

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 276 630**

21 Número de solicitud: 200503110

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **13.12.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2007**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2007

71 Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici A - Campus Universitari, s/n
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
Banc de Sang i Teixits**

72 Inventor/es: **Juan Otero, Manuel;
Casamitjana Ponces, Natalia;
Palou Rivera, Eduardo;
Pujol Borrell, Ricardo y
Faner Canet, María Rosa**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

54 Título: **Método y kit para genotipificación de HLA-B basados en la PCR en tiempo real.**

57 Resumen:

Método y kit para genotipificación de HLA-B basados en la PCR en tiempo real.

Método y kit basados en la PCR en tiempo real con cebadores y sondas específicos que permiten alcanzar un alto grado de subtipificación del locus completo HLA-B. Sus principales ventajas son la mayor rapidez (65 minutos, incluyendo la interpretación); la facilidad de automatización ya que sólo son necesarios dieciocho tubos para obtener un buen nivel de resolución (tipificación de 300 grupos); reducción del coste total por test gracias a la facilidad de automatización y la simplicidad; se consigue un sorprendente alto grado de definición alélica; y se reducen los riesgos de contaminación de la muestra debido a que los productos amplificados siempre permanecen en los tubos y no es necesario ningún paso post-PCR.

ES 2 276 630 A1

DESCRIPCIÓN

Método y kit para genotipificación de HLA-B basados en la PCR en tiempo real.

5 Esta invención se relaciona con el campo de la medicina en general y específicamente con la investigación médica, la biología molecular, la inmunología, la medicina forense y el diagnóstico. En particular, la invención proporciona un método para la determinación del genotipo (es decir, el conjunto de alelos específicos) de un individuo.

Estado de la técnica

10 En el trasplante entre individuos inmunogenéticamente diferentes se establece la inmunidad en el trasplante y se induce una reacción de rechazo contra el injerto. Existen antígenos que inducen una inmunidad en el trasplante particularmente intensa como dianas de esta reacción, que se llaman antígenos mayores de histocompatibilidad. Estos antígenos son controlados por un grupo de genes llamado complejo mayor de histocompatibilidad (“major histocompatibility complex”, MHC), conocido en los humanos como el sistema de antígenos leucocitarios humanos (“human leukocyte antigens”, HLA). Estos genes que codifican las moléculas HLA se encuentran entre los genes más variables en humanos: cada variante codifica para moléculas que unen péptidos diferentes. Estos genes son los mismos en todas las células de un individuo particular, pero difieren de una persona a otra. Se ha probado extensivamente que si el HLA del paciente y del donante no relacionado concuerdan, se reduce significativamente el rechazo al trasplante, la enfermedad del injerto contra el huésped y consecuentemente, se reduce la mortalidad relacionada con los trasplantes (cfr. N. Flomenberg *et al.*, “Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome”, *Blood* 2004, vol. 104, pp. 1923-30).

25 El HLA comprende varios genes agrupados en un segmento de 4 Mb en el brazo corto del cromosoma 6. La región HLA comprende seis loci mayores que codifican estructuralmente proteínas homólogas que se clasifican en la clase I HLA (HLA-A, B, Cw) y en la clase II (HLA-DR, DQ, DP), que presentan antígenos a dos subtipos diferentes de células. Las moléculas HLA de clase I presentan antígenos a las células T que expresan la glicoproteína de superficie celular CD8. Las glicoproteínas HLA son altamente polimórficas y, en el caso del locus HLA-B, el polimorfismo está localizado principalmente en los exones 2 y 3. Hasta el momento, se conocen 699 variantes alélicas de este locus que se agrupan en 35 especificidades serológicas, lo que significa que este locus es el más polimórfico de los loci HLA. Las variaciones alélicas del locus HLA-B son las que tienen mayor importancia para la selección del trasplante dentro de las moléculas de clase I.

35 La genotipificación de HLA por técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”, PCR) se ha convertido en una alternativa a los métodos serológicos, ampliamente usada en la práctica clínica. Los métodos de tipificación basados en la PCR más comúnmente utilizados son la PCR con cebadores específicos de secuencia (“PCR with sequence-specific primers”, PCR-SSP) y la PCR con hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (“PCR with sequence-specific oligonucleotides”, PCR-SSO). En el método PCR-SSP la secuencia del gen se determina mediante la amplificación de la región hipervariable del antígeno HLA diana para determinar el tipo de antígeno HLA (p.ej. cfr. M. Bunce *et al.*, “Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)”, *Tissue Antigens* 1995, vol. 46, pp. 355-67). En el método PCR-SSO, se prepara una membrana (sobre la que se inmoviliza el ADN amplificado por los cebadores específicos del gen HLA) y se hibridan las sondas oligonucleotídicas específicas del tipo respectivo de HLA para la tipificación (p.ej. cfr. R.K. Saiki *et al.*, “Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes”, *Nature* 1986, vol. 324, pp. 163-6).

50 Los kits que actualmente están en el mercado para la genotipificación de HLA-B se basan en estos dos métodos, la PCR-SSP y la PCR-SSO. Pero aunque estos métodos han sido efectivos en la práctica rutinaria de laboratorio, requieren un procesamiento post-PCR que consume tiempo y representa una gran fuente de contaminaciones. Asimismo, la PCR-SSP requiere el uso de un gran número de reacciones de PCR y es difícil de automatizar, limitando así su rendimiento. Por otro lado, aunque la PCR-SSO es capaz de un mayor rendimiento, sus tiempos de procesamiento son más largos y no permite discriminar entre motivos situados en las hebras cis o trans del ADN.

55 Para superar estas limitaciones, se han propuesto varias alternativas en los últimos tres años, pero todavía no están en el mercado: la tecnología de microarray (cfr. C. Consolandi *et al.*, “Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array”, *Hum. Mutat.* 2004, vol. 24, pp. 428-34), la pirosecuenciación (cfr. S. Ringquist *et al.*, “HLA class II DRB high resolution genotyping by pyrosequencing: comparison of group specific PCR and pyrosequencing primers”, *Hum. Immunol.* 2004, vol. 65, pp. 163-74), la técnica de la extensión de nucleótido único (“single nucleotide extension”) (cfr. M. Han *et al.*, “Multiplex single nucleotide extension: a robust and high throughput method for HLA-A locus typing”, *Hum. Immunol.* 2003, vol. 64, pp. 1111-22) y la PCR en tiempo real. Se han descrito aplicaciones de la PCR en tiempo real para la tipificación de HLA-B27 (cfr. C. Tiemann *et al.*, “Rapid DNA typing of HLA-B27 allele by real-time PCR using Lightcycler technology”, *Clin. Lab.* 2001, vol. 47, pp. 131-4; K. Sylvain *et al.*, “Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan trade mark probe”, *J. Immunol. Methods* 2004, vol. 287, pp. 179-86; WO 2005/059505) y de HLA-DRB (cfr. WO 2005/059174).

Explicación de la invención

El problema a solucionar por la presente invención es proporcionar herramientas para conseguir un nivel de descripción del locus HLA-B que permita abordar mejor el estudio de la compatibilidad en los trasplantes. Los laboratorios de tipificación de HLA tienen que analizar un gran número de muestras y necesitan incrementar la resolución de la tipificación para tener resultados clínicos válidos que determinen la compatibilidad de trasplante en un individuo.

La solución tiene su base en el trabajo detallado de los inventores (ver ejemplos de más adelante) que han encontrado un método basado en la PCR en tiempo real con cebadores y sondas específicos, que permiten alcanzar un alto grado de subtipificación del locus completo HLA-B. Previamente, como ya se ha indicado, se han propuesto protocolos basados en la PCR en tiempo real con SYBR® green I o con sondas FRET para la tipificación de otros targets, entre ellos, HLA-DRB y HLA-B27. Sin embargo no se han descrito técnicas similares para llegar a un alto nivel de subtipificación de todo el locus HLA-B. Para la descripción de este locus, los kits actualmente disponibles en el mercado se basan en la PCR-SSO reversa (p.ej. Inno-LiPA HLA-B Update Plus kit de Innogenetics; Dynal RELI SSO HLA-B Typing kit de Dynal Biotech-Oxoid S.A.), la PCR-SSO Luminex (p.ej. LifeMatch HLA-B Typing Kit de Tepnel Lifecodes-Diagnostica Longwood; Kit LabType SSO B Locus de One Lambda-Rafer) y la PCR-SSP (p.ej. Dynal Biotech / Pel-Freez; Genovision Olerup; One Lambda; Protrans).

Así, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la genotipificación de los alelos del locus B de HLA a partir de una muestra de ácido nucleico, que comprende los pasos de: (i) amplificar el ácido nucleico de la muestra mediante PCR en tiempo real y con cebadores adecuados; (ii) detectar señales de fluorescencia mediante sondas marcadas con un marcador fluorescente, después de la amplificación llevada a cabo en el paso (i), y analizar las temperaturas de fusión de las secuencias amplificadas de ácidos nucleicos; y (iii) comparar más de una señal detectada en el paso (ii) con un patrón de fluorescencia definido experimentalmente; habiendo sido establecido dicho patrón mediante una definición inicial basada en la comparación teórica de las secuencias de las sondas del paso (ii) con las secuencias de los diferentes alelos del locus B, seguido de una definición definitiva basada en una determinación experimental de cuales de las señales son realmente positivas para cada temperatura de fusión (cuadrados negros en la Tabla 6) y cuales son realmente negativas para cada temperatura de fusión (cuadrados blancos en la Tabla 6); donde los pasos (i), (ii) y (iii) se realizan para cada recipiente de una batería de recipientes y los cebadores para dicha batería comprenden los cebadores con secuencias SEQ ID NO: 15-19.

El recipiente normalmente será un tubo o vial adecuado para PCR. Los cebadores y sondas de la presente invención tienen secuencias diseñadas para amplificar regiones concretas dentro del intrón 1-exón 2-intrón 2-exón 3-intrón 3 del locus HLA-B. Serán útiles para esta invención tanto las secuencias de cebadores y sondas indicadas en esta descripción como sus secuencias complementarias.

En el paso (ii) se detectan señales de fluorescencia mediante sondas marcadas con un marcador fluorescente. Existen en la técnica varias formas de marcar las sondas fluorescentemente. Una de las más utilizadas actualmente es el marcaje de sondas con fluorocromos del tipo marcador donador-marcador aceptor ("donor label-acceptor label"), que induce el fenómeno llamado FRET (acrónimo de "Förster or fluorescence resonance energy transfer"). El fenómeno FRET implica la intervención de dos sondas, cuyas secuencias son específicas al ADN molde que se amplifica. Cada una de las sondas se marca con un fluoróforo diferente. Cuando la sonda con marcador donador es excitada por una fuente de luz, transfiere su energía a la segunda sonda marcada como aceptor en lugar de emitir fluorescencia. Las dos sondas están diseñadas para hibridar en sus dianas específicas de forma que ambos fluoróforos están en estrecha proximidad, así la transferencia de energía de resonancia sólo ocurre cuando ambas sondas se hibridan a la diana, y estando así muy próximas entre sí. La transferencia de energía resonante de fluorescencia es la magnitud que permite seguir la producción del amplímero en la PCR en tiempo real. La cantidad de FRET depende de la cantidad de sondas hibridadas y ésta es proporcional a la cantidad de amplímero al cual se pueden unir, por tanto a la cantidad de amplímero que se produce. Son marcadores específicos para este propósito la fluoresceína, el LC-RED 640™, el LC-RED 705™ y FAM de Tib-Mol Biol. Los ensayos pueden llevarse a cabo utilizando múltiples marcadores con distintas longitudes de onda de emisión.

Otras sondas marcadas fluorescentemente desarrolladas recientemente por Biotools son las sondas Lion. Se basan en la generación de una señal detectable y/o cuantificable mediada por una actividad 3'-5' nucleasa. Se pone en contacto el ácido nucleico sustrato que se pretende identificar, con al menos una sonda diseñada de manera que dicha sonda es capaz de hibridar con el ácido nucleico sustrato, dejando una o más bases desapareadas en el extremo 3' de la sonda, o bases adyacentes. La estructura del ácido nucleico de doble hebra con bases desapareadas en el extremo 3' de la cadena oligonucleotídica es sustrato de la actividad 3'-5' nucleasa, también presente que escinde las bases desapareadas de la sonda, así como las bases que se encuentren en posición 3' de la zona desapareada, generando una señal medible. La cadena de la sonda presenta un doble marcaje con un fluoróforo bloqueante (quencher) y un fluoróforo emisor (reporter).

Otras sondas marcadas fluorescentemente conocidas en la técnica son las sondas Taqman de Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Las sondas Taqman utilizan la actividad exonucleasa fluorogénica 5' de la Taq polimerasa para medir la cantidad de secuencias target en las muestras. Estas sondas son oligonucleótidos más largos que los cebadores (20-30 bases de longitud con un valor Tm de 10°C más alto) que contienen un marcador fluorescente normalmente en 5', y un marcador de ocultador (normalmente TAMRA) por lo general en 3'. Cuando se irradia,

ES 2 276 630 A1

el marcador fluorescente excitado transfiere energía a la molécula más cercana de marcador de ocultador en lugar de emitir fluorescencia (fenómeno FRET). Así, la proximidad del revelador y del ocultador impide la emisión de cualquier fluorescencia mientras la sonda está intacta. Las sondas TaqMan están diseñadas para hibridarse a una región interna de un producto de PCR. Cuando la polimerasa replica, su actividad exonucleasa 5' libera la sonda. Esto finaliza la actividad del ocultador (no FRET) y el marcador de revelador empieza a emitir fluorescencia que aumenta en cada ciclo proporcional al ritmo de liberación de la sonda. Otras sondas marcadas fluorescentemente conocidas en la técnica son las sondas Molecular Beacons, con química fluorescente igual que las Taqman pero con una secuencia que es complementaria entre sí de manera que se pliegan de manera característica. Otras sondas marcadas fluorescentemente conocidas en la técnica son las sondas Scorpion, con química fluorescente igual que las Taqman pero pueden tener dos estructuras moleculares diferentes: Scorpion uni-probe, con conformación de bucle similar a las Molecular Beacons, y Scorpion bi-probe con conformación duplex. Otras sondas marcadas fluorescentemente conocidas en la técnica son las sondas Simple, que consisten en una sola sonda marcada sólo con un fluorocromo llamado LED y sólo emite fluorescencia cuando está unida a ADN.

El experto en la materia sabría adaptar el método de la invención de acuerdo con cada uno de los tipos de sondas indicados.

En general, el ácido nucleico en la muestra será ADN, normalmente ADN genómico. Sin embargo, el método de la presente invención se puede usar con otros ácidos nucleicos, tales como ADN clonado o para determinadas reacciones ARN mensajero, y el ácido nucleico puede ser de hebra simple o de hebra doble. La PCR en tiempo real se realiza usando parámetros térmicos de ciclado universales y condiciones de la reacción de PCR conocidas por un experto en la materia. Aunque los tiempos de ensayo son más cortos utilizando un LightCycler™ que con otros termicladores, el experto en la materia sabría adaptar fácilmente el método de la invención a otros aparatos de RT-PCR.

En una realización particular de la invención, las sondas para la batería de recipientes comprenden las sondas con secuencias SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 40-50. La Fig. 2, paso 1, es un ejemplo de la batería de recipientes indicados anteriormente. En este caso, la batería consiste en siete tubos con los cebadores y sondas indicados anteriormente, con los que se consigue la discriminación de los principales grupos alélicos de HLA-B.

En una realización más particular, la batería de recipientes además comprende uno o más de los recipientes segundos siguientes, cada recipiente comprendiendo los cebadores indicados:

recipiente 1: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 1-3;

recipiente 2: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 10-12;

recipiente 3: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 13-14;

recipiente 4: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 4-7;

recipiente 5: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 22-23;

recipiente 6: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 20-21.

En una realización más particular, cada uno de los mencionados recipientes segundos comprende además las sondas indicadas:

recipiente 1: sondas con secuencias SEQ ID NO: 32-33, o bien

recipiente 1: sondas con secuencias SEQ ID NO: 38-39;

recipiente 2: sondas con secuencias SEQ ID NO: 40-41;

recipiente 3: sondas con secuencias SEQ ID NO: 32-33;

recipiente 4: sondas con secuencias SEQ ID NO: 34-35;

recipiente 5: sondas con secuencias SEQ ID NO: 33 y SED ID NO: 51;

recipiente 6: sondas con secuencias SEQ ID NO: 42-43.

Por lo tanto, la batería de recipientes de la invención puede estar formada por los recipientes que permiten la discriminación de los principales grupos alélicos de HLA-B y, adicionalmente por los recipientes segundos anteriormente mencionados. Los recipientes segundos permiten solucionar las confusiones alélicas en el patrón de hibridación homocigoto. Un ejemplo de recipientes segundos son los indicados en la Fig. 2 paso 2. En este ejemplo el recipiente 3 correspondería a T11. Pueden escogerse diferentes combinaciones de recipientes segundos según las confusiones alélicas que se requiera solucionar.

ES 2 276 630 A1

En una realización más particular, la batería de recipientes además comprende uno o más de los recipientes terceros siguientes, cada recipiente comprendiendo los cebadores indicados:

5 recipiente 7: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 8-9;

recipiente 8: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 24-25;

recipiente 9: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 26-27;

10 recipiente 10: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 27.

Finalmente, en una realización más particular, cada uno de los mencionados recipientes terceros comprende además las sondas indicadas:

15 recipiente 7: sondas con secuencias SEQ ID NO: 36-37;

recipiente 8: sondas con secuencias SEQ ID NO: 46-47;

20 recipiente 9: sondas con secuencias SEQ ID NO: 36-37;

recipiente 10: sondas con secuencias SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 50.

Por lo tanto, la batería de recipientes de la invención puede estar formada por los recipientes que permiten la discriminación de los principales grupos alélicos de HLA-B, los recipientes segundos que permiten solucionar las confusiones alélicas en el patrón de hibridación homocigoto y adicionalmente, por los recipientes terceros anteriormente mencionados. Los recipientes terceros permiten solucionar las confusiones alélicas en el patrón de hibridación heterocigoto. Un ejemplo de recipientes terceros son los indicados en la Fig. 2 paso 3. En este ejemplo el recipiente 7 correspondería a T12. Pueden escogerse diferentes combinaciones de recipientes terceros según las confusiones alélicas que se requiera solucionar.

30 En otra realización particular de la invención, se añaden como control en el paso (i) del método de genotipificación dos cebadores para el gen de la β -globina con SEQ ID NO: 28-29. En una realización más particular, además se añaden las sondas con secuencias SEQ ID NO: 52-53 para detectar la amplificación del gen de la β -globina. En vez de un control basado en el gen de la β -globina, puede ser necesario añadir en algún recipiente, dos cebadores para el gen SCYA4 con SEQ ID NO: 30-31 que se añaden como control en el paso (i). En una realización más particular, además se añaden las sondas con secuencias SEQ ID NO: 54-55 para detectar la amplificación del gen SCYA4. Esto se da por ejemplo en el tubo T5 de los ejemplos que vienen a continuación. Los controles pueden ser externos (en un tubo diferente), aunque preferiblemente son internos (en el mismo tubo).

40 En una realización preferida, las sondas están marcadas fluorescentemente con fluorocromos del tipo marcador donador-marcador aceptor que dan lugar al fenómeno de transferencia de energía FRET antes explicado.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la genotipificación de los alelos del locus B de HLA a partir de una muestra de ácido nucleico, mediante el método definido en cualquiera de las modalidades antes descritas, que comprende el patrón de fluorescencia, los cebadores y las sondas, tal y como se definen anteriormente. El kit puede opcionalmente comprender instrucciones para determinar los alelos de HLA-B de una muestra según los componentes del kit.

50 Los términos “genotipificación” y “tipificación” se usan como sinónimos en esta descripción y se refieren a cualquier test que revele los alelos específicos heredados por un individuo, lo cual es particularmente útil para situaciones en las que más de una combinación genotípica puede producir la misma presentación clínica. En la presente descripción, el término “locus” significa la posición ocupada por cada gen HLA (p.ej. el locus B de HLA). El término “alelo” se refiere a una de las dos o más formas alternativas de un gen, difiriendo en la secuencia genética y resultando en diferencias observables en los caracteres hereditarios (fenotipo), y se encuentran en el mismo lugar en un cromosoma. En este caso, el locus HLA-B se distribuye en grupos alélicos diferentes (p.ej. B*35 o B*37) que contienen varios alelos (p.ej. B*3502, B*3508).

60 El método y el kit de la presente invención presentan muchas ventajas frente a los métodos de tipificación de HLA conocidos en la técnica. Las principales ventajas son la mayor rapidez (65 minutos, incluyendo la interpretación); la facilidad de automatización ya que sólo son necesarios dieciocho tubos para obtener un buen nivel de resolución (tipificación de 300 grupos); reducción del coste total por test gracias a la facilidad de automatización y la simplicidad; se consigue un sorprendente alto grado de definición alélica; y se reducen los riesgos de contaminación de la muestra debido a que los productos amplificados siempre permanecen en los tubos y no es necesario ningún paso post-PCR.

65 El método y el kit de la invención demuestran una gran robustez cuando se ensayan muestras reales de laboratorio. Permiten la reproducibilidad, precisión y simplicidad que se requiere para el diagnóstico clínico: 1) los valores de T_m muestran una variación inter-ensayo por debajo de 1°C y una variación inter-ensayo por debajo de 0,5°C en la mayoría de los casos; 2) todas las reacciones de PCR se pueden realizar en 50 ciclos y en las mismas condiciones.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que la invención pertenece. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El resumen de la solicitud se incorpora aquí como referencia. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos y la lista de secuencias se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un ejemplo de los resultados de los 18 tubos de reacción utilizados para la tipificación de una muestra. La muestra ejemplo da como resultado de tipificación los alelos B*14/51. T1 significa tubo número 1 y la misma nomenclatura sirve hasta el tubo 18 (T18). TB significa tubo de beta-globina. En cada gráfica T1-T18 se representa fluorescencia 640/Back 530 *versus* temperatura. Se indica la temperatura resultado de la muestra ejemplo en cada tubo. En los tubos en que los alelos de la muestra ejemplo no se amplifican no se indica la temperatura pues para ellos la muestra es negativa. Se indica con una línea gris continua la muestra control negativo (mezcla de reacción sin ADN), con una línea gris discontinua la muestra control positivo (una muestra de ADN de tipificación conocida que se amplifica en dicho tubo) y con una línea negra continua la muestra ejemplo de tipificación desconocida. Para TB se representa fluorescencia 705/Back 530 *versus* ciclos.

La Fig. 2 muestra el esquema de tipificación en tres pasos. El primer paso, indicado con un 1 sirve para la discriminación de los principales grupos alélicas. En el segundo paso, indicado con un 2, se solucionan las confusiones alélicas en el patrón de hibridación homocigoto. En el tercer paso, indicado con un 3, se solucionan las confusiones alélicas en el patrón de hibridación heterocigoto. Una “w” significa “con” y “vs.”, *versus*. Por ejemplo en el T8, se soluciona la confusión de B*1553 con B*4035.

Descripción detallada de realizaciones particulares

Preparación de las muestras

Todas las muestras utilizadas tanto para la puesta a punto del método como para su validación, se tipificaron previamente en el laboratorio mediante una metodología de tipificación estándar PCR-SSO, PCR-SSP o secuenciación directa de amplímero generado (“sequence-based typing”, SBT). En todos los casos, el ADN genómico se obtuvo de muestras utilizando el QIAamp DNA blood mini kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany).

Puesta a punto del método y construcción del patrón de fluorescencia

Reacciones de PCR en tiempo real

Todas las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas con el equipo LightCycler™ o LightCycler 2.0™ (Roche, Mannheim, Germany) combinando la amplificación con cebadores específicos (secuencias especificadas en la Tabla 1) con la detección por sondas específicas marcadas con fluorocromos (secuencias especificadas en la Tabla 2). Todos los cebadores se diseñaron para tener una T_m entre 60-62°C; todas las sondas de anclaje fueron diseñadas para tener una T_m entre 70-75°C y todas las sondas sensoras en principio entre 60-68°C, aunque en el caso de P20s se necesitó una T_m superior para incluir todas las posibilidades de aquella región. Todos los cebadores se compraron a Sigma-Genosys (London, UK) y todas las sondas de hibridación se compraron a Tib MolBiol™ (Mannheim, Germany). Se utilizó un conjunto de 18 tubos de reacción para cada muestra para definir todos los alelos HLA-B. Para desarrollar todas las reacciones descritas, se usaron 31 cebadores: dos pares para los dos genes diferentes de muestra control (beta-globina y SCYA4) y los otros 27 para las 18 reacciones específicas HLA-B (algunos de ellos se usaron en diferentes combinaciones para generar amplificaciones diferentes). Cada reacción contenía dos pares de conjunto de cebadores y sondas: un conjunto con cebadores para el locus HLA-B y sondas FRET para el locus B marcadas con LC-Red 640™, y un segundo conjunto con cebadores para el gen control (normalmente beta-globina) y sondas FRET para este control interno marcadas con LC-Red 705™. Como consecuencia, en cada tubo, la señal obtenida en F2/F1 (o 640/530 en el equipo LightCycler 2.0™) era de la reacción específica del locus HLA-B, y la señal obtenida en F3/F1 (o 705/530 en el equipo LightCycler 2.0™) era del gen control. Se usaron los cebadores control para el gen SCYA4 en una sola reacción, en la que las complementariedades entre los cebadores y sondas para la beta-globina con los cebadores y sondas específicas para el locus HLA-B (tubo 18; cebadores Pbx1-R1as; sondas P18s-P1a) afectaron la reacción de tal manera que se obtuvo una señal muy baja de la amplificación de HLA-B (o de la reacción de la beta-globina, dependiendo de las concentraciones probadas de los cebadores y sondas). Todas las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 10 µl, para cada reacción. Los detalles de cada mezcla (cebadores y sondas utilizadas así como las concentraciones específicas de reactivos) están listados en la Tabla 3. En todas las reacciones de PCR, se añadió Taq polimerasa, dNTPs y tampón de reacción mediante la utilización de 1 µl de LightCycler Fast Start Master Hybridization probes™ (x10), hasta 9 µl de cada mezcla de reacción; se añadió un volumen de 1 µl de ADN a una concentración de 0,1 El protocolo de amplificación a tiempo real para todas las reacciones fue: 10 min de desnaturalización inicial y activación del enzima Fast Start™ a 95°C, seguidos por 50 ciclos de amplificación (5 segundos de desnaturalización a 95°C, 6 segundos de hibridación a 62°C y 10 segundos de extensión a 72°C). Las curvas de fusión se generaron a 95°C para 0 segundos, 72°C para 20 segundos, 65°C para 15 segundos, 42°C para 270

segundos, 39°C para 0 segundos (todas a una rampa de 20°C/s) y 80°C para 0 segundos (rampa de 0,05°C/s; modo de adquisición: continuo), seguidas por un paso de enfriamiento de 30 segundos a 40°C.

Análisis e interpretación de los datos

5 Para la tipificación fluorogénica de HLA-B, la amplificación por PCR de una muestra se realizó en paralelo con todos las mezclas de 18 cebadores y sondas. A través del análisis de la presencia de las curvas de fusión en el canal F2/F1 (640/530) se pudo comprobar la especificidad del producto de PCR del locus HLA-B. En la Tabla 6 se listan las especificidades de HLA-B, mostrando también las diferentes Tms que permiten la discriminación de estas especificidades. El análisis del canal F3/F1 (F3/F1 channel) (705/530) durante el paso de amplificación permitió detectar el producto de PCR control, que se evidencia por el incremento de la fluorescencia-F3 en las muestras. La interpretación de los resultados de la tipificación de HLA obtenidos por PCR en tiempo real se llevó a cabo con el uso de una tabla (Tabla 6) de confrontación de sondas que contenía los patrones de hibridación homocigotos de cada alelo HLA-B y utilizando el Polygene 2.0, el software desarrollado para el análisis de ambigüedades (ver después).

Análisis con software

Para definir los oligonucleótidos (cebadores y sondas), debido a la necesidad de dirigirlos a las secuencias polimórficas de HLA-B, se realizó un análisis manual de las secuencias de HLA-A, B y -C a partir de las herramientas de alineación de la web de IMGT/HLA (Robinson y Marsh 2000). Se utilizó el software Oligo[®] v4 para predecir la tendencia a generar artefactos procedentes de los cebadores y sondas y se utilizó la aplicación meltcalc99free.xlm[®] (Schutz y von Ahlsen 1999) para calcular las Tms de las sondas, así como para calcular la temperatura teórica de fusión obtenida de todas las hibridaciones incompatibles diferentes. Con el objetivo de predecir los resultados de tipificación ambiguos obtenidos de muestras heterocigotas para alelos HLA-B, se desarrolló el software Polygene 2.0. Para obtener la genotipificación de cada muestra considerando situaciones heterocigotas, se codificaron los diferentes resultados de Tm en código binario, donde para cada Tm, 1 significaba positivo y 0 negativo. El número codificado se analizó mediante Polygene 2.0. Este software compara todos los posibles pares de resultados de tipificación predecidos para los alelos conocidos de HLA-B, incluyendo su frecuencia en cada alelo [calculada como media de todos los datos conocidos sobre este alelo en la población Caucasoide (cfr. D. Middleton *et al.*, "New allele frequency database: <http://www.allelefrequency.net>", *Tissue Antigens* 2003, vol. 61, pp. 403-7) y a partir de las muestras tipificadas en el año 2004 por el National Marrow Donor Program (NMDP) (cfr. G.M. Schreuder *et al.*, "HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens", *Hum. Immunol.* 2005, vol 66(2), pp.170-210)] y determina qué combinaciones de alelos generarán resultados ambiguos (cuando coexisten en una muestra heterocigota) así como la frecuencia de cada combinación alélica.

Resultados

Para el establecimiento de la aproximación de PCR en tiempo real FRET con 18 tubos, se seleccionaron un total de 250 muestras pacientes de trasplante de médula ósea o de un órgano sólido, o de donantes sanos del depósito de ADN del Banc de Sang i Teixits (Barcelona) para representar todos los alelos de HLA-B definidos serológicamente disponibles en la población española (en presentación homo y heterocigótica). Las muestras se seleccionaron para representar todas las situaciones heterocigóticas involucrando perfiles de Tm próximos en la misma reacción; de esta manera su Tm se concretaba permitiendo obtener la asignación precisa para los resultados heterocigóticos con ambigüedad. Para cada reacción, se ensayaron diferentes concentraciones de ambos conjuntos de cebadores involucrados (cebadores para el locus B y para el gen control), así como la concentración de MgCl₂, hasta encontrar la mejor combinación para dar la señal de fusión específica mayor para los alelos del locus HLA-B en cada caso. En reacciones en las que las condiciones lo requerían, se añadió DMSO después de la valoración de la concentración requerida en dichas reacciones. Cuando los cebadores o las sondas diseñadas no funcionaban como se esperaba, se diseñaron nuevos oligonucleótidos incluyendo modificaciones respecto a la secuencia original (cfr. Tabla 1 y 2). Como el principal parámetro a analizar era el paso de fusión, todas las sondas fueron diseñadas para trabajar bajo las mismas condiciones de fusión, aunque algunas de ellas dieron un nivel de fluorescencia mayor que otras. De hecho, esta variabilidad entre reacciones indica diferentes eficiencias de PCR de las mezclas individuales de cebadores y sondas. Para superar este problema, se midió el máximo y el mínimo de fluorescencia para cada reacción (Tabla 4). En general, el mínimo de fluorescencia corresponde a 10 ng de ADN (la cantidad mínima de muestra ensayada por reacción). Si se observaban fluorescencias más bajas, se consideraban como artefactos de la PCR.

Tipificación de HLA-B mediante patrones de resultados de Tm de 18 PCR en tiempo real: cuando se usó en un único ensayo la metodología, se debían considerar los resultados de las 18 reacciones (Tabla 6). Se definieron experimentalmente 61 Tms y se adicionaron 47 Tms teóricas no definidas experimentalmente debido a que correspondían a especificidades de HLA-B no comunes en la población. En dos reacciones (tubo 2 y tubo 4) las sondas HLA-B utilizadas para la monitorización no dieron una señal de fluorescencia con algunos de los alelos amplificados debido al gran número de falsos apareamientos con la sonda sensora. Se consideraron como alelos no amplificados. De manera similar, en el tubo 4 donde es posible detectar una Tm de 50°C, algunas de las muestras que teóricamente tenían que dar esta Tm dieron una señal de fluorescencia muy débil, mientras que otras muestras no produjeron señal. Estos resultados de Tm no se tuvieron en cuenta para en la asignación alélica final para cada muestra analizada.

Tipificación de HLA-B en rondas consecutivas de PCR: grupos iniciales de tipificación de HLA-B mediante 7 reacciones; resolución de ambigüedades mediante reacción adicional como segunda ronda de rt-PCR: No siempre son necesarios los resultados de las 18 reacciones para dar una tipificación. Por ello, para optimizar el procedimiento se diseñó un diagrama de flujo para hacer la tipificación en varios pasos utilizando el mínimo óptimo de reacciones en cada caso. En realidad, siete de las dieciocho reacciones (tubos 1 a 7) permiten clasificar los alelos B en 188 grupos, dando una asignación inicial para muchos de los resultados. Cinco de estas siete reacciones (tubos 1 a 5, que usan los mismos cebadores pero sondas diferentes) amplifican el exón 2 de todos los alelos HLA-B excepto de B*7301. Para el tercer exón, se diseñaron dos reacciones adicionales (tubos 6 a 7) para amplificar un amplio número de alelos. Así, esas siete reacciones iniciales permiten caracterizar un alelo mediante el análisis de 26 curvas de fusión definidas experimentalmente (teóricamente podían definir 21 Tms adicionales que no fueron analizadas porque correspondían a alelos muy poco frecuentes). Las subsiguientes once amplificaciones se dividieron en dos grupos configurando dos rondas más de amplificación. La segunda ronda fue usada para la resolución de ambigüedades en el caso de combinaciones homocigotas de alelos y la tercera ronda para resolver las ambigüedades en combinaciones heterocigotas de alelos.

Así pues, para utilizar el número mínimo posible de reacciones, la tipificación se pudo hacer utilizando las primeras siete reacciones (tubos 1-7) para todas las muestras, y después, dependiendo del resultado obtenido, utilizando las reacciones necesarias para resolver las ambigüedades observadas, como se detalla en la Fig. 3. Aunque se diferenciaron las reacciones en dos pasos, uno para discernir las ambigüedades homocigotas (paso 2) y las ambigüedades heterocigotas (paso 3), ambos pasos se pueden desarrollar simultáneamente en un sólo segundo ensayo de PCR.

Interpretación de los datos de genotipificación de HLA-B en tiempo real y definición de indeterminaciones: La interpretación de los resultados de tipificación de HLA-B obtenidos mediante PCR en tiempo real, se llevó a cabo mediante el uso de una tabla de confrontación de sondas que contenía los patrones de hibridación homocigotas para cada alelo HLA-B (cfr. Tabla 6) y, utilizando el software Polygene 2.0. A partir del análisis informático se encontraron cuatro parejas de alelos no resolubles por esta metodología, (la frecuencia relativa se incluye en paréntesis): B*3537 (0,0010443%) versus B*7804 (0,0041772%); B*5401 (0,65895%) versus B*5507 (0,0020886%); B*4047 (0%) versus B*4431 (0%); B*5104 (0,0062658%) versus B*5306 (0%). Usando el software Polygene 2.0 también fue posible detectar redundancias de alelo y asignar una tipificación alelica específica (todos estos datos en relación con la frecuencia esperada de población). Además, utilizando en Polygene 2.0. se determinó si la coexistencia de diferentes alelos HLA-B podía generar indeterminaciones de tipificación. Se demostró que sólo alelos muy raros en la población daban asignaciones HLA no resolubles (cfr. Tabla 5).

Validación del método

Análisis de 200 muestras

Para verificar la capacidad de la técnica para dar resultados en muestras clínicas (una vez todas las condiciones para las reacciones establecidas), la técnica se ensayó a ciegas con 200 muestras clínicas seleccionadas al azar de pacientes de trasplante de un órgano sólido o de médula ósea, o de donantes sanos, que fueron genotipificadas previamente mediante PCR-SSO. Las muestras se distribuyeron en siete conjuntos de rondas de LightCycler, incluyendo junto con las muestras a tipificar, una muestra negativa (mezcla de reacción sin muestra clínica) y una muestra conocida positiva (la misma para los siete tubos) en cada reacción. El análisis de las Tm de esta muestra positiva permitió calcular la reproducibilidad del ensayo para evaluar la variación de Tm inter-ensayo; la variabilidad intra-ensayo se evaluó entre muestras positivas de la misma ronda. En 17 reacciones la variabilidad (intra e inter-ensayo) de las Tm fue menor que $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; en una reacción (tubo 2) la Tm de 54°C tuvo una variabilidad de $\pm 0,75^{\circ}\text{C}$ (estas variaciones altas no se apreciaron en la evaluación de otras Tms presentadas en esta reacción). En todos los casos, la tipificación alcanzados por el procedimiento en tiempo real concordó con los métodos de tipificación anteriores. Un ejemplo de la tipificación de HLA-B de una muestra de ADN con este método se muestra en la Fig. 1.

PCR-SSO (oligonucleótidos específicos de secuencia)

El conjunto de muestras utilizadas tanto para el establecimiento como para la validación de la técnica, se tipificaron utilizando la metodología convencional de PCR-SSO (Dynal Rely SSO HLA-B typing kit, Dynal Biotech, Bromborough, UK).

PCR-SBT (secuenciación directa de amplímero generado)

Para la validación de la técnica con las 200 muestras, y cuando la técnica dio una resolución mayor que la metodología de tipificación anterior (PCR-SSO), aquellas muestras de PCR en tiempo real que dieron la resolución más alta fueron re-tipificadas por PCR-SBT. Esta PCR-SBT se realizó como describió S. Pozzi, *et al.*, ("HLA-B locus sequence-based typing", *Tissue Antigens* 1999, vol. 53, pp. 275-81) utilizando polimerasa FastStart™ (Roche) y BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 (AbiPrism - PE Biosystems, Foster City, California).

ES 2 276 630 A1

TABLA 1

Cebadores para la tipificación de HLA-B mediante PCR en tiempo real

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Cebador	Secuencia	Posición
R8s	SEQ ID NO: 1	737
R8as1	SEQ ID NO: 2	846
R8as2	SEQ ID NO: 3	846
R13s	SEQ ID NO: 4	279
R13as1	SEQ ID NO: 5	414
R13as2	SEQ ID NO: 6	414
R13as3	SEQ ID NO: 7	414
R12s	SEQ ID NO: 8	243
R12as	SEQ ID NO: 9	416
R10s	SEQ ID NO: 10	729
R10as1	SEQ ID NO: 11	941
R10as2	SEQ ID NO: 12	941
R11s	SEQ ID NO: 13	745
R11as	SEQ ID NO: 14	985
Pbx1	SEQ ID NO: 15	138
R1as	SEQ ID NO: 16	515
R6s	SEQ ID NO: 17	781
Pbint3	SEQ ID NO: 18	1037
R7s	SEQ ID NO: 19	846
R15s	SEQ ID NO: 20	279
R15as	SEQ ID NO: 21	409
R14s	SEQ ID NO: 22	729
R14as	SEQ ID NO: 23	941
R16s	SEQ ID NO: 24	419
R16as	SEQ ID NO: 25	729
R17s	SEQ ID NO: 26	292
Bw4as	SEQ ID NO: 27	454
Pc03	SEQ ID NO: 28	199
Pc04	SEQ ID NO: 29	270
4o1s	SEQ ID NO: 30	1335
442as	SEQ ID NO: 31	1548

ES 2 276 630 A1

TABLA 2

Sondas para la tipificación de HLA-B mediante PCR en tiempo real

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Sonda	Secuencia	Marcaje
P6s	SEQ ID NO: 32	3' Fluos
P6a	SEQ ID NO: 33	3' LC-Red 640
P9s	SEQ ID NO: 34	5' Fam
P9a	SEQ ID NO: 35	3' LC-Red 640
P1a	SEQ ID NO: 36	3' LC-Red 640
P1s	SEQ ID NO: 37	5' Fam
P8s	SEQ ID NO: 38	3' Fluos
P8a	SEQ ID NO: 39	5' LC-Red 640
P14s	SEQ ID NO: 40	3' Fluos
P14a	SEQ ID NO: 41	5' LC-Red 640
P73s	SEQ ID NO: 42	3' Fluos
P73a	SEQ ID NO: 43	5' LC-Red 640
P2s	SEQ ID NO: 44	5' Fam
P2a	SEQ ID NO: 45	3' LC-Red 640
P20s	SEQ ID NO: 46	3' Fluos
P20a	SEQ ID NO: 47	5' LC-Red 640
P19s	SEQ ID NO: 48	3' Fluos
P19a	SEQ ID NO: 49	5' LC-Red 640
P18s	SEQ ID NO: 50	5' Fam
P5s	SEQ ID NO: 51	3' Fluos
CTW LC	SEQ ID NO: 52	5' LC-Red 705
CTW FL	SEQ ID NO: 53	3'Fluos
C2a	SEQ ID NO: 54	3' Fluos
C2s	SEQ ID NO: 55	5' LC-Red 705

ES 2 276 630 A1

TABLA 3

Reactivos para la PCR

5 M significa mezcla de cebadores (as) para aquella reacción, en los casos R8, R10 y R13. La mezcla MR8as está formada por 16.5% de R8as1 y 83.5% de R8as2. MR10as está formada por 80% de R10as1 y 20% de R10as2. MR13as está formada por 46.53% de R13as1, 52.47% de R13as2 y 1% de R13as3. En todos los tubos había 1x de Fast Start Master H.P. T significa tubo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

T	cebador sentido (S)	μM S	cebador antisentido (AS)	μM AS	Sonda anclaje	μM sonda anclaje	Sonda sensora	μM sensora	% DMSO	mM Mg ²⁺
1	Pbx1	0,2	R1 as	1,4	P20A	0,2	P20S	0,2	2	5
	PC 03	0,2	PC 04	0,6	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
2	Pbx1	0,5	R1 as	0,5	P19a	0,2	P19s	0,4	2	5
	PC 03	0,2	PC 04	0,6	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
3	Pbx1	0,2	R1 as	1,4	P73a	0,2	P73s	0,2	2	4
	PC 03	0,2	PC 04	0,6	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
4	Pbx1	0,5	R1 as	0,5	P2a	0,2	P2s	0,2	2	5
	PC 03	0,2	PC 04	0,6	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
5	Pbx1	0,2	R1 as	1,6	P1a	0,2	P18s	0,2	2	5
	4o1s	0,6	442as	0,2	C2a	0,2	C2s	0,2		
6	R6s	0,2	Pbint 3	0,6	P14a	0,2	P14s	0,2	-	3
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
7	R7s	0,1	Pbint 3	0,5	P14s	0,2	P14a	0,2	-	3
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
8	R8s	0,2	MR8as	0,6	P6a	0,2	P6s	0,2	-	3
	PC 03	0,4	PC 04	2,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
9	R8s	0,2	MR8as	0,8	P8a	0,2	P8s	P8s	-	3.75
	PC 03	0,2	PC 04	2,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
10	R10s	0,2	MR10as	1,0	P14a	0,2	P14s	0,2	-	3
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
11	R11s	0,4	R11as	1,0	P6a	0,2	P6s	0,2	-	5
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
12	R12s	0,2	R12as	1,0	P1a	0,2	P1s	0,2	-	4
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
13	R13s	0,2	MR13as	1,4	P9a	0,2	P9s	0,2	-	3
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
14	R14s	0,2	R14as	1,0	P6a	0,2	P5s	0,2	-	5
	PC 03	0,2	PC 04	0,6	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
15	R15s	0,1	R15as	1,4	P73a	0,2	P73s	0,2	-	4.5
	PC 03	0,2	PC 04	1,0	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
16	R16s	0,5	R16as	1,5	P20A	0,2	P20S	0,2	-	3
	PC 03	0,2	PC 04	0,5	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
17	R17s	0,2	Bw4as	0,5	P1a	0,2	P1s	0,2	-	5
	PC 03	0,2	PC 04	1,2	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		
18	Pbx1	0,2	Bw4as	1,0	P1a	0,2	P18s	0,2	-	4
	PC 03	0,2	PC 04	0,6	CTW LC	0,2	CTW FL	0,2		

ES 2 276 630 A1

TABLA 4

Máximos y mínimos de fluorescencia observados para cada reacción

5

10

15

20

25

30

	Mínimo de fluorescencia	Maximo de fluorescencia
Tubo 1	0.002	0.01
Tubo 2	0.002	0.013
Tubo 3	0.003	0.012
Tubo 4	0.002	0.007
Tubo 5	0.002	0.007
Tubo 6	0.002	0.011
Tubo 7	0.002	0.007
Tubo 8	0.0045	0.03
Tubo 9	0.002	0.011
Tubo 10	0.0045	0.01
Tubo 11	0.0045	0.017
Tubo 12	0.001	0.006
Tubo 13	0.017	0.021
Tubo 14	0.003	0.09
Tubo 15	0.0045	0.023
Tubo 16	0.005	0.012
Tubo 17	0.03	0.07
Tubo 18	0.02	0.07

35

TABLA 5

Confusiones encontradas en la situación heterocigota HLA-B

40

Ambigüedades encontradas en la situación heterocigota. Frecuencias combinatorias de los alelos HLA-B están calculadas de la media de toda la población caucásica del National Marrow Donor Program (columna NMDP) y del Allele Project (columna AP). Esta figura presenta sólo las indeterminaciones con valores de PNDM mayores que 0.0005% (5E-6) y con un porcentaje dentro del grupo (% en grupo) mayor que el 1%, o valores de PA que tienen frecuencia documentada.

45

50

55

Nº	Alelo 1	Alelo 2	NMDP	AP
			Frecuencia de combinación (% en grupo)	Frecuencia de combinación (% en grupo)
1	B*5001	B*520101	5,23E-04 (81,65%)	2,63E-04 (51,45%)
	B*4005	B*520101	9,02E-05 (14,07%)	9,23E-05 (18,05%)
	B*5002	B*520101	2,43E-05 (3,79%)	1,56E-04 (30,50%)
	B*4009	B*520101	2,16E-06 (0,34%)	Nd (-)
	B*5004	B*520101	9,24E-07 (0,14%)	Nd (-)

60

65

ES 2 276 630 A1

TABLA 5 (continuación)

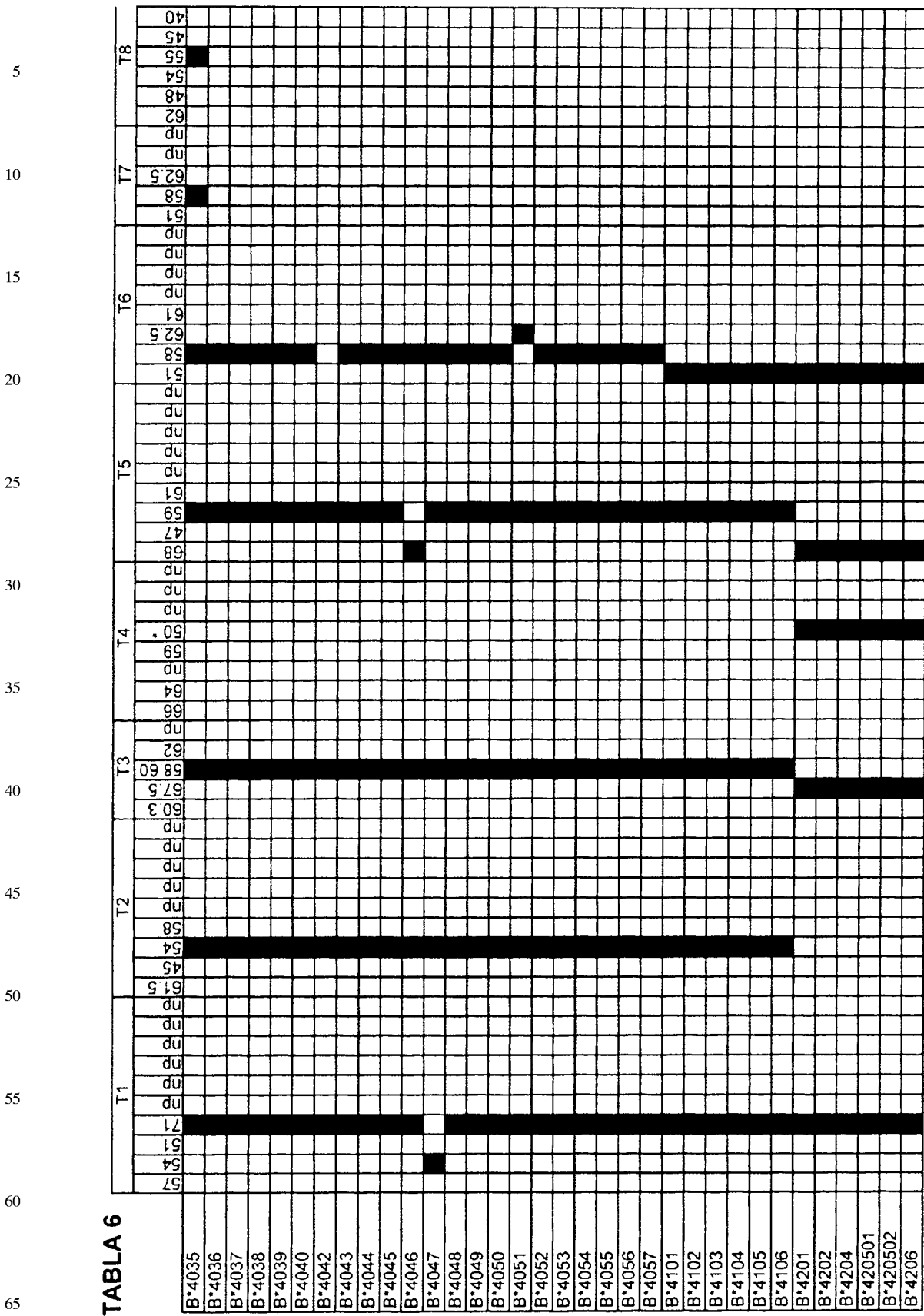
5	2	B*0801	B*4102	3,40E-04 (96,33%)	Nd (-)
		B*0801	B*4103	7,82E-06 (2,22%)	Nd (-)
		B*0801	B*4009	4,98E-06 (1,41%)	Nd (-)
10	3	B*5001	B*510101	3,52E-04 (72,90%)	1,94E-03 (61,43%)
		B*4005	B*510101	6,07E-05 (12,56%)	6,82E-05 (2,15%)
		B*5001	B*510201	4,04E-05 (8,37%)	Nd (-)
		B*5002	B*510101	1,64E-05 (3,39%)	1,15E-03 (36,42%)
		B*4005	B*510201	6,97E-06 (1,44%)	Nd (-)
15	4	B*3701	B*8101	1,23E-04 (51,85%)	1,33E-05 (49,23%)
		B*3701	B*4801	1,14E-04 (48,15%)	1,38E-05 (50,77%)
20	5	B*3801	B*390101	1,20E-04 (57,77%)	Nd (-)
		B*3801	B*3905	6,19E-05 (29,73%)	Nd (-)
		B*3801	B*670101	2,05E-05 (9,83%)	Nd (-)
		B*3801	B*3911	4,04E-06 (1,94%)	Nd (-)
25	6	B*180102	B*8101	1,18E-04 (50,86%)	4,53E-05 (47,86%)
		B*180102	B*4801	1,09E-04 (47,22%)	4,68E-05 (49,35%)
		B*1803	B*8101	2,08E-06 (0,90%)	1,30E-06 (1,37%)
		B*1803	B*4801	1,93E-06 (0,83%)	1,34E-06 (1,41%)
30	7	B*0801	B*3910	9,03E-05 (60,74%)	Nd (-)
		B*0801	B*670101	5,76E-05 (38,74%)	Nd (-)
35	8	B*4102	B*4201	5,29E-05 (89,33%)	Nd (-)
		B*4102	B*4202	4,17E-06 (7,04%)	Nd (-)
		B*4103	B*4201	1,22E-06 (2,06%)	Nd (-)
		B*4009	B*4201	7,75E-07 (1,31%)	Nd (-)
40	9	B*5001	B*7801	3,89E-05 (81,65%)	4,66E-05 (61,43%)
		B*5002	B*7801	1,81E-06 (3,79%)	2,76E-05 (36,42%)
		B*4005	B*7801	6,71E-06 (14,07%)	1,63E-06 (2,15%)
45	10	B*4501	B*5108	3,87E-05 (81,95%)	4,37E-05 (87,22%)
		B*4102	B*5108	8,03E-06 (16,98%)	6,27E-06 (12,51%)
		B*4502	B*5108	6,72E-08 (0,14%)	1,36E-07 (0,27%)
50	11	B*5109	B*5301	1,43E-05 (98,89%)	2,74E-06 (90,72%)
		B*5109	B*5302	2,34E-08 (0,16%)	2,40E-07 (7,95%)
		B*5105	B*5109	1,17E-07 (0,81%)	4,00E-08 (1,33%)
55	12	B*0804	B*4801	4,66E-07 (48,15%)	1,19E-06 (50,77%)
		B*0804	B*8101	5,02E-07 (51,85%)	1,16E-06 (49,23%)
60	13	B*4801	B*4801	4,06E-05 (48,11%)	8,40E-07 (50,77%)
		B*4801	B*8101	4,37E-05 (51,81%)	8,15E-07 (49,23%)
65	14	B*5105	B*5301	8,33E-06 (98,93%)	6,85E-07 (90,72%)
		B*5105	B*5302	1,36E-08 (0,16%)	6,00E-08 (7,95%)
		B*5105	B*5105	6,82E-08 (0,81%)	1,00E-08 (1,33%)
	15	B*1802	B*4801	2,22E-06 (51,85%)	2,50E-07 (50,77%)
		B*1802	B*8101	2,06E-06 (48,15%)	2,42E-07 (49,23%)
	16	B*4801	B*4802	2,59E-06 (48,15%)	8,33E-08 (50,77%)
		B*4802	B*8101	2,79E-06 (51,85%)	8,08E-08 (49,23%)

TABLA 6

	T1				T2				T3				T4				T5				T6				T7				T8											
	57	54	51	71	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np				
B*1588																																								
B*1589																																								
B*1592																																								
B*1593																																								
B*1594N																																								
B*180102																																								
B*180101																																								
B*1802																																								
B*1803																																								
B*1804																																								
B*1805																																								
B*1806																																								
B*1807																																								
B*1808																																								
B*1809																																								
B*1810																																								
B*1811																																								
B*1812																																								
B*1813																																								
B*1814																																								
B*1815																																								
B*1817N																																								
B*1818																																								
B*1819																																								
B*1820																																								
B*2701																																								
B*2702																																								
B*2703																																								
B*2704																																								
B*270505																																								
B*270506																																								
B*270502																																								
B*270503																																								
B*270504																																								

TABLA 6

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
B*390601								
B*390602								
B*3907								
B*3908								
B*3909								
B*3910								
B*3911								
B*3912								
B*3913								
B*3914								
B*3915								
B*3916								
B*3917								
B*3918								
B*3919								
B*3920								
B*3922								
B*3923								
B*3924								
B*3925N								
B*3926								
B*3927								
B*3928								
B*3929								
B*3930								
B*3931								
B*3932								
B*400101								
B*400102								
B*400103								
B*400104								
B*400105								
B*400201								
B*400202								



5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T9		T10		T11		T12		T13		T14		T15		T16		T17		T18			
	44	45	44	45	44	45	44	45	44	45	44	45	44	45	44	45	44	45	44	45		
B*070201																					np	
B*070202																						np
B*070203																						np
B*070204																						np
B*0703																						np
B*0704																						np
B*0705																						np
B*0706																						np
B*0707																						np
B*0708																						np
B*0709																						np
B*0710																						np
B*0711																						np
B*0712																						np
B*0713																						np
B*0714																						np
B*0715																						np
B*0716																						np
B*0717																						np
B*0718																						np
B*0719																						np
B*0720																						np
B*0721																						np
B*0722																						np
B*0723																						np
B*0724																						np
B*0725																						np
B*0726																						np
B*0727																						np
B*0728																						np
B*0729																						np
B*0730																						np
B*0731																						np
B*0732																						np

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18								
	58	60	49	53	44	44	54	np	np	np	np	np	48	58	48	np	np	np	51	57	51	np	np	np	58	48	np	np	np	np	58	47	58
B*1308																																	
B*1309																																	
B*1310																																	
B*1311																																	
B*1312																																	
B*1313																																	
B*1401																																	
B*1402																																	
B*1403																																	
B*1404																																	
B*1405																																	
B*140601																																	
B*140602																																	
B*15010102N																																	
B*15010101																																	
B*150102																																	
B*150103																																	
B*150105																																	
B*150104																																	
B*1502																																	
B*1503																																	
B*1504																																	
B*1505																																	
B*1506																																	
B*1507																																	
B*1508																																	
B*1509																																	
B*1510																																	
B*151101																																	
B*151102																																	
B*1512																																	
B*1513																																	
B*1514																																	
B*1515																																	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18					
	58	60	49	53	44	54	np	np	np	np	np	np	58	48	58	51	57	51	np	np	np	58	48	np	np	np	np	58	47	np
B*1516																														
B*151701																														
B*151702																														
B*1518																														
B*1519																														
B*1520																														
B*1521																														
B*1523																														
B*1524																														
B*1525																														
B*1526N																														
B*1527																														
B*1528																														
B*1529																														
B*1530																														
B*1531																														
B*1532																														
B*1533																														
B*1534																														
B*1535																														
B*1536																														
B*1537																														
B*1538																														
B*1539																														
B*1540																														
B*1542																														
B*1543																														
B*1544																														
B*1545																														
B*1546																														
B*1547																														
B*1548																														
B*1549																														
B*1550																														

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

T9	T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18			B*		
	58	60	49	53	44	54	np	np	58	48	np	61	52	np	60	55	48	58	68	57	51	np	np	np	np	np	np		np	np
																														B*1551
																														B*1552
																														B*1553
																														B*1554
																														B*1555
																														B*1556
																														B*1557
																														B*1558
																														B*1560
																														B*1561
																														B*1562
																														B*1563
																														B*1564
																														B*1565
																														B*1566
																														B*1567
																														B*1568
																														B*1569
																														B*1570
																														B*1571
																														B*1572
																														B*1573
																														B*1574
																														B*1575
																														B*1576
																														B*1577
																														B*1578
																														B*1579N
																														B*1580
																														B*1581
																														B*1582
																														B*1583
																														B*1584
																														B*1587

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18						
	58	60	49	53	44	np	45	np	np	48	58	np	61	52	np	55	60	55	48	58	68	57	51	np	58	48	np		58	47	np
B*1588																															
B*1589																															
B*1592																															
B*1593																															
B*1594N																															
B*180102																															
B*180101																															
B*1802																															
B*1803																															
B*1804																															
B*1805																															
B*1806																															
B*1807																															
B*1808																															
B*1809																															
B*1810																															
B*1811																															
B*1812																															
B*1813																															
B*1814																															
B*1815																															
B*1817N																															
B*1818																															
B*1819																															
B*1820																															
B*2701																															
B*2702																															
B*2703																															
B*2704																															
B*270505																															
B*270506																															
B*270502																															
B*270503																															
B*270504																															

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T19	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	
B*270507											np
B*2706											np
B*2707											np
B*2708											np
B*2709											np
B*2710											np
B*2711											np
B*2712											np
B*2713											np
B*2714											np
B*2715											np
B*2716											np
B*2717											np
B*2718											np
B*2719											np
B*2720											np
B*2721											np
B*2723											np
B*2724											np
B*2725											np
B*350101											np
B*350102											np
B*3502											np
B*3503											np
B*3504											np
B*3505											np
B*3506											np
B*3507											np
B*3508											np
B*350901											np
B*350902											np
B*3510											np
B*3511											np
B*3512											np

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T9			T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18		
	58	60	49	53	44	np	np	45	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np
B*3513																														
B*351401																														
B*351402																														
B*3515																														
B*3516																														
B*3517																														
B*3518																														
B*3519																														
B*3520																														
B*3521																														
B*3522																														
B*3523																														
B*3524																														
B*3525																														
B*3526																														
B*3527																														
B*3528																														
B*3529																														
B*3530																														
B*3531																														
B*3532																														
B*3533																														
B*3534																														
B*3535																														
B*3536																														
B*3537																														
B*3538																														
B*3539																														
B*3540N																														
B*3541																														
B*3542																														
B*3543																														
B*3544																														
B*3545																														

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA G

	T9			T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18									
	58	60	49	53	44	45	np	np	np	51	57	62	44	54	np	60	60	55	48	58	68	57	51	np	np	np	np	48	58	np	np	np	np	58	47	58	
B*3546																																					
B*3547																																					
B*3548																																					
B*3549																																					
B*3550																																					
B*3551																																					
B*3552																																					
B*3553N																																					
B*3701																																					
B*3702																																					
B*3703N																																					
B*3704																																					
B*3705																																					
B*3706																																					
B*3707																																					
B*3801																																					
B*380201																																					
B*380202																																					
B*3803																																					
B*3804																																					
B*3805																																					
B*3806																																					
B*3807																																					
B*3808																																					
B*3809																																					
B*3810																																					
B*390101																																					
B*390103																																					
B*390104																																					
B*390201																																					
B*390202																																					
B*3903																																					
B*3904																																					
B*3905																																					

TABLA 6

	T9				T10				T11				T12				T13				T14				T15				T16				T17				T18			
	44	45	49	53	51	57	62	64	44	54	55	48	52	61	60	55	48	58	58	57	51	51	51	51	48	58	48	58	48	58	48	58	47	58	47	58				
B*4003																																								
B*4004																																								
B*4005																																								
B*4006101																																								
B*4006102																																								
B*4007																																								
B*4008																																								
B*4009																																								
B*4010																																								
B*4011																																								
B*4012																																								
B*4013																																								
B*401401																																								
B*401402																																								
B*401403																																								
B*4015																																								
B*4016																																								
B*4018																																								
B*4019																																								
B*4020																																								
B*4021																																								
B*4022N																																								
B*4023																																								
B*4024																																								
B*4025																																								
B*4026																																								
B*4027																																								
B*4028																																								
B*4029																																								
B*4030																																								
B*4031																																								
B*4032																																								
B*4033																																								
B*4034																																								

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 6

	T18	T17	T16	T15	T14	T13	T12	T11	T10	T9	
B*44020102S	np										58
B*4402101	np										60
B*440202	np										49
B*440203	58										53
B*440301	47										44
B*440302	68										62
B*4404	np										57
B*4405	np										51
B*4406	np										61
B*4407	48	np									np
B*4408	np	np									48
B*4409	np	np									58
B*4410	np	np									np
B*4411	np	np									52
B*4412	np	np									61
B*4413	np	np									np
B*4414	np	np									55
B*4415	np	np									60
B*4416	np	np									np
B*4417	np	np									52
B*4418	np	np									61
B*4419N	np	np									np
B*4420	np	np									55
B*4421	np	np									60
B*4422	np	np									np
B*4423N	np	np									52
B*4424	np	np									61
B*4425	np	np									np
B*4426	np	np									48
B*4427	np	np									58
B*4428	np	np									np
B*4429	np	np									54
B*4430	np	np									44
B*4431	np	np									62

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

T9	T10			T11			T12			T13			T14			T15			T16			T17			T18												
	58	60	49	53	44	np	np	np	np	45	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np	np							
B*4432																																					
B*4433																																					
B*4434																																					
B*4435																																					
B*4436																																					
B*4437																																					
B*4438																																					
B*4439																																					
B*4440																																					
B*4501																																					
B*4502																																					
B*4503																																					
B*4504																																					
B*4505																																					
B*4506																																					
B*4507																																					
B*4601																																					
B*4602																																					
B*4603																																					
B*4604																																					
B*470101																																					
B*470102																																					
B*4702																																					
B*4703																																					
B*4704																																					
B*4801																																					
B*4802																																					
B*4803																																					
B*4804																																					
B*4805																																					
B*4806																																					
B*4807																																					
B*4808																																					
B*4809																																					

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

	T9		T10		T11		T12		T13		T14		T15		T16		T17		T18			
	np	44	np	44	np	44	np	48	np	51	np	52	np	55	np	57	np	48	np	58		np
B*4810																						
B*4901																						
B*4902																						
B*4903																						
B*5001																						
B*5002																						
B*5004																						
B*510105																						
B*510101																						
B*510102																						
B*510103																						
B*510104																						
B*510201																						
B*510202																						
B*5103																						
B*5104																						
B*5105																						
B*5106																						
B*5107																						
B*5108																						
B*5109																						
B*5110																						
B*5111N																						
B*5112																						
B*511301																						
B*511302																						
B*5114																						
B*5115																						
B*5116																						
B*5117																						
B*5118																						
B*5119																						
B*5120																						
B*5121																						

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 6

T9	T10				T11				T12				T13				T14				T16				T17				T18							
	58	60	49	53	44	45	np	np	np	np	np	np	48	58	np	np	52	np	61	np	55	48	58	68	51	57	68	np	np	np	48	np	np	np	47	58
B*5402																																				
B*5501																																				
B*5502																																				
B*5503																																				
B*5504																																				
B*5505																																				
B*5507																																				
B*5508																																				
B*5509																																				
B*5510																																				
B*5511																																				
B*5512																																				
B*5513																																				
B*5514																																				
B*5515																																				
B*5516																																				
B*5601																																				
B*5602																																				
B*5603																																				
B*5604																																				
B*560501																																				
B*560502																																				
B*5606																																				
B*5607																																				
B*5608																																				
B*5609																																				
B*5610																																				
B*5611																																				
B*5612																																				
B*5613																																				
B*5614																																				
B*570101																																				
B*570102																																				
B*5702																																				

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la genotipificación de los alelos del locus B del antígeno leucocitario humano (“human leukocyte antigen B”, HLA-B) a partir de una muestra de ácido nucleico, que comprende los pasos de:

(i) amplificar el ácido nucleico de la muestra mediante la reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”, PCR) en tiempo real y con cebadores adecuados;

10 (ii) detectar señales de fluorescencia mediante sondas marcadas con un marcador fluorescente, después de la amplificación llevada a cabo en el paso (i), y analizar las temperaturas de fusión de las secuencias amplificadas de ácidos nucleicos; y

15 (iii) comparar más de una señal detectada en el paso (ii) con un patrón de fluorescencia definido experimentalmente; habiendo sido establecido dicho patrón mediante una definición inicial basada en la comparación teórica de las secuencias de las sondas del paso (ii) con las secuencias de los diferentes alelos del locus B, seguido de una definición definitiva basada en una determinación experimental de cuales de las señales son realmente positivas para cada temperatura de fusión (cuadrados negros en Tabla 6) y cuales son realmente negativas para cada temperatura de fusión (cuadrados blancos en Tabla 6);

20 donde los pasos (i), (ii) y (iii) se realizan para cada recipiente de una batería de recipientes y los cebadores para dicha batería comprenden los cebadores con secuencias SEQ ID NO: 15-19.

25 2. Método según la reivindicación 1, donde las sondas para la batería de recipientes comprenden las sondas con secuencias SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 40-50.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la batería de recipientes además comprende uno o más de los recipientes segundos siguientes, cada recipiente comprendiendo los cebadores indicados:

30 recipiente 1: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 1-3;

recipiente 2: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 10-12;

recipiente 3: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 13-14;

35 recipiente 4: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 4-7;

recipiente 5: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 22-23;

40 recipiente 6: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 20-21.

4. Método según la reivindicación 3, donde cada uno de los mencionados recipientes segundos comprende además las sondas indicadas:

45 recipiente 1: sondas con secuencias SEQ ID NO: 32-33, o bien

recipiente 1: sondas con secuencias SEQ ID NO: 38-39;

recipiente 2: sondas con secuencias SEQ ID NO: 40-41;

50 recipiente 3: sondas con secuencias SEQ ID NO: 32-33;

recipiente 4: sondas con secuencias SEQ ID NO: 34-35;

55 recipiente 5: sondas con secuencias SEQ ID NO: 33 y SED ID NO: 51;

recipiente 6: sondas con secuencias SEQ ID NO: 42-43.

60 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la batería de recipientes además comprende uno o más de los recipientes terceros siguientes, cada recipiente comprendiendo los cebadores indicados:

recipiente 7: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 8-9;

recipiente 8: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 24-25;

65 recipiente 9: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 26-27;

recipiente 10: cebadores con secuencias SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 27.

ES 2 276 630 A1

6. Método según la reivindicación 5, donde cada uno de los mencionados recipientes terceros comprende además las sondas indicadas:

5 recipiente 7: sondas con secuencias SEQ ID NO: 36-37;

recipiente 8: sondas con secuencias SEQ ID NO: 46-47;

recipiente 9: sondas con secuencias SEQ ID NO: 36-37;

10 recipiente 10: sondas con secuencias SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 50.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dos cebadores para el gen de la β -globina con SEQ ID NO: 28-29 se añaden como control en el paso (i).

15 8. Método según la reivindicación 7, donde además se añaden las sondas con secuencias SEQ ID NO: 52-53 para detectar la amplificación del gen de la β -globina.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dos cebadores para el gen SCYA4 con SEQ ID NO: 30-31 se añaden como control en el paso (i).

20

10. Método según la reivindicación 9, donde además se añaden las sondas con secuencias SEQ ID NO: 54-55 para detectar la amplificación del gen SCYA4.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde las sondas están marcadas fluorescentemente con fluorocromos del tipo marcador donador-marcador aceptor (“donor label-acceptor label”) que dan lugar al fenómeno de transferencia de energía FRET.

25

12. Kit para la genotipificación de los alelos del locus B del antígeno leucocitario humano (“human leukocyte antigen B”, HLA-B) a partir de una muestra de ácido nucleico, mediante el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende el patrón de fluorescencia, los cebadores y las sondas, tal y como se definen en cada una de las reivindicaciones 1-11.

30

35

40

45

50

55

60

65

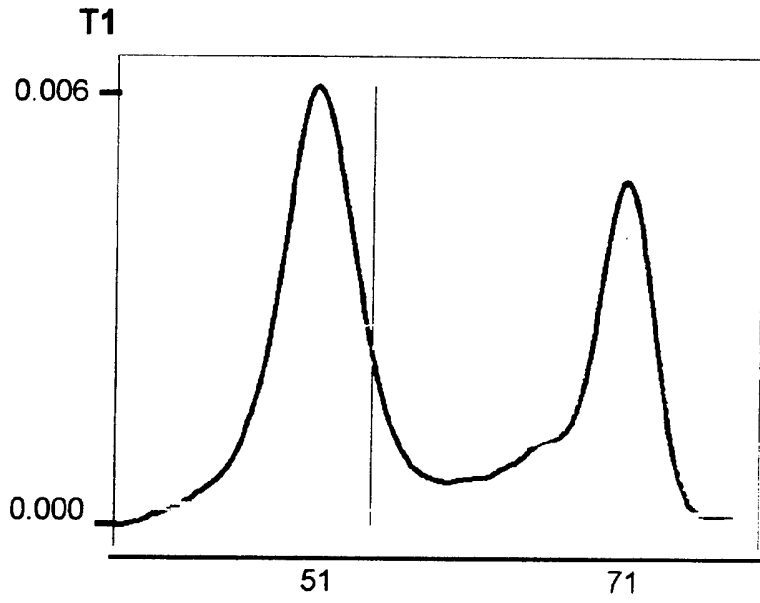
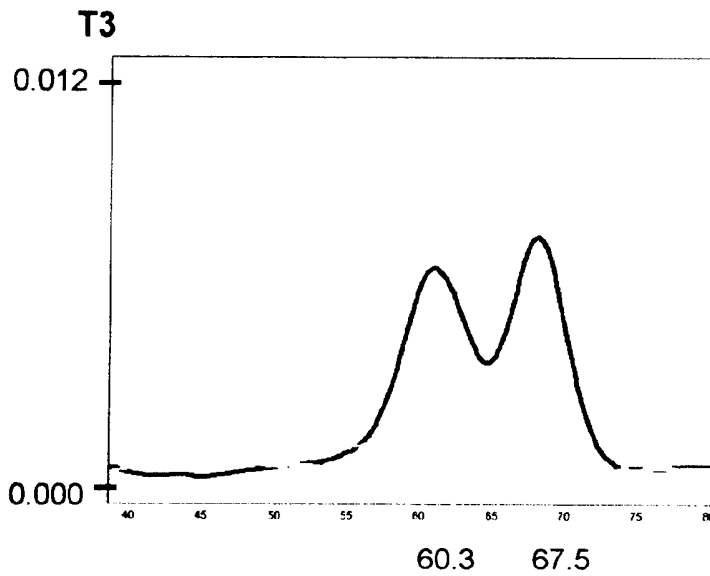
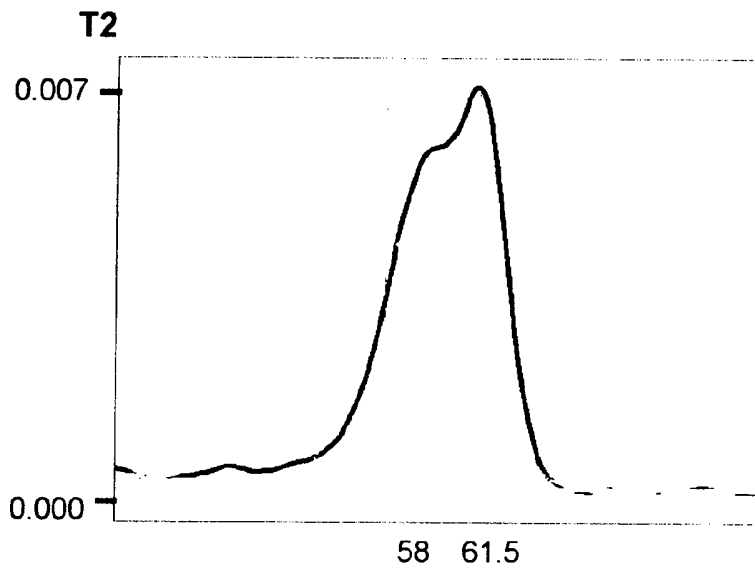
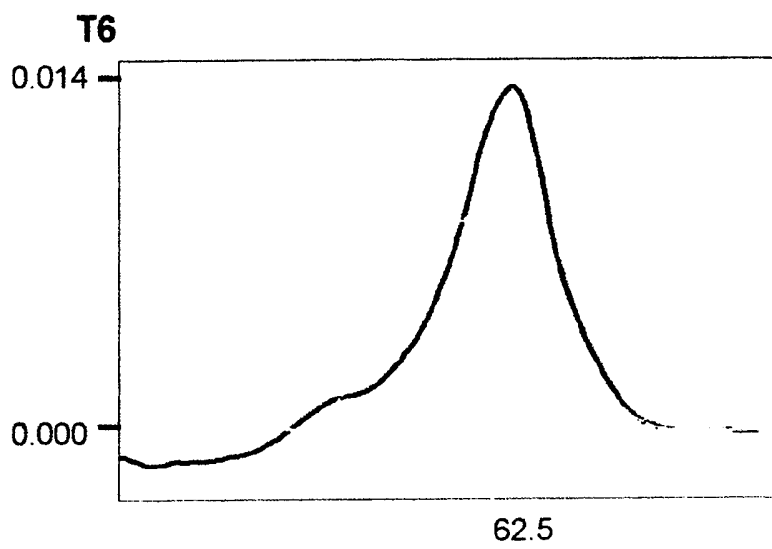
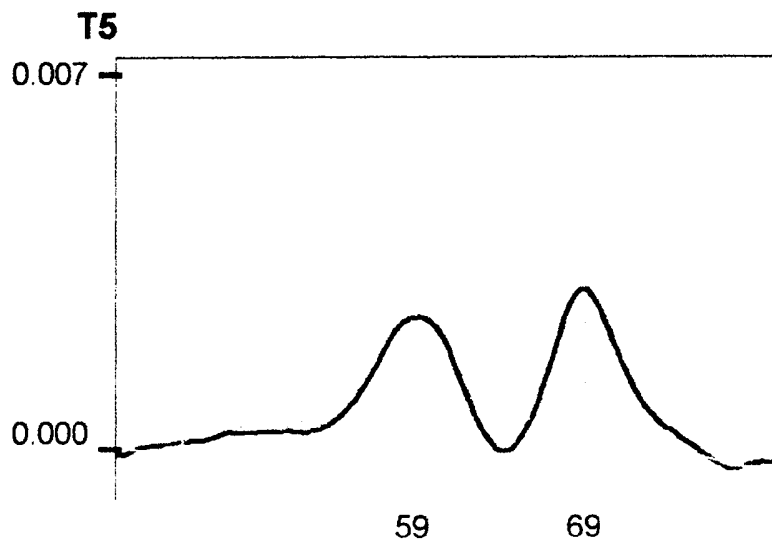
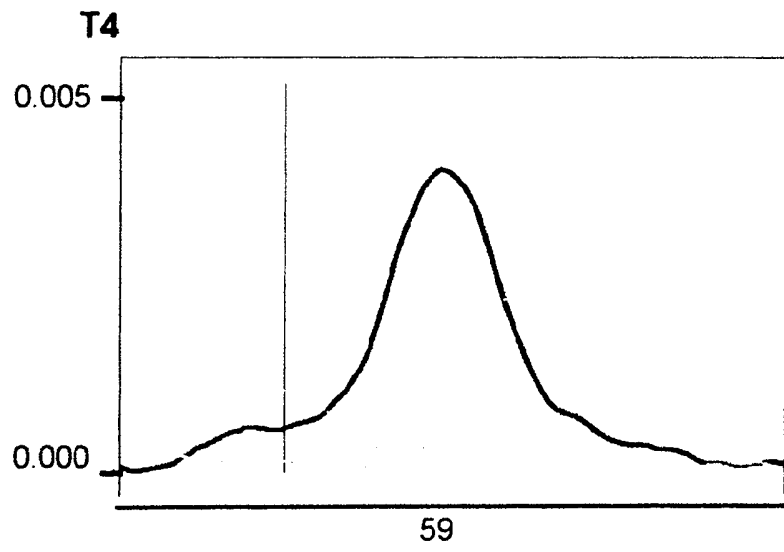
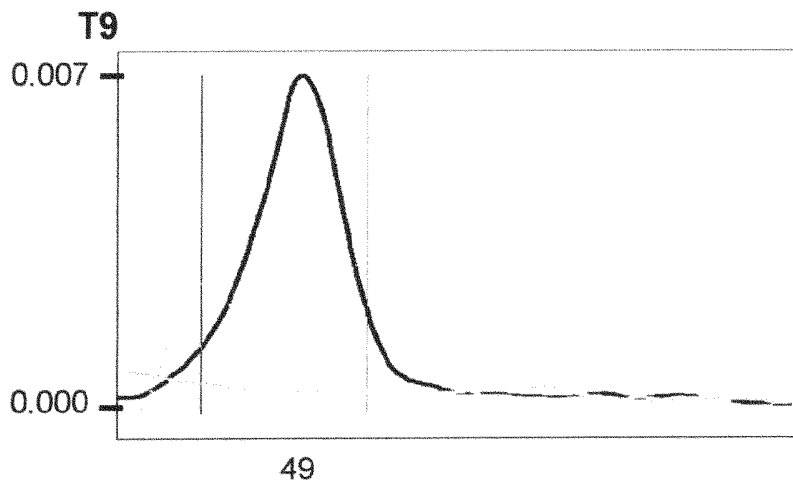
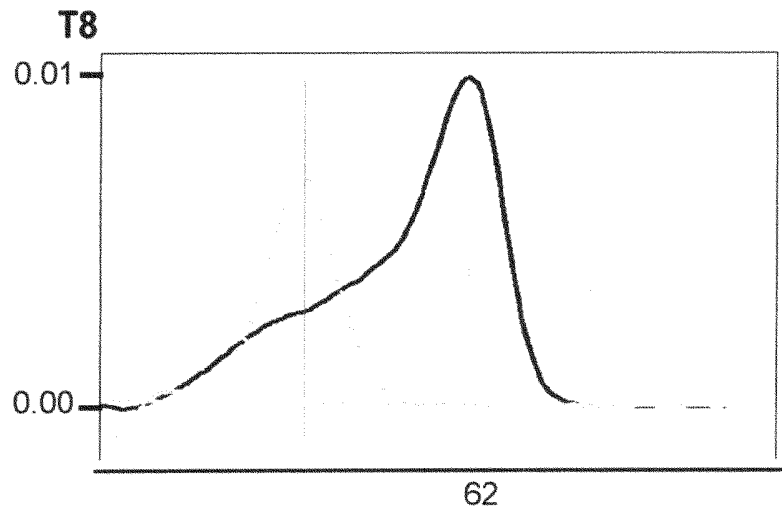
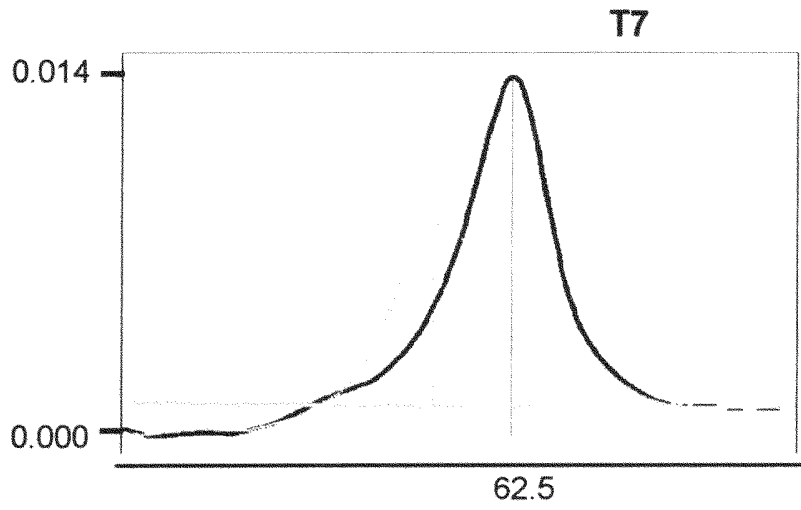
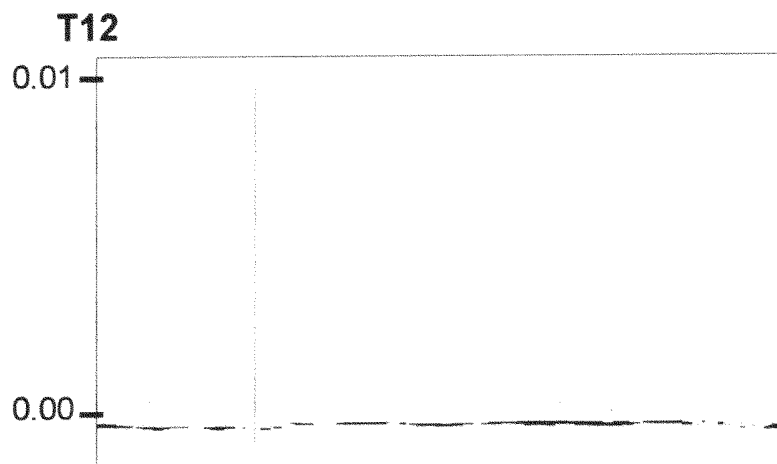
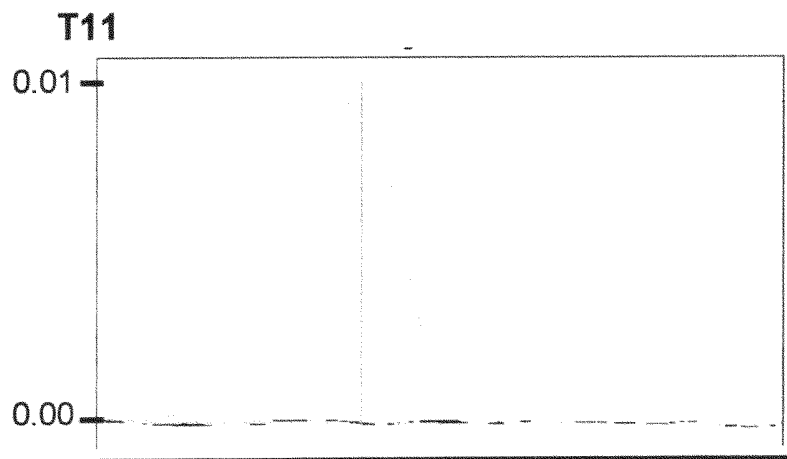
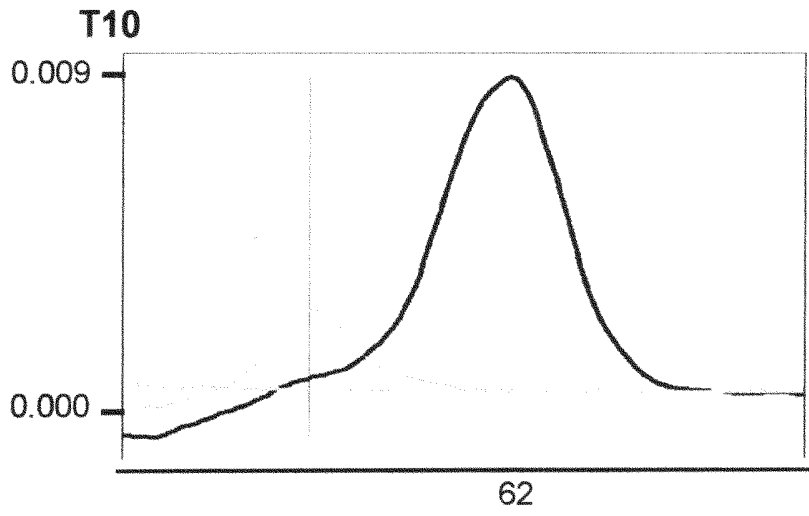


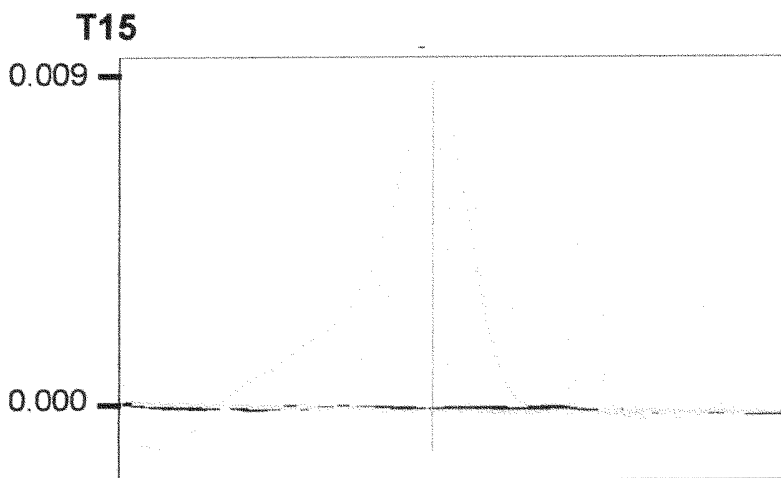
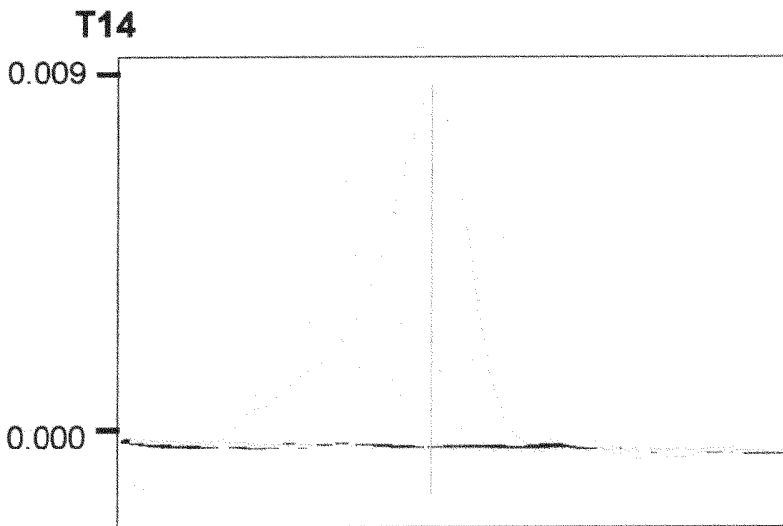
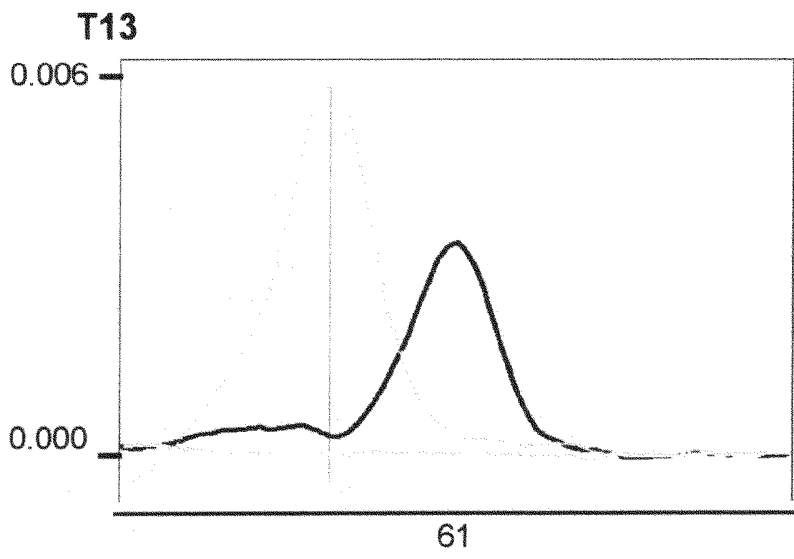
FIG. 1

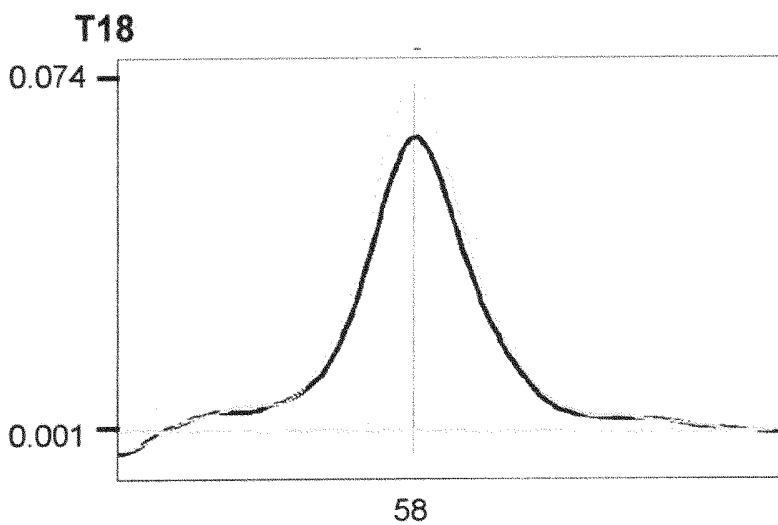
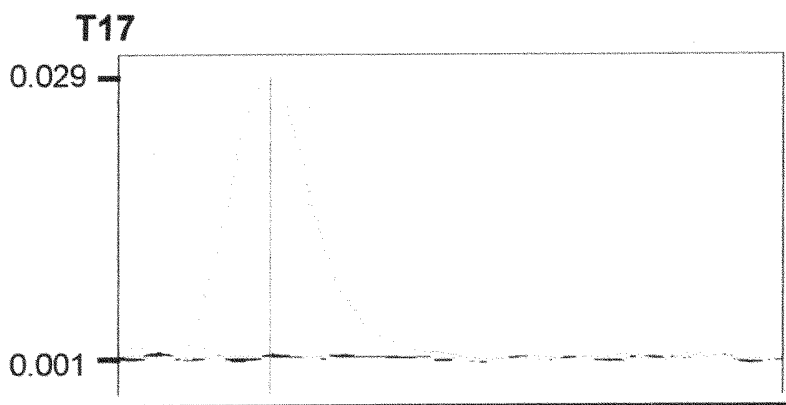
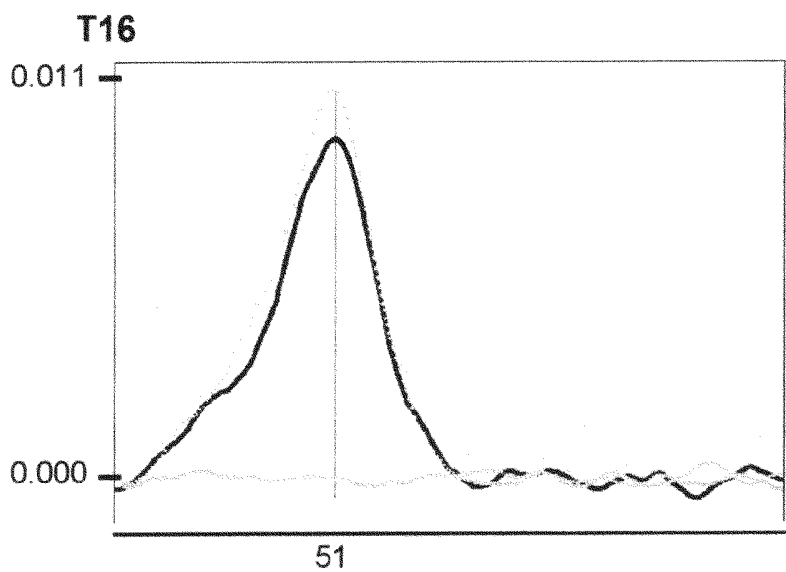












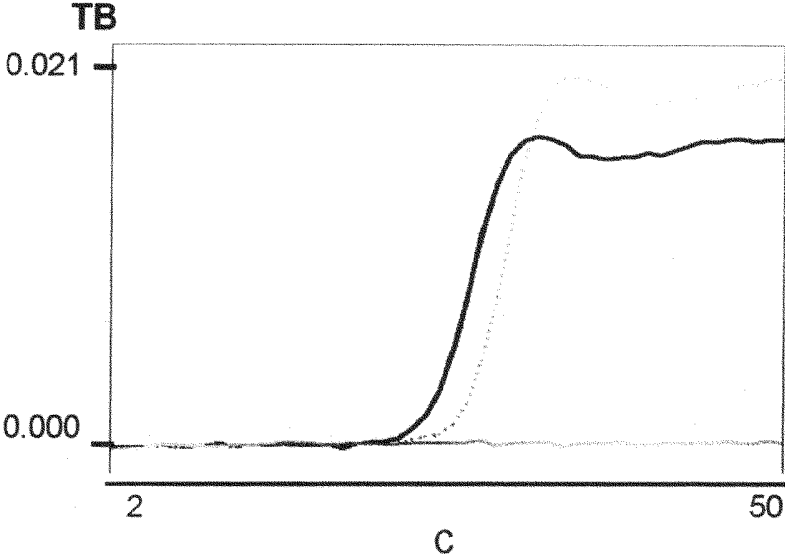


FIG.2A

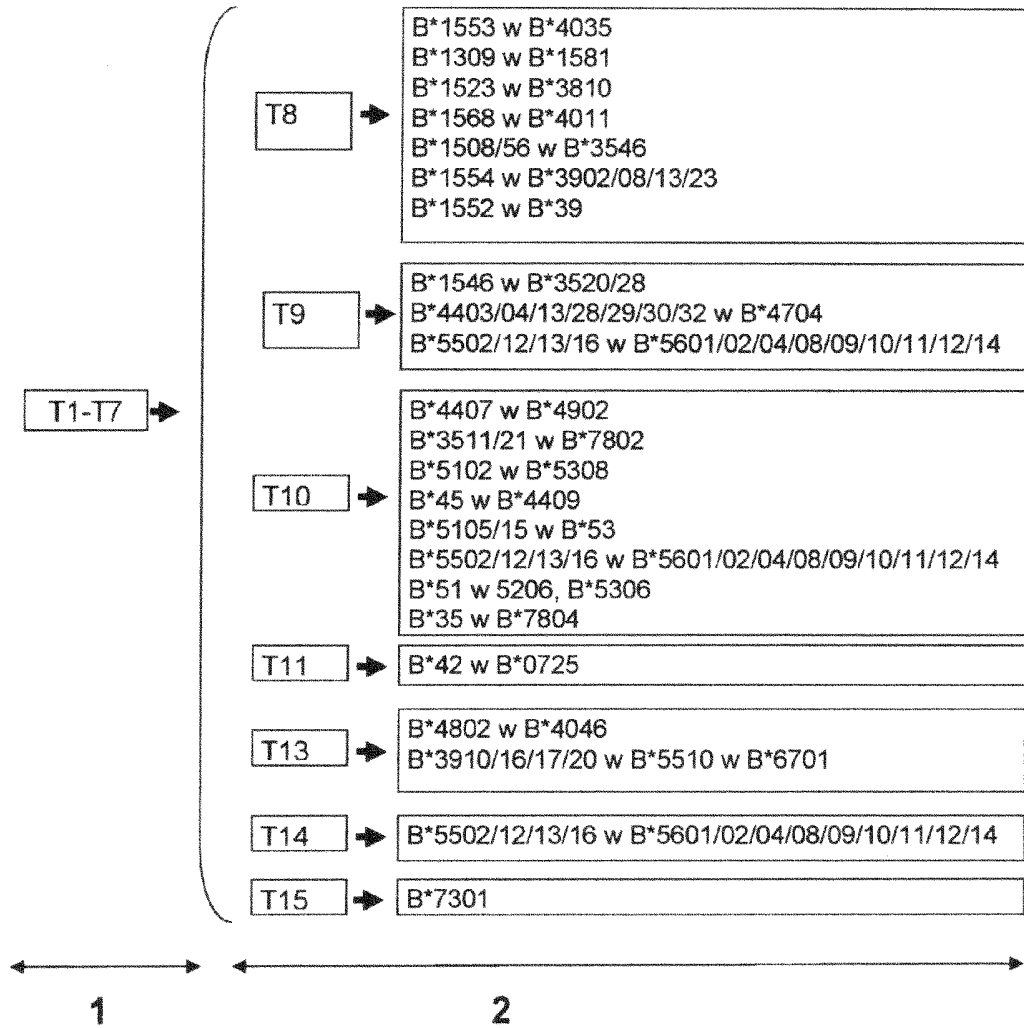
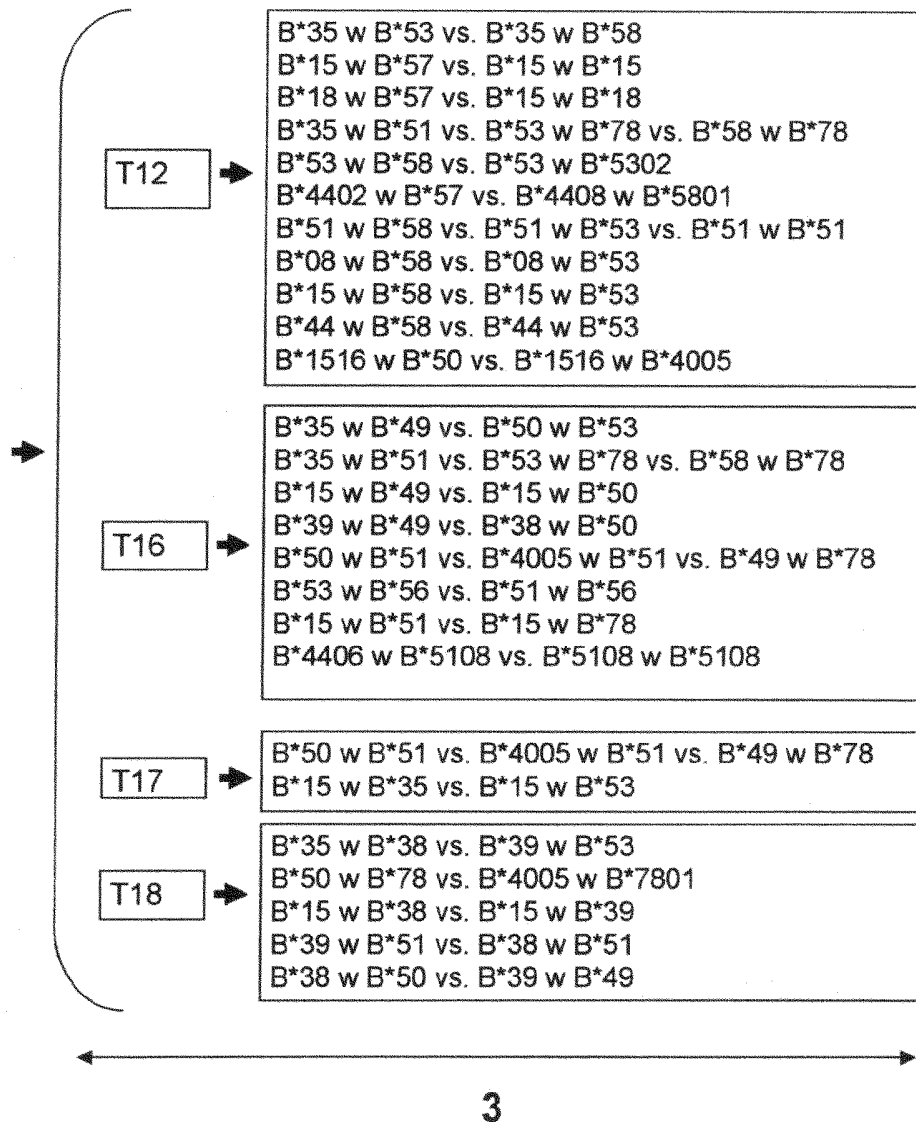


FIG. 2B



ES 2 276 630 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universitat Autònoma de Barcelona / Banc de Sang i de Teixits

5 <120> Método y kit para la genotipificación de HLA-B basados en la PCR en tiempo real

<130> P612ES00 HLA-B

10 <140> --

<141> 2005-12-13

<160> 55

15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20

<211> 17

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 1

gccagggtct cacaccc

17

30 <210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 2

cggcggtcca ggagct

16

40

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 3

50

ccgcggtcca ggagct

16

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

55

60

<400> 4

ggagccccgc ttcatt

17

65

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

ES 2 276 630 A1

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
5	ggtcagtctg tgtgttgg	19
	<210> 6	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 6	
	cggtaagtct gtgtttgg	20
20	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 7	
	ggtaagtccg tgtgttgg	19
30	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
40	aggtatttct acaccgcca	19
	<210> 9	
	<211> 17	
45	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
50	cggtaagtct gcgcgga	17
	<210> 10	
55	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 10	
	gtccagggtc tcacacttg	19
65	<210> 11	
	<211> 17	
	<212> DNA	

ES 2 276 630 A1

	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 11</i>	
5	agccactcca cgcacag	17
	<i><210> 12</i>	
10	<i><211> 16</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
15	<i><400> 12</i>	
	gcccctccac gcacag	16
20	<i><210> 13</i>	
	<i><211> 19</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
25	<i><400> 13</i>	
	gtctcacacc ctccagagc	19
30	<i><210> 14</i>	
	<i><211> 15</i>	
	<i><212> DNA</i>	
35	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 14</i>	
40	gcgcgctcca gcttg	15
	<i><210> 15</i>	
	<i><211> 22</i>	
45	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 15</i>	
50	gggaggagcg aggggaccsc ag	22
	<i><210> 16</i>	
55	<i><211> 17</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
60	<i><400> 16</i>	
	tmcgtggggg atgggga	17
65	<i><210> 17</i>	
	<i><211> 16</i>	
	<i><212> DNA</i>	

ES 2 276 630 A1

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
5	egcctcctec gcgggc	16
	<210> 18	
10	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 18	
	ggaggccatc cccggcgacc tat	23
20	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 19	
	ccctgaacga ggacctga	18
30	<210> 20	
	<211> 17	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
40	ggagccccgc ttcatca	17
	<210> 21	
	<211> 17	
45	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21	
50	ctgtgccttg gccttgc	17
	<210> 22	
55	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 22	
	ccgggtctca cacttgg	17
65	<210> 23	
	<211> 17	
	<212> DNA	

ES 2 276 630 A1

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
5	agccactcca cgcacgt	17
	<210> 24	
10	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 24	
	cacacagact taccgagaga a	21
20	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 25	
	gccatacacc gtctgcaaa	19
30	<210> 26	
	<211> 18	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 26	
40	ggctacgtgg acgacacc	18
	<210> 27	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27	
50	gctctggttg tagtagcgga	20
	<210> 28	
55	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 28	
	acacaactgt gttcactagc	20
65	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	

ES 2 276 630 A1

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	
5	caacttcac cagttcacc	20
	<210> 30	
10	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 30	
	gcagaggaag atgcctacca c	21
20	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 31	
	ggcagaggaa gatgcaaag	19
30	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 32	
	cgcgataac cagttcgct	20
40	<210> 33	
	<211> 24	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 33	
50	cgacggcaag gattacatcg ccct	24
	<210> 34	
	<211> 17	
55	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 34	
	gccggaatat tgggacc	17
65	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> DNA	

ES 2 276 630 A1

	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 35</i>	
5	gccgtggata gagcaggagg	20
	<i><210> 36</i>	
10	<i><211> 20</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
15	<i><400> 36</i>	
	tgaggttcga cagcgagcc	20
	<i><210> 37</i>	
20	<i><211> 17</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
25	<i><400> 37</i>	
	gagtccgagg atggcgc	17
30	<i><210> 38</i>	
	<i><211> 19</i>	
	<i><212> DNA</i>	
35	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 38</i>	
40	cagaggatgt acggctgcg	19
	<i><210> 39</i>	
	<i><211> 15</i>	
45	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 39</i>	
50	cgtggggccg gacgg	15
	<i><210> 40</i>	
55	<i><211> 19</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
60	<i><400> 40</i>	
	ccggtgaggc ggagcagct	19
65	<i><210> 41</i>	
	<i><211> 23</i>	
	<i><212> DNA</i>	

ES 2 276 630 A1

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 41	
5	agagcctacc tggagggcct gtg	23
	<210> 42	
10	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 42	
	gctacgtgga cgacaccag t	21
20	<210> 43	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 43	
	cgtgaggttc gacagcgacg ccg	23
30	<210> 44	
	<211> 18	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 44	
40	cactgcgatg aagcgggg	18
	<210> 45	
	<211> 24	
45	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 45	
50	gcaactgggt gtcgtccacg tagc	24
	<210> 46	
55	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 46	
	ggaacctgcg ccctactac aacca	25
65	<210> 47	
	<211> 24	
	<212> DNA	

ES 2 276 630 A1

	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 47</i>	
5	agcgaggccg gtgagtgacc ccgg	24
	<i><210> 48</i>	
10	<i><211> 21</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
15	<i><400> 48</i>	
	gtgtgttggc cttgaagatc t	21
	<i><210> 49</i>	
20	<i><211> 21</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
25	<i><400> 49</i>	
	gtgttccggt cccaatactc c	21
30	<i><210> 50</i>	
	<i><211> 19</i>	
	<i><212> DNA</i>	
35	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 50</i>	
40	cgagtccgag agaggagcc	19
	<i><210> 51</i>	
	<i><211> 20</i>	
45	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
	<i><400> 51</i>	
50	gggcatgacc agtacgcctv	20
	<i><210> 52</i>	
55	<i><211> 29</i>	
	<i><212> DNA</i>	
	<i><213> Homo sapiens</i>	
60	<i><400> 52</i>	
	aagtctgccg ttactgcctt gtggggcaa	29
65	<i><210> 53</i>	
	<i><211> 35</i>	
	<i><212> DNA</i>	

ES 2 276 630 A1

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

5 caaacagaca ccatggtgca cctgactcct gagga 35

<210> 54

10 <211> 26

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 54

tcagcacaga cttgcttget tctttt 26

20 <210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 55

tttggatct gtagaacaag gag 23

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 276 630

⑫ Nº de solicitud: 200503110

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 13.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FANER, R., et al.: "HLA-B27 Genotyping by Fluorescent Resonance Emission Transfer (FRET) Probes in Real-Time PCR". HUMAN IMMUNOL., vol. 65 (8): 826-838, agosto 2004. Ver todo el documento.	1-8,11,12
X	WO 2005059505 A2 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA) 30.06.2005. Ver todo el documento.	1-8,11,12 9,10
Y		
Y	BAST, G.: FOCIS Abstract Supplement. CLINICAL IMMUNOL., Supplement 1, páginas S3-S282, abril 2005. Ver página S206.	9,10
A	US 5334499 A (BURDICK, B.A.; EKEZE, T.D.) 02.08.1994. Ver columna 12, líneas 5-49, en especial las líneas 33-35.	7
P,X	FANER, R., et al.: Real-Time PCR Using Fluorescent Resonance Emission Transfer Probes for HLA-B Typing". HUMAN IMMUNOL., vol. 67: 374-385, abril-mayo 2006. Ver todo el documento.	1-12
A	WO 2005059174 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA) 30.06.2005. Ver todo el documento.	1-12
A	NEOH, S-H. et al.: Rapid Detection of the Factor V Leiden (1691G>A) and Haemochromatosis (845G>A) Mutation by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) and Real Time PCR". J. CLIN. PATHOL., vol. 52: 766-769, 1999. Ver todo el documento.	1-12 ce
A	PRADEAU, K., et al.: "Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Quantitation of Human Cytomegalovirus and Herpesvirus-6 in Polymorphonuclear and Mononuclear Cells of Transplant Recipients". J. VIROL. METHODS, vol. 132: 77-84, accesible on line 21.11.2005. Ver todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.04.2007

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/1