701 ggggctgag ggagcctgc cagccatagc aggtggtgt ctcctccag agacgctgc
 2761 cctaaccct gctaccggc ccatcaccct ccacccatc ctggctggga gccacggtc
 2821 cagcagctca gcaaacgca gcctttggc ttcctctgg ttggtgtgg gcggggagag
 2881 cttcctctg actccagcag agcgcccagg cccctcccc tgaccagac caacggccac
 2941 agtccactta gggggccct catgcggccc tggcctggg ctcacctca gttggtctc
 3001 acccaggat ccccagagg ctgtgcacgg gcaagctggg catcgccatg aagggtctg
 3061 gcggcgtggc cctcttctg atcatcttca tctgggcta cctcacagg tactatgtgc
 3121 acaagtcaa ataatgctg ccccgcatg acgcgggggg ctggccqcac acgtgagagc
 3181 acaggcctgg agaca

SEQ ID NO. 34: var 2 de SMIM1 (chr1:3691980 A/G)

1 ggtgaggcgc gcggggtccg ggctgcggct tcccggtgcc gccgcagtgg gcadgtgcga
 61 ctgtgcgcgg cctcgtggc tgagaactgg cgggggtggg ggctgccc ttgactgacc
 121 ccaccggcct aaccgcggg gcggggccag ggccggaact gccgcccgg ctccttgccc
 181 ggctcctgt ggctgctgg gacccccgac accagccact ttccttccc gcccttagc
 241 aagatcggct tctccgtca cctttatct tttaggctcg aggcgtctgc cgcacctcag
 301 cccacgacct gccccgctgg gaggtgcggg ccgctggcca ggcctgacc gcaacctggc
 361 ccagaggccc cagccctcag gcaaggttct ccggtaagt gtggggccct gaggcgtgt
 421 ggggtgaaga ggtctatgga ggggcgctg tgtacctagg gccttctgc actcaaacg
 481 cccagggagg tgccaggatc cgggagcctc ccaggcctg gaggggagtc cctgatgggt
 541 tcctgccgcc acacctgtga ccatcacatg agtgtggaga gacgtttact gagcaagtga
 601 gggaggccag cctcaagggc cggctctggg ggctgtgcac cgggtgact tgggaacaac
 661 gtgttctacg tcagcaagac aggaacccat gatcccagag ttgaacacac tgggcttgac
 721 cctcccacc gggaggcca tgggtggctg ctgctgtgga cttggagcct cagcactccc
 781 gagactaatg ctgctggat gtcgggttc aaggcgctg ctgcagctcc agcagctcca
 841 gccatcacgt cgagtctgga agaaggaggt ggctgctgct gctttcacag aagcaaacctc
 901 tccatcccc tgctgcacc tggctcctgg accccagctg ggtgacttgg gaaagcaggg
 961 gtggtggtat taagctgtc ttaccgggt catggtgtt acctggggt ggcacattgc
 1021 tgctgggacc agaatgggat tctgcacacc aggcaagagg gcgtgaacct cgggtaggca
 1081 gctgaccgct ccacatgctc cgggaaaaca gcaccatac tccagtagag gctgggctc
 1141 tccgggctg agtgccaggc tgcactgagc cagggtccc accgaaggca cactttatgg
 1201 ctttgagaca gctcctctg cctctctggg ctttgggga aggcagacat ggaagtgcg

ES 2 713 162 T3

1261 ggagtctcag aactgcctgg ggcctgagtt tctgagctgg cttcttgacag gggagtggct
 1321 gctgtgcctt taggcctctg tgccgatgac ctgggaggaa ggtcagcctt ccccgcctga
 1381 gggggcccag caaagcctca gctcctagaa gtgagggggc tgccattgcc tgcccagga
 1441 cccactcct gggggccaga tgctgagag ggacactggg ggcccagcag accagagagc
 1501 tgaccccagt cccacagcct ggggtgggtg tcaacttctc gtgccccctc caactcctcc
 1561 acccccacac cccttaggt aatagggag tcgaaacaga ggccagaggg taaaggaggt
 1621 gcttagagtc cgggctggct caggccggcc gggcagctgt gctagtgtt ggagttcctg
 1681 ctcagtcccc gtggtctcct cggccctctg ggcacttggg ctgccaggca ccgagctgag
 1741 tgccgagatg caaagatgag tcccaggtct gcaggagtgt gagcccagca gggagctggc
 1801 cttggggccg ggccccctc gctctgggca gccaccagc cctacgacc tctgtctct
 1861 gtagggcctc cccaaggcct tgaatccacc cgggccccgt gctcagtga tcatgcccc
 1921 caagccccag cctcctaga ggtgtgggtg ggggagggg tgcaaccac acaggctgag
 1981 gacacagctg ctgccactgc ctggggccag ccacgcatcc tcccagaca gggaccggtc
 2041 tagctgtacc agccgctgcc cggacctgc tgccctgcc cccccccc tcccctggcc
 2101 agcctccca gaggccagaa ggcgccttat cgggcagggt taaggagggg gacagttatc
 2161 aggggctgca gcctagattg ggccacaatg tcctcgtctc ttgagggtgg caggctgtgc
 2221 aggetccctg ataaaagcac cggggaaggg aggetcctgg agtgtgtgtg aaggaaacac
 2281 tggcctccca catgcctgag gtcagggtt ggctgagat ggaattctcg cttggtccca
 2341 tcctcccggc ctgacctgg gcaaatgact ctaccacttt gtgtctaggt cacctgttaa
 2401 gtcaggcgac agaccgggtg agggagttag cccccgacc ttagtgtccc tctcctaaca
 2461 gcagcctcag aggggtctt gactgccgc ctcacccgc ttgttttaca **gtgaagccac**
 2521 **agcctggcca cctgtcttga tctccccacc gagaaggccc cggccccctc gctgcagccc**
 2581 **cacagcatgc agccccagga gagccacgtc cactatagta ggtgggagga cggcagcagg**
 2641 **gacggagtca gcctaggggc tgtgtccagc acagaagagg cctcagctg ccgcaggtga**
 2701 ggggctgag ggcagcctgc cagccatagc aggtgtgtgt ctccctccag agacgctgc
 2761 ctaaccctt gctaccggcc ccatcaccct ccacccatc ctggctggga gccacggtc
 2821 cagcagctca gcaaaccgca gccttggcc ttcctctgg ttggtgtgtg gcggggagag
 2881 cttctcttg actccagcag agcggccagg cccctcccc tgaccagac caacggccac
 2941 agtccactta gggggcccc catgcggccc tggcctgggg ctcacctca gttggtctc
 3001 accccagat ctcccagagg ctgtgcacgg gcaagctggg catcgccatg aagggtctgg
 3061 **ggggcgigg cctctctgg atcatcttca tctgggcta cctcacagg tactatAtgc**
 3121 **acaagtcaa ataatgctg ccccgcatgc acggggggg ctggccgac acgtgagagc**
 3181 **acaggcctgg agaca**

SEQ ID NO. 35: ADNc de la variante de SMIM1 (transcrito según 5' y 3' RACE en sangre)

1 CAGAGACGCG GGGACACAGg ctgaggcgt ctgccgacc tcagcccag acctgccccg
 61 ctgggaggtg cgggcccgtg gccaggcct gaccgcaacc tggcccagag gccccagccc
 121 tcaggcaagg ttctccggtg aagccacagc ctggccacct gtcttgatct cccaccgag
 181 aaggccccgc cctcccgtg gcagcccac agcatgcagc cccaggagag ccacgtccac
 241 tatagtaggt gggaggacgg cagcagggac ggagtgcagc taggggtgt gtccagcaca
 301 gaagaggcct cacgctgccg caggatctcc cagaggtgt gcacgggcaa gctgggcatc
 361 gccatgaagg tgctgggagg cgtggccctc tctggatca tcttcatcct gggctacctc
 421 acaggctact atgtgcacaa gtgcaataa atgctgcccc gcatgcagc ggggggctgg
 481 ccgcaaaaaa aaaaaaa

SEQ ID NO. 36: ADNc de la variante de SMIM1 (transcrito según 5' y 3' RACE en sangre; delección de 17 pb)

```

1 CAGAGACGCG GGGACACAGg ctcgaggcgt ctgccgcacc tcagcccacg acctgccccg
61 ctgggaggtg cgggcccgtg gccaggccct gaccgcaacc tggcccagag gccccagccc
121 tcaggcaagg ttctccggtg aagccacagc ctggccacct gtcttgatct ccccaccgag
181 aaggccccgc cctcccgtc gcagccccac agcatgcagc cccaggagag ccacgtccac
241 tatagtaggt gggaggacgg cagcagggac ggagtc cagcaca
284 gaagaggcct cacgctgccg caggatctcc cagaggctgt gcacgggcaa gctgggcatc
344 gccatgaagg tctggggcgg cgtggccctc ttctggatca tcttcatcct gggctacctc
404 acaggctact atgtgcacaa gtgcaataa atgctgcccc gcatgcacgc ggggggctgg
464 ccgcaaaaaa aaaaaaa

```

5 **Ejemplo 2: Identificación del antígeno Vel**

Antecedentes

10 El antígeno de grupo sanguíneo Vel está localizado en glóbulos rojos y es uno de unos pocos denominados antígenos de grupo sanguíneo huérfanos para los que la base molecular es desconocida. Es clínicamente importante y por tanto la identificación de la molécula portadora permitiría el desarrollo de un ensayo de cribado para identificar donantes de sangre apropiados para pacientes Vel negativo/negativo inmunizados, y también pacientes en riesgo de producir un anticuerpo indeseado.

15 Los presentes inventores proporcionaron entendimiento de la base molecular y genética del antígeno del grupo sanguíneo Vel. Esto se ha logrado mediante una gama de investigaciones serológicas y bioquímicas, incluyendo investigaciones de genes candidatos. Estas investigaciones produjeron estimaciones del tamaño de la proteína de glóbulos rojos que porta el antígeno Vel y una configuración probablemente de homodímero.

20 Una hipótesis de que el gen que codifica el antígeno de grupo sanguíneo Vel se podría potencialmente triangular a través de cribado genético de todo el genoma usando matrices de polimorfismo de nucleótido único (SNP) se basó en tres observaciones:

- 25 (a) se cree que el fenotipo Vel negativo/negativo es más común en Suecia (1:1700, comparado con aprox. 1:4000 en otras poblaciones),
- (b) el fenotipo Vel negativo se hereda de una manera autosómica recesiva, y
- (c) el gen que codifica el antígeno Vel, como varios otros genes de grupo sanguíneo, se podría expresar preferentemente en eritrocitos.

30 En conjunto, estas observaciones hicieron a los inventores sugerir que el fenotipo Vel negativo podría estar causado por una única mutación fundadora en la población sueca, en cuyo caso un cribado genético de todo el genoma podría tener éxito a pesar del número relativamente limitado de muestras de ADN de individuos Vel negativos disponibles.

35 Según esto, se recogieron perfiles de SNP en todo el genoma de donantes Vel negativos usando micromatrices Illumina Human Omni 2.5M-Quad. Usando una estrategia computacional concebida y ejecutada en colaboración por los presentes inventores, se identificó una región en el cromosoma 1 que contiene 5 genes.

40 Después de la revisión de las características de estos genes, se determinó que *SMIM1* (*LOC388588*) era el más prometedor porque:

- 45 (a) su estructura predicha corresponde a una proteína transmembrana,
- (b) su tamaño predicho coincidía con las estimaciones de tamaño de los estudios bioquímicos anteriores del inventor, y
- (c) análisis de datos preexistentes de micromatrices de expresión génica recuperados de bases de datos públicas indicaban que se expresaba preferentemente en precursores de glóbulos rojos.

50 Con esta información en mano, los inventores determinaron la secuencia de ADN de *SMIM1* (*LOC388588*) en donantes Vel negativos y encontraron una delección de 17 pares de bases que destruye la proteína, produciendo un denominado fenotipo nulo o inactivado.

Estudios genéticos posteriores han identificado la misma delección exacta de 17 pares de bases en todos los donantes Vel negativos de Suecia, RU, Suiza, Israel y los EE UU ensayados hasta la fecha, lo que sugiere que es en efecto la causa predominante del fenotipo Vel negativo. Análisis de secuencia adicionales revelaron homocigosidad para la

deleción de 17 pares de bases en cinco muestras más Vel- de origen suizo y 2 muestras de origen israelí. Esto ha sentado las bases para la identificación de donantes de sangre Vel negativos por ensayo genético.

Muestras

5 Se obtuvieron las aprobaciones del Comité Regional de Revisión de Ética en la Universidad de Lund para recogida de médula ósea y análisis de grupo sanguíneo genético en muestras de sangre de donantes de sangre. Se sacaron muestras de sangre anticoaguladas de donantes suecos Vel negativos y Vel positivos con consentimiento informado según la práctica de donación de sangre rutinaria. Otras muestras Vel negativas usadas fueron de una colección de donantes raros ensamblada de un esquema internacional de intercambio de muestras raras, SCARF (http://scarfex.jove.prohosting.com/); o enviadas directamente a nuestro laboratorio de referencia para investigación por otros laboratorios de referencia. Los paneles de muestras de ADN usados para cribado para establecer prevalencia de mutación eran muestras anónimas de donantes de sangre suecos normales.

15 **Tabla 1:** Cohorte de descubrimiento de muestras Vel negativas y Vel positivas analizadas en la micromatriz Illumina Human Omni 2.5M BeadChip.

Número de muestra	Fenotipo Vel	Comentarios	Origen
1	Vel negativo	Donante de sangre	Suecia
2	Vel negativo	Hermano de #1	Suecia
3	Vel positivo	Hermano de #1	Suecia
4	Vel positivo	Hijo de #1	Suecia
5	Vel positivo	Hijo de #1	Suecia
6	Vel negativo	Donante de sangre	Suecia
7	Vel negativo	Hermano de #6	Suecia
8	Vel negativo	Hermano de #6	Suecia
9	Vel positivo	Hermano de #6	Suecia
10	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
11	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
12	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
13	Vel positivo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
14	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
15	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
16	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
17	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
18	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
19	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
20	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
21	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
22	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
23	Vel positivo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia
24	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	EE UU
25	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	EE UU
26	Vel negativo	Donante de sangre sin parentesco	EE UU
27	Vel positivo	Donante de sangre sin parentesco	EE UU
28	Vel positivo	Donante de sangre sin parentesco	Suecia

Extracción de ácidos nucleicos

20 El ADN genómico se preparó usando un procedimiento de precipitación con sal modificado y se diluyó a 100 ng/ul en agua; o usando el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen AB, Sollentuna, Suecia) y se usó sin diluir. Se extrajo ARN total de sangre completa o de líneas celulares usando el reactivo Trizol® LS (Life Technologies Europe BV, Estocolmo, Suecia) según las instrucciones del fabricante.

Generación y análisis de datos de matriz de polimorfismo de nucleótido único

30 Se sometió ADN genómico de 20 muestras Vel negativas y 8 Vel positivas (Tabla 1) a genotipado de todo el genoma con respecto a 2.443.179 polimorfismos de nucleótido único (SNP) usando micromatrices Illumina HumanOmni 2.5M BeadChip (Illumina Inc, San Diego, CA, EE UU; el genotipado y asignación genotipo se realizaron en la instalación SCIBLU, Universidad de Lund, Suecia). Los genotipos se asignaron en GenomeStudio (Illumina Inc). El índice de asignación era al menos el 99,5% para todas las muestras. Cuatro muestras se genotiparon dos veces en matrices separadas con una concordancia de al menos el 99,3%. Solo el resultado en una de las matrices se analizó posteriormente.

Se seleccionaron SNP autosómicos no ambiguos para ensayo de asociación. Para encontrar SNP compatibles con una herencia autosómica recesiva, se aplicó después un filtro que seleccionó SNP donde las muestras Vel negativas en cada familia eran homocigotas e idénticas mientras que los miembros de su familia Vel positivos eran heterocigotos u homocigotos, pero no idénticos. Después de aplicar este filtro, permanecieron 8.780 SNP. Todas las muestras Vel negativas familiares (n=5) se retiraron antes del ensayo de asociación. El ensayo de asociación se llevó a cabo usando los sujetos del panel EUR (n=379) en la publicación de la fase final 1 del Proyecto de 1000 Genomas como controles. Las frecuencias de genotipo en las muestras Vel negativas sin parentesco (n=15) se compararon con los controles usando la prueba exacta de Fisher en R2.14.1.

Se estimaron puntos de ruptura del bloque de haplotipo detectado de inspección de datos de asignación de genotipo sin filtrar.

Secuenciación de SMIM1

El ADN genómico de 31 muestras Vel negativas y 10 Vel positivas se amplificó y secuenció con los cebadores 388588int2f (SEQ ID NO. 15) y 388588ex4r (SEQ ID NO. 16) que flanqueaban los exones 3 y 4 y contenían el marco abierto de lectura de SMIM1 (véase, Tabla 2; Figura 1).

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 3%, se cortaron, eluyeron, y secuenciaron usando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Life Technologies) en un analizador genético ABI 3500 Dx. El análisis de secuencia se realizó con software SeqEd v1.0 (Applied Biosystems).

El ARN total aislado de sangre completa o líneas celulares se convirtió a ADNc usando el kit High Capacity (Applied Biosystems) según el protocolo. La amplificación del ARNm se realizó con el kit Expand High Fidelity PCR (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, In, EE UU) usando los cebadores 388588cDNAf (SEQ ID NO. 11) y 388588cDNAr (SEQ ID NO. 12). Los productos se secuenciaron como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de genotipado

Se diseñaron ensayos para distinguir los alelos de tipo salvaje y mutante. Todos los cebadores fueron sintetizados por Life Technologies y usados a una concentración de 10 pM a menos que se indique de otra manera. Véase la tabla 2 para las secuencias de cebadores.

- i) PCR-RFLP: se amplificó ADN genómico con los cebadores 388588int2f (SEQ ID NO. 15) y 388588int3R2 (SEQ ID NO. 19). En este ensayo, las bandas amplificadas eran de 459 y 442 pb respectivamente, sin embargo, el tamaño del amplicón es arbitrario y el experto en la materia podría haber diseñado otros cebadores específicos de gen que rodean la delección. Los productos se digirieron con StylI a 37°C durante dos horas. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 3% (véase la figura 2). El sitio de restricción se abolía en la secuencia mutada. En este ensayo, las bandas amplificadas eran de 459 y 442 pb respectivamente, sin embargo, el tamaño del amplicón es arbitrario y se podrían haber usado otros cebadores específicos de gen que rodean la delección.
- ii) PCR específica de alelo (ASP): se amplificó ADN genómico con los cebadores 388588int2f (SEQ ID NO. 15) (1 pM), 388588int3R2 (SEQ ID NO. 19) y o bien 388588wtex3f (SEQ ID NO. 20) o 388588mutex3f (SEQ ID NO. 21). Se proporcionó una banda de control interno mediante la amplificación de un producto de 460 pb (tipo salvaje) o 443 pb (mutante). Se amplificaron específicamente bandas específicas de alelo de 266 pb (tipo salvaje) o 249 (mutante) por sus respectivos cebadores (véase la figura 3).
- iii) PCR específica de gen (GSP): se amplificó ADN genómico con los cebadores LOCex3f_screen (SEQ ID NO. 22) y LOCex3r_screen (SEQ ID NO. 23) que flanqueaban el exón 3 de SMIM1. Se distinguieron productos de PCR específicos de alelo de 178 pb (tipo salvaje) o 161 pb (mutante) basado en el tamaño mediante electroforesis durante 75 minutos a 165 V en un gel de agarosa al 3% (véase la figura 4). Se ensayaron un total de 520 muestras de ADN genómico aleatorias mediante GSP. Se identificaron treinta muestras heterocigotas. Por tanto, la frecuencia alélica en la población sueca del sur es 1 en 17 y la frecuencia calculada de individuos homocigotos para la mutación Vel es 1 en 1200.

PCR a tiempo real y análisis de datos

Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real en 3 µl de ADNc con sondas TaqMan y el sistema de detección de secuencias 7500 (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron usando el Software de detección de secuencia 7500 versión 1.3.1 (Applied Biosystems). Se detectaron transcritos de SMIM1 con un ensayo de expresión génica TaqMan® (Hs01369635_g1, Applied Biosystems, que se une al límite exón 3-4). Las cantidades diana de transcrito se normalizaron respecto al ARN ribosómico 18S (en sayo Hs99999901_s1). Todas las muestras se corrieron en triplicados. La muestra con el menor valor C_T se usó como calibrador. Se consideraron como positivos los resultados de cualquier muestra con al menos dos valores (C_T <40) detectados en el triplicado.

Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)

65

Se aisló ARN mensajero a partir del ARN total extraído de células de médula ósea cultivadas hacia maduración eritropoyética como se ha descrito previamente mediante un kit de aislamiento de ARNm (Roche Diagnostics Corporation). Se realizó RACE con el kit FirstChoice RLM-RACE (Ambion) según las recomendaciones del fabricante. En 5'-RACE, se sintetizó ADNc con cebadores aleatorios proporcionados con el kit. Se usaron los cebadores específicos de gen Vel 332R (SEQ ID NO. 27), Vel 355R (SEQ ID NO. 28) y Vel 376R (SEQ ID NO. 29) para amplificación por PCR junto con los cebadores de 5'-RACE proporcionados en el kit. Para 3'-RACE, se realizó PCR con los cebadores VEL 59F (SEQ ID NO. 24), VEL 176F (SEQ ID NO. 25) y VEL 280F (SEQ ID NO. 26), junto con los cebadores 3' incluidos en el kit. Las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla 2.

10 **Atenuación de *SMIM1* con clones lentivíricos de ARNhc**

SMIM1 se atenuó de forma estable en líneas celulares eritroleucémica humana (HEL) y JK-1 mediante vectores de ARNhc basados en lentivirus específicos para *SMIM1*. Se compraron las siguientes bibliotecas de Sigma: TRCN0000365551, TRCN0000365607, TRCN0000365620, TRCN0000376652, TRCN0000376653, TRCN0000376654, TRCN0000422700 a un título de 10^6 en el vector pLKO.1. La transducción se realizó según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron $1,6 \times 10^4$ de células HEL y JK-1 que expresaban establemente *SMIM1* en una placa de 96 pocillos en 100 μ l de medio de crecimiento por pocillo en el día de la transducción. Se añadió bromuro de hexadimetirina a cada pocillo a una concentración final de 8 μ g/ml. La transducción con clones lentivíricos de ARNhc se llevó a cabo a una MOI (multiplicidad de infección) que variaba entre 0,5 y 5. Se añadieron partículas de lentivirus de un control de transducción no humano (SH202V, SIGMA), un control de eficacia de transducción (SHC203V, SIGMA), y partículas lentivíricas de ARNhc para *SMIM1* a los pocillos que contenían las células. La placa se centrifugó a 2300 rpm durante 30 min a 37°C. 4-5 horas después de la transducción, los pocillos se rellenaron con RPMI-1640 con SFT al 10 y al 20% para células HEL y JK-1, respectivamente. Las células transducidas se incubaron a 37°C en un incubador humidificado en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas. El medio que contenía partículas lentivíricas se retiró y se añadió medio nuevo. Se añadió puromicina a una concentración de 1,75 μ g/ml y 0,25 μ g/ml para células HEL y JK-1, respectivamente. El medio que contenía fármaco se sustituyó después cada dos días durante un periodo de 8 días. Después de ello, los clones se dejaron proliferar hasta confluencia para análisis adicional. Las líneas celulares se analizaron por PCR en tiempo real, inmunotransferencia y citometría de flujo (figura 9).

30

Tabla 2. Cebadores usados en la investigación de *SMIM1*

Nombre cebador (SEQ ID NO.)	Secuencia 5' a 3'	Fin	Tamaño producto (pb) wt/mut
388588cDNAf (SEQ ID NO. 11)	CGCACCTCAGCCCACGAC	Amplificación & Secuenciación	472/455
388588cDNAr (SEQ ID NO. 12)	TCCAGGCCTGTGCTCTCAC		
Vel negativoF (SEQ ID NO. 13)	GCCGAATTCGCCACCATGCAGCCCCAGGAGAGC	Clonación & Expresión	257/240
Vel negativoR2 (SEQ ID NO. 14)	GCCGGATCCCCCTTATTTGCACTTGTGCACATA		
388588i nt2f (SEQ ID NO. 15)	TCTCCTAACAGCAGCCTCAG	Amplificación y secuenciación	745/728
388588ex4r (SEQ ID NO. 16)	TGTCTCCAGGCCTGTGCTC		
388588int3f (SEQ ID NO. 17)	CAGCTCAGCAAACCGCAGC	Secuenciación	
388588int3r (SEQ ID NO. 18)	GGCGCTCTGCTGGAGTCA		
388588int3r2 (SEQ ID NO. 19)	CTGGGCGCTCTGCTGGAG	Secuenciación ASP	266
388588wtex3f (SEQ ID NO. 20)	CGGAGTCAGCCTAGGGGC	Cribado por ASP	
388588mutex3f (SEQ ID NO. 21)	GGACGGAGTCCAGCACAG		249
LOCex3f_screen (SEQ ID NO. 22)	ACAGCCTGGCCACCTGTCTTG	Cribado por GSP	178/161
LOCex3r_screen (SEQ ID NO. 23)	CTGCGGCAGCGTGAGGC		
cebador RACE Vel 59F (SEQ ID NO. 24)	GGCCGCAGTGGGCAGGCTC	3' RACE	
cebador RACE Vel 176F (SEQ ID NO. 25)	CTCAGGCAAGGTTCTCCGGTGA		
cebador RACE Vel 280F (SEQ ID NO. 26)	AGGAGAGCCACGTCCACTATAG		
cebador RACE Vel 332R (SEQ ID NO. 27)	GCAGCGTGAGGCCTCTTCTGTG	5' RACE	
cebador RACE Vel 355R (SEQ ID NO. 28)	CACAGCCTCTGGGAGATCCTGC		
cebador RACE Vel 376R (SEQ ID NO. 29)	GATGCCAGCTTGCCCGTGC		

Ejemplo 3: Generación de anticuerpos de conejo

5 Se diseñaron cuatro péptidos solapantes del dominio extracelular predicho de *SMIM1* (SEQ ID NO. 5) como sigue:

- Péptido 1 MQPQESHVHYSRWED (SEQ ID NO.6)
- Péptido 2 SRWEDGSRDGVSLGA (SEQ ID NO.7)
- Péptido 3 GVSLGAVSSTEEASR (SEQ ID NO.8)
- 10 Péptido 4 EASRCRRISQRLCTG (SEQ ID NO.9)
- Péptido 5 CPESWHSYMRVQHEQD (péptido 1 mezclado) (SEQ ID NO.10)

Los péptidos 1 y 3 se usaron para inmunizar conejos para producir un anticuerpo policlonal hacia la proteína predicha. La síntesis de péptidos y la producción de anticuerpos se compró como un servicio de Innovagen AB (Lund, Suecia).
 15 Los sueros post-inmunización se ensayaron por hemaglutinación e inmunotransferencia. Ningún anticuerpo era específicamente reactivo por técnicas de hemaglutinación serológica rutinaria (descritas posteriormente), sin embargo, anti-péptido 1 era muy específico como se indica en la sección que describe los experimentos de inmunotransferencia posteriormente.

20 **ELISA**

Se realizó ELISA para determinar si el anti-Vel policlonal reconocía específicamente los péptidos lineales 1-4. El péptido 5 era una secuencia mezclada del péptido 1. Se usó una concentración de 0,01 µg/ml de cada péptido para recubrir microplacas durante la noche. Después del recubrimiento, las placas se bloquearon en PBS/BSA al 1%, se lavaron e incubaron con anti-Vel. Se usaron como controles un anticuerpo sin relación anti-K y plasma inerte (suero AB). El anticuerpo no unido se lavó, y la placa se incubó con anti-IgG humana de cabra marcado con HRP (BioRad Laboratories). Después de lavar, las reacciones se desarrollaron con cromógeno TMB Single Solution para ELISA (Invitrogen) y se pararon con HCl 1 M. Las reacciones se leyeron a 450 nm mediante un lector de ELISA.

SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia del anti-péptido 1 de conejo

Se prepararon membranas de eritrocitos como se ha descrito previamente; y se solubilizaron con Nodidet P-40 al 1%. El solubilizado se mezcló con volúmenes iguales de tampón de muestra de Laemmli con o sin la adición de mercaptoetanol al 5% dependiendo de las condiciones requeridas. Antes de cargar, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las membranas de GR solubilizadas (15 µl) se corrieron en geles NuPAGE® Bis-Tris del 4-12% (Novex, Life Technologies) durante ~ 75 minutos a 150 v hasta que el frente del colorante alcanzó la parte inferior del gel. El gel se tiñó con SimplyBlue™ SafeStain (Life Technologies), o las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon en leche desnatada al 5%/solución salina tamponada en fosfato (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, después se enjuagaron en PBS antes de la incubación con anti-péptido 1 (sangrado #2, diluido 1:20.000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las membranas se lavaron 3 x 10 minutos en PBS/Tween (PBST), después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anti-IgG de conejo de cabra marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Agrisera, Vännäs, Suecia) diluido 1:10000 en PBS-T. Las membranas de PVDF se lavaron como antes y después se revelaron con el reactivo ECL (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Las membranas marcadas se sellaron en plástico y después se expusieron a película (Hyperfilm ECL, Life, Technologies) durante un tiempo apropiado, determinado por una exposición inicial de 60 segundos, y se revelaron manualmente. Las membranas se volvieron a probar con un anti-GAPDH murino (clone 6C5, Millipore, Solna, Suecia), diluido 1:5000, se lavaron e incubaron con anti-IgG de ratón de cabra marcado con HRP diluido 1:10000 en PBS-T; y se visualizaron como antes (Figura 6). Los resultados muestran que el anticuerpo generado hacia la secuencia N-terminal de las proteínas *SMIM1* reconocía específicamente una proteína que estaba presente en individuos Vel positivos, pero ausente en individuos Vel negativos.

Ejemplo 4: Citometría de flujo

Se realizó citometría de flujo en GR, líneas celulares y células transfectadas. Una suspensión de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ GR o 10^6 células cultivadas en PBS que contenía seroalbúmina bovina al 1% (PBS/BSA) se ensayó con anti-Vel humano policlonal, diluido 1:4 en PBS/BSA. Se incluyó suero AB como control para unión inespecífica. Después de lavar el anticuerpo primario sin unir, las células se incubaron con fragmento $F(ab')_2$ de conejo anti-IgG humana conjugado a FITC (Dako, Electra-Box Diagnostica AB, Estocolmo) diluido 1:4 (GR) o con fragmento $F(ab')_2$ de cabra AffiniPure anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson Immunoresearch Europe Ltd, Newmarket, Inglaterra) diluido 1:40 (líneas celulares y células transfectadas). Las células se lavaron dos veces como antes y se resuspendieron en 300 µl de PBS. El análisis se realizó con el citrómetro celular FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EE UU) usando software CellQuest™ 3.3 (Becton Dickinson); se analizaron 10.000 sucesos para GR y 50.000 sucesos para células transfectadas. Se usaron anti-CD33 conjugado a PE (Dako, Life Technologies) y 7AAD (BD Pharmingen) como controles de compensación positivos en análisis por FACS tricolor de células K562 transfectadas. Las células viables se seleccionaron para señal doble positiva en los canales de GFP y PE y se asumió que eran Vel positivas.

Se sabe bien en el campo que la expresión del antígeno Vel varía entre los GR de un individuo Vel positivo y otro. La figura 7a muestra la variación entre los GR de donantes de sangre normal que se sabe son homocigotos para *SMIM1* de tipo salvaje. La figura 7b muestra la expresión media del antígeno obtenida por análisis de citometría de flujo de muestras de 37 donantes de sangre (genotipo 16 w/w; 21 w/w). La figura 7c muestra la expresión del antígeno Vel después de la sobreexpresión de *SMIM1* de longitud completa.

Análisis serológico

Se usaron técnicas de aglutinación estándar para la identificación de anti-Vel, fenotipado de GR y ensayos de hemaglutinación/inhibición. Anti-Vel se purificó por afinidad mediante adsorción a y elución de GR Vel positivos. Se prepararon eluatos usando el kit Elu-Kit II (Immucoor Inc., Norcross, EE UU).

Ejemplo 5: Expresión de *SMIM1* en células K562

Plásmidos

La secuencia de ADNc entera (exones 1-4) del gen *SMIM1* se amplificó de donantes de sangre Vel positivos y Vel negativos y se insertó en el vector plásmido positivo para proteína fluorescente verde (GFP) pIRES2-ZsGreen1 por digestión con enzimas de restricción usando EcoR1 y BamH1. Después de la religación, células de *E. coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen) se transformaron con las nuevas construcciones y se

incubaron durante la noche en placas de agar que contenían kanamicina. Se amplificaron colonias por PCR y se secuenciaron para confirmar la presencia y orientación del inserto. Las colonias que contenían la secuencia de tipo salvaje (pEF1 α -LOCwt), la secuencia mutante (pEF1 α -LOCmut) o el vector vacío (pEF1 α -IRES-ZsGreen1) se cultivaron durante la noche en múltiples tubos de 15 ml que contenían 5 ml de medio LB y 5 μ l de kanamicina. Se prepararon minipreps usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, #K0502). Se evaluaron medidas de la concentración y pureza del ADN de plásmido usando el kit Quant-iT™ dsDNS Broad-Range Assay (Invitrogen, Life Technologies), y se volvieron a secuenciar para confirmar la presencia del inserto correcto.

Cultivo celular y transfección

Las células K562 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal (SBF; Gibco) al 10% a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Las células K562 cultivadas se mezclaron con 10 μ g de plásmido que contenía vectores de tipo salvaje, mutante o control y se electroporaron usando el sistema de electroporación Gene Pulser II (BioRad Inc. Carlsbad, CA) y se incubaron durante 48 h antes de ser analizadas por citometría de flujo.

Ejemplo 6: Método para cribar (donantes/receptores de) sangre Vel negativa/negativa

Se han diseñado ensayos para distinguir los alelos de tipo salvaje y mutante. Es importante indicar que los cebadores dados en la tabla 2 no son los únicos cebadores que se pueden usar para los ensayos 1 y 2, sin embargo, es importante que el amplicón contenga la secuencia en la que se produce la delección de 17 pb para obtener especificidad. Ya están en uso tres métodos manuales:

- 1) PCR específica de gen (GSP): se puede amplificar ADN genómico con los cebadores LOCex3f_screen (SEQ ID NO. 22) y LOCex3r_screen (SEQ ID NO. 23) que flanqueaban el exón 3 de *SMIM1*. Se distinguen fácilmente productos de PCR específicos de alelo de 178 pb (tipo salvaje) o 161 pb (mutante) basado en el tamaño mediante electroforesis durante 75 minutos a 165 V en un gel de agarosa al 3% (véase la figura 4).
- 2) PCR-RFLP: se puede amplificar ADN genómico con los cebadores 388588int2f (SEQ ID NO. 15) y 388588int3R2 (SEQ ID NO. 19).

En este ensayo, las bandas amplificadas son de 459 y 442 pb respectivamente, sin embargo, el tamaño del amplicón es arbitrario y se podrían usar otros cebadores específicos de gen que rodean la delección.

Los productos se digirieron con Styl a 37°C durante dos horas. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 3% (véase la figura 2). El sitio de restricción se abolía en la secuencia mutada.

- 3) PCR específica de alelo (ASP): se puede amplificar ADN genómico con los cebadores 388588int2f (SEQ ID NO. 15) (1 pM), 388588int3R2 (SEQ ID NO. 19) y o bien 388588wtex3f (SEQ ID NO. 20) o 388588mutex3f (SEQ ID NO. 21). Se proporcionó una banda de control interno mediante la amplificación de un producto de 460 pb (tipo salvaje) o 443 pb (mutante). Se amplificaron específicamente bandas específicas de alelo de 266 pb (tipo salvaje) o 249 pb (mutante) por sus respectivos cebadores (véase la figura 3). Basado en este principio, cebadores que amplifican el fragmento de *SMIM1* de tipo salvaje de 266 pb (388588int3R2 (SEQ ID NO. 19) y 388588wtex3f (SEQ ID NO. 20)) se han incorporado en un método de cribado de medio rendimiento, aunque manual, para alelos de grupo sanguíneo de alta prevalencia (véase la figura 5). Los individuos Vel-, es decir, mutantes de *SMIM1* homocigotos se identifican por la ausencia de la banda específica de *SMIM1* en presencia de las restantes cinco bandas específicas para otros loci de grupo sanguíneo.

Métodos adicionales útiles incluyen ensayos basados en genotipado semiautomatizados (medio y alto rendimiento) que incorporan fácilmente cribado para Vel en sus plataformas. Esto se logra incorporando una sonda que abarca la secuencia delecionada de modo que el genotipado rutinario da una señal negativa en ausencia de la secuencia de tipo salvaje. Este es el método más sencillo para detectar muestras Vel negativas, sin embargo, software que distingue homocigotos de heterocigotos podría subir el nivel de sofisticación mediante la incorporación de una sonda de tipo salvaje y normal en la tecnología. Las secuencias de sondas que son útiles (y que ya han demostrado especificidad de alelo en el ejemplo 6, método 3, anteriormente) son las secuencias de cebadores 388588wtex3f (SEQ ID NO. 20) y 388588mutex3f (SEQ ID NO. 21).

Ejemplo 7: Integración de los métodos presentes en plataformas de cribado

BLODChip (Progenika Biopharma, SA) es una plataforma de micromatriz que incorpora sondas específicas de alelo (habitualmente basadas en polimorfismos de nucleótido único) que capturan productos de PCR marcados que contienen el alelo de interés. Por ejemplo, una reacción de PCR multiplex amplifica del ADN genómico regiones seleccionadas de diferentes genes de grupos sanguíneos que contienen polimorfismos que definen antígenos. Los productos de PCR se marcan e hibridan a la micromatriz que está impresa con ambas permutaciones en un alelo. El producto de PCR hibridará con la sonda que contiene el SNP específico de alelo en una posición específica. Las reacciones positivas se determinan por un lector laser. Las secuencias de las sondas que se podrían incorporar en tal

plataforma incluirían SEQ ID NO. 20 para la detección del alelo de tipo salvaje de Vel (es decir, Vel+), y SEQ ID NO. 21 para la detección del alelo mutante de Vel (es decir, Vel negativo). Dependiendo de los requisitos del sistema, es decir, cebadores oligonucleotídicos más largos de 18 pares de bases, las sondas se podrían elongar en cualquier extremo con la secuencia consenso sin afectar la especificidad.

5 El kit HEA BeadChip™ (Immucor, Inc.) es una tecnología que emplea bolas a las que sondas oligonucleotídicas específicas de alelo se han unido a bolas de colores. El color determina la firma de cada bola, y tras la producción, se ordenan a una oblea de silicona que es la plataforma de prueba. Como antes, una reacción de PCR multiplex amplifica del ADN genómico regiones seleccionadas de diferentes genes de grupos sanguíneos que contienen polimorfismos que definen antígenos. Estos productos se mezclan con las bolas, y en contraste con lo anterior, la tecnología se basa en la extensión específica de alelo de la hebra de ADN e incorporación del producto de PCR marcado. De nuevo, la delección de 17 pb en *SMIM1* se podría explotar por esta tecnología usando sondas que incorporan SEQ ID NO. 20 o SEQ ID NO. 21 en el sitio de síntesis activa.

15 La tecnología MassARRAY® iPLEX® (Sequenom® GmbH) ha desarrollado una plataforma de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF) para la detección de alelos de grupo sanguíneo específicos. Esta tecnología basa la detección de un alelo específico en la diferencia de masa entre un alelo y su homólogo y se ha mostrado que es muy específica [5]. Es una tecnología flexible que permite la incorporación rápida de alelos deseables. Actualmente, Sequenom® GmbH tiene una plataforma a punto para la detección de alelos de grupo sanguíneo comunes y están buscando expandir la detección de alelos que codifican otros antígenos de grupo sanguíneo clínicamente significativos.

20 Además de las tres plataformas mencionadas anteriormente, la presente divulgación se podría integrar en y hacer uso de cualquier matriz de fase sólida o líquida para el genotipado que se basa en la hibridación específica de alelo, extensión o reconocimiento podría incorporar sondas que incluyen SEQ ID NO. 20 o SEQ ID NO. 21 para la determinación específica del fenotipo Vel positivo y Vel negativo respectivamente.

Ejemplo 8. Caso clínico I

30 Una mujer de 72 años de edad, grupo sanguíneo B, RhD positivo, está programada para la reparación de una arteria carótida con poco riesgo asociado de hemorragia. Se le había transfundido ocho años antes, después de traumatismo ortopédico en otro hospital regional, aunque los detalles no estaban disponibles. En ese momento, se habían detectado anticuerpos irregulares en su plasma y se atribuyeron lo más probable debido a un autoanticuerpo. Debido a la baja probabilidad de que la paciente requiriera sangre, la cirugía se empieza incluso aunque la investigación serológica actual no está completa y como se ha demostrado previamente la presencia de anticuerpos irregulares hacia un antígeno indeterminado. La hemorragia preoperatoria es modesta, pero la paciente padece un infarto de miocardio el día 1 posoperatorio y se inicia una transfusión de sangre con una unidad de eritrocitos compatibles. Después de 50 ml de sangre, la paciente tiene una reacción a la transfusión, con escalofríos y vómitos y la transfusión se para. La investigación serológica extendida demuestra que la paciente tiene un anti-Vel que era la causa de su reacción a la transfusión. La expresión variable conocida del antígeno Vel en eritrocitos y la reactividad relativamente débil del anticuerpo de la paciente *in vitro* contribuyeron a que la paciente recibiera una unidad de sangre Vel positiva. El presente caso clínico ejemplifica la necesidad para los ensayos genéticos de grupo sanguíneo Vel mejorados proporcionados utilizando los métodos de la presente divulgación.

Ejemplo 9: Caso clínico II

Se pidieron dos unidades de GR para una mujer de 44 años de edad con insuficiencia renal y cáncer. Un cribado de anticuerpos pretransfusión reveló que su plasma contenía un anticuerpo irregular reactivo con todos los GR ensayados mediante una prueba de antiglobulina indirecta rutinaria, sin embargo, la reactividad se pudo eliminar una vez que el plasma se calentó a 37°C. Basado en estos resultados, el laboratorio juzgó que el anticuerpo no era clínicamente significativo ("anticuerpo reactivo en frío"), y la paciente se transfundió con 2 unidades de sangre. La paciente murió 8 horas después tras una reacción hemolítica a la transfusión. Una investigación de anticuerpos post-mortem realizada por un laboratorio de referencia demostró que el plasma de la paciente contenía un potente anti-Vel hemolítico que fue la causa de la reacción a la transfusión letal [6]. El presente caso clínico es un ejemplo adicional de la necesidad largamente sentida para pruebas de grupo sanguíneo Vel mejoradas tal como la prueba genética proporcionada por la presente divulgación para evitar consecuencias potencialmente letales de las herramientas y métodos actualmente insatisfactorias disponibles para el fenotipado de Vel e identificación de anti-Vel.

Referencias

60 1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;**16**: 1215.
 65 2. Edvardsson L, Dykes J, Olsson ML, Olofsson T: Clonogenicity, gene expression and phenotype during neutrophil versus erythroid differentiation of cytokine-stimulated CD34+ human marrow cells in vitro. *Br J Haematol*. 2004;**127**: 451-63.

3. Wester ES, Storry JR, Olsson ML: Characterization of Jk(a+(weak)): a new blood group phenotype associated with an altered JK*01 allele. *Transfusion*. 2011; **51**: 380-92.
4. Judd WJ, Johnson ST, Storry JR: *Judd's methods in immunohematology*: aaBB Press, Bethesda, MD, EE UU; 2008.
- 5 5. Gassner C, Meyer S, Frey BM, Vollmert C. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping--the alternative approach. *Transfus Med Rev*. 2013;**27**:2-9.
6. Storry JR, Mallory DM: Misidentification of anti-Vel due to inappropriate use of techniques. *Immunohematology*. 1994;**10**: 83-6.
- 10 7. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, Francis CL, Moulds JM, Moulds JJ, Olsson ML, Poole J, Reid ME, Rouger P, van der Schoot E, Scott M, Smart E, Tani Y, Yu LC, Wendel S, Westhoff C, Yahalom V, Zelinski T: International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. *Vox Sang*. 2011;**101**:77-82.
8. Sandler SG, Beyth Y, Laufer N, Levene C.: Autologous blood transfusions and pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 1979; **53**:62-66.

15

Lista de secuencias

- <110> Storry, Jill R
Jöud, Magnus
20 Nilsson, Björn
Olsson, Martin L
- <120> Métodos y herramientas para la determinación del grupo sanguíneo Vel
- 25 <130> P2985PC00
- <150> SE 1251099-6
<151> 01-10-2012
- 30 <160> 36
- <170> PatentIn Versión 3.5
- <210> 1
35 <211> 3187
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 713 162 T3

cagagacgcg gggacacagg tgaggcgcgc ggggtccggg ctgcggcttc ccggtgcggc 60
 cgcagtgggc aggtgcgact gtgcgcggcc tcgctggctg agaactggcg ggggtggggg 120
 cgtgccctgg actgaccccc accggcctaa cccgcggtgc ggggccaggg ccggaactgc 180
 ccgcccggct ccttgcccgg ctccctgtgg ctgctgggga cccccgacac cagccacttt 240
 cccttcccgg cccttagcaa gatcggttc tccggtcacc tttatttttt taggctcgag 300
 gcgtctgccg cacctcagcc cagcactgc cccgctggga ggtgcgggcc gctggccagg 360
 ccctgaccgc aacctggccc agaggcccca gccctcaggc aaggttctcc gggtaagtgt 420
 ggggccctga ggcgctgtgg ggtgaagagg totatggagg ggcgcctgtg tacctagggc 480
 cttcctgcac tcacaagccc ccaggaggtg ccaggatccg ggagcctccc agggcctgga 540
 ggggagtccc tgatgggttc ctgccccac acctgtgacc atcacatgag tgtggagaga 600
 cgtttactga gcaagtgagg gaggccagcc tcaagggccg gctctggtgg ctgtgcaccg 660
 gggtgacttg ggaacaacgt gttctacgtc agcaagacag gaacccatga tcccagagtt 720
 gaacacactg ggcttgacct ctcccaccgg gaggcccatg gtgggctgct gctgtggact 780
 tggagcctca gcaactcccga gactaatgct gcgtggatgt cgggttgcaa ggcggctgct 840
 gcagctccag cagctccagc catcacgtcg agtctggaag aaggaggtgg ctgctgctgc 900
 tttcacagaa gcaaactctc ccatcccctg ctgcaccctg gctcctggac cccagctggg 960
 tgacttggga aagcaggggt ggtggtatta agcttgtctt acccgggtca tggctgttac 1020
 ctggggctgg cacattgctg ctgggaccag aatgggattc tgcacaccag gcaagagggc 1080
 gtgaacctcg ggtaggcagc tgaccgctcc acatgctccg ggaaaacagc acccatactc 1140
 cagtagaggc tgggcctctc cgggcctgag tgccaggctg cactgagcca gggctcccac 1200

ES 2 713 162 T3

cgaaggcaca ctttatggct ttgagacagc tcottctgcc tctctgggct ttgggggaag 1260
gcagacatgg aagtgccggg agtctcagaa ctgcctgggg cctgagtttc tgagctggct 1320
tcttgccaggg gagtggctgc tgtgccttta ggctctgtg ccgatgacct gggaggaagg 1380
tcagccttcc ccgctggagg gggcccagca aagcctcagc tcctagaagt gaggggcctg 1440
ccattgctg cccgaggacc cactcctgg gggccagatg ctgagagggg aactggggg 1500
cccagcagac cagagagctg accccagtcc cacagcctgg gtgggttgtc aacttctcgt 1560
gccccctcca actcctccac cccacacccc ccttaggtaa ataggaggtc gaaacagagg 1620
ccagagggta aaggaggtgc ttagagtccg ggctggctca ggccggccgg gcagctgtgc 1680
tagtgcttgg agttcctgct cagtccccgt ggtctcctcg cccctctggg cacttgggct 1740
gccaggcacc gagctgagtg ccgagatgca aagatgagtc ccaggtctgc aggagtggga 1800
gcccagcagg gagctggcct tggggccggg cccctcctgc tctgggcagc caccagccc 1860
tacgaccctc ctgtctctgt agggcctccc caaggccttg aatccacccc ggccccgtgc 1920
tcagtgcac atgccccca agccccagcc ctctagagg tgtgggtggg ggaggggctg 1980
caaccacac aggtgagga cacagctgct gccactgcct gggccagcc acgcatcctc 2040
cccagacagg gaccgtcta gctgtaccag ccgctgcccc ggacctgctg ccctgcccc 2100
cccccccctc ccctggccag cctccccaga ggccagaagg cgccttatcg ggcagggtta 2160
aggaggggga cagttatcag gggctgcagc cttagattgg ccacaatgct ctctctctt 2220
gaggggtggca ggctgtcag gctccctgat aaaagcaccg ggaagggag gctcctggag 2280
tgtgctggaa ggaaacactg gcctcccaca tgctgaggt cagggcttgg cctgagatgg 2340
aattctcgtc tggctccatc ctcccggcct gacctgggc aaatgactct accactttgt 2400
gtctaggtca cctgttaagt caggcgacag acccggtagg ggagtcagcc cccgaccctt 2460
agtgccccctc tcctaacagc agcctcagag ggggtcttga ctgccgccct ccatccgctt 2520
gttttacagt gaagccacag cctggccacc tgtcttgatc tccccaccga gaaggccccg 2580
cccctcccgc tgcagccca cagcatgcag cccaggaga gccacgtcca ctatagtagg 2640
tgggaggacg gcagcagggg cggagtcagc ctaggggctg tgtccagcac agaagaggcc 2700
tcacgctgcc gcaggtgagg ggcctgaggg cagcctgcca gccatagcag gctggtgtct 2760
ccctccagag acgctgccc taaccctgc taccggcccc atcaccctcc accccatcct 2820
ggctgggagc ccacgtcca gcagctcagc aaaccgcagc ctttggcctt ccctctggtt 2880
ggctgtgggc ggggagagct tcctcttgac tccagcagag cggccaggcc cctccccctg 2940
accagacca acggccacag tccacttagg gggcccctca tgcggccctg gcctggggct 3000
cacctccagt tggttctcac cccagatct cccagaggct gtgcacgggc aagctgggca 3060
tcgcatgaa ggtgctgggc ggcgtggccc tcttctggat catcttcac ctgggctacc 3120
tcacaggcta ctatgtcac aagtgcaaat aaatgctgcc ccgcatgcac gcggggggct 3180
ggccgca 3187

ES 2 713 162 T3

<210> 2
 <211> 3170
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 cagagacgcg gggacacagg tgaggcgcgc ggggtccggg ctgcggcttc ccggtgcggc 60
 cgcagtgggc aggtgcgact gtgcgcggcc tcgctggctg agaactggcg ggggtggggg 120
 cgtgccctgg actgaccccc accggcctaa cccgcggctg ggggccaggg ccggaactgc 180
 ccgcccggct ccttgcccgg ctccctgtgg ctgctgggga cccccgacac cagccacttt 240
 cccttcccgg cccttagcaa gatcggcttc tccggtcacc tttatTTTTT taggctcgag 300
 gcgtctgccg cacctcagcc cacgacctgc cccgctggga ggtgcggggc gctggccagg 360
 ccctgaccgc aacctggccc agaggcccca gccctcaggc aaggttctcc gggtaagtgt 420
 ggggccctga ggcgctgtgg ggtgaagagg tctatggagg ggcgcctgtg tacctagggc 480
 cttcctgcac tcacaagccc ccaggaggtg ccaggatccg ggagcctccc agggcctgga 540
 ggggagtccc tgatgggttc ctgccccac acctgtgacc atcacatgag tgtggagaga 600
 cgtttactga gcaagtgagg gaggccagcc tcaagggccg gctctggtgg ctgtgcaccg 660
 ggggtgacttg ggaacaacgt gttctacgtc agcaagacag gaacctatga tcccagagtt 720
 gaacacactg ggcttgacct ctcccaccgg gaggcccatg gtgggctgct gctgtggact 780
 tggagcctca gcaactcccga gactaatgct gcgtggatgt cgggttgcaa ggcggctgct 840
 gcagctccag cagctccagc catcacgtcg agtctggaag aaggaggtgg ctgctgctgc 900
 tttcacagaa gcaaactctc ccatcccctg ctgcaccctg gctcctggac cccagctggg 960
 tgacttggga aagcaggggt ggtggtatta agcttgtctt acccggtca tggctgttac 1020
 ctggggctgg cacattgctg ctgggaccag aatgggattc tgcacaccag gcaagagggc 1080
 gtgaacctcg ggtagggcagc tgaccgctcc acatgctccg ggaaaacagc acccactctc 1140
 cagtagaggc tgggcctctc cgggcctgag tgccaggctg cactgagcca gggctccac 1200
 cgaaggcaca ctttatggct ttgagacagc tccttctgcc tctctgggct ttgggggaag 1260
 gcagacatgg aagtgccggg agtctcagaa ctgcctgggg cctgagtttc tgagctggct 1320
 tcttgagggg gagtggctgc tgtgccttta ggctctgtg ccgatgacct gggaggaagg 1380
 tcagccttcc ccgctggagg gggcccagca aagcctcagc tcctagaagt gaggggctg 1440
 ccattgcctg cccgaggacc ccaactcctg gggccagatg ctgagagggg aactggggg 1500

ES 2 713 162 T3

cccagcagac cagagagctg accccagtcc cacagcctgg gtgggttgtc aacttctcgt 1560
 gccccctcca actcctccac cccacacccc ccttaggtaa ataggaggtc gaaacagagg 1620
 ccagagggta aaggaggtgc ttagagtccg ggctggctca ggccggccgg gcagctgtgc 1680
 tagtgcttgg agttcctgct cagtccccgt ggtctcctcg cccctctggg cacttgggct 1740
 gccaggcacc gagctgagtg ccgagatgca aagatgagtc ccaggtctgc aggagttgga 1800
 gcccagcagg gagctggcct tggggccggg cccctcctgc tctgggcagc caccagccc 1860
 tacgaccctc ctgtctctgt agggcctccc caaggccttg aatccacccc ggccccgtgc 1920
 tcagtgcctc atgccccca agccccagcc ctccctagagg tgtgggtggg ggaggggctg 1980
 caaccacac aggtgagga cacagctgct gccactgcct ggggccagcc acgcatcctc 2040
 cccagacagg gaccggtcta gctgtaccag ccgctgcccc ggacctgctg ccctgccccca 2100
 cccccccctc ccctggccag cctccccaga ggccagaagg cgccttatcg ggcagggta 2160
 aggaggggga cagttatcag gggctgcagc ctagattggg ccacaatgtc ctcgtctctt 2220
 gaggggtggca ggctgtcag gctccctgat aaaagcaccg ggaaggagg gctcctggag 2280
 tgtgctggaa ggaaactctg gcctcccaca tgcctgaggt cagggtctgg cctgagatgg 2340
 aattctcgtc tggctccatc ctcccggcct gaccctgggc aatgactct accactttgt 2400
 gtctaggtca cctgttaagt caggcgacag acccgggtgag ggagtcagcc cccgaccctt 2460
 agtgccccctc tcctaacagc agcctcagag ggggtcttga ctgccgccct ccacccgctt 2520
 gttttacagt gaagccacag cctggccacc tgtcttgatc tccccaccga gaaggccccg 2580
 cccctcccgc tgcagccca cagcatgcag cccagggaga gccacgtcca ctatagtagg 2640
 tgggaggacg gcagcaggga cggagtccag cacagaagag gcctcacgct gccgcaggtg 2700
 aggggcctga gggcagcctg ccagccatag caggctgggtg tctccctcca gagacgcctg 2760
 ccctaaccctc tgctaccggc cccatcacc cccacccat cctggtggtg agcccacggt 2820
 ccagcagctc agcaaaccgc agcctttggc cttccctctg gttggctgtg ggcggggaga 2880
 gcttccctc aactccagca gagcgcccag gccctcccc ctgaccaga ccaacggcca 2940
 cagtccactt agggggcccc tcatgcggcc ctggcctggg gctcacctcc agttggttct 3000
 cccccagga tctcccagag gctgtgcag ggcaagctgg gcatcgccat gaaggtgctg 3060
 ggcggcgtgg ccctcttctg gatcatcttc atcctgggct acctcacag ctactatgtg 3120
 cacaagtgca aataaatgct gccccgatg cacgcggggg gctggccgca 3170

<210> 3
 <211> 530
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

ES 2 713 162 T3

```

ggtgagggcgc gcgggggtccg ggctgaggct tcccgggtgcg gccgcagtgg gcaggctcga      60
ggcgtctgcc gcacctcagc ccacgacctg ccccgtggg aggtgcgggc cgctggccag      120
gccctgaccg caacctggcc cagaggcccc agccctcagg caaggttctc cggatgaagcc      180
acagcctggc cacctgtctt gatctcccca ccgagaaggc cccgcccctc ccgctgcagc      240
cccacagcat gcagccccag gagagccacg tccactatag taggtgggag gacggcagca      300
gggacggagt cagcctaggg gctgtgtcca gcacagaaga ggcctcacgc tgccgcagga      360
tctcccagag gctgtgcacg ggcaagctgg gcatcgccat gaaggtgctg ggcggcgtgg      420
cctctctctg gatcatcttc atcctgggct acctcacagg ctactatgtg cacaagtgca      480
aataaatgct gcccgcgatg cacgcggggg gctggcccga aaaaaaaaaa      530

```

5 <210> 4
 <211> 513
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

```

<400> 4
ggtgagggcgc gcgggggtccg ggctgaggct tcccgggtgcg gccgcagtgg gcaggctcga      60
ggcgtctgcc gcacctcagc ccacgacctg ccccgtggg aggtgcgggc cgctggccag      120
gccctgaccg caacctggcc cagaggcccc agccctcagg caaggttctc cggatgaagcc      180
acagcctggc cacctgtctt gatctcccca ccgagaaggc cccgcccctc ccgctgcagc      240
cccacagcat gcagccccag gagagccacg tccactatag taggtgggag gacggcagca      300
gggacggagt ccagcacaga agaggcctca cgctgccgca ggatctccca gaggctgtgc      360
acgggcaagc tgggcatcgc catgaagggtg ctgggcggcg tggccctctt ctggatcatc      420
ttcatcctgg gctacctcac aggctactat gtgcacaagt gcaaataaat gctgccccgc      480
atgcacgcgg ggggctggcc gcaaaaaaaaa aaa      513

```

10 <210> 5
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 5
 Met Gln Pro Gln Glu Ser His Val His Tyr Ser Arg Trp Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Asp Gly Val Ser Leu Gly Ala Val Ser Ser Thr Glu Glu Ala
 20 25 30
 Ser Arg Cys Arg Arg Ile Ser Gln Arg Leu Cys Thr Gly Lys Leu Gly
 35 40 45

ES 2 713 162 T3

Ile Ala Met Lys Val Leu Gly Gly Val Ala Leu Phe Trp Ile Ile Phe
 50 55 60

Ile Leu Gly Tyr Leu Thr Gly Tyr Tyr Val His Lys Cys Lys
 65 70 75

5 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6
 Met Gln Pro Gln Glu Ser His Val His Tyr Ser Arg Trp Glu Asp
 1 5 10 15

15 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 7
 Ser Arg Trp Glu Asp Gly Ser Arg Asp Gly Val Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15

20 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 8
 Gly Val Ser Leu Gly Ala Val Ser Ser Thr Glu Glu Ala Ser Arg
 1 5 10 15

30 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 9
 Glu Ala Ser Arg Cys Arg Arg Ile Ser Gln Arg Leu Cys Thr Gly
 1 5 10 15

40 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 10
 Cys Pro Glu Ser Trp His Ser Tyr Met Arg Val Gln His Glu Gln Asp
 1 5 10 15

45 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador de ADNc 388588cDNAf

<400> 11
 cgcacctcag cccacgac

18

<210> 12

ES 2 713 162 T3

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

5 <220>
 <223> cebador de ADNc 388588cDNAr

<400> 12
tccaggcctg tgctctcac 19

10 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador de PCR Vel negativoF

<400> 13
gccgaattcg ccaccatgca gccccaggag agc 33

20 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador de PCR Vel negativoR2

30 <400> 14
gccggatccc ccttatttgc acttgtgac ata 33

<210> 15
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador de PCR 388588int2f

40 <400> 15
tctcctaaca gcagcctcag 20

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

<220>
 50 <223> cebador de PCR 388588ex4r

<400> 16
tgtctccagg cctgtgctc 19

<210> 17
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador de PCR 388588int3f

<400> 17
cagctcagca aaccgcagc 19

ES 2 713 162 T3

	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR 388588int3r	
10	<400> 18	
	ggcgctctgc tggagtca	18
	<210> 19	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR 388588int3r2	
20	<400> 19	
	ctgggcgctc tgctggag	18
	<210> 20	
25	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador de PCR específica de alelo – 388588wtex3f	
	<400> 20	
	cggagtcagc ctaggggc	18
35	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de PCR específica de alelo – 388588mutex3f	
	<400> 21	
	ggacggagtc cagcacag	18
45	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de PCR LOCex3f_screen	
	<400> 22	
55	acagcctggc cacctgtctt g	21
	<210> 23	
	<211> 17	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR LOCex3r_screen	
65	<400> 23	

	ctgcggcagc gtgaggc	17
5	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de RACE Vel 59F	
	<400> 24 ggccgcagtg ggcaggctc	19
15	<210> 25 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de RACE Vel 176F	
	<400> 25 ctcaggcaag gttctccggt ga	22
25	<210> 26 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador de RACE Vel 280F	
35	<400> 26 aggagagcca cgtccactat ag	22
40	<210> 27 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de RACE Vel 332R	
	<400> 27 gcagcgtgag gcctcttctg tg	22
50	<210> 28 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de RACE Vel 355R	
	<400> 28 cacagcctct gggagatcct gc	22
60	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de RACE Vel 376R	

ES 2 713 162 T3

	<400> 29		
	gatgccccagc ttgcccgtgc		20
5	<210> 30 <211> 185 <212> ADN <213> Homo sapiens		
10	<220> <221> característica_misc <222> (1)..(185) <223> exón 3 de SMIM1		
	<400> 30		
	tgaagccaca gcctggccac ctgtcttgat ctccccaccg agaaggcccc gccctccccg		60
	ctgcagcccc acagcatgca gccccaggag agccacgtcc actatagtag gtgggaggac		120
	ggcagcaggg acggagtcag cctaggggct gtgtccagca cagaagaggc ctcacgctgc		180
15	cgcag		185
20	<210> 31 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens		
25	<220> <221> característica_misc <222> (1)..(17) <223> Secuencia de la delección de 17 pb		
	<400> 31		
	agcctagggg ctgtgtc		17
30	<210> 32 <211> 3778 <212> ADN <213> Homo sapiens		
35	<220> <221> característica_misc <222> (1)..(3778) <223> Fenotipo SMIM1 mutante extendido al posterior codón de terminación		
40	<400> 32		

ES 2 713 162 T3

ggtgaggcgc gcgggggtccg ggctgctggc tcccgggtgcg gccgcagtgg gcaggtgcga 60
 ctgtgctcgg cctcgtctggc tgagaactgg cgggggtggg ggctgcccct ggactgaccc 120
 ccaccggcct aaccgcgggt gcggggccag ggccggaact gcccgcccgg ctccttgccc 180
 ggctccttgt ggctgctggg gacccccgac accagccact ttcccttccc ggcccttagc 240
 aagatcggct tctccggcct cctttatattt tttaggctcg aggcgtctgc cgcacctcag 300
 cccacgacct gccccgctgg gaggtgctgg cctgctggcca ggccctgacc gcaacctggc 360
 ccagaggccc cagccctcag gcaaggctct ccgggtaagt gtggggccct gaggcgctgt 420
 ggggtgaaga ggtctatgga ggggctcctg tgtacctagg gccttcctgc actcacaagc 480
 ccccaggagg tgccaggatc cgggagcctc ccagggctc gaggggagtc cctgatgggt 540
 tcctgccgcc acacctgtga ccatcacatg agtgtggaga gacgtttact gagcaagtga 600
 gggaggccag cctcaagggc cggctctggg ggctgtgcac cggggtgact tgggaacaac 660
 gtgttctacg tcagcaagac aggaacccat gatcccagag ttgaacacac tgggcttgac 720
 ccctcccacc gggaggccca tgggtgggctg ctgctgtgga cttggagcct cagcactccc 780
 gagactaatg ctgctgggat gtcgggttgc aaggcggctg ctgcagctcc agcagctcca 840
 gccatcacgt cgagtctgga agaaggagggt ggctgctgct gctttcacag aagcaaactc 900
 tcccatcccc tgctgcaccc tggctcctgg accccagctg ggtgacttgg gaaagcaggg 960
 gtggtggtat taagcttctc ttaccgggt catggctgtt acctggggct ggcacattgc 1020
 tgctgggacc agaatgggat tctgcacacc aggcaagagg gcgtgaacct cgggtaggca 1080
 gctgaccgct ccacatgctc cgggaaaaca gcaccatac tccagtagag gctgggcctc 1140
 tccgggcctg agtgccaggc tgcaactgagc cagggtccc accgaaggca cactttatgg 1200

ES 2 713 162 T3

ctttgagaca gctccttctg cctctctggg ctttggggga aggcagacat ggaagtgccg 1260
 ggagtctcag aactgcctgg ggctgagtt tctgagctgg cttcttgagcag gggagtggct 1320
 gctgtgcctt taggcctctg tgccgatgac ctgggaggaa ggtcagcctt ccccgctgga 1380
 gggggcccag caaagcctca gtcctagaa gtgaggggcc tgccattgcc tgcccagga 1440
 cccactcct gggggccaga tgctgagagg ggacactggg ggcccagcag accagagagc 1500
 tgaccccagt cccacagcct gggtaggttg tcaacttctc gtgccccctc caactcctcc 1560
 acccccacac ccccttaggt aaataggagg tcgaaacaga ggccagaggg taaaggaggt 1620
 gcttagagtc cgggctggct caggccggcc gggcagctgt gctagtgctt ggagttcctg 1680
 ctcagtcccc gtggtctcct cgccccctg ggcaacttggg ctgccaggca ccgagctgag 1740
 tgccgagatg caaagatgag tcccaggtct gcaggagttg gagcccagca gggagctggc 1800
 cttggggccg ggccccctc gctctgggca gccaccacgc cctacgacct tctgtctct 1860
 gtagggcctc cccaaggcct tgaatccacc ccggccccgt gctcagtgca tcatgcccc 1920
 caagccccag ccctcctaga ggtgtgggtg ggggaggggc tgcaaccac acaggctgag 1980
 gacacagctg ctgccactgc ctggggccag ccacgcatcc tccccagaca gggaccggtc 2040
 tagctgtacc agccgctgcc ccggacctgc tgccctgccc ccccccccc tccctggcc 2100
 agcctcccc aaggccagaa ggcgccttat cgggcagggt taaggagggg gacagttatc 2160
 aggggctgca gcctagattg ggccacaatg tctctgtctc ttgaggggtg caggctgtgc 2220
 aggctccctg ataaaagcac cggggaaggg aggtcctctg agtgtgctgg aaggaaacac 2280
 tggcctcca catgcctgag gtcagggtt ggccctgagat ggaattctcg cttggtcca 2340
 tctcccggc ctgaccctgg gcaaatgact ctaccacttt gtgtctaggt cacctgttaa 2400
 gtcaggcgac agaccgggtg agggagtcag cccccgacct ttagtgcccc tctcctaaca 2460
 gcagcctcag agggggtctt gactgcccgc ctccatccgc ttgttttaca gtgaagccac 2520
 agcctggcca cctgtcttga tctccccacc gagaaggccc cgccccctcc gctgcagccc 2580
 cacagcatgc agccccagga gagccaagtc cactatagta ggtgggagga cggcagcagg 2640
 gacggagtcc agcacagaag aggcctcacg ctgccgagg tgaggggcct gagggcagcc 2700
 tgccagccat agcaggctgg tgtctccctc cagagacgcc tgccctaacc cctgctaccg 2760
 gccccatcac cctccacccc atcctggctg ggagcccacg gtccagcagc tcagcaaacc 2820
 gcagcctttg gccttccctc tggttggctg tgggagggga gagcttctc tcaactccag 2880
 cagagcggcc agggccctcc ccctgaccca gaccaacggc cacagtccac ttagggggcc 2940
 cctcatgcgg ccctggcctg gggctcacct ccagttggtt ctacccccag gatctccag 3000
 aggctgtgca cgggcaagct gggcatgcc atgaaggtgc tgggaggcgt ggccctctc 3060

ES 2 713 162 T3

tggatcatct tcatcctggg ctacctcaca ggctactatg tgcacaagtg caaataaatg 3120
ctgccccgca tgcacgcggg gggctggcgg cacacgtgag agcacaggcc tggagacaca 3180
cccttgttac acatggaccc cccacacagac acggaccctg cggcacacac agcgcacagg 3240
gcacacgcgc tggcagccag gcacacgaag acaccagggtg cacagctgtc atcggcccca 3300
cacggggggc cacaacaccc tggcacacag cccttcaaag gacctacaaa cagctgggca 3360
cacgtggctg ggaggcctgg gccacgcctc agcaggagct gcaggacaca cccaggctgg 3420
gccctgcggc ctggagcccc cagctacagc ctctctctc ccagggccca gcccttccc 3480
ttgtgaaggc caggatgagg ggttccttca gcggacaaac cgagcccacc tccttggcag 3540
ccccccgggg tgggatoctc ccggctgctt tctctcgtgg gagcagtgtg cagagctgtg 3600
tggccctggg caggccccctg tctctctctg gcctttctga ctcttggtt tgtaagggtg 3660
gctatgtgtc ccccgccctt gtctcagatg caccatatct tccttagtaa gtgggcacag 3720
ttcttctag gcagcccacc acgcgcagag gctgggtgtg tcctcttgg gcccgggc 3778

<210> 33
<211> 3195
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> característica_misc
<222> (1)..(3195)
<223> SMIM1 var 1 (chr1:3691980 A/G)

<400> 33
ggtgaggcgc gcgggggtccg ggctgcggct tcccgggtgcg gccgcagtgg gcagggtgcga 60
ctgtgcgcgg cctcgtctggc tgagaactgg cgggggtggg ggcgtgccct ggactgaccc 120
ccaccggcct aaccgcgggt gcggggccag ggccggaact gcccgcccgg ctcttggccc 180
ggctccttgt ggctgctggg gacccccgac accagccact ttcccttccc ggcccttagc 240
aagatcggct tctccgggtca cctttatattt tttaggctcg aggcgtctgc cgcacctcag 300
cccacgacct gccccgctgg gaggtgcggg ccgctggcca ggccctgacc gcaacctggc 360
ccagaggccc cagccctcag gcaaggttct ccgggtaagt gtggggccct gaggcgctgt 420
gggggtgaaga ggtctatgga ggggcgcctg tgtacctagg gccttctctgc actcacaagc 480
cccaggagg tgccaggatc cgggagcctc ccagggcctg gaggggagtc cctgatgggt 540
tcttgccgcc acacctgtga ccatcacatg agtgtggaga gacgtttact gagcaagtga 600
gggaggccag cctcaagggc cggctctggg ggctgtgcac cgggggtgact tgggaacaac 660
gtgttctacg tcagcaagac aggaacccat gatcccagag ttgaacacac tgggcttgac 720
ccctcccacc gggaggccca tgggtggctg ctgctgtgga ottggagcct cagcaactccc 780

ES 2 713 162 T3

gagactaatg ctgcgtggat gtcgggttgc aaggcggctg ctgcagctcc agcagctcca 840
gccatcacgt cgagtctgga agaaggaggt ggctgctgct gctttcacag aagcaaactc 900
tcccatcccc tgctgcaccc tggctcctgg accccagctg ggtgacttgg gaaagcaggg 960
gtggtggtat taagcttgtc ttaccgggt catggctgtt acctggggct ggcacattgc 1020
tgctgggacc agaatgggat tctgcacacc aggcaagagg gcgtgaacct cgggtaggca 1080
gctgaccgct ccacatgctc cgggaaaaca gcaccatac tccagtagag gctgggcctc 1140
tccgggcctg agtgccaggc tgactgagc cagggtccc accgaaggca cactttatgg 1200
ctttgagaca gctccttctg cctctctggg ctttggggga aggcagacat ggaagtgccg 1260
ggagtctcag aactgcctgg ggcctgagtt tctgagctgg cttcttgca gggagtggct 1320
gctgtgcctt taggcctctg tgccgatgac ctgggaggaa ggtcagcctt ccccgctgga 1380
gggggcccag caaagcctca gtcctagaa gtgaggggcc tgccattgcc tgcccagga 1440
ccccactcct gggggccaga tgctgagagg ggacactggg ggcccagcag accagagagc 1500
tgaccccagt cccacagcct gggtggttg tcaacttctc gtgccccctc caactcctcc 1560
acccccacac ccccttaggt aatagaggg tcgaaacaga ggccagaggg taaaggaggt 1620
gcttagagtc cgggctggct caggccggcc gggcagctgt gctagtgctt ggagttcctg 1680
ctcagtcccc gtggtctcct cgcccctctg ggcacttggg ctgccaggca ccgagctgag 1740
tgccgagatg caaagatgag tcccaggtct gcaggagttg gagcccagca gggagctggc 1800
cttggggccg ggcccctcct gctctgggca gccaccagc octacgacct tctgtctct 1860
gtagggcctc cccaaggcct tgaatccacc cgggccccgt gctcagtgca tcatgcccc 1920
caagccccag ccctcctaga ggtgtgggtg ggggaggggc tgcaaccac acaggctgag 1980
gacacagctg ctgccactgc ctggggccag ccacgcatcc tcccagaca gggaccggtc 2040
tagctgtacc agccgctgcc ccggacctgc tgccctgccc cccccccc tcccctggcc 2100
agcctccca gaggccagaa ggcgccttat cgggcagggt taaggagggg gacagttatc 2160
aggggctgca gcctagattg gcccacaatg tcctcgtctc ttgaggggtg caggctgtgc 2220
aggctccctg ataaaagcac cggggaaggg aggctcctgg agtgtgctgg aaggaaacac 2280
tggcctcca catgcctgag gtcagggtt ggcctgagat ggaattctcg cttggtccca 2340
tcctcccggc ctgaccctgg gcaaatgact ctaccacttt gtgtctaggt cacctgttaa 2400
gtcagggcag agaccgggtg agggagtcag cccccgacct ttagtgcccc tctcctaaca 2460
gcagcctcag agggggtctt gactgccgcc ctccatccgc ttgttttaca gtgaagccac 2520
agcctggcca cctgtcttga tctccccacc gagaaggccc cgcccctccc gctgcagccc 2580
cacagcatgc agccccagga gagccacgtc cactatagta ggtgggagaa cggcagcagg 2640
gacggagtca gcctaggggc tgtgtccagc acagaagagg cctcacgctg ccgcaggtga 2700

ES 2 713 162 T3

ggggcctgag ggcagcctgc cagccatagc aggctggtgt ctccctccag agacgcctgc 2760
 cctaaccct gctaccggcc ccatcaccct ccaccccatc ctggctggga gcccacggtc 2820
 cagcagctca gcaaaccgca gcctttggcc ttccctctgg ttggctgtgg gcggggagag 2880
 cttcctcttg actccagcag agcgcccagg ccctccccc tgaccagac caacggccac 2940
 agtccactta gggggccct catgcgccc tggcctgggg ctcacctca gttggttctc 3000
 accccaggat ctccagagg ctgtgcacgg gcaagctggg catcgccatg aagtgctgg 3060
 gcggcgtggc cctctctgg atcatctca tctgggcta cctcacaggc tactatgtgc 3120
 acaagtcaa ataaatgctg ccccgcatgc acgcgggggg ctggccgcac acgtgagagc 3180
 acaggcctgg agaca 3195

<210> 34
 <211> 3195
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(3195)
 <223> SMIM1 var 2 (chr1:3691980 A/G)

10

<400> 34
 ggtgaggcgc ggggggtccg ggctgcccgt tcccggtgcg gccgcagtgg gcaggtgcga 60
 ctgtgcgcgg cctcgtctgg tgagaactgg cgggggtggg ggcgtgccct ggactgacct 120
 ccaccggcct aaccgcggt gcggggccag ggccggaact gcccgcccgg ctccttgccc 180
 ggctccttgt ggctgctggg gacccccgac accagccaact ttcccttccc ggcccttagc 240
 aagatcggct tctccggtca cctttatattt tttaggctcg aggcgtctgc cgcacctcag 300
 cccacgacct gccccgctgg gaggtgcggg ccgctggcca ggccctgacc gcaacctggc 360
 ccagaggccc cagccctcag gcaaggttct ccgggtaagt gtggggccct gaggcgctgt 420
 ggggtgaaga ggtctatgga ggggcgcctg tgtacctagg gccttcctgc actcacaagc 480
 ccccaggagg tgccaggatc cgggagcctc ccagggcctg gaggggagtc cctgatgggt 540
 tcctgccgcc acacctgtga ccatcacatg agtgtggaga gacgtttact gagcaagtga 600
 gggaggccag cctcaagggc cggctctggg ggctgtgcac cggggtgact tgggaacaac 660
 gtgttctacg tcagcaagac aggaacccat gatcccagag ttgaacacac tgggcttgac 720
 ccctcccacc gggaggccca tgggtgggctg ctgctgtgga cttggagcct cagcactccc 780
 gagactaatg ctgctgggat gtcgggttgc aaggcggctg ctgcagctcc agcagctcca 840
 gccatcacgt cgagtctgga agaaggaggt ggctgctgct gctttcacag aagcaaactc 900
 tcccatcccc tgctgcacc tggctcctgg accccagctg ggtgacttgg gaaagcaggg 960

ES 2 713 162 T3

gtggtggtat	taagcttgtc	ttaccocgggt	catggctggt	acctggggct	ggcacattgc	1020
tgctgggacc	agaatgggat	tctgcacacc	aggcaagagg	gcgtgaacct	cgggtaggca	1080
gctgaccgct	ccacatgctc	cgggaaaaca	gcaccatac	tccagtagag	gctgggcctc	1140
tccgggcctg	agtgccaggc	tgactgagc	cagggtccc	accgaaggca	cactttatgg	1200
ctttgagaca	gctcctctg	cctctctggg	ctttggggga	aggcagacat	ggaagtgccg	1260
ggagtctcag	aactgcctgg	ggcctgagtt	tctgagctgg	cttcttgag	gggagtggct	1320
gctgtgcctt	taggcctctg	tgccgatgac	ctgggaggaa	ggtcagcctt	ccccgctgga	1380
gggggcccag	caaagcctca	gctcctagaa	gtgaggggcc	tgccattgcc	tgcccaggga	1440
ccccactcct	ggggccaga	tgctgagagg	ggacactggg	ggcccagcag	accagagagc	1500
tgaccccagt	cccacagcct	gggtgggttg	tcaacttctc	gtgccccctc	caactcctcc	1560
acccccacac	ccccttaggt	aaataggagg	tcgaaacaga	ggccagaggg	taaaggaggt	1620
gcttagagtc	cgggctggct	caggccggcc	gggcagctgt	gctagtgctt	ggagttcctg	1680
ctcagtcccc	gtggtctcct	cgccccctctg	ggcacttggg	ctgccaggca	ccgagctgag	1740
tgccgagatg	caaagatgag	tcccaggtct	gcaggagttg	gagcccagca	gggagctggc	1800
cttggggccg	ggcccctcct	gctctgggca	gccaccagc	cctacgacct	tctgtctct	1860
gtagggcctc	ccaaggcct	tgaatccacc	ccggccccgt	gctcagtgca	tcatgcccc	1920
caagccccag	ccctcctaga	ggtgtgggtg	ggggaggggc	tgcaaccac	acaggctgag	1980
gacacagctg	ctgccactgc	ctggggccag	ccacgcatcc	tccccagaca	gggaccggtc	2040
tagctgtacc	agccgctgoc	ccggacctgc	tgccctgccc	cacccccccc	tcccctggcc	2100
agcctcccca	gaggccagaa	ggcgccttat	cgggcagggt	taaggagggg	gacagttatc	2160
aggggctgca	gcctagattg	ggccacaatg	tctctgtctc	ttgaggggtg	caggctgtgc	2220
aggctccctg	ataaaagcac	cggggaaggg	aggctcctgg	agtgtgctgg	aaggaaacac	2280
tggcctccca	catgcctgag	gtcagggtct	ggcctgagat	ggaattctcg	cttggctcca	2340
tcctccgggc	ctgaccctgg	gcaaatgact	ctaccacttt	gtgtctaggt	cacctgttaa	2400
gtcaggcgac	agaccgggtg	agggagtcag	ccccgacct	ttagtcccc	tctcctaaca	2460
gcagcctcag	aggggtctt	gactgccgcc	ctccatccgc	ttgttttaca	gtgaagccac	2520
agcctggcca	cctgtcttga	tctccccacc	gagaaggccc	cgccccctcc	gctgcagccc	2580
cacagcatgc	agccccagga	gagccacgtc	cactatagta	ggtgggagga	cggcagcagg	2640
gacggagtca	gcctaggggc	tgtgtccagc	acagaagagg	cctcacgctg	ccgcaggtga	2700
ggggcctgag	ggcagcctgc	cagccatagc	aggctggtgt	ctccctccag	agacgcctgc	2760
cctaaccct	gctaccggcc	ccatcacct	ccaccctatc	ctggctggga	gcccacggtc	2820

ES 2 713 162 T3

	cagcagctca gcaaaccgca gcctttggcc ttccctctgg ttggctgtgg gcggggagag	2880
	cttcctcttg actccagcag agcgcccagg cccctcccc tgacctagac caacggccac	2940
	agtccactta gggggcccct catgcggccc tggcctgggg ctcacctcca gttggttctc	3000
	accccaggat ctcccagagg ctgtgcacgg gcaagctggg catcgccatg aagggtctgg	3060
	gcgggcgtggc cctctttctg atcatcttca tcttgggcta cctcacaggc tactatatgc	3120
	acaagtgcaa ataaatgctg ccccgcatgc acgcgggggg ctggccgcac acgtgagagc	3180
	acaggcctgg agaca	3195
	<210> 35	
	<211> 497	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> característica_misc	
10	<222> (1)..(497)	
	<223> ADNc de variante de SMIM1 (transcrito según RACE 5' y 3' en sangre)	
	<400> 35	
	cagagacgcg gggacacagg ctgagggcgt ctgccgcacc tcagcccacg acctgccccg	60
	ctgggaggtg cgggcccgtg gccaggccct gaccgcaacc tggcccagag gccccagccc	120
	tcaggcaagg ttctccggtg aagccacagc ctggccacct gtcttgatct ccccaccgag	180
	aaggccccgc cctcccgtg gcagccccac agcatgcagc cccaggagag ccacgtccac	240
	tatagtaggt gggaggacgg cagcaggac ggagtcagcc taggggctgt gtccagcaca	300
	gaagaggcct cacgctgccg caggatctcc cagaggctgt gcacgggcaa gctgggcatc	360
	gccatgaagg tgctgggcgg cgtggccctc ttctggatca tcttcatcct gggctacctc	420
	acaggctact atgtgcacaa gtgcaaataa atgctgcccc gcatgcacgc ggggggctgg	480
	ccgcaaaaaa aaaaaaa	497
15	<210> 36	
	<211> 480	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (1)..(497)	
	<223> ADNc de variante de SMIM1 (transcrito según RACE 5' y 3' en sangre; delección de 17 pb)	
25	<400> 36	
	cagagacgcg gggacacagg ctgagggcgt ctgccgcacc tcagcccacg acctgccccg	60
	ctgggaggtg cgggcccgtg gccaggccct gaccgcaacc tggcccagag gccccagccc	120

ES 2 713 162 T3

tcaggcaagg	ttctccggtg	aagccacagc	ctggccacct	gtcttgatct	ccccaccgag	180
aaggccccgc	ccctcccgct	gcagccccac	agcatgcagc	cccaggagag	ccacgtccac	240
tatagtaggt	gggaggacgg	cagcagggac	ggagtccagc	acagaagagg	cctcacgctg	300
ccgcaggatc	tcccagaggc	tgtgcacggg	caagctgggc	atcgccatga	aggtgctggg	360
cggcgtggcc	ctcttctgga	tcatcttcat	cctgggctac	ctcacaggct	actatgtgca	420
caagtgcaaa	taaattgctgc	cccgcattgca	cgcggggggc	tggccgcaaa	aaaaaaaaaa	480

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificar el fenotipo Vel de un individuo, dicho método comprende distinguir entre fenotipos Vel positivo y Vel negativo analizando en una muestra biológica de dicho individuo la composición del gen *SMIM1*,
en donde al menos un gen *SMIM1* intacto es indicativo de un fenotipo Vel positivo, y
en donde un gen *SMIM1* que comprende una mutación que produce expresión abolida de una proteína Vel es indicativo de un fenotipo Vel negativo.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la mutación es una delección.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la mutación es una delección de SEQ ID NO: 31, o un fragmento o variante de la misma en donde dicho fragmento comprende al menos 12 nucleótidos consecutivos de dicha SEQ ID NO: 31, y en donde en dicha variante, no más de 5 nucleótidos se han alterado a 5 nucleótidos diferentes.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición del gen *SMIM1* se determina analizando al menos un fragmento de:
 - a) un gen *SMIM1*, y/o
 - b) un transcrito de un gen *SMIM1*, y/o
 - c) un ADNc derivado de un gen *SMIM1*, y/o
 - d) un polinucleótido que es complementario a cualquiera de a) a c).
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende las etapas de:
 - a) una muestra biológica que se ha proporcionado
 - b) amplificar al menos un fragmento de:
 - (i) un gen *SMIM1*, con la condición de que un fragmento comprenda al menos los residuos de nucleótidos 2658 a 2667 (ggacggagtc) y los residuos de nucleótidos 2685 a 2694 (cagcacagaa) de SEQ ID NO: 1 de un gen *SMIM1*
 - (ii) un transcrito de un gen *SMIM1*, con la condición de que un fragmento comprenda al menos los residuos de nucleótidos del transcrito de gen correspondiente a los residuos de nucleótidos 2658 a 2667 (ggacggagtc) y los residuos de nucleótidos 2685 a 2694 (cagcacagaa) de SEQ ID NO: 1 del que deriva el transcrito del gen, o
 - (iii) un ADNc derivado de un gen *SMIM1*, con la condición de que un fragmento comprenda al menos los residuos de nucleótidos del ADNc correspondientes a los residuos de nucleótidos 2658 a 2667 (ggacggagtc) y los residuos de nucleótidos 2685 a 2694 (cagcacagaa) de SEQ ID NO: 1 del que deriva el ADNc, o
 - (iv) un polinucleótido que es complementario a cualquiera de (i) a (iii),
 - c) obtener un amplicón,
 - d) analizar la longitud del amplicón, y
 - e) distinguir entre amplicones que se diferencian en longitud en aproximadamente 17 pb,

en donde amplicones que son aproximadamente 17 pb más cortos que un control Vel positivo es indicativo de un fenotipo Vel negativo, y
en donde amplicones que son aproximadamente 17 pb más largos que un control Vel negativo es indicativo de un fenotipo Vel positivo.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el gen *SMIM1* comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una variante de secuencia de la misma en donde la variante de secuencia es al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%, tal como al menos el 99,1, al menos el 99,9%, tal como al menos el 100% idéntica a SEQ ID NO. 1 o una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO. 1.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método es para la identificación de sangre Vel negativa y/o Vel positiva.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende las etapas de:
 - a) una muestra biológica que se ha proporcionado
 - b) amplificar un polinucleótido de *SMIM1* aplicando un primer y un segundo cebador oligonucleotídico, obteniendo de esta manera un amplicón,
 - c) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de *SMIM1* obtenido en la etapa b), y

- d) comparar la longitud del amplicón, a al menos un control Vel positivo, en donde una longitud que se diferencia del control Vel positivo indica que la muestra es un sujeto Vel negativo.
- 5 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende las etapas de:
- a) una muestra biológica que se ha proporcionado y que contiene ADN genómico,
b) poner en contacto la muestra que comprende ADN genómico con un primer y un segundo cebador oligonucleotídico,
10 en donde dicho primer cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia identificada como SEQ ID NO. 1 y localizados antes (5') de la posición del nucleótido 2667 de SEQ ID NO. 1, y
en donde dicho segundo cebador comprende al menos 10 nucleótidos que son complementarios a al menos 10 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 1 y localizados después (3') de la posición del nucleótido 2649 de SEQ ID NO. 1,
15 con la condición de que dicho primer y dicho segundo cebador no se seleccionen ambos de una secuencia que sea complementaria a SEQ ID NO. 31;
c) obtener un amplicón;
d) realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo del amplicón de la etapa iii).
- 20 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en raspados celulares, un tejido de biopsia o un fluido corporal.
11. El método según la reivindicación 10, en donde el fluido corporal se selecciona de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, semen, esputo, orina y heces.
- 25 12. Uso de un oligonucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, en el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

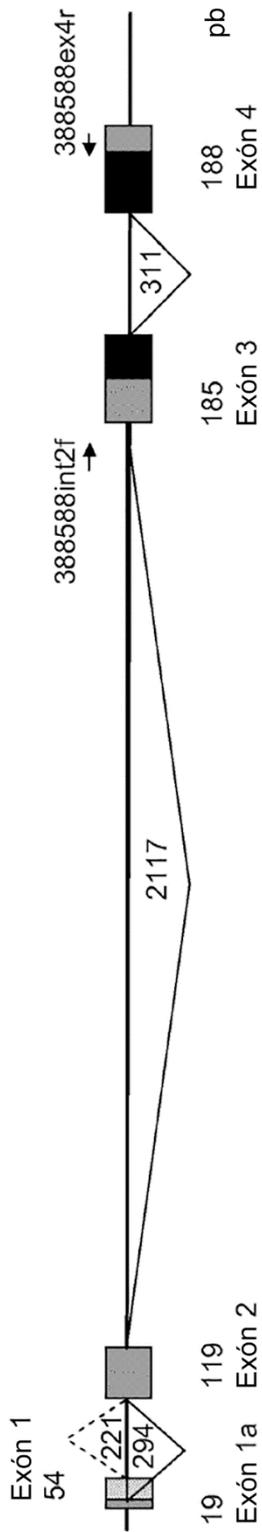


Fig. 1

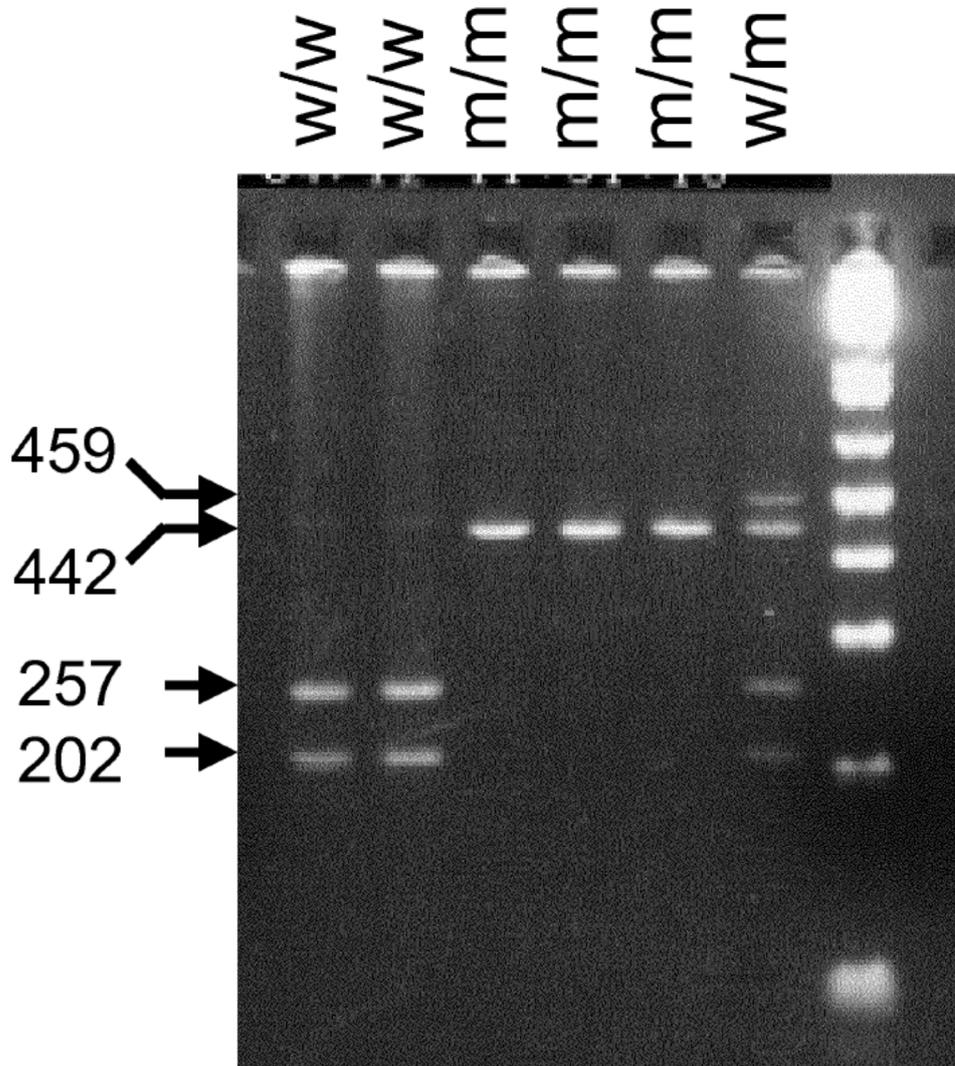


Fig. 2

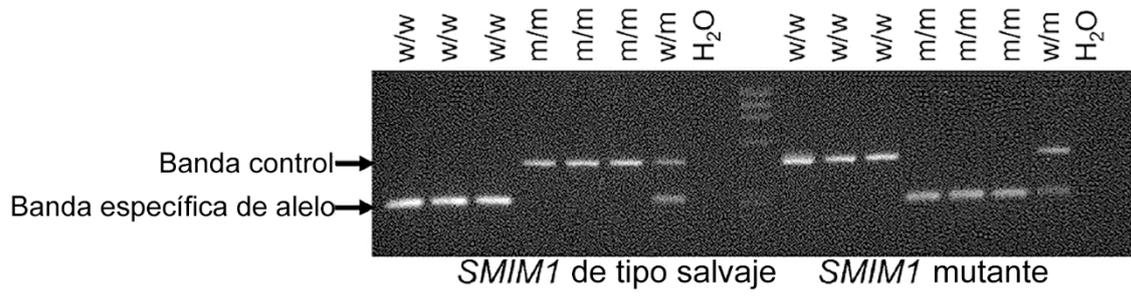


Fig. 3

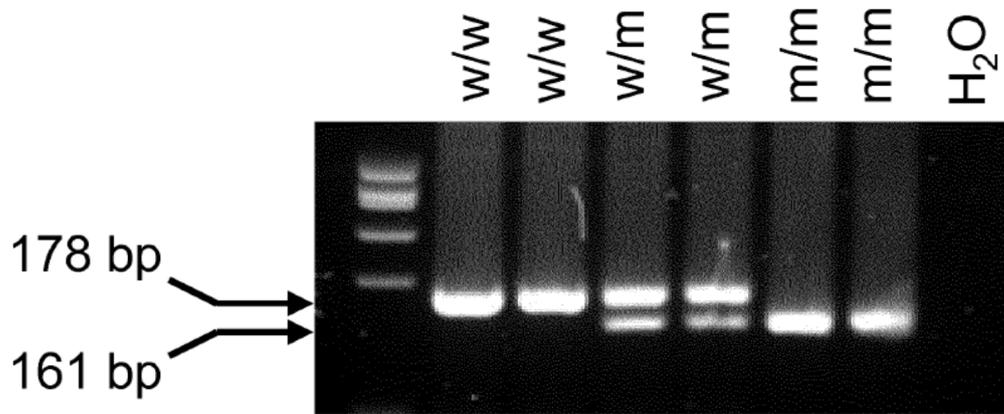


Fig. 4

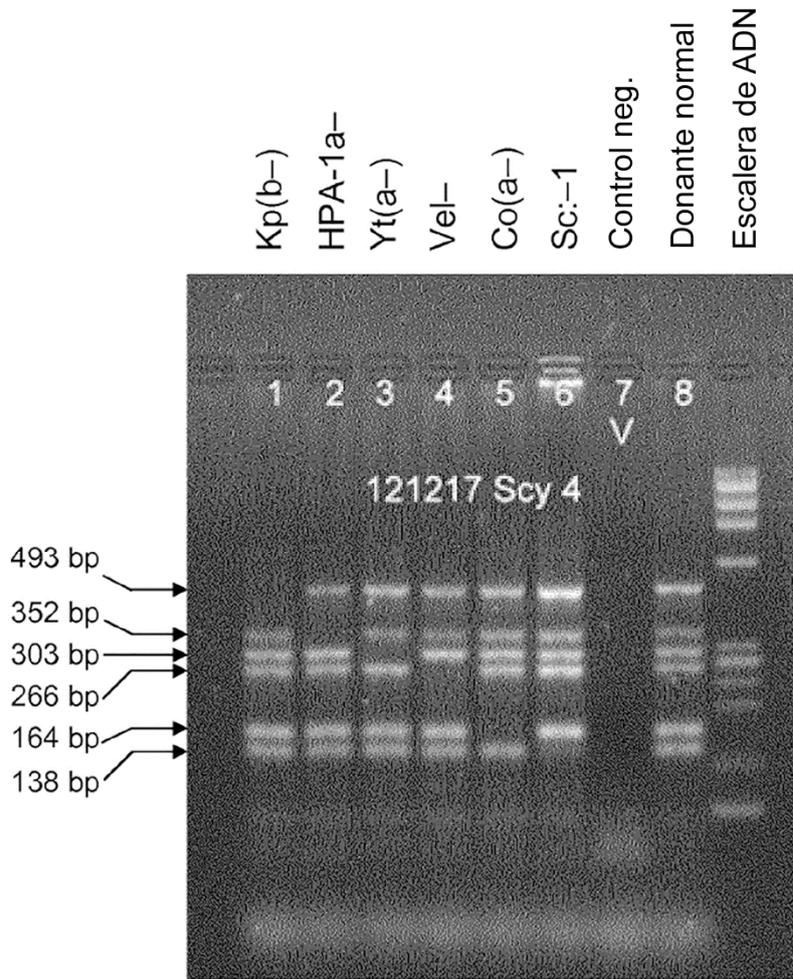


Fig. 5

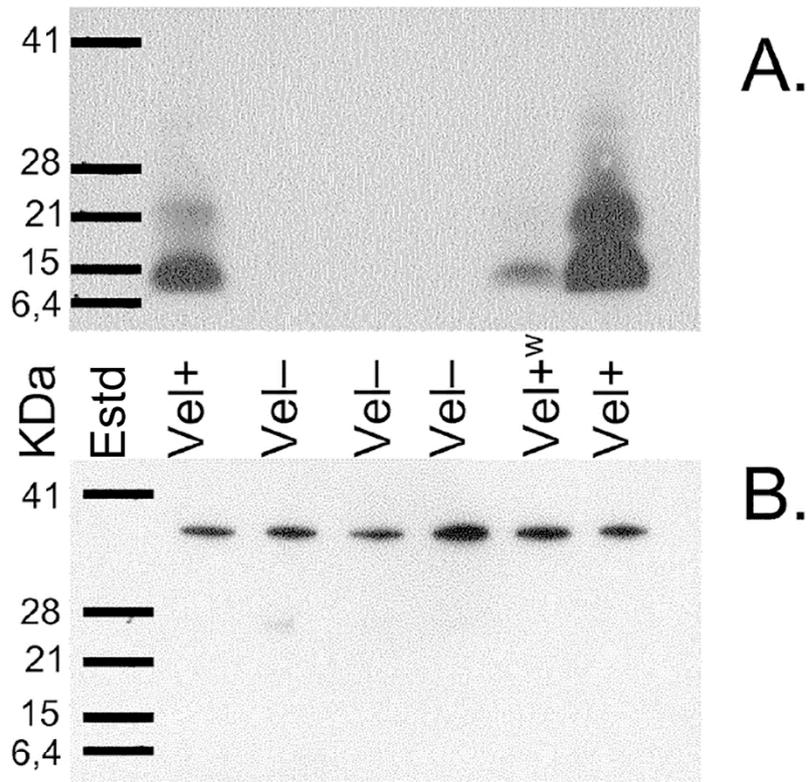


Fig. 6

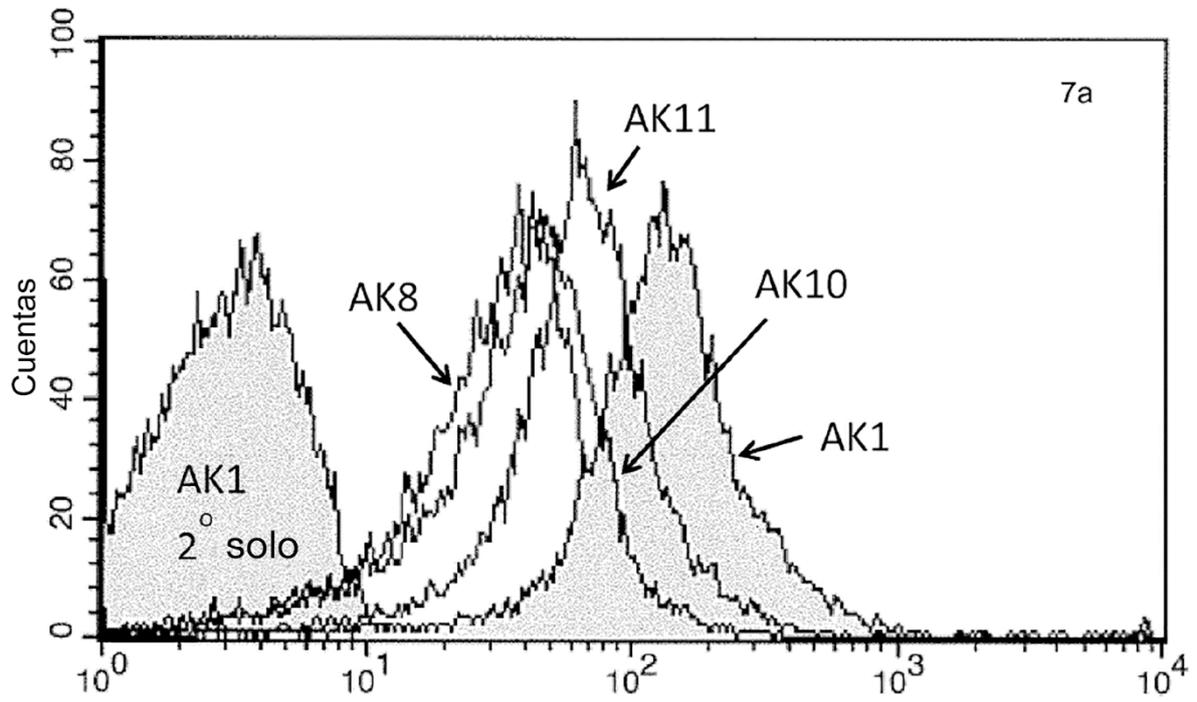


Fig. 7

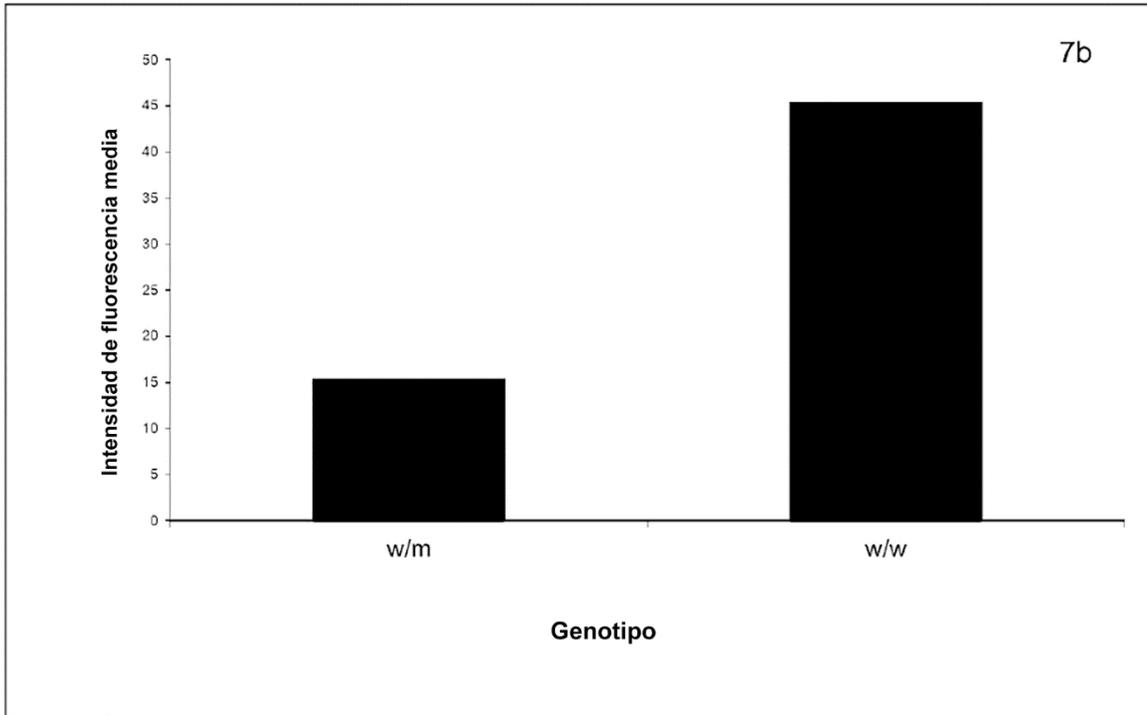


Fig. 7, cont

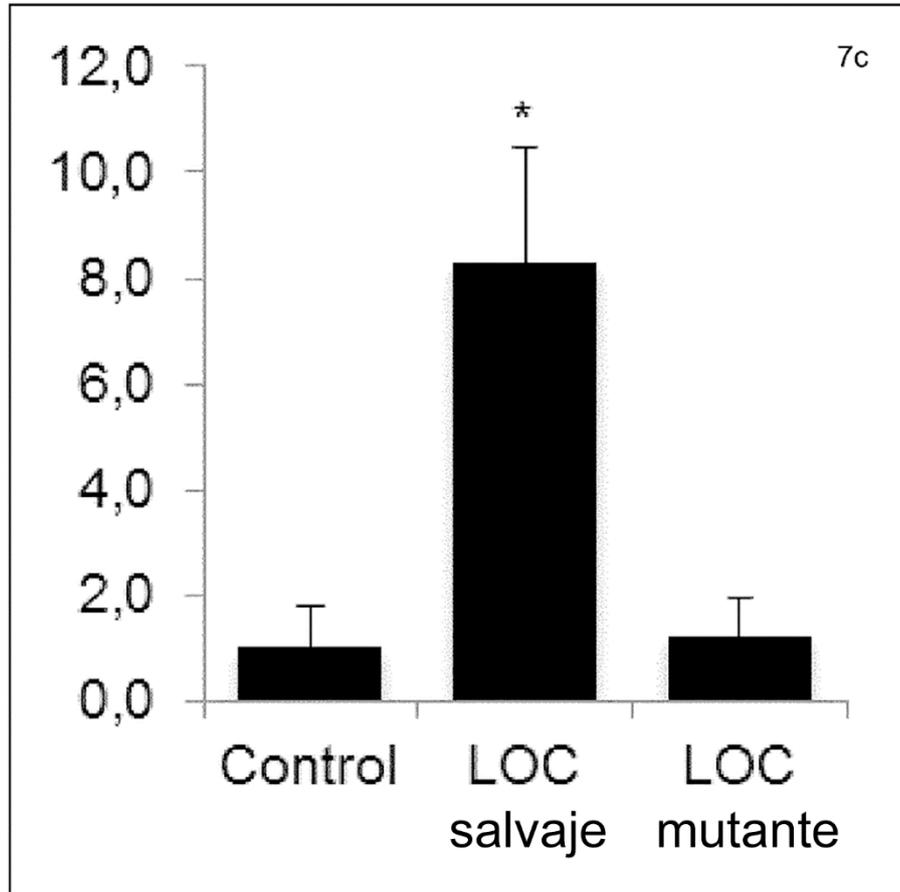


Fig. 7, cont.

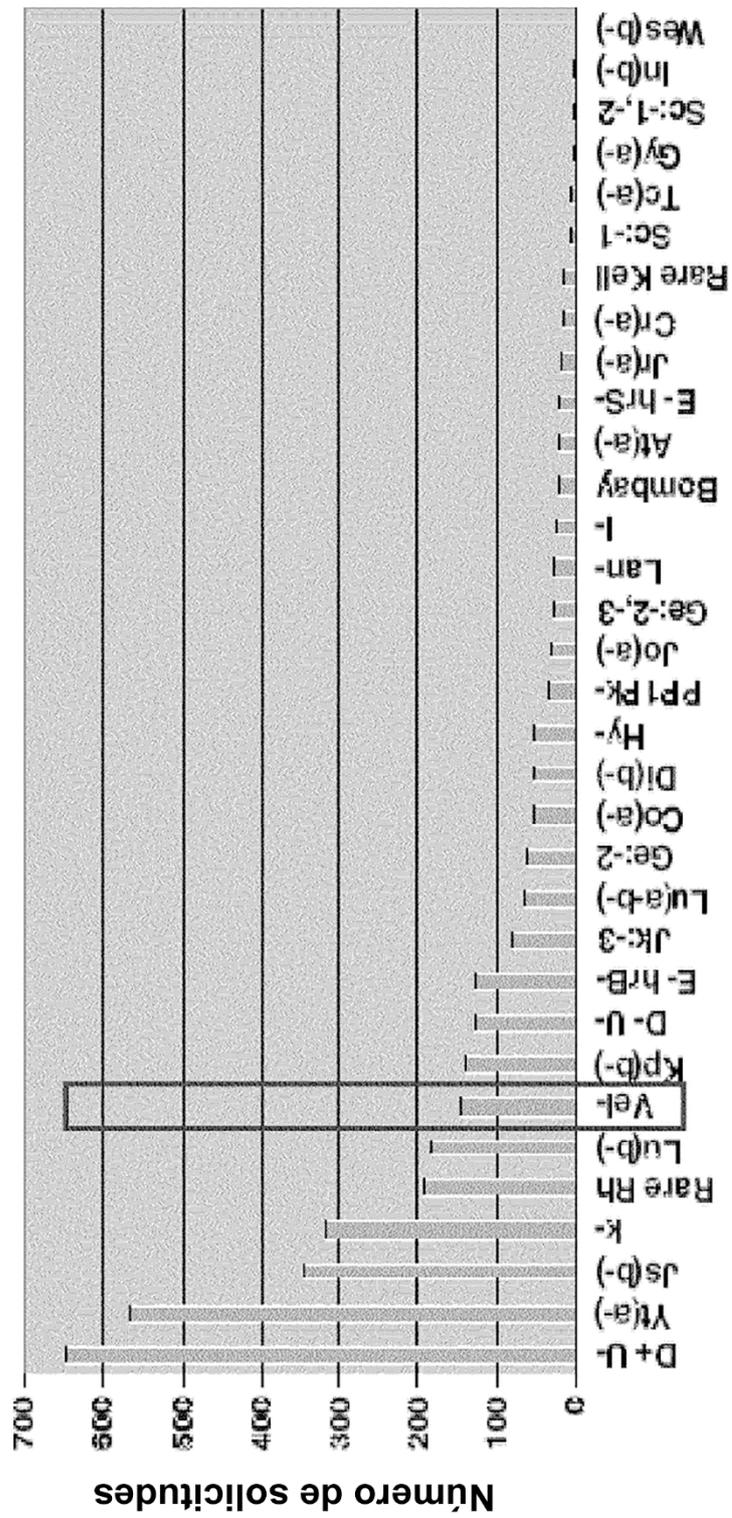


Fig. 8

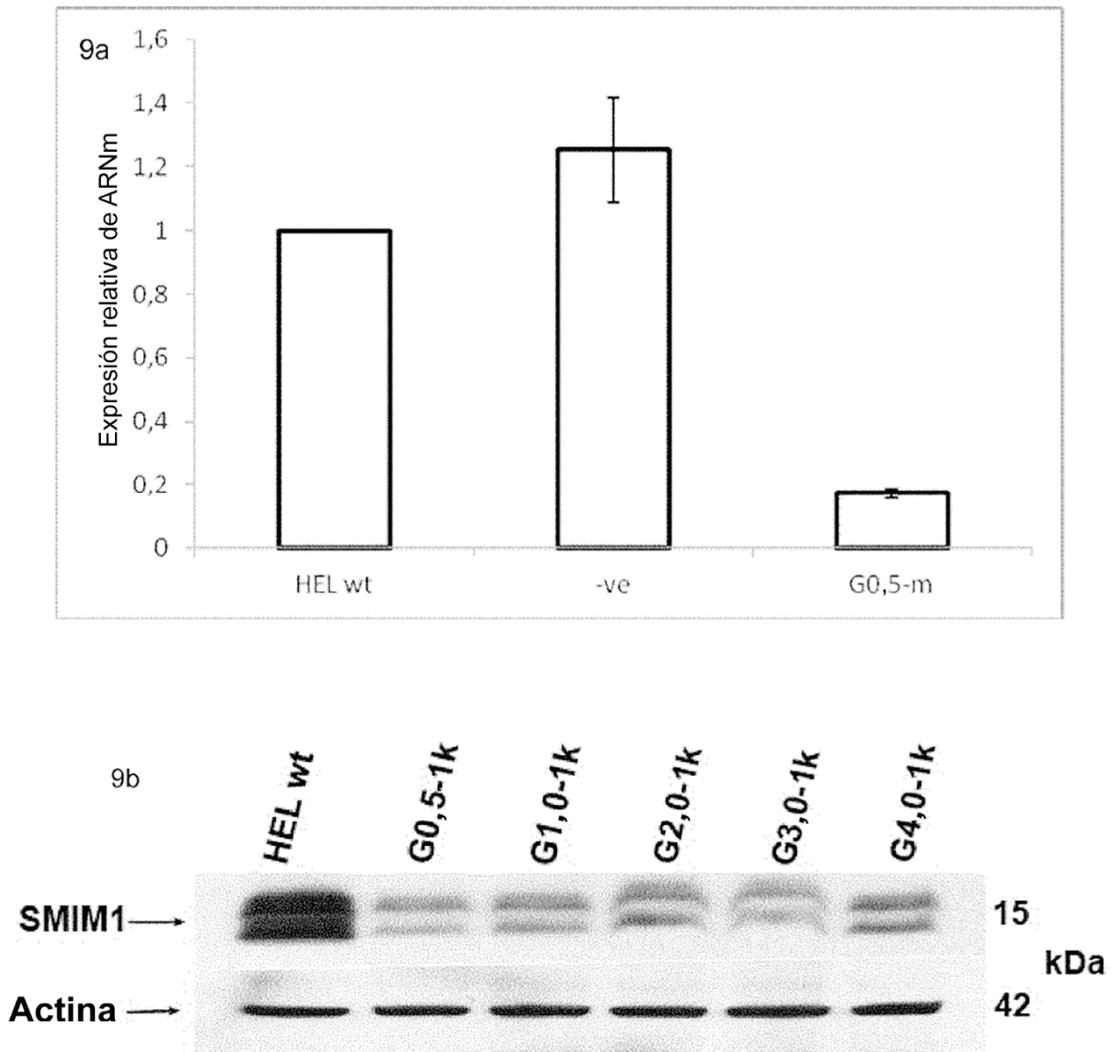


Fig. 9