(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 351 686**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00914181 .3**
(96) Fecha de presentación : **05.04.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1173610**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

(54) Título: **Método para la amplificación de alelos HLA de clase I.**

(30) Prioridad: **09.04.1999 EP 99870068**
11.06.1999 US 138614 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.02.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.02.2011

(73) Titular/es: **INNOGENETICS N.V.**
Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4
9052 Ghent, BE

(72) Inventor/es: **De Canck, Ilse;**
Rombout, Annelies y
Rossau, Rudi

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método para la amplificación de alelos HLA de clase I.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para el tipado o subtipado de HLA-A. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A.

Antecedentes de la invención

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano está contenido en alrededor de 4 Mpb de ADN en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3 (Campbell y Trowsdale, 1993). El MHC humano se divide en las regiones de clase I, clase II y clase III. Los genes de clase I y clase II codifican moléculas de la superficie celular muy polimórficas que se unen y presentan antígenos procesados en forma de péptidos a linfocitos T, iniciando respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales.

Las moléculas de clase I del MHC humano, HLA-A, -B, y -C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glucoproteínas de la superficie celular que se unen y presentan péptidos procesados derivados de proteínas endógenamente sintetizadas a células T CD8+. Estos heterodímeros consisten en una cadena α codificada por HLA asociada con un polipéptido monomórfico no codificado por MHC, β_2-microglobulina (Townsend y Bodmer, 1989; Spencer y Parham, 1996). Las moléculas de clase II del MHC humano están codificadas en la región de HLA-D. Estas glucoproteínas de la superficie celular consisten en una cadena α y β codificada por HLA, asociada con heterodímeros sobre la superficie celular de células que presentan antígenos, tales como células B y macrófagos. Las moléculas de clase II sirven como receptores para péptidos procesados. Sin embargo, estos péptidos derivan predominantemente de proteínas membránicas y extracelulares, y se presentan a células T CD4+. La región de HLA-D contiene varios genes de clase II, y tiene tres subregiones principales: HLA-DR, -DQ, y -DP. Tanto las regiones HLA-DQ como -DP contienen un gen funcional para cada una de sus cadenas α y β. La subregión de HLA-DR contiene un gen funcional para la cadena α; el número de genes funcionales para la cadena β varía de uno a dos según el haplotipo (Andersson *et al*., 1987: Apple y Erlich, 1996).

Existe un amplio polimorfismo en la mayoría de los locus. A la vista de la importancia biológica y médica de estos antígenos, se requiere una técnica rápida y muy sensible para el tipado de HLA. Actualmente se usa una variedad de técnicas para detectar el polimorfismo de HLA, incluyendo el reconocimiento serológico, bioquímico, de células T y, más recientemente, métodos biológicos moleculares.

La serología sigue siendo el método de sostén para el tipado de HLA - especialmente para clase I - para muchos laboratorios de histocompatibilidad rutinarios. El microensayo de linfocitotoxicidad (Kissmeyer *et al*., 1969; Terasaki y McClelland, 1964) es el enfoque estándar: se mezclan células mononucleares de sangre periférica (clase I) viables o células B separadas (clase II) con antisueros (policlonales o monoclonales) de especificidad por HLA conocida.

La detección del polimorfismo se puede lograr observando la diferente composición de aminoácidos de las moléculas de HLA mediante técnicas bioquímicas tales como el enfoque isoeléctrico unidimensional (IEF; Yang, 1987). Este método se basa en sustituciones de aminoácidos que contribuyen a cambios en la carga de la molécula de HLA.

Otro método de tipado de HLA es la reacción linfocitaria mixta (MLR). Concurrente con las observaciones realizadas usando antisueros específicos de HLA, se observó que los linfocitos procedentes de dos fuentes no relacionadas, cuando se mezclan en cultivo, proliferan (Hirschom *et al*., 1963).

El análisis de las especificidades de HLA a partir de ADN proporcionó un nuevo enfoque para definir sus diferencias polimórficas. En lugar de fijarse en las diferencias en la molécula expresada, el polimorfismo se caracteriza a nivel nucleotídico.

Un desarrollo importante y poderoso en el campo de la biología molecular ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis *et al*., 1986; Mullis y Faloona, 1987). En el tipado tisular, la PCR se usa para amplificar las regiones polimórficas de genes de HLA. Este producto de la PCR de HLA se puede analizar entonces en busca de sus diferencias polimórficas, para establecer el tipo de tejido. Se ha desarrollado un número de tales enfoques, incluyendo el análisis de heterodúplex de productos de la PCR (Clay *et al*., 1994), el análisis de polimorfismo conformacional monocatenario del producto de la PCR (PCR-SSCP; Yoshida *et al*., 1992), el tipado a base de secuencias (SBT; Santamaria *et al*., 1992 y 1993), el uso de cebadores específicos de secuencias en la reacción de PCR (PCR-SSP; Olerup y Zetterquist, 1991), el uso de PCR en combinación con el sondaje oligonucleotídico específico de secuencias (PCR-SSOP; Saiki *et al*., 1986) o el sondaje mediante transferencia de punto inversa (Saiki *et al*., 1989). Estos enfoques, usados de forma individual o en combinación, se han aplicado todos como métodos basados en ADN para el tipado tisular de las especificidades de HLA de clase I y clase II. Los métodos de tipado de ADN se deberían de preferir con respecto a los métodos serológicos con la condición de que esté disponible un método de tipado de ADN fácil, rápido y fiable. Algunas diferencias a nivel de subtipo, que son detectables mediante los métodos de ADN, pueden no ser

detectadas mediante los métodos actuales de tipado serológico, aunque estas diferencias pueden provocar rechazo de haloinjertos (Fleischhauer *et al*., 1990).

El sistema de HLA es el sistema genético humano más polimórfico todavía conocido. Los genes de HLA clase I comparten una estructura similar (desde 5' a 3'): una región de flanqueo no traducida en 5', un primer exón (exón 1) que tiene una longitud de aproximadamente 73 pares de bases, un primer intrón (intrón 1) que tiene una longitud de aproximadamente 130 pares de bases, un segundo exón (exón 2), que tiene una longitud de aproximadamente 250 pares de bases, un segundo intrón (intrón 2), que tiene una longitud de aproximadamente 272 pares de bases, un tercer exón (exón 3), que tiene una longitud de aproximadamente 276 pares de bases, un tercer intrón (intrón 3), que tiene una longitud de aproximadamente 588 pares de bases, y un cuarto exón (exón 4), que tiene una longitud de aproximadamente 276 pares de bases. Las sustituciones polimórficas en los alelos HLA de clase I están mayoritariamente localizados tanto en el exón 2 como en el exón 3, que codifican la ranura de unión a péptidos de la molécula de clase I. Estos polimorfismos hacen una diferenciación entre alelos que se pueden lograr a través de una variedad de técnicas biológicas moleculares, tales como secuenciación o hibridación con sondas relevantes. En los kits de diagnóstico actuales, el exón 2 y el exón 3, se amplifican juntos, dando como resultado amplicones de alrededor de 1 kb, que consisten en al menos el exón 2, el intrón 2 y el exón 3. Existen cebadores específicos del locus para la amplificación de estos amplicones de 1 kb. Sin embargo, tales amplicones grandes son difíciles de amplificar y muestran una formación de estructura secundaria, dando como resultado la hibridación ineficaz de algunas sondas. Además, debido a la aparición de nuevos alelos HLA de clase I, ya no se pueden distinguir ciertas combinaciones alélicas mediante la detección de polimorfismos sólo en el exón 2 y en el exón 3, y se requiere un tipado adicional en el exón 4. Esto provoca la necesidad de la amplificación adicional del exón 4, dando como resultado un amplicón incluso más grande. Por lo tanto, sería deseable una amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4, dando como resultado productos de amplificación que permiten un tipado más eficaz de alelos HLA de clase I. Sin embargo, puesto que los sitios de hibridación a cebadores específicos del locus son escasos y no se pueden encontrar en el exón 2, exón 3 o exón 4, la amplificación separada y específica del locus del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C no es tan evidente.

En los documentos in WO 99/07883, WO 97/23645, WO 98/26091, por ejemplo, se describen métodos y kits para el tipado de HLA-A a base de la amplificación de exones 2 y 3. En los documentos EP-A-0414469, WO 97/23650, WO 97/20197 se describen, por ejemplo, cebadores específicos de HLA-A.

Objetivos de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para la amplificación específica del locus y separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de alelos HLA-A.

Es un objetivo más específico de la presente invención proporcionar un método para una amplificación de una sola etapa, específica del locus, separada de los tres exones, exón 2, exón 3 y exón 4, de HLA-A.

Se describen además aquí cebadores para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C,

cebadores para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C,

cebadores para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C,

un conjunto de cebadores para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C,

un conjunto de cebadores para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C,

un conjunto de cebadores para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C,

una mezcla de cebadores múltiple para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, en una etapa, del exón 2 y del exón 3 de HLA-A, HLA-B o HLA-C,

una mezcla de cebadores múltiple para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, en una etapa, del exón 2 y del exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C,

una mezcla de cebadores múltiple para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, en una etapa, del exón 3 y del exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C,

una mezcla de cebadores múltiple para uso en un método para la amplificación separada, específica del locus, en una etapa, del exón 2, del exón 3 y del exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método mejorado para el tipado o subtipado de uno o más alelos HLA-A en una muestra.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un kit de diagnóstico mejorado para el tipado o subtipado de uno o más alelos HLA-A en una muestra.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un ensayo de sondas en líneas para el tipado o subtipado de uno o más alelos HLA-A en una muestra.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 2, exón 3 y exón 4 de alelos HLA-A, haciendo uso de al menos un primer conjunto de cebadores, en el que:

- para la amplificación del exón 2, el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de HLA-A;

- para la amplificación del exón 3, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de HLA-A, y/o el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 de HLA-A;

- para la amplificación del exón 4, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 de HLA-A.

El método de amplificación descrito aquí hace uso así de un conjunto de cebadores de los cuales al menos uno de los cebadores se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 o en el intrón 3 del gen de HLA de Clase I a fin de obtener la amplificación separada del exón 2 (sin el exón 3 o el exón 4), del exón 3 (sin el exón 2 o el exón 4) y/o del exón 4 (sin el exón 2 o el exón 3).

En el caso en el que se amplifique el exón 2, el cebador inverso se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2, mientras que el cebador directo se puede escoger para que se hibride a una región en dirección 5' del exón 2 (por ejemplo en el intrón 1 o en el exón 1) o a los nucleótidos iniciales del exón 2. En una realización preferida, el cebador directo se hibrida a una región específica del locus en dirección 5' del exón 2 (por ejemplo en el intrón 1 o en el exón 1) o a nucleótidos iniciales específicos del locus del exón 2, y el cebador inverso se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2.

En el caso en el que se amplifique el exón 3, el cebador directo se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2, mientras que el cebador inverso se puede escoger para que se hibride a los nucleótidos finales del exón 3 o en dirección 5' del exón 3 (por ejemplo, en el intrón 3), o el cebador inverso se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 mientras que el cebador directo se puede escoger para que se hibride a una región en dirección 5' del exón 3 (por ejemplo, intrón 2) o a los nucleótidos iniciales del exón 3. En una realización preferida, el exón 3 se amplifica mediante uso de un conjunto de cebadores de los cuales el cebador directo se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2, y el cebador inverso se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3.

En el caso en el que se amplifique el exón 4, el cebador directo se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3, mientras que el cebador inverso se puede escoger para que se hibride a los nucleótidos finales del exón 4 o en dirección 3' del exón 4 (por ejemplo, en el intrón 4). En una realización preferida, el cebador directo se hibrida a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3, mientras que el cebador inverso se hibrida a secuencias diana específicas del locus al final del exón 4 o en dirección 3' del exón 4 (por ejemplo, en el intrón 4).

Este nuevo método de amplificación dará como resultado la amplificación de fragmentos de ADN más cortos, que sólo contienen el exón 2, sólo el exón 3 o sólo el exón 4, que son mucho más fáciles de amplificar y mucho más fáciles para uso en diferentes métodos de tipado, tales como secuenciación o hibridación con diferentes sondas específicas de alelos. De la sección de ejemplos, está claro que los conjuntos de cebadores que contienen un cebador que se hibrida a una secuencia diana en el intrón 2 o en el intrón 3 proporcionan una amplificación mucho mejor y más fácil del exón 2, exón 3 o exón 4 de los alelos HLA de Clase I, y un patrón de hibridación más claro y pronunciado con las sondas de tipado de alelos. Ha sido un mérito definir cebadores específicos que permiten esta amplificación separada del exón 2, exón 3 o exón 4 de sólo un locus de HLA, mientras que dichos exones de los otros locus de HLA (es decir, otros genes de HLA clásicos, genes de HLA no clásicos o pseudogenes) no se coamplifican. Puesto que los amplicones específicos de α en el producto de amplificación pueden dar como resultado un tipado defectuoso, el método de amplificación de la invención ciertamente mejorará la seguridad de los métodos actuales de tipado.

La expresión "específico del locus" significa así que el exón 2, el exón 3 y/o el exón 4 de un solo locus (es decir HLA-A, HLA-B o HLA-C) se amplifica, mientras que el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de los otros locus de HLA (es decir, otros genes de HLA clásicos, genes de HLA no clásicos o pseudogenes) no se amplifica. De este modo, cuando se usan cebadores específicos para la amplificación del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, el exón 2, el exón 3 y/o

el exón 4 de HLA-B, HLA-C o de otros locus de HLA no se amplifican. De forma similar, cuando se usan cebadores específicos para la amplificación del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, HLA-C o de otros locus de HLA no se amplifican. De forma similar, cuando se usan los cebadores específicos para la amplificación del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-C, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, HLA-B y de otros locus de HLA no se amplifican. A partir de esto está claro que el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de 2, 3 o más locus de HLA diferentes nunca se pueden amplificar juntos. De este modo, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A nunca se pueden amplificar en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B. De forma similar, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A nunca se pueden amplificar en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-C. De forma similar, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 del HLA-B nunca se pueden amplificar en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-C. De forma similar, el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A nunca se pueden amplificar en el mismo tubo de reacción con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-B y con el exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-C. Como consecuencia, la presente invención se refiere a un método para la amplificación separada, específica del locus, del exón 2, exón 3 y exón 4 de alelos HLA-A. Esto significa que la invención se refiere a un método para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A.

El término "cebador" se refiere a una secuencia oligonucleotídica monocatenaria capaz de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico a copiar. La longitud y la secuencia del cebador debe ser tal que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión. En una realización específica, la longitud del cebador tiene alrededor de 5-50 nucleótidos. En otra realización específica, la longitud del cebador tiene alrededor de 10-30 nucleótidos. En otra realización específica, la longitud de los cebadores tiene alrededor de 20-25 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad de la diana de ADN o ARN requerida, así como de las condiciones a las que se use el cebador, tal como temperatura y fuerza iónica.

La expresión "conjunto de cebadores" o "par de cebadores" se refiere a un par de cebadores que permite la amplificación de parte o de todos los exones 2, 3 ó 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C. Un conjunto de cebadores siempre consiste en un cebador directo (o cebador 5') y un cebador inverso (o cebador 3').

Las expresiones "para hibridarse específicamente" y "se hibrida específicamente" significa que, durante la etapa de amplificación, dicho cebador forma un dúplex con parte de su secuencia diana o con toda la secuencia diana en las condiciones experimentales usadas, y que en esas condiciones dicho cebador no forma un dúplex con otras secuencias de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra a analizar. Se debería entender que los cebadores que se diseñan para hibridarse específicamente a una secuencia diana de un ácido nucleico pueden caer dentro de dicha secuencia diana, o pueden solapar en gran medida con dicha secuencia diana (es decir, formar un dúplex con nucleótidos fuera así como dentro de dicha secuencia diana).

La expresión "secuencia diana" de un cebador según la presente invención es una secuencia en un intrón 2 o intrón 3 de los alelos HLA de Clase I a la que el cebador es completamente complementaria o parcialmente complementaria (es decir, con hasta 20%, 15%, 10% o 5% de desemparejamientos). Se entenderá que el complemento de dicha secuencia diana es también en algunos casos una secuencia diana adecuada. El hecho de que los cebadores de la amplificación no tengan que emparejarse exactamente con la secuencia diana correspondiente en el molde para garantizar la amplificación apropiada está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok *et al*., 1990). Sin embargo, cuando los cebadores no son completamente complementarios con su secuencia diana, se debería tener en cuenta que los fragmentos amplificados tendrán la secuencia de los cebadores y no de la secuencia diana.

En una realización, la amplificación se lleva a cabo en un tubo de reacción con un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 2 como se describe anteriormente (el cebador inverso se hibrida con una secuencia diana específica del locus en el intrón 2) y consiguientemente sólo se amplifica el exón 2. En otra realización, la amplificación se lleva a cabo en un tubo de reacción con un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 3 como se describe anteriormente (el cebador directo se hibrida con una secuencia diana específica del locus en el intrón 2) y consecuentemente sólo se amplifica el exón 3.

En otra realización, la amplificación se lleva a cabo en un tubo de reacción con un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 3 como se describe anteriormente (el cebador inverso se hibrida con una secuencia diana específica del locus en el intrón 3) y consiguientemente sólo se amplifica el exón 3.

En otra realización, la amplificación se lleva a cabo en un tubo de reacción con un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 3 como se describe anteriormente (el cebador directo se hibrida con una secuencia diana específica del locus en el intrón 2, y el cebador inverso se hibrida con una secuencia diana específica del locus en el intrón 3) y consiguientemente sólo se amplifica el exón 3.

En otra realización, la amplificación se lleva a cabo en un tubo de reacción con un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 4 como se describe anteriormente (el cebador directo se hibrida con una secuencia diana específica del locus en el intrón 3), y consiguientemente sólo se amplifica el exón 4.

En consecuencia, se describe aquí un método para la amplificación separada del exón 2, exón 3 o exón 4 de alelos HLA de Clase I.

En otra realización, los diferentes conjuntos de cebadores implicados en la amplificación del exón 2 y la amplificación del exón 3 se mezclan y se lleva a cabo en un único tubo de reacción la amplificación separada tanto del exón 2 como del exón 3. De este modo, se describe además aquí un método como se describe anteriormente, caracterizado además porque tanto el exón 2 como el exón 3 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante uso de una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3. En consecuencia, se describe un método para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de alelos HLA de Clase I.

En una realización, los diferentes conjuntos de cebadores implicados en la amplificación del exón 2 y la amplificación del exón 4 se mezclan y se lleva a cabo en un único tubo de reacción la amplificación separada tanto del exón 2 como del exón 4. De este modo, se describe un método como se describe anteriormente, caracterizado además porque tanto el exón 2 como el exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante uso de una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 4. En consecuencia, se describe un método para la amplificación separada del exón 2 y del exón 4 de alelos HLA de Clase I.

En otra realización, los diferentes conjuntos de cebadores implicados en la amplificación del exón 3 y la amplificación del exón 4 se mezclan y se lleva a cabo en un único tubo de reacción la amplificación separada tanto del exón 3 como del exón 4. De este modo, se describe un método como se describe anteriormente, caracterizado además porque tanto el exón 3 como el exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante uso de una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 4. En consecuencia, se describe un método para la amplificación separada del exón 3 y del exón 4 de alelos HLA de Clase I.

En otra realización, los diferentes conjuntos de cebadores implicados en la amplificación del exón 2, la amplificación del exón 3 y la amplificación del exón 4 se mezclan y se lleva a cabo en un único tubo de reacción la amplificación separada de los tres exones, el exón 2, exón 3 y exón 4. De este modo, la presente invención también se refiere a un método como se describe anteriormente caracterizado además porque los tres exones, el exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C se amplifican mediante uso de una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2, al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 4.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de alelos HLA de Clase I.

El método de amplificación usado puede ser reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al*., 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren *et al*., 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificación a base de secuencias de ácido nucleico (NASBA; Guatelli *et al*., 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación a base de transcripción (TAS; Kwoh *et al*., 1989), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, 1990) o amplificación por medio de Qβ replicasa (Lomeli *et al*., 1989), o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico conocida en la técnica. También, en el método de la presente invención, se pueden usar técnicas de TMA (Guatelli *et al*., 1990) o de ADNb (Sanchez-Pescador *et al*., 1988; Urdea *et al*., 1991). En una realización específica, el exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A se amplifican mediante PCR.

En una realización específica, la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente, caracterizado además porque la secuencia diana específica del locus está situada en una de las siguientes posiciones:

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 ó 181 del intrón 2 de HLA-A (Fig. 1) y/ó 32, 50, 62, 73, 83, 86, 118, 130, 150, 501, 525, 561 ó 571 (Fig. 4) del intrón 3 de HLA-A.

Puesto que estas posiciones contienen todas ellas nucleótidos específicos del locus, estas posiciones son particularmente adecuadas para diseñar un cebador eficaz para la amplificación específica del locus del exón 2, exón 3 o exón 4. Los cebadores pueden tener diferente longitud. En una realización específica, la longitud del cebador es alrededor de 5-50 nucleótidos. En otra realización específica, la longitud del cebador es alrededor de 10-30 nucleótidos. En otra realización específica, la longitud de los cebadores es alrededor de 20-25 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad de la diana de ADN o ARN requerida, así como de las condiciones a las que se use el cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.

En una realización específica, la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente caracterizado además porque dichas posiciones constituyen el extremo 3' del cebador que se usar para la amplificación del exón 2, exón 3 o exón 4. De este modo, a partir de las posiciones descritas anteriormente, se pueden diseñar cebadores directos así como inversos que tienen su extremo 3' en estas posiciones específicas. El cebador inverso que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas mencionadas anteriormente del intrón 2 permitirá la amplificación específica del locus del exón 2 del alelo HLA. El cebador directo que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas mencionadas anteriormente del intrón 2 permitirá la amplificación específica del locus del exón 3 del alelo HLA-A. El cebador inverso que tiene su extremo 3' en una de las posiciones específicas mencionadas anteriormente del intrón 3 permitirá la amplificación específica del locus del exón 3 del alelo HLA-A. El cebador directo que tiene

su extremo 3' en una de las posiciones específicas mencionadas anteriormente del intrón 3 permitirá la amplificación específica del locus del exón 4 del alelo HLA-A. Los cebadores pueden tener diferente longitud. En una realización específica, la longitud del cebador es alrededor de 5-50 nucleótidos. En otra realización específica, la longitud del cebador es alrededor de 10-30 nucleótidos. En otra realización específica, la longitud de los cebadores es alrededor de 20-25 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad de la diana de ADN o ARN requerida, así como de las condiciones a las que se use el cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente, caracterizado además porque el cebador se elige de la siguiente lista:

- para la amplificación del exón 2 de HLA-A (tabla 1):

5'ATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 1)

5'GATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 2)

5'GGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 3)

5'YGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 4)

5'GYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 5)

5'GGYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 6)

5'GGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 7)

5'GGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 8)

5'AGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 9)

5'AAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 10)

5'CAAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 11)

5'CTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 12)

5'TCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 13)

5'CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 14)

5'CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 15)

5'GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 16)

5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 17)

5'TCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 18)

5'CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 19)

5'CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 20)

5'GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 21)

5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 22)

5'GGGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 23)

5'CCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 30)

5'GCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 31)

5'CGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 32)

5'GCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 33)

5'GGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 34)

5'AGGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 35)

5'AGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 36)

5'AAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 37)

5'WAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 38)

5'TWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 39)

5'GTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 40)

5'GGTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 41)

5'CCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 42)

5'ACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 43)

5'AACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 44)

5'AAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 45)

5'GAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 46)

5'TGAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 47)

5'YCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 48)

5'GYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 49)

5'YGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 50)

5'CYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 51)

5'CCYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 52)

5'CCCYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 53)

- para la amplificación del exón 3 de HLA-A (tabla 2; tabla 3)

5'CGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 54)

5'ACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 55)

5'CACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 56)

5'CCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 57)

5'CCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 58)

5'CCCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 59)

5'GGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 60)

5'GGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 61)

5'CGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 62)

5'CCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 63)

5'TCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 64)

5'CTCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 65)

5'CCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 66)

5'RCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 67)

5'CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 68)

5'CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 69)

5'TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 70)

5'ATCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 71)

5'CCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 72)

5'CCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 73)

5'RCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 74)

5'CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 75)

5'CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 76)

5'TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 77)

5'CGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 84)

5'CCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 85)

5'GCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3'(SEC ID NO 86)

5'AGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 87)

5'AAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 88)

5'GAAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 89)

5'GACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 90)

5'GGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 91)

5'GGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 92)

5'CGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 93)

5'GCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 94)

5'CGCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 95)

5'GACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 96)

5'AGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 97)

5'GAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 98)

5'CGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 99)

5'CCGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 100)

5'YCCGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 101)

5'GTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 102)

5'AGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 103)

5'CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 104)

5'TCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 105)

5'TTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 106)

5'TTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 107)

5'AGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 150)
5'CAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 151)
5'CCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 152)
5'GCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 153)
5'GGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 154)
5'AGGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 155)
5'CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 156)
5'CCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 157)
5'TCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 158)
5'CTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 159)
5'TCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 160)
5'GTCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 161)
5'CCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 162)
5'TCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 163)
5'GTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 164)
5'GGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 165)
5'TGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 166)
5'TTGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 167)
5'CTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 168)
5'TCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 169)
5'TTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 170)
5'ATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 171)
5'TATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 172)
5'ATATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 173)
5'GGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 174)
5'AGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 175)
5'GAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 176)
5'GGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 177)
5'GGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 178)
5'AGGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 179)
5'GGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 180)
5'GGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 181)
5'AGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 182)
5'GAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 183)
5'AGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 184)
5'CAGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 185)

5'CCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 186)

5'ACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 187)

5'AACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 188)

5'AAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 189)

5'GAAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 190)

5'GGAAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 191)

5'AGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 192)

5'CAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 193)

5'ACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 194)

5'TACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 195)

5'GTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 196)

5'GGTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 197)

5'TCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 198)

5'CTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 199)

5'CCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 200)

5'ACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 201)

5'AACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 202)

5'GAACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 203)

- para la amplificación del exón 4 de HLA-A (tabla 4):

5'TTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 204)

5'GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3'(SEC ID NO 205)

5'GGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 206)

5'GGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 207)

5'TGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 208)

5'CTGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 209)

5'GGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 24)

5'RGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 25)

5'CRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 26)

5'CCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 27)

5'CCCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 28)

5'TCCCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 29)

5'CTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 210)

5'GCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 211)

5'TGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 212)

5'RTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 213)

5'YRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 214)

5'GYRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 215)

5'GTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 216)

5'TGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 217)

5'GTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 218)

5'AGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 219)

5'GAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 220)

5'GGAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 221).

Se describen además aquí los siguientes cebadores para la amplificación del exón 2 de HLA-B (tabla 5):

5'ACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 108)

5'AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 109)

5'CAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 110)

5'CCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 111)

5'MCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 112)

5'GMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 113)

5'YGMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 314)

- para la amplificación del exón 3 de HLA-B (tabla 6; tabla 7):

5'CYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (SEC ID NO 114)

5'CCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (SEC ID NO 115)

5'GCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (SEC ID NO 116)

5'GGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (SEC ID NO 117)

5'CGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (SEC ID NO 118)

5'CCGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT3' (SEC ID NO 119)

5'CCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 120)

5'ACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 121)

5'TACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 122)

5'TTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 123)

5'TTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 124)

5'GTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 125)

5'CGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 222)

5'GCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 223)

5'CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 224)

5'CGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (SEC ID NO 225)

5'TCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (SEC ID NO 226)

5'CTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (SEC ID NO 227)

5'TCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (SEC ID NO 228)

5'TTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (SEC ID NO 229)

5'CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC3' (SEC ID NO 230)

5'TCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (SEC ID NO 231)

5'TTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (SEC ID NO 232)

5'CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (SEC ID NO 233)

5'TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (SEC ID NO 234)

5'YTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (SEC ID NO 235)

5'CYTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC3' (SEC ID NO 236)

5'GATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (SEC ID NO 237)

5'TGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (SEC ID NO 238)

5'CTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (SEC ID NO 239)

5'GCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (SEC ID NO 240)

5'CGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (SEC ID NO 241)

5'GCGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT3' (SEC ID NO 242)

5'GCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (SEC ID NO 243)

5'CGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (SEC ID NO 244)

5'GCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (SEC ID NO 245)

5'AGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (SEC ID NO 246)

5'TAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (SEC ID NO 247)

5'CTAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT3' (SEC ID NO 248)

5'TCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (SEC ID NO 249)

5'CTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (SEC ID NO 250)

5'TCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (SEC ID NO 251)

5'TTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (SEC ID NO 252)

5'ATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (SEC ID NO 253)

5'CATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC3' (SEC ID NO 254)

- para la amplificación del exón 4 de HLA-B (tabla 8):

5'AGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (SEC ID NO 255)

5'GAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (SEC ID NO 256)

5'GGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (SEQ NO 257)

5'AGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (SEC ID NO 258)

5'TAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (SEC ID NO 259)

5'ATAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC3' (SEC ID NO 260)

5'TGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (SEC ID NO 261)

5'GTGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (SEC ID NO 262)

5'GGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (SEC ID NO 263)

5'AGGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (SEC ID NO 264)

5'CAGGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (SEC ID NO 265)

5'CCAGGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC3' (SEC ID NO 266)

5'TCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 267)

5'GTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 268)

5'GGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 269)

5'TGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 270)

5'CTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 271)

5'KCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 272)

5'GKCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG3' (SEC ID NO 273)

5'TSCCATGARAGATGCMAAGC3' (SEC ID NO 274)

5'GTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (SEC ID NO 275)

5'TGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (SEC ID NO 276)

5'GTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (SEC ID NO 277)

5'GGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (SEC ID NO 278)

5'GGGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC3' (SEC ID NO 279)

5'GWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (SEC ID NO 280)

5'TGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (SEC ID NO 281)

5'CTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (SEC ID NO 282)

5'CCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (SEC ID NO 283)

5'GCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (SEC ID NO 284)

5'CGCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA3' (SEC ID NO 285)

- para la amplificación del exón 2 de HLA-C (tabla 9):

5'GTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 126)

5'GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 127)

5'CGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 128)

5'CCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 129)

5'YCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 130)

5'CYCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 131)

- para la amplificación del exón 3 de HLA-C (tabla 10):

5'CGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (SEC ID NO 132)

5'TCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (SEC ID NO 133)

5'GTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (SEC ID NO 134)

5'GGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (SEC ID NO 135)

5'GGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (SEC ID NO 136)

5'CGGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT3' (SEC ID NO 137)

5'CGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 138)

5'TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 139)

5'CTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 140)

5'CCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 141)

5'CCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 142)

5'ACCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 143)

- para la amplificación del exón 4 de HLA-C (tabla 11):

5'GTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (SEC ID NO 286)

5'GGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (SEC ID NO 287)

5'AGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (SEC ID NO 288)

5'CAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (SEC ID NO 289)

5'CCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (SEC ID NO 290)

5'CCCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC3' (SEC ID NO 291)

5'TGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (SEC ID NO 292)

5'CTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (SEC ID NO 293)

5'GCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (SEC ID NO 294)

5'GGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (SEC ID NO 295)

5'AGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (SEC ID NO 296)

5'CAGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC3' (SEC ID NO 297)

5'CTCAGGATRGTCACATGGSC3' (SEC ID NO 298)

5'TCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (SEC ID NO 299)

5'TTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (SEC ID NO 300)

5'RTTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (SEC ID NO 301)

5'CRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (SEC ID NO 302)

5'CCRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC3' (SEQ NO 303)

5'GCGCTGTTGGAGTGTCGCAA3' (SEC ID NO 78)

5'GGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA3' (SEC ID NO 79)

5'GGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA3' (SEC ID NO 80)

5'TGGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA3' (SEC ID NO 81)

5'ATGGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA3' (SEC ID NO 82)

5'CATGGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA3' (SEC ID NO 83)

5'SCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (SEC ID NO 304)

5'CSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (SEC ID NO 305)

5'TCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (SEC ID NO 306)

5'GTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (SEC ID NO 307)

5'TGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (SEC ID NO 308)

5'GTGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT3' (SEC ID NO 309)

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a cualquier método como se describe anteriormente, caracterizado además porque la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con al menos uno de los siguientes cebadores directos:

- para HLA-A: 5APBio: B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC (SEC ID NO 144).

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a cualquier método como se describe anteriormente, caracterizado además porque la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con al menos uno de los siguientes cebadores inversos:

- para HLA-A: 3ex4APbio: B-TTGGGCAGACCCTCATGCTGC (SEC ID NO 311).

En una realización muy específica, la presente invención se refiere a cualquier método como se describe anteriormente, caracterizado además porque:

- la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con al menos uno de los siguientes conjuntos de cebadores:

  - para HLA-A: 5APbio (B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC; SEC ID NO 144) y 3ex2APbio (B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT; SEC ID NO 1);

- la amplificación del exón 3 se lleva a cabo con al menos uno de los siguientes conjuntos de cebadores:

  - para HLA-A: 5ex3APbio (B-CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC: SEC ID NO 104) y 3ex3APbio (B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG; SEC ID NO 156);

- la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con al menos uno de los siguientes conjuntos de cebadores:

  - para HLA-A: 5ex4APbio (B-GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT; SEC ID NO 205) y 3ex4APbio (B-TTGGGCAGACCCTCATGCTGC; SEC ID NO 311).

La persona experta entenderá que estos cebadores (SEC ID NO 1 a 314) se pueden adaptar mediante adición o supresión de uno o más nucleótidos en sus extremidades. Tales adaptaciones pueden ser necesarias, por ejemplo, si se cambian las condiciones de amplificación, si el material amplificado es ARN en lugar de ADN, como es el caso, por ejemplo, en el sistema de NASBA.

Adicionalmente se describe aquí un cebador como se describe anteriormente, para uso en la amplificación del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, hibridándose específicamente dicho cebador a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 ó 181 del intrón 2 de HLA-A (Fig. 1); o
- 35 ó 170 del intrón 2 de HLA-B (Fig. 2); o
- 84, 107 ó 142 del intrón 2 de HLA-C (Fig. 3);

más específicamente, eligiéndose dicho cebador de la tabla 1 (para la amplificación del exón 2 de HLA-A), de la tabla 5 (para la amplificación del exón 2 de HLA-B), o de la tabla 9 (para la amplificación del exón 2 de HLA-C).

Se describe adicionalmente un cebador como se describe anteriormente, para uso en la amplificación del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, hibridándose específicamente dicho cebador a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 (cebador directo) o una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 (cebador inverso) de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 ó 181 del intrón 2 de HLA-A (Fig. 1) o 32, 50, 62, 73, 83, 86, 118, 130, 150 del intrón HLA-A 3 (Fig. 4); o
- 35 ó 170 del intrón 2 de HLA-B (Fig. 2) o 42, 46, 65, 68, 96, del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5); o
- 84, 107 ó 142 del intrón 2 de HLA-C (Fig. 3);

más específicamente, eligiéndose dicho cebador de la tabla 2 o la tabla 3 (para la amplificación del exón 3 de HLA-A), o de la tabla 6 o tabla 7 (para la amplificación del exón 3 de HLA-B).

Se describe adicionalmente un cebador como se describe anteriormente, para uso en la amplificación del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C, hibridándose específicamente dicho cebador a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 501, 525, 561 ó 571 del intrón 3 de HLA-A (Fig. 4); o
- 438, 502, 524, 547 ó 571 del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5); o
- 461, 477, 527, 545 ó 561 del intrón 3 de HLA-C (Fig. 6);

más específicamente, eligiéndose dicho cebador de la tabla 4 (para la amplificación del exón 4 de HLA-A), de la tabla 8 (para la amplificación del exón 4 de HLA-B), o de la tabla 11 (para la amplificación del exón 4 de HLA-C).

Se describe adicionalmente un conjunto de cebadores que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define anteriormente, para uso en la amplificación del exón 2 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C. Se describe específicamente la combinación del cebador directo 5APBio (SEC ID NO 144) para HLA-A, IBPin1 (SEC ID NO 145) para HLA-B o 5CIN1 (SEC ID NO 146) para HLA-C y un cebador inverso que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador inverso a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 ó 181 del intrón 2 de HLA-A;
- o 35 ó 170 del intrón 2 de HLA-B; o
- 84, 107 ó 142 del intrón 2 de HLA-C;

más específicamente, eligiéndose dicho cebador inverso de la tabla 1 (para la amplificación del exón 2 de HLA-A), de la tabla 5 (para la amplificación del exón 2 de HLA-B), o de la tabla 9 (para la amplificación del exón 2 de HLA-C).

También se describe un conjunto de cebadores que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se describe anteriormente, para uso en la amplificación del exón 3 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C. Se describe específicamente la combinación de un cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador directo a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 ó 181 del intrón 2 de HLA-A; o
- 35 ó 170 del intrón 2 de HLA-B; o
- 84, 107 ó 142 del intrón 2 de HLA-C;

más específicamente, eligiéndose dicho cebador directo de la tabla 2 (para la amplificación del exón 3 de HLA-A), o de la tabla 6 (para la amplificación del exón 3 de HLA-B) o de la tabla 10 (para la amplificación del exón 3 de HLA-C), y un cebador inverso que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón

3 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador inverso a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 32, 50, 62, 73, 83, 86, 118, 130, 150 (Fig. 4) del intrón 3 de HLA-A; o
- 42, 46, 65, 68, 96, del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5);

más específicamente, eligiéndose dicho cebador inverso de la tabla 3 (para la amplificación del exón 3 de HLA-A), de la tabla 7 (para la amplificación del exón 3 de HLA-B), o de 3CIN3 (SEC ID NO 149) (para la amplificación del exón 3 de HLA-C).

Se describe adicionalmente un conjunto de cebadores que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se describe anteriormente, para uso en la amplificación del exón 4 de los alelos HLA-A, HLA-B o HLA-C. Se describe específicamente la combinación de un cebador directo que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 de respectivamente HLA-A, HLA-B o HLA-C; más específicamente, hibridándose específicamente dicho cebador directo a una secuencia diana específica del locus situada en la posición:

- 501, 525, 561 ó 571 del intrón 3 de HLA-A (Fig. 4); o
- 438, 502, 524, 547 ó 571 del intrón 3 de HLA-B (Fig. 5); o
- 461, 477, 527, 545 ó 561 del intrón 3 de HLA-C (Fig. 6);

más específicamente, eligiéndose dicho cebador directo de la tabla 4 (para la amplificación del exón 4 de HLA-A), de la tabla 8 (para la amplificación del exón 4 de HLA-B) o de la tabla 11 (para la amplificación del exón 4 de HLA-C), y un cebador inverso 3ex4APbio (SEC ID NO 311) para HLA-A, 3ex4IBbio (SEC ID NO 312) para HLA-B, o 3ex4ICbio (SEC ID NO 313) para HLA-C.

Específicamente, los cebadores se usan en una mezcla que permite la amplificación separada del exón 2 y del exón 3. En consecuencia, se describe una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores como se describe anteriormente para la amplificación del exón 2 y un par de cebadores como se describe anteriormente para la amplificación del exón 3.

Específicamente, la mezcla de cebadores múltiple para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 comprende los siguientes conjuntos de cebadores:

- para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de HLA-A:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID
Exón 1-2	5APbio(5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
	3ex2APbio (3')	B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
Exón 3	5ex3APbio(5')	B-CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	104
	3ex3APbio (3')	B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156

- para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de HLA-B:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID
Exón 2	IBPinlbio (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
	IB3Pin2bio (3')	B-AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
Exón 3	IB5Pin2bio (5')	B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224
	IB3Pin3bio (3')	B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234

- para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de HLA-C:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID
Exón 2	5CIN1(5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
	IC3Pin2bio(3')	B-GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
Exón 3	IC5Pin2bio(5')	B-TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149

Específicamente, los cebadores se usan en una mezcla que permite la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4. En consecuencia, se describe una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores como se describe anteriormente para la amplificación del exón 2, un par de cebadores como se describe anteriormente para la amplificación del exón 3, y un par de cebadores como se describe anteriormente para la amplificación del exón 4.

Específicamente, la mezcla de cebadores múltiple para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 comprende los siguientes conjuntos de cebadores:

- para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID
Exón 1-2	5APbio(5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
	3ex2APbio (3')	B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
Exón 3	5ex3APbio(5')	B-CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	104
	3ex3APbio (3')	B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156
Exón 4	5ex4APbio (5')	B-GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	205
	3ex4APbio (3')	B-TTGGGCAGACCCTCATGCTGC	311

- para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID
Exón 2	IBPin1bio (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
	IB3Pin2bio (3')	B-AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
Exón 3	IB5Pin2bio(5')	B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224
	IB3Pin3bio (3')	B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234
Exón 4	5ex41Bbio(5')	B-TCACATGGGTGGTCCTAGG	267
	3ex41Bbio (3')	B-TCGGCAGCCCCTCATGCTGT	312

- para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID
Exón 2	5CIN1(5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
	IC3Pin2bio(3')	B-GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
Exón 3	IC5Pin2bio(5')	B-TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149
Exón 4	5ex4lCbio(5')	B-TCTCAGGATRGTCACATGGSC	299
	3ex4lCbio(3')	B-CATCTCAGGGTGMRGGGCTT	313

Los cebadores se pueden marcar. El marcado se puede llevar a cabo por cualquier método conocido por la persona experta en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica (^{32}P, ^{35}S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).

Los oligonucleótidos usados como cebadores también pueden comprender análogos nucleotídicos tales como fosforotioatos (Matsukura *et al*., 1987), alquilfosforotioatos (Miller *et al*., 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen *et al*., 1991; Nielsen *et al*., 1993), o pueden contener agentes intercalantes (Asseline *et al*., 1984). Como la mayoría de las otras variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales, estas variaciones necesitarán adaptaciones con respecto a las condiciones en las que el oligonucleótido se debería de usar para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados eventuales de la hibridación serán esencialmente los mismos que los obtenidos con los oligonucleótidos no modificados. La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa a fin de influir positivamente en características tales como la cinética de hibridación, reversibilidad de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas oligonucleotídicas, etc.

Se describe aquí el uso de los cebadores, los conjuntos de cebadores y/o las mezclas de cebadores de la invención en un método para la amplificación separada y específica del locus del exón 2, exón 3 y/o exón 4 de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

La presente invención también se refiere a un método para tipar o subtipar uno o más alelos HLA-A en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

(i) si es necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) amplificar los ácidos nucleicos descritos aquí;

(iii) tipar los alelos HLA-A específicos presentes en dicha muestra.

La liberación, concentración y aislamiento de los ácidos nucleicos procedentes de la muestra se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Actualmente, existen diversos kits comerciales tales como el QIAamp Blood Kit de Qiagen (Hilden, Alemania) para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de sangre, o el "High pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica). También existen otros procedimientos bien conocidos para el aislamiento de ADN o ARN a partir de una muestra biológica (Sambrook *et al*., 1989). Los ácidos nucleicos se amplifican subsiguientemente mediante el método de la invención descrito anteriormente. Los productos de esta etapa de amplificación son entonces idealmente adecuados para tipar el alelo específico presente en la muestra. Actualmente se conocen 169 alelos diferentes de HLA-A, 332 alelos diferentes de HLA-B, y 87 alelos diferentes de HLA-C. El tipado de estos alelos se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como el análisis dúplex de los productos de la PCR (Clay *et al*., 1994), el análisis de polimorfismo conformacional monocatenario del producto de la PCR (PCR-SSCP; Yoshida *et al*., 1992), tipado a base de secuencias (SBT; Santamaria *et al*., 1992 y 1993), el uso de cebadores específicos de secuencias en la reacción de la PCR (PCR-SSP; Olerup y Zetterquist, 1991), el uso de PCR en combinación con un sondaje oligonucleotídico específico de secuencias (PCR-SSOP; Saiki *et al*., 1986), la transferencia de punto convencional, la transferencia Southern, el sándwich o sondado mediante transferencia de punto inversa (Saiki *et al*., 1989). A fin de obtener resultados rápidos y fáciles si están implicadas una multitud de sondas, puede ser conveniente un formato de hibridación inversa. En consecuencia, en una realización preferida, las sondas seleccionadas se inmovilizan en ciertas localizaciones sobre un soporte sólido, y los ácidos polinucleicos amplificados se marcan a fin de permitir la detección de los híbridos formados. La expresión "soporte sólido" se puede referir a cualquier sustrato al que se puede acoplar una sonda oligonucleotídica,

con la condición de que retenga sus características de hibridación y con la condición de que el nivel de fondo de la hibridación permanezca bajo. Habitualmente, el sustrato sólido será una placa de microtitulación (por ejemplo en la técnica de DEIA), una membrana (por ejemplo nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip. Antes de la aplicación a la membrana o fijación, puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico a fin de facilitar la fijación o mejorar la eficacia de la hibridación. Tales modificaciones pueden englobar la unión de un homopolímero de ácido nucleico a un trozo de ADN, el acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH_2, grupos SH, grupos carboxílicos, y el acoplamiento con biotina, aptenos o proteínas.

La presente invención se refiere además a un kit de diagnóstico para el tipado o subtipado de uno o más alelos HLA-A en una muestra, que comprende los siguientes componentes:

(i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) un conjunto de cebadores o una mezcla de cebadores como se describe aquí;

(iv) un medio para tipar los alelos HLA-A específicos presentes en dicha muestra.

Un kit de diagnóstico específico y muy compatible con el usuario es el ensayo de sondas en líneas para el tipado o subtipado de uno o más alelos HLA-A en una muestra, que comprende los siguientes componentes:

(i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) un par de cebadores o una mezcla de cebadores como se describe aquí;

(iii) al menos una sonda que se hibrida específicamente con uno de los alelos HLA-A, fijada a un soporte sólido;

(iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;

(v) una disolución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha disolución;

(vi) cuando sea apropiado, un medio para detectar los híbridos que resultan de la hibridación precedente.

En esta realización, el conjunto seleccionado de sondas se inmoviliza a una tira de membrana en forma de líneas. Dichas sondas se pueden inmovilizar individualmente o como mezclas a las localizaciones delineadas. Los ácidos polinucleicos de HLA-A amplificados se pueden marcar con biotina, y el híbrido se puede detectar entonces, vía un acoplamiento con biotina-estreptavidina, con un sistema de desarrollo del color no radioactivo.

La expresión “tampón de hibridación” significa un tampón que permite una reacción de hibridación entre las sondas y los ácidos polinucleicos presentes en la muestra, o los productos amplificados, en las condiciones de restricción apropiadas.

La expresión “disolución de lavado” significa una disolución que permite lavar los híbridos formados en las condiciones de restricción apropiadas.

También se describe aquí el uso de los cebadores, los conjuntos de cebadores y/o las mezclas de cebadores de la invención para la fabricación de un kit de diagnóstico o ensayo de sondas en líneas para el tipado de HLA de Clase I.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones a continuación, excepto que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implican la inclusión de un todo o etapa señalado o grupo de todos o etapas señalados, pero no la exclusión de ningún otro todo o etapa o grupo de todos o etapas.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Alineamiento de 29 secuencias del intrón 2 de HLA-A. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de consenso. Los nucleótidos que conforman la secuencia de consenso se indican con una línea vertical. Se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia de consenso. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición. La secuenciación se llevó a cabo según el ejemplo 1.

Figura 2. Alineamiento de 38 secuencias del intrón 2 de HLA-B. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de consenso. Los nucleótidos que conforman la secuencia de consenso se indican con una línea vertical. Se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia de consenso. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición. La secuenciación se llevó a cabo según el ejemplo 1.

Figura 3. Alineamiento de 13 secuencias del intrón 2 de HLA-C. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de consenso. Los nucleótidos que conforman la secuencia de consenso se indican con una línea vertical. Se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia de consenso. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición. La secuenciación se llevó a cabo según el ejemplo 1.

Figura 4. Alineamiento de 12 secuencias del intrón 3 de HLA-A. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de consenso. Los nucleótidos que conforman la secuencia de consenso se indican con una línea vertical. Se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia de consenso. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición.

Figura 5. Alineamiento de 22 secuencias del intrón 3 de HLA-B. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de consenso. Los nucleótidos que conforman la secuencia de consenso se indican con una línea vertical. Se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia de consenso. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición.

Figura 6. Alineamiento de 12 secuencias del intrón 3 de HLA-C. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de consenso. Los nucleótidos que conforman la secuencia de consenso se indican con una línea vertical. Se indican los nucleótidos que difieren de la secuencia de consenso. N indica la ausencia de un nucleótido en esa posición.

Figura 7. Resultado de un ensayo de sondas en líneas para el tipado de HLA-A como se indica en el ejemplo 5. Los ácidos nucleicos se amplificaron mediante uso de: (A) 5APBio (cebador directo; SEC ID NO 144) y 3APBio (cebador inverso; SEC ID NO 147) para la amplificación del exón 2 y exón 3 de HLA-A en un solo amplicón; (B) la mezcla de cebadores múltiple para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A. Las sondas con los números 1, 4, 9, 10, 12 y 13 muestran claramente una señal más fuerte tras la hibridación con los amplicones obtenidos mediante uso de la mezcla de cebadores múltiple (tira B).

Figura 8. Resultados de un ensayo de sondas en líneas para el tipado de HLA-B como se indica en el ejemplo 6. Los ácidos nucleicos se amplificaron mediante uso de: (B) IBPin1 (cebador directo; SEC ID NO 145) e IBPin3 (cebador inverso; SEC ID NO 148) para la amplificación del exón 2 y exón 3 de HLA-B en un solo amplicón; (B) la mezcla de cebadores múltiple para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B. Las sondas con los números 9, 10, 18, 19, 20, 34 y 35 muestran claramente una señal más fuerte tras la hibridación con los amplicones obtenidos mediante uso de la mezcla de cebadores múltiple (tiras B).

Tablas

TABLA 1

Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 2 de HLA-A

Posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	SEC ID NO
67	ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
	GATCTCGGACCCGGAGACTGT	2
	GGATCTCGGACCCGGAGACTGT	3
	YGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	4
	GYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	5
	GGYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT	6
96	GGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	7
	GGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	8
	AGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	9
	AAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	10
	CAAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT	11
109	CTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	12
	TCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	13
	CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	14

	CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	15
	GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	16
	GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG	17
110	TCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	18
	CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	19
	CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	20
	GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	21
	GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	22
	GGGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC	23
118	CCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	30
	GCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	31
	CGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	32
	GCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	33
	GGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	34
	AGGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA	35
123	AGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	36
	AAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	37
	WAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	38
	TWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	39
	GTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	40
	GGTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG	41
131	CCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	42
	ACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	43
	AACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	44
	AAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	45
	GAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	46
	TGAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC	47
181	YCCVGCCCCGACCAACCYGG	48
	GYCCVGCCCCGACCAACCYGG	49
	YGYCCVGCCCCGACCAACCYGG	50
	CYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG	51
	CCYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG	52

	CCCYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG	53

TABLA 2

Cebadores directos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-A

Posición 3' en el intrón 2	**Secuencia (5'-3')**	**SEC ID NO**
67	CGGACGGGCCRGGTSRCCCA	54
	ACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	55
	CACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	56
	CCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	57
	CCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	58
	CCCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA	59
96	GGTCCGAGATCCRCCCCGAA	60
	GGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	61
	CGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	62
	CCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	63
	TCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	64
	CTCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA	65
109	CCCCGAAGCCGCGGGACYCC	66
	RCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	67
	CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	68
	CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	69
	TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	70
	ATCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC	71
110	CCCGAAGCCGCGGGACYCCG	72
	CCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	73
	RCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	74
	CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	75
	CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	76
	TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG	77
118	CGCGGGACYCCGAGACCCTT	84

	CCGCGGGACYCCGAGACCCTT	85
	GCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	86
	AGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	87
	AAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	88
	GAAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT	89
123	GACYCCGAGACCCTTGDCCC	90
	GGACYCCGAGACCCTTGDCCC	91
	GGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	92
	CGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	93
	GCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	94
	CGCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC	95
131	GACCCTTGDCCCGGGAGAGG	96
	AGACCCTTGDCCCGGGAGAGG	97
	GAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG	98
	CGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG	99
	CCGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG	100
	YCCGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG	101
181	GTTTAGGCCAAAAATCCCCC	102
	AGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	103
	CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	104
	TCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	105
	TTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	106
	TTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	107

TABLA 3

Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-A

Posición 3' en el intrón 3	**Secuencia (5'-3')**	**SEC ID NO**
32	AGCCCGGGAGATCTAYAGGC	150
	CAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	151
	CCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	152

	GCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	153
	GGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	154
	AGGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC	155
50	CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156
	CCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	157
	TCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	158
	CTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	159
	TCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	160
	GTCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	161
62	CCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	162
	TCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	163
	GTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	164
	GGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	165
	TGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	166
	TTGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT	167
73	CTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	168
	TCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	169
	TTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	170
	ATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	171
	TATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	172
	ATATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT	173
83	GGGYGATATTCTAGTGTTGG	174
	AGGGYGATATTCTAGTGTTGG	175
	GAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	176
	GGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	177
	GGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	178
	AGGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG	179
86	GGAGGGYGATATTCTAGTGT	180
	GGGAGGGYGATATTCTAGTGT	181
	AGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	182
	GAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	183
	AGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	184

	CAGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT	185
118	CCCAGGAGGAKTCCTCTCCC	186
	ACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC	187
	AACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC	188
	AAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC	189
	GAAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC	190
	GGAAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC	191
130	AGGATCTGGAAACCCAGGAG	192
	CAGGATCTGGAAACCCAGGAG	193
	ACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	194
	TACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	195
	GTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	196
	GGTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG	197
150	TCAGAGTCACTCTCTGGTAC	198
	CTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	199
	CCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	200
	ACCTCAGAGTCACTCTCTG GTAC	201
	AACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	202
	GAACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC	203

TABLA 4

Cebadores directos usados para la amplificación del exón 4 de HLA-A

Posición 3' en el intrón 3	**Secuencia (5'-3')**	**SEC ID NO**
501	TTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	204
	GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	205
	GGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	206
	GGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	207
	TGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	208
	CTGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	209
525	GGTGTCCTGTCCATTCTCAA	24

	RGGTGTCCTGTCCATTCTCAA	25
	CRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA	26
	CCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA	27
	CCCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA	28
	TCCCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA	29
561	CTGGWGGAGTGTCCCATKAC	201
	GCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	211
	TGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	212
	RTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	213
	YRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	214
	GYRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC	215
571	GTCCCATKACAGATRCMMAA	216
	TGTCCCATKACAGATRCMMAA	217
	GTGTCCCATKACAGATRCMMAA	218
	AGTGTCCCATKACAGATRCMMAA	219
	GAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA	220
	GGAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA	221

TABLA 5

Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 2 de HLA-B

Posición 3' en el intrón 2	**Secuencia (5'-3')**	**SEC ID NO**
170	ACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	108
	AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
	CAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	110
	CCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	111
	MCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	112
	GMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	113
	YGMCCAACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	314

TABLA 6

Cebadores directos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-B

Posición 3′ en el intrón 2	Secuencia (5′-3′)	SEC ID NO
35	CYGGGGCGSAGGTCACGACT	114
	CCYGGGGCGSAGGTCACGACT	115
	GCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	116
	GGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	117
	CGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	118
	CCGGCCYGGGGCGSAGGTCACGACT	119
170	CCCGGTTTCATTTTCAGTTG	120
	ACCCGGTTTCAIIIICAGTTG	121
	TACCCGGTTTCAIIIICAGTTG	122
	TTACCCGGTTTCAIIIICAGTTG	123
	TTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	124
	GTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	125
	CGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	222
	GCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	223
	CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224

TABLA 7

Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-B

Posición 3′ en el intrón 3	Secuencia (5′-3′)	SEC ID NO
42	CGTKGGAGSCCATCCCCGSC	225
	TCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	226
	CTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	227
	TCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	228
	TTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	229
	CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCCGSC	230
46	TCTCGTKGGAGSCCATCCCC	231
	TTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	232

	CTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	233
	TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234
	YTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	235
	CYTCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	236
65	GATCCCATTTTCCTCYTCTT	237
	TGATCCCATTTTCCTCYTCTT	238
	CTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	239
	GCTGATCCCAIIIICCTCYTCTT	240
	CGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	241
	GCGCTGATCCCATTTTCCTCYTCTT	242
68	GCTGATCCCAIIIICCTCYT	243
	CGCTGATCCCATTTTCCTCYT	244
	GCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	245
	AGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	246
	TAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	247
	CTAGCGCTGATCCCATTTTCCTCYT	248
96	TCCATTCAAGGGAGGGCGAC	249
	CTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	250
	TCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	251
	TTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	252
	ATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	253
	CATTCTCCATTCAAGGGAGGGCGAC	254

TABLA 8

Cebadores directos usados para la amplificación del exón 4 de HLA-B

Posición 3' en el intrón	**Secuencia (5'-3')**	**SEC ID NO**
438	AGATTATCCCAGGTGCCTGC	255
	GAGATTATCCCAGGTGCCTGC	256
	GGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	257
	AGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	258

	TAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	259
	ATAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC	260
502	TGTCCTGYCCATTCTCAGKC	261
	GTGTCCTGYCCATTCTCAGKC	262
	GGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC	263
	AGGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC	264
	CAGGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC	265
	CCAGGTGTCCTGYCCATTCTCAGKC	266
524	TCACATGGGTGGTCCTAGG	267
	GTCACATGGGTGGTCCTAGG	268
	GGTCACATGGGTGGTCCTAGG	269
	TGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	270
	CTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	271
	KCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	272
	GKCTGGTCACATGGGTGGTCCTAGG	273
547	TSCCATGARAGATGCMAAGC	274
	GTSCCATGARAGATGCMAAGC	275
	TGTSCCATGARAGATGCMAAGC	276
	GTGTSCCATGARAGATGCMAAGC	277
	GGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC	278
	GGGTGTSCCATGARAGATGCMAAGC	279
571	GWAWTTTCTGACTCTTCCCA	280
	TGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	281
	CTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	282
	CCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	283
	GCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	284
	CGCCTGWAWTTTCTGACTCTTCCCA	285

TABLA 9

Cebadores inversos usados para la amplificación del exón 2 de HLA-C

Posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	SEC ID NO
107	GTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	126
	GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
	CGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	128
	CCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	129
	YCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	130
	CYCCGGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	131

TABLA 10

Cebadores directos usados para la amplificación del exón 3 de HLA-C

Posición 3' en el intrón 2	Secuencia (5'-3')	SEC ID NO
84	CGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	132
	TCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	133
	GTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	134
	GGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	135
	GGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	136
	CGGGTCGCCCCRAGTCTCCSSGTCT	137
142	CGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	138
	TCG RCCG G RGAGAGCCCCAGT	139
	CTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	140
	CCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	141
	CCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	142
	ACCCTCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	143

TABLA 11

Cebadores directos usados para la amplificación del exón 4 de HLA-C

Posición 3' en el intrón 3	Secuencia (5'-3')	SEC ID NO
461	GTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	286
	GGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	287
	AGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	288
	CAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	289
	CCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	290
	CCCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGC	291
477	TGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	292
	CTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	293
	GCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	294
	GGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	295
	AGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	296
	CAGGCTGGCGTCTGGGTTCTGTGCC	297
527	CTCAGGATRGTCACATGGSC	298
	TCTCAGGATRGTCACATGGSC	299
	TTCTCAGGATRGTCACATGGSC	300
	RTTCTCAGGATRGTCACATGGSC	301
	CRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC	302
	CCRTTCTCAGGATRGTCACATGGSC	303
545	GCGCTGTTGGAGTGTCGCAA	78
	GGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA	79
	GGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA	80
	TGGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA	81
	ATGGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA	82
	CATGGGCGCTGTTGGAGTGTCGCAA	83
561	SCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	304
	CSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	305
	TCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	306
	GTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	307
	TGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	308
	GTGTCSCAAGAGAGAWRCAAAGTGT	309

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación de la secuencia del intrón 2 de diversos alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C

Se prepararon ácidos nucleicos a partir de diferentes muestras de sangre mediante el uso del kit QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

Parte del exón 1, del intrón 2, del exón 2, del intrón 2 y del exón 3 de HLA-A se amplificaron mediante uso del siguiente conjunto de cebadores:

Cebador	**Secuencia (5′-3′)**	**SEC ID NO**
5APBio (5′)	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
3APBio (3′)	B-CCGTGCGCTGCAGCGTCTCCTTCCCG	147
B = biotina.		

El exón 2, el intrón 2 y el exón 3 de HLA-B se amplificaron mediante uso del siguiente conjunto de cebadores:

Cebador	**Secuencia (5′-3′)**	**SEC ID NO**
IBPin1 (5′)	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
IBPin3(3′)	B-GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT	148
B = biotina.		

El exón 2, el intrón 2 y el exón 3 de HLA-C se amplificaron mediante uso del siguiente conjunto de cebadores:

Cebador	**Secuencia (5′-3′)**	**SEC ID NO**
5CIN1 (5′)	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
3CIN3 (3′)	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149
B = biotina.		

El ciclo de reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

1 min. a 96ºC;

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 64ºC; 50 s a 72ºC);

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 62ºC; 50 s a 72ºC);

10 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 60ºC; 50 s a 72ºC);

15 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 55ºC; 50 s a 72ºC);

5 min. a 72ºC.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en 50 mM de Tris-HCl pH 9,2, 16 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 200 μM de dNTPs, 2,5 U de Taq polimerasa, 1,5 mM de $MgCl_2$, 15 pmoles de cada cebador y 0,1 a 0,5 μg de ADN.

El amplicón resultante se clonó en el vector pGEMt (Promega, Madison, WI, USA). El análisis de la secuencia nucleotídica se llevó a cabo mediante uso de un secuenciador de ADN automatizado Modelo 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con didesoxinucleótidos marcados para fluorescencia PrismTM Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los cebadores usados para la reacción de secuenciación fueron los mismos que para la etapa de amplificación. Se obtuvieron 29 secuencias del intrón 2 para HLA-A, 38 para HLA-B y 13 para HLA-C. Las secuencias se muestran en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

Ejemplo 2

Amplificación del exón 2 y del exón 3 de HLA-A

Se prepararon ácidos nucleicos a partir de diferentes muestras de sangre mediante uso del QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Basándose en el alineamiento de secuencias de las secuencias del intrón 2 de HLA-A (Figura 1) se diseñó un cebador inverso y uno directo, específico del locus, para la amplificación específica del exón 2 y del exón 3, respectivamente, de HLA-A. Con estos cebadores, se construyó una mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de HLA-A, que consiste en los siguientes dos conjuntos de cebadores:

- para el exón 2: 5APBio (SEC ID NO 144) como cebador directo, y 5'ATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 1) como cebador inverso;

- para el exón 3: 5'CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 104) como cebador directo, y 3APBio (SEC ID NO 147) como cebador inverso.

El ciclo de la reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

5 min. a 96ºC;

35 veces (30 s a 96ºC; 20 s a 58ºC; 30 s a 72ºC);

10 min. a 72ºC.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 10 mM de Tris.HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,001% (p/v) de gelatina, 200 μM de los dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20 pmoles de cada cebador y 1U AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La longitud de los productos de la PCR obtenidos se verificó en un gel de agarosa según Sambrook *et al*. (1989).

Ejemplo 3

Amplificación del exón 2 y del exón 3 de HLA-B

Se prepararon ácidos nucleicos a partir de diferentes muestras de sangre mediante uso del QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Basándose en el alineamiento de secuencias de las secuencias del intrón 2 de HLA-B (Figura 2), se diseñó un cebador inverso y uno directo, específicos del locus, para la amplificación específica del exón 2 y del exón 3, respectivamente, de HLA-B. Con estos cebadores, se construyó una mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de HLA-B, que consiste en los siguientes 2 conjuntos de cebadores:

- para el exón 2: IBPin1 (SEQ ID NO 145) como cebador directo, y 5'ACCCGCGGGGATTTTTGGCCTC3' (SEC ID NO 310) como cebador inverso;

- para el exón 3: 5'ACCCGGTTTCATTTTCAGTTG3' (SEC ID NO 121) como cebador directo, y IBPin3 (SEC ID NO 148) como cebador inverso.

El ciclo de la reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

5 min. a 96ºC;

35 veces (30 s a 96ºC; 20 s a 58ºC; 30 s a 72ºC);

10 min. a 72ºC.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 10 mM de Tris.HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,001% (p/v) de gelatina, 200 μM de los dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20 pmoles de cada cebador y 1U AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La longitud de los productos de la PCR obtenidos se verificó en un gel de agarosa según Sambrook *et al*. (1989).

Ejemplo 4

Amplificación del exón 2 y del exón 3 de HLA-C

Se prepararon ácidos nucleicos a partir de diferentes muestras de sangre mediante uso del QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Basándose en el alineamiento de secuencias de las secuencias del intrón 2 de HLA-C (Figura 3), se diseñó un cebador inverso y uno directo, específicos del locus, para la amplificación específica del exón 2 y del exón 3, respectivamente, de HLA-C. Con estos cebadores, se construyó una mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2 y del exón 3 de HLA-C, que consiste en los siguientes 2 conjuntos de cebadores:

- para el exón 2: 5CIN1 (SEC ID NO 146) como cebador directo, y 5'GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT3' (SEC ID NO 127) como cebador inverso;
- para el exón 3: 5'TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT3' (SEC ID NO 139) como cebador directo, y 3CIN3 (SEC ID NO 149) como cebador inverso.

El ciclo de la reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

5 min. a 96ºC;

35 veces (30 s a 96ºC; 20 s a 58ºC; 30 s a 72ºC);

10 min. a 72ºC.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 10 mM de Tris.HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,001% (p/v) de gelatina, 200 μM de los dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20 pmoles de cada cebador y 1U AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La longitud de los productos de la PCR obtenidos se verificó en un gel de agarosa según Sambrook *et al*. (1989).

Ejemplo 5

Amplificación del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A

Se recogieron muestras de sangre a partir de un donante caucásico en B.A.R.C. (Gante, Bélgica). Se prepararon ácidos nucleicos a partir de las muestras de sangre mediante el uso del QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

5.1 *Mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A*

Se usó una mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-A, que consiste en los siguientes conjuntos de cebadores:

Amplicón	**Conjunto de cebadores**	**Secuencia (5'-3')**	**SEC ID NO**
Exón 1-2	5APbio (5')	B-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC	144
	3ex2APbio (3')	B-ATCTCGGACCCGGAGACTGT	1
Exón 3	5ex3APbio (5')	B-CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC	104
	3ex3APbio (3')	B-CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG	156
Exón 4	5ex4APbio (5')	B-GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT	205

	3ex4APbio (3')	B-TTGGGCAGACCCTCATGCTGC	311
B = biotina.			

El ciclo de reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

1 min. a 96ºC;

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 64ºC; 50 s a 72ºC);

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 62ºC; 50 s a 72ºC);

10 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 60ºC; 50 s a 72ºC);

15 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 55ºC; 50 s a 72ºC);

5 min. a 72ºC;

4ºC.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 mM de Tris.HCl pH 9,2, 16 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de los dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, US), 20 pmoles del cebador 5APbio, 20 pmoles del cebador 3ex2APbio, 40 pmoles del cebador 5ex3APbio, 40 pmoles del cebador 3ex3APbio, 15 pmoles del cebador 5ex4APbio, 15 pmoles del cebador 3ex4APbio y 0,1-0,5 μg de ADN.

La longitud de los productos de amplificación obtenidos se verificó en un gel de agarosa al 3% según Sambrook *et al*. (1989). Se obtuvieron 3 bandas de diferente longitud que se refieren respectivamente al exón 2 (559 pb), exón 3 (439 pb) y exón 4 (380 pb) de HLA-A. Mediante el uso de este protocolo, los exones de HLA-A se amplificaron de forma suficientemente potente para el tipado subsiguiente en un ensayo de hibridación.

5.2 *Ensayo de los productos de amplificación obtenidos en un ensayo de tipado de HLA-A*

Los amplicones de HLA-A se tiparon subsiguientemente en un ensayo de hibridación inversa basado en la tecnología de LiPA (Stuyver *et al*., 1993). Tras la etapa de amplificación como se describe anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron a un panel de 36 sondas mediante uso del kit de HLA-A de LiPA (Innogenetics, Gante, Bélgica) según las instrucciones del fabricante. En la Figura 7 se muestran los resultados de esta hibridación inversa.

Para comparación, también se obtuvo un producto de amplificación, que comprende el exón 2 y el exón 3 en un único amplicón, mediante el uso de 5APBio (cebador directo; SEC ID NO 144) y 3APBio (cebador inverso; SEC ID NO 147). En la Figura 7 también se muestra la hibridación de este amplicón más grande a las sondas en la tira de LiPA. La Figura 7 ilustra claramente que los amplicones obtenidos mediante amplificación separada del exón 2 y del exón 3 permiten un tipado más claro y pronunciado que el amplicón más grande obtenido mediante amplificación del exón 2 y del exón 3 en un único amplicón.

Ejemplo 6

Amplificación del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B

Se recogieron muestras de sangre a partir de un donante caucásico en B.A.R.C. (Gante, Bélgica). Se prepararon ácidos nucleicos a partir de las muestras de sangre mediante el uso del QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

6.1 *Mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B*

Se usó una mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-B, que consiste en los siguientes conjuntos de cebadores:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID NO
Exón 2	IBPin1bio (5')	B-GGGAGGAGCGAGGGGACCSCAG	145
	IB3Pin2bio (3')	B-AACCCGCGGGGATTTTGGCCTC	109
Exón 3	IB5Pin2bio (5')	B-CGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	224
	IB3Pin3bio (3')	B-TCTTCTCGTKGGAGSCCATCCCC	234
Exón 4	5ex4IBbio (5')	B-TCACATGGGTGGTCCTAGG	267
	3ex4IBbio (3')	B-TCGGCAGCCCTCATGCTGT	312
B = biotina.			

El ciclo de reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

1 min. a 96ºC;

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 64ºC; 50 s a 72ºC);

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 62ºC; 50 s a 72ºC);

10 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 60ºC; 50 s a 72ºC);

15 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 55ºC; 50 s a 72ºC);

5 min. a 72ºC;

4ºC.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 mM de Tris.HCl pH 9,2, 16 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de los dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, US), 35 pmoles del cebador IBPinIbio, 35 pmoles del cebador IBPin2bio, 50 pmoles del cebador IB5Pin2bio, 50 pmoles del cebador IB3Pin3bio, 10 pmoles del cebador 5ex4IBbio, 10 pmoles del cebador 3ex4IBbio y 0,1-0,5 μg de ADN.

La longitud de los productos de amplificación obtenidos se verificó en un gel de agarosa al 3% según Sambrook *et al*. (1989). Se obtuvieron 3 bandas de diferente longitud que se refieren respectivamente al exón 2 (555 pb), exón 3 (446 pb) y exón 4 (323 pb) de HLA-B. Mediante el uso de este protocolo, los exones de HLA-B se amplificaron de forma suficientemente potente para el tipado subsiguiente en un ensayo de hibridación.

6.2 *Ensayo de los productos de amplificación obtenidos en un ensayo de tipado de HLA-B*

Los amplicones de HLA-B se tiparon subsiguientemente en un ensayo de hibridación inversa basado en la tecnología de LiPA (Stuyver *et al*., 1993). Tras la etapa de amplificación como se describe anteriormente, los ácidos nucleicos amplificados se hibridaron a un panel de 60 sondas mediante uso del kit de HLA-B de LiPA (Innogenetics, Gante, Bélgica) según las instrucciones del fabricante. En la Figura 8 se muestran los resultados de esta hibridación inversa.

Para comparación, también se obtuvo un producto de amplificación, que comprende el exón 2 y el exón 3 en un único amplicón, mediante el uso de IBPin1 (cebador directo; SEC ID NO 145) y IBPin3 (cebador inverso; SEC ID NO 148). En la Figura 8 también se muestra la hibridación de este amplicón más grande a las sondas en la tira de LiPA. La Figura 8 ilustra claramente que los amplicones obtenidos mediante amplificación separada del exón 2 y del exón 3 permiten un tipado más claro y pronunciado que el amplicón más grande obtenido mediante amplificación del exón 2 y del exón 3 en un único amplicón.

Ejemplo 7

Amplificación del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C

Se prepararon ácidos nucleicos a partir de las muestras de sangre mediante el uso del QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se usó una mezcla de cebadores para la amplificación separada del exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C, que consiste en los siguientes conjuntos de cebadores:

Amplicón	Conjunto de cebadores	Secuencia (5'-3')	SEC ID NO
Exón 2	5CIN1(5')	B-AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	146
	IC3Pin2bio(3')	B-GGTCGAGGGTCTGGGCGGGTT	127
Exón 3	IC5Pin2bio(5')	B-TCGRCCGGRGAGAGCCCCAGT	139
	3CIN3 (3')	B-GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	149
Exon 4	5ex4ICbio(5')	B-TCTCAGGATRGTCACATGGSC	299
	3ex4ICbio(3')	B-CATCTCAGGGTGMRGGGCTT	313
B = biotina.			

El ciclo de reacción de la PCR estaba compuesto de las siguientes etapas:

1 min. a 96ºC;

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 64ºC; 50 s a 72ºC);

5 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 62ºC; 50 s a 72ºC);

10 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 60ºC; 50 s a 72ºC);

15 veces (30 s a 96ºC; 50 s a 55ºC; 50 s a 72ºC);

5 min. a 72ºC;

4ºC.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 mM de Tris.HCl pH 9,2, 16 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de los dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, US), 20 pmoles de cada cebador y 0,1-0,5 μg de ADN.

La longitud de los productos de amplificación obtenidos se verificó en un gel de agarosa al 3% según Sambrook *et al*. (1989). Se obtuvieron 3 bandas de diferente longitud que se refieren respectivamente al exón 2, exón 3 y exón 4 de HLA-C. Mediante el uso de este protocolo, los exones de HLA-C se amplificaron de forma suficientemente potente para el tipado subsiguiente en un ensayo de sondas en líneas.

Referencias

Andersson G, **Larhammar** D, **Widmark** E, **Servenius** B, **Peterson** PA y **Rask** L (1987) Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DRbeta genes. *J Biol Chem* 262: 8748-8758.

Apple RJ y **Erlich** HA (1996) HLAclass II genes: structure and diversity. Chapter5 HLA and MHC: genes, molecules and function. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.

Asseline U, **Delarue** M, **Lancelot** G, **Toulme** F y T**huong** N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3297-3301.

Barany F (1991) The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl* 1: 5-16.

Campbell RD and **Trowsdale** J (1993) Map of the human MHC. *Immunology Today* 14: 349-352.

Clay TM, **Culpan** D, **Howell** WM, **Sage** DA, **Bradley** BA y **Bidwell** JL (1994) UHG crossmatching. A comparison with PCR-SSO typing in the selection of HLA-DPB-compatible bone marrow donors. *Transplantation* 58: 200-207.

Compton J (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350: 91-92.

Duck P (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques* 9: 142-147.

Fleischhauer K, **Kernan** NA, **O'Reilly** RJ, **Dupont** B y **Yang** SY (1990) Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *New Eng J Med* 323: 1818-1822.

Guatelli J, **Whitfield** K, **Kwoh** D, **Barringer** K, **Richman** D y **Gengeras** T (1990) Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1874-1878.

Hirschorn K, **Bach** F, **Kolodny** RL y **Firschen** IL (1963) Immune response and mitotis of human peripheral blood lymphocytes *in vitro. Science* 142: 1185-1187.

Kissmeyer NF, **Svejgaard** A y **Hauge** M (1969) The HLA system defined with Iymphocytoyoxic and platelet antibodies in relation to kidney transplantation. *Transplant Proc* 1: 357-361.

Kwoh D, **Davis** G, **Whitfield** K, **Chappelle** H, **Dimichele** L y **Gingeras** T (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1173-1177.

Kwok S, **Kellogg** DE, **McKinney** N, **Spasic** D, **Goda** L, **Levenson** C y **Sninsky** JJ (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res*. 18: 999-1005.

Landgren U, **Kaiser** R, **Sanders** J y **Hood** L (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080.

Lomeli H, **Tyagi** S, **Pritchard** C, **Lisardi** P y **Kramer** F (1989) Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 35: 1826-1831.

Matsukura M, **Shinozuka** K, **Zon** G, **Mitsuya** H, **Reitz** M, **Cohen** J y **Broder** S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7706-7710.

Miller P, **Yano** J, **Yano** E, **Carroll** C, **Jayaram** K y **Ts'o** P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18: 5134-5143.

Mullis K, **Faloona** F, **Scharf** S, **Saiki** R, **Horn** G y **Erlich** H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Gold Spring Harb Symp Quant Biol* 1: 263-273.

Mullis KB y **Faloona** FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.

Nielsen P, **Egholm** M, **Berg** R y **Buchardt** O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254: 1497-1500.

Nielsen P, **Egholm** M, **Berg** R y **Buchardt** O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic-Acids-Res* 21: 197-200.

Olerup O y **Zetterquist** H (1991) HLA-DRB1 *01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 37: 197-204.

Saiki RK, **Bugawan** TL, **Horn** GT, **Mullis** KB y **Erlich** HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.

Saiki RK, **Gelfland** DH, **Stoffel** S, **Scharf** SJ, **Higuchi** R, **Horn** GT, **Mullis** KB y **Erlich** HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Saiki RK, **Walsh** PS, **Levenson** CH y **Erlich** HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilizes sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Nat1 Acad Sci USA* 86: 6230-6234.

Sambrook J, **Fritsch** E y **Maniatis** T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA*.

Santamaria P, **Boyce-Jacino** MT, **Lindstrom** AL, **Barbosa** JJ, **Faras** AJ y **Rich** SS (1992) HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB and DQA genes. *Hum Immunol* 33: 69-81.

Santamaria P, **Lindstrom** AL, **Boyce** JM, **Jacino** MT, **Myster** SH, **Barbosa** JJ, **Faras** AJ y **Rich** SS (1993) HLA class I sequence-based typing. *Hum Immunol* 37: 39-50.

Sanchez-Pescador R, **Stempien** MS y **Urdea** MS (1988) Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection ofTEM-1 beta-lactamase-mediated penicillin resistance in Neisseria gonorrhoeae and other bacteria. *J Clin Microbiol* 26: 1934-1938.

Spencer WR y **Parham** P (1996) HLA class 1 genes: structure and diversity. Capítulo 4. HLA and MHC: genes, molecules and function. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.

Stuyver L, **Rossau** R, **Wyseur** A, **Duhamel** M, **Vanderborght** B, Van **Heuverswyn** H y **Maertens** G (1993) Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 74: 1093-1102.

Terasaki PH y **McClelland** JD (1964) Microdoplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998-1007.

Townsend A y **Bodmer** H (1989) Antigen recognition by Class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 7: 601-624.

Urdea MS, **Horn** T, **Fultz** TJ, **Anderson** M, **Running** JA, **Hamren** S, **Ahle** D y **Chang** CA (1991) Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser* 24: 197-200.

Wu D y **Wallace** B (1989) The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 4: 560-569.

Yang SY (1987) A standardised method for detection of HLA-A and HLA-B alleles by one-dimensional isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis. Immunobiology of HLA. Histocompatibility testing (ed. B Dupont). *Springer-Verlag*, Nueva York, USA. p. 332-335.

Yoshida M, **Kimura** A, **Numano** F y **SasazukiT** (1992) Polymerase-chain-reaction-based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum Immunol* 34: 257-266.

REIVINDICACIONES

1. Método para tipar o subtipar uno o más alelos HLA-A en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

(i) si es necesario, liberar, aislar y/o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) amplificar de forma separada, específica del locus, el exón 2, exón 3 y exón 4 de los alelos HLA-A, haciendo uso de al menos tres conjuntos de cebadores, en los que

- para la amplificación del exón 2, el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de HLA-A,

- para la amplificación del exón 3, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 2 de HLA-A, y/o el cebador inverso se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 de HLA-A, y

- para la amplificación del exón 4, el cebador directo se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del locus en el intrón 3 de HLA-A;

(iii) tipar el alelo HLA-A específico presente en dicha muestra.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** además porque la secuencia diana específica del locus está situada en la posición 67, 96, 109, 110, 118, 123, 131 ó 181 del intrón 2 de HLA-A (Fig. 1) y/o posición 32, 50, 62, 73, 83, 86, 118, 130, 150, 501, 525, 561 ó 571 del intrón 3 de HLA-A (Fig. 4).

3. Método según la reivindicación 2, **caracterizado** además porque dichas posiciones constituyen el extremo 3' del cebador que se usa para la amplificación del exón 2, exón 3 o exón 4.

4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** además porque el cebador se escoge de la siguiente lista:

- para la amplificación del exón 2 de HLA-A (tabla 1):

5'ATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 1)

5'GATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 2)

5'GGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 3)

5'YGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 4)

5'GYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 5)

5'GGYGGATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 6)

5'GGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 7)

5'GGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 8)

5'AGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 9)

5'AAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 10)

5'CAAGGGTCTCGGRGTCCCGCGGCT3' (SEC ID NO 11)

5'CTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 12)

5'TCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 13)

5'CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 14)

5'CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 15)

5'GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 16)

5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTCG3' (SEC ID NO 17)

5'TCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 18)

5'CTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 19)

5'CCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 20)

5'GCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 21)

5'GGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 22)

5'GGGCCTCTCCCGGGDCAAGGGTCTC3' (SEC ID NO 23)

5'CCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 30)

5'GCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 31)

5'CGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 32)

5'GCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 33)

5'GGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 34)

5'AGGCGCCTGGGCCTCTCCCGGGDCA3' (SEC ID NO 35)

5'AGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 36)

5'AAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 37)

5'WAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 38)

5'TWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 39)

5'GTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 40)

5'GGTWAAGGCGCCTGGGCCTCTCCCG3' (SEC ID NO 41)

5'CCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 42)

5'ACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 43)

5'AACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 44)

5'AAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 45)

5'GAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 46)

5'TGAAACCGGGTWAAGGCGCCTGGGC3' (SEC ID NO 47)

5'YCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 48)

5'GYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 49)

5'YGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 50)

5'CYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 51)

5'CCYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 52)

5'CCCYGYCCVGCCCCGACCAACCYGG3' (SEC ID NO 53)

- para la amplificación del exón 3 de HLA-A (tabla 2; tabla 3)

5'CGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 54)

5'ACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 55)

5'CACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 56)

5'CCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 57)

5'CCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 58)

5'CCCCACGGACGGGCCRGGTSRCCCA3' (SEC ID NO 59)

5'GGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 60)

5'GGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 61)

5'CGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 62)

5'CCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 63)

5'TCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 64)

5'CTCCGGGTCCGAGATCCRCCCCGAA3' (SEC ID NO 65)

5'CCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 66)

5'RCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 67)

5'CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 68)

5'CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 69)

5'TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 70)

5'ATCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCC3' (SEC ID NO 71)

5'CCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 72)

5'CCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 73)

5'RCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 74)

5'CRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 75)

5'CCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 76)

5'TCCRCCCCGAAGCCGCGGGACYCCG3' (SEC ID NO 77)

5'CGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 84)

5'CCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 85)

5'GCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3'(SEC ID NO 86)

5'AGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 87)

5'AAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 88)

5'GAAGCCGCGGGACYCCGAGACCCTT3' (SEC ID NO 89)

5'GACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 90)

5'GGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 91)

5'GGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 92)

5'CGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 93)

5'GCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 94)

5'CGCGGGACYCCGAGACCCTTGDCCC3' (SEC ID NO 95)

5'GACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 96)

5'AGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 97)

5'GAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 98)

5'CGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 99)

5'CCGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 100)

5'YCCGAGACCCTTGDCCCGGGAGAGG3' (SEC ID NO 101)

5'GTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 102)

5'AGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 103)

5'CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 104)

5'TCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 105)

5'TTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 106)

5'TTTCAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 107)

5'AGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 150)

5'CAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 151)

5'CCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 152)

5'GCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 153)

5'GGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 154)

5'AGGCCAGCCCGGGAGATCTAYAGGC3' (SEC ID NO 155)

5'CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 156)

5'CCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 157)

5'TCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 158)

5'CTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 159)

5'TCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 160)

5'GTCTCCCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 161)

5'CCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 162)

5'TCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 163)

5'GTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 164)

5'GGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 165)

5'TGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 166)

5'TTGGTCCCAAWTGTCTCCCCTCCTT3' (SEC ID NO 167)

5'CTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 168)

5'TCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 169)

5'TTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 170)

5'ATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 171)

5'TATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 172)

5'ATATTCTAGTGTTGGTCCCAAWTGT3' (SEC ID NO 173)

5'GGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 174)

5'AGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 175)

5'GAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 176)

5'GGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 177)

5'GGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 178)

5'AGGGAGGGYGATATTCTAGTGTTGG3' (SEC ID NO 179)

5'GGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 180)

5'GGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 181)

5'AGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 182)

5'GAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 183)

5'AGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 184)

5'CAGAGGGAGGGYGATATTCTAGTGT3' (SEC ID NO 185)

5'CCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 186)

5'ACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 187)

5'AACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 188)

5'AAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 189)

5'GAAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 190)

5'GGAAACCCAGGAGGAKTCCTCTCCC3' (SEC ID NO 191)

5'AGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 192)

5'CAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 193)

5'ACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 194)

5'TACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 195)

5'GTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 196)

5'GGTACAGGATCTGGAAACCCAGGAG3' (SEC ID NO 197)

5'TCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 198)

5'CTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 199)

5'CCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 200)

5'ACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 201)

5'AACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 202)

5'GAACCTCAGAGTCACTCTCTGGTAC3' (SEC ID NO 203)

- para la amplificación del exón 4 de HLA-A (tabla 4):

5'TTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 204)

5'GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3'(SEC ID NO 205)

5'GGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 206)

5'GGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 207)

5'TGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 208)

5'CTGGGTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 209)

5'GGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 24)

5'RGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 25)

5'CRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 26)

5'CCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 27)

5'CCCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 28)

5'TCCCRGGTGTCCTGTCCATTCTCAA3' (SEC ID NO 29)

5'CTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 210)

5'GCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 211)

5'TGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 212)

5'RTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 213)

5'YRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 214)

5'GYRTGCTGGWGGAGTGTCCCATKAC3' (SEC ID NO 215)

5'GTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 216)

5'TGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 217)

5'GTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 218)

5'AGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 219)

5'GAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 220)

5'GGAGTGTCCCATKACAGATRCMMAA3' (SEC ID NO 221).

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** además porque la amplificación del exón 2 se lleva a cabo el siguiente cebador directo:

- 5'TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC3' (SEC ID NO 144).

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** además porque la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con el siguiente cebador inverso:

- 5'TTGGGCAGACCCTCATGCTGC3' (SEC ID NO 311).

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** además porque:

- la amplificación del exón 2 se lleva a cabo con el siguiente conjunto de cebadores:

  - 5'TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC3' (SEC ID NO 144) y 5'ATCTCGGACCCGGAGACTGT3' (SEC ID NO 1);

- la amplificación del exón 3 se lleva a cabo con el siguiente conjunto de cebadores:

  - 5'CAGTTTAGGCCAAAAATCCCCC3' (SEC ID NO 104) y 5'CCCTCCTTGTGGGAGGCCAG3' (SEC ID NO 156);

- la amplificación del exón 4 se lleva a cabo con el siguiente conjunto de cebadores:

  - 5'GTTCTGTGCTCYCTTCCCCAT3' (SEC ID NO 205) y 5'TTGGGCAGACCCTCATGCTGC3' (SEC ID NO 311).

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** además porque tanto el exón 2 como el exón 3 de HLA-A se amplifican mediante uso de una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** además porque los tres exones, exón 2, exón 3 y exón 4, de HLA-A se amplifican mediante uso de una mezcla de cebadores múltiple que contiene al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 2, al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 3 y al menos un par de cebadores para la amplificación del exón 4.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** además porque la etapa de tipado se lleva a cabo mediante hibridación con una o más sondas adecuadas.

11. Un kit de diagnóstico para tipar o subtipar uno o más alelos HLA-A en una muestra, que comprende los siguientes componentes:

(i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) una mezcla de cebadores que contiene al menos

- un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 2, que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la amplificación del exón 2 de alelos HLA-A,
- un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 3, que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la amplificación del exón 3 de alelos HLA-A, y
- un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 4, que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la amplificación del exón 4 de alelos HLA-A;

(iii) un medio para el tipado del alelo HLA-A específico presente en dicha muestra.

12. Un kit de ensayo sondas en líneas para el tipado o subtipado de uno o más alelos HLA-A en una muestra, que comprende los siguientes componentes:

(i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra;

(ii) una mezcla de cebadores que contiene al menos

- un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 2, que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la amplificación del exón 2 de alelos HLA-A,
- un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 3, que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la amplificación del exón 3 de alelos HLA-A, y
- un conjunto de cebadores para la amplificación del exón 4, que consiste en una combinación de un cebador directo y un cebador inverso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la amplificación del exón 4 de alelos HLA-A;

(iii) al menos una sonda que se hibrida específicamente con el exón 2, exón 3 o exón 4 de HLA-A, fijada a un soporte sólido;

(iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;

(v) una disolución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha disolución;

(vi) cuando sea apropiado, un medio para detectar los híbridos que resultan de la hibridación precedente.

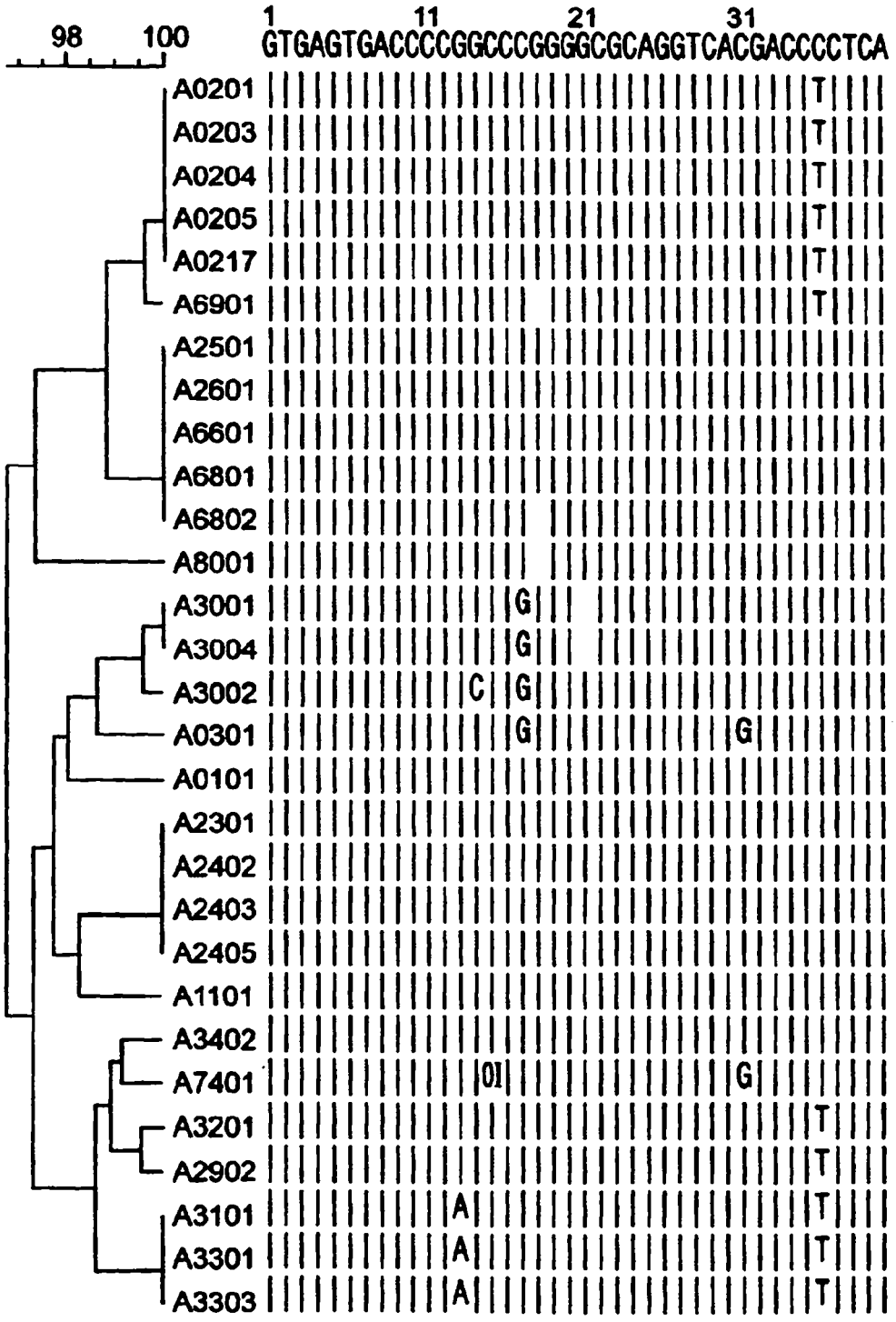

98
100
1
11
21
31
GTGAGTGACCCCGGCCCGGGGCGCAGGTCACGACCCCTCA
A0201
A0203
A0204
A0205
A0217
A6901
A2501
A2601
A6601
A6801
A6802
A8001
A3001
A3004
A3002
A0301
A0101
A2301
A2402
A2403
A2405
A1101
A3402
A7401
A3201
A2902
A3101
A3301
A3303

Fig 1

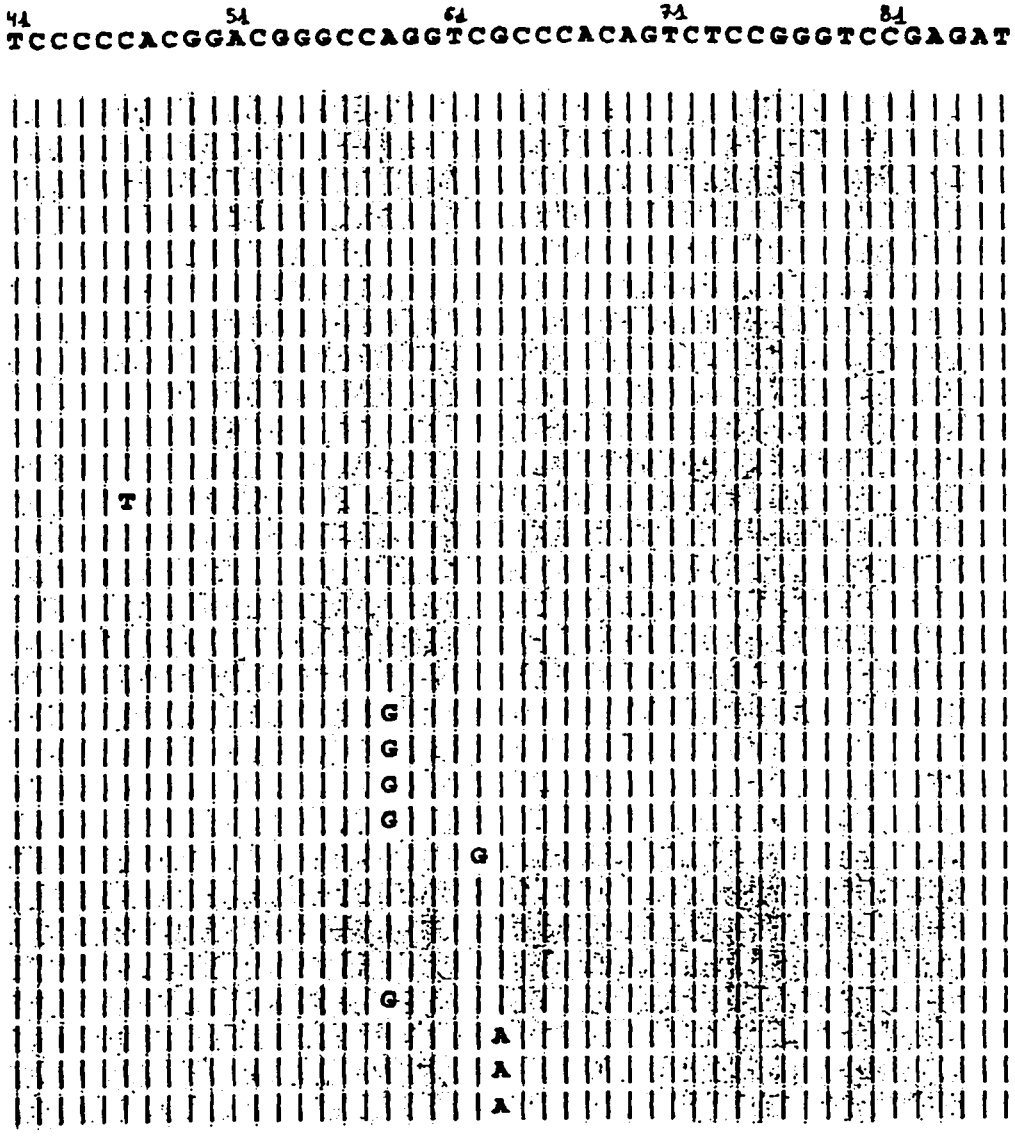


Fig. 1 (continuación 1)

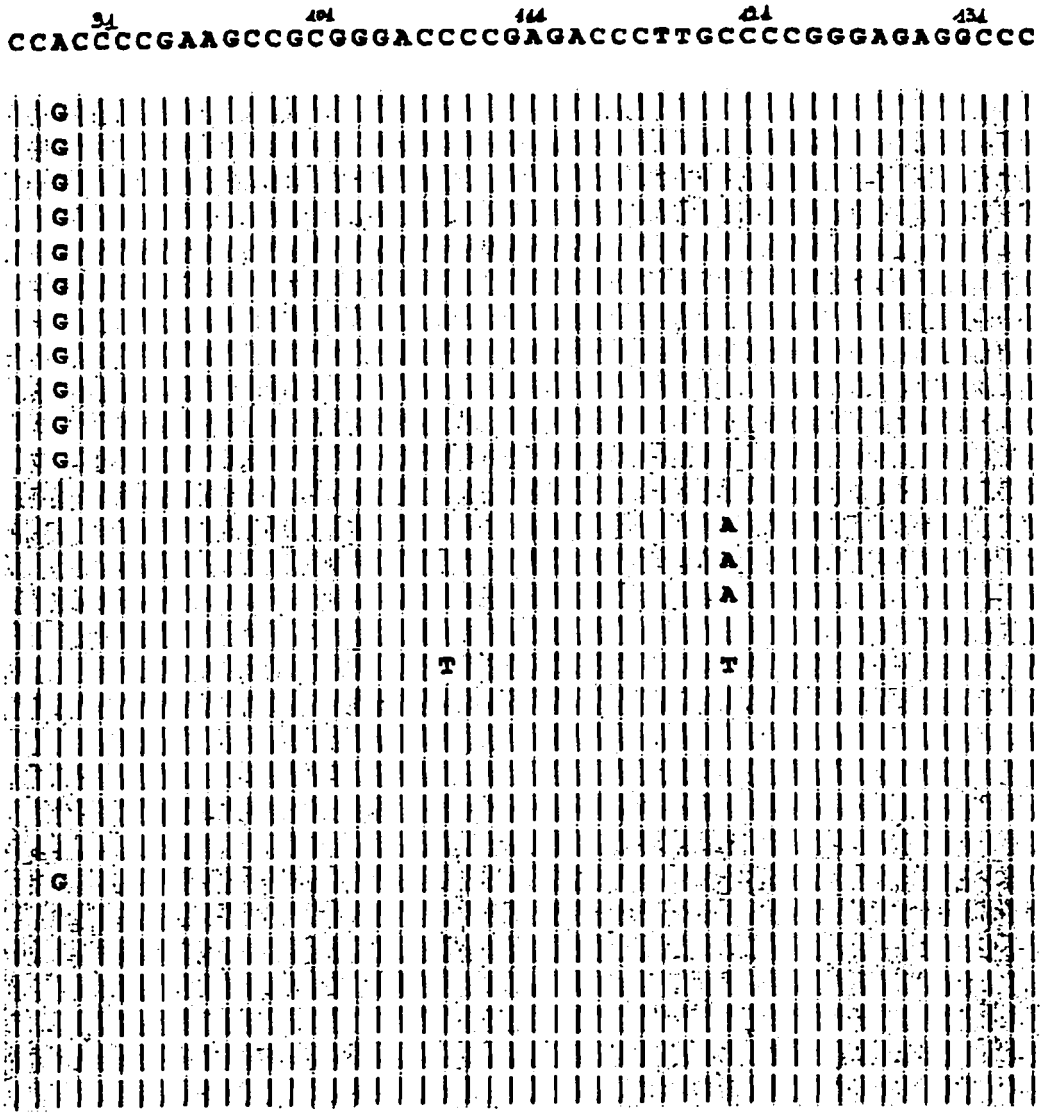


Fig. 1 (continuación 2)

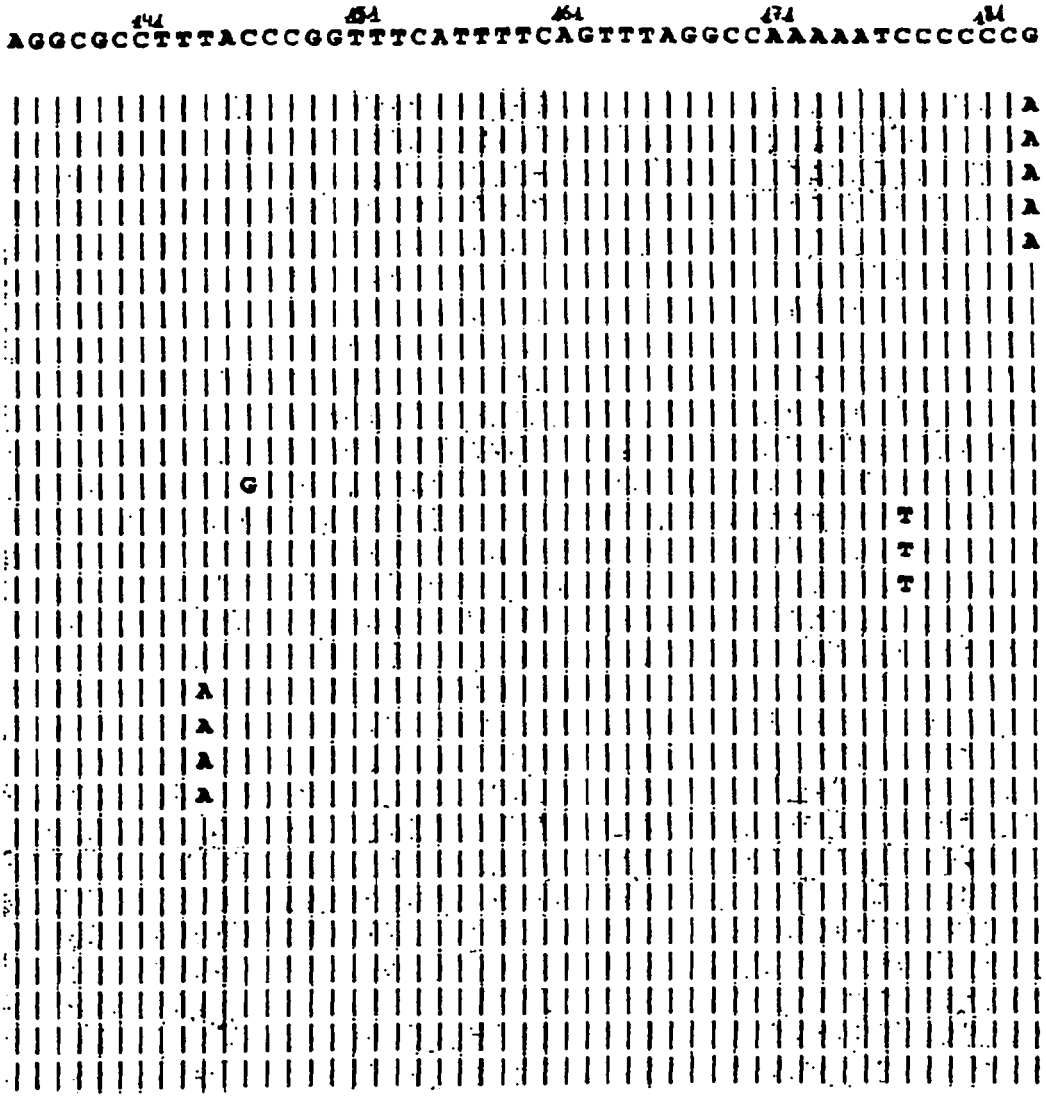


Fig. 1 (continuación 3)

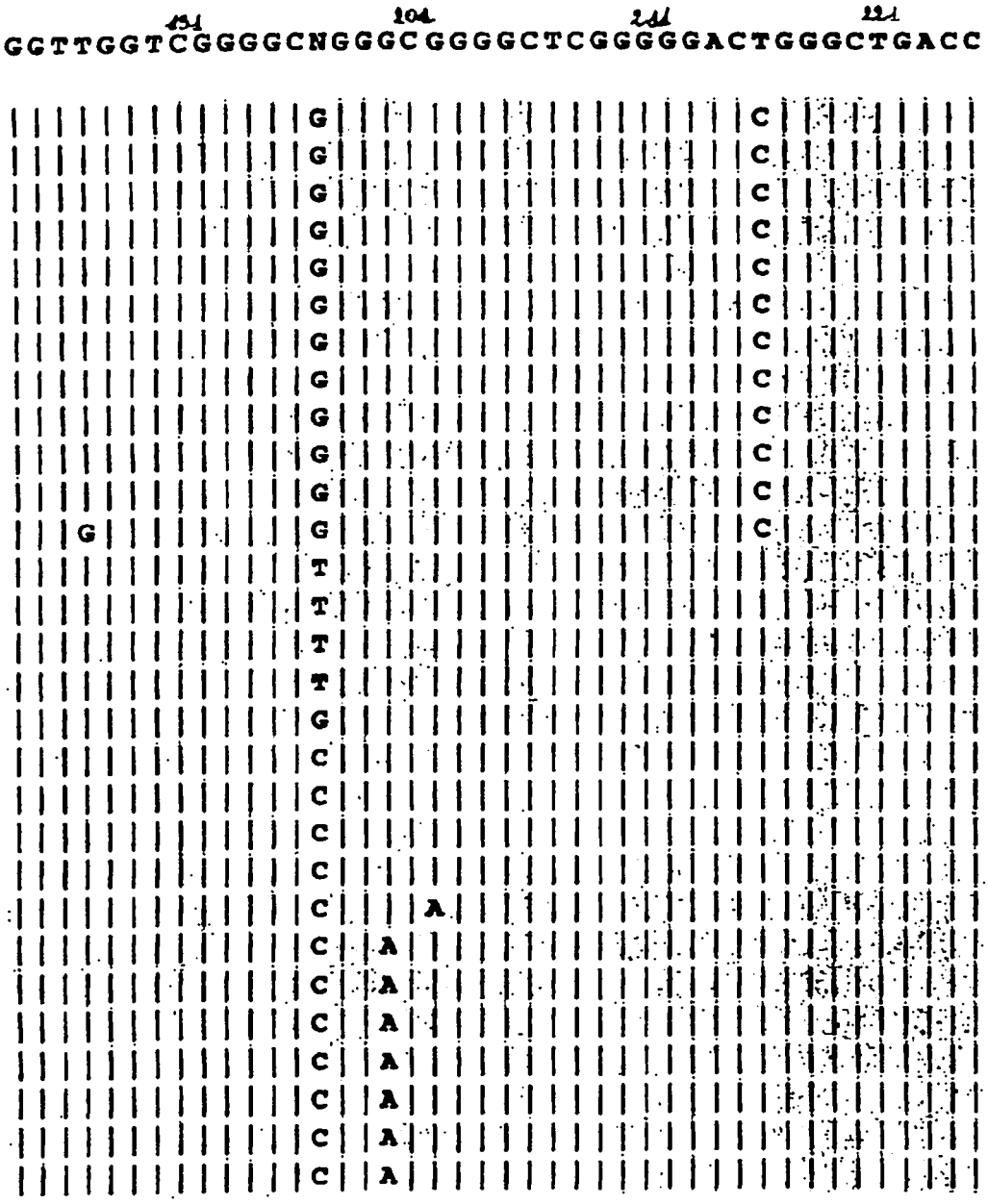


Fig. 1 (continuación 4)

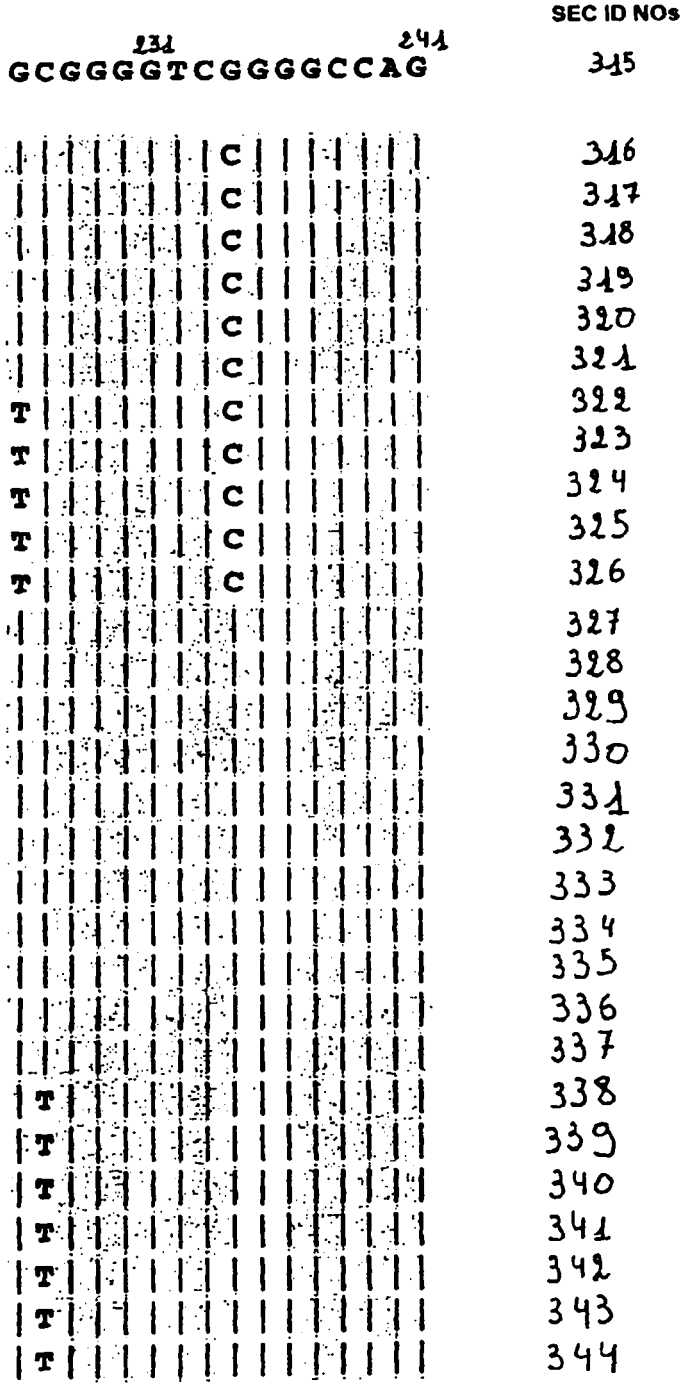


Fig. 1 (continuación 5)

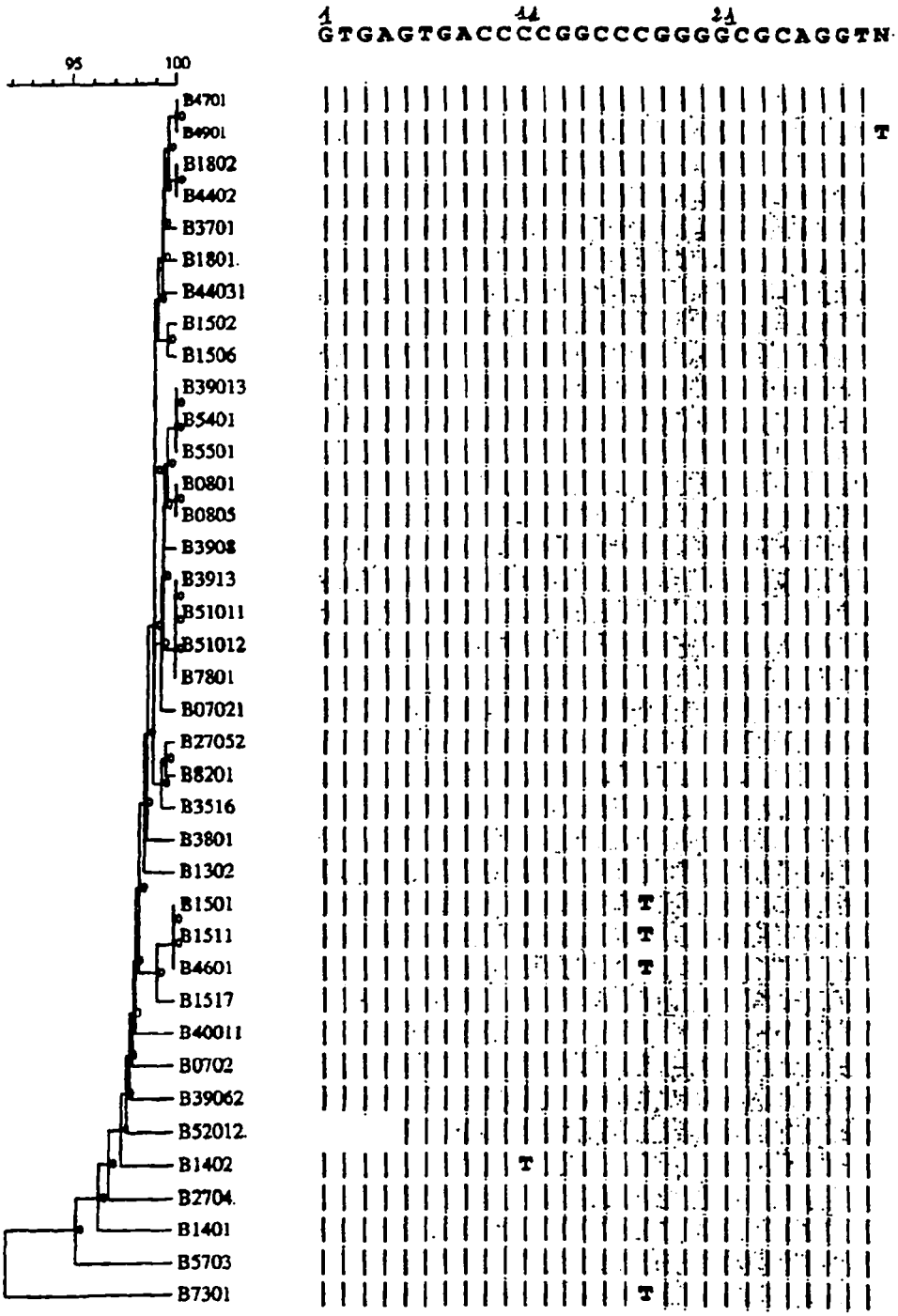

1
GTGAGTGACCCCGGCCCGGGGCGCAGGTN
11
21
95
100
B4701
B4901
B1802
B4402
B3701
B1801
B44031
B1502
B1506
B39013
B5401
B5501
B0801
B0805
B3908
B3913
B51011
B51012
B7801
B07021
BZ7052
B8201
B3516
B3801
B1302
B1501
B1511
B4601
B1517
B40011
B0702
B39062
B52012
B1402
B2704
B1401
B5703
B7301

Fig. 2

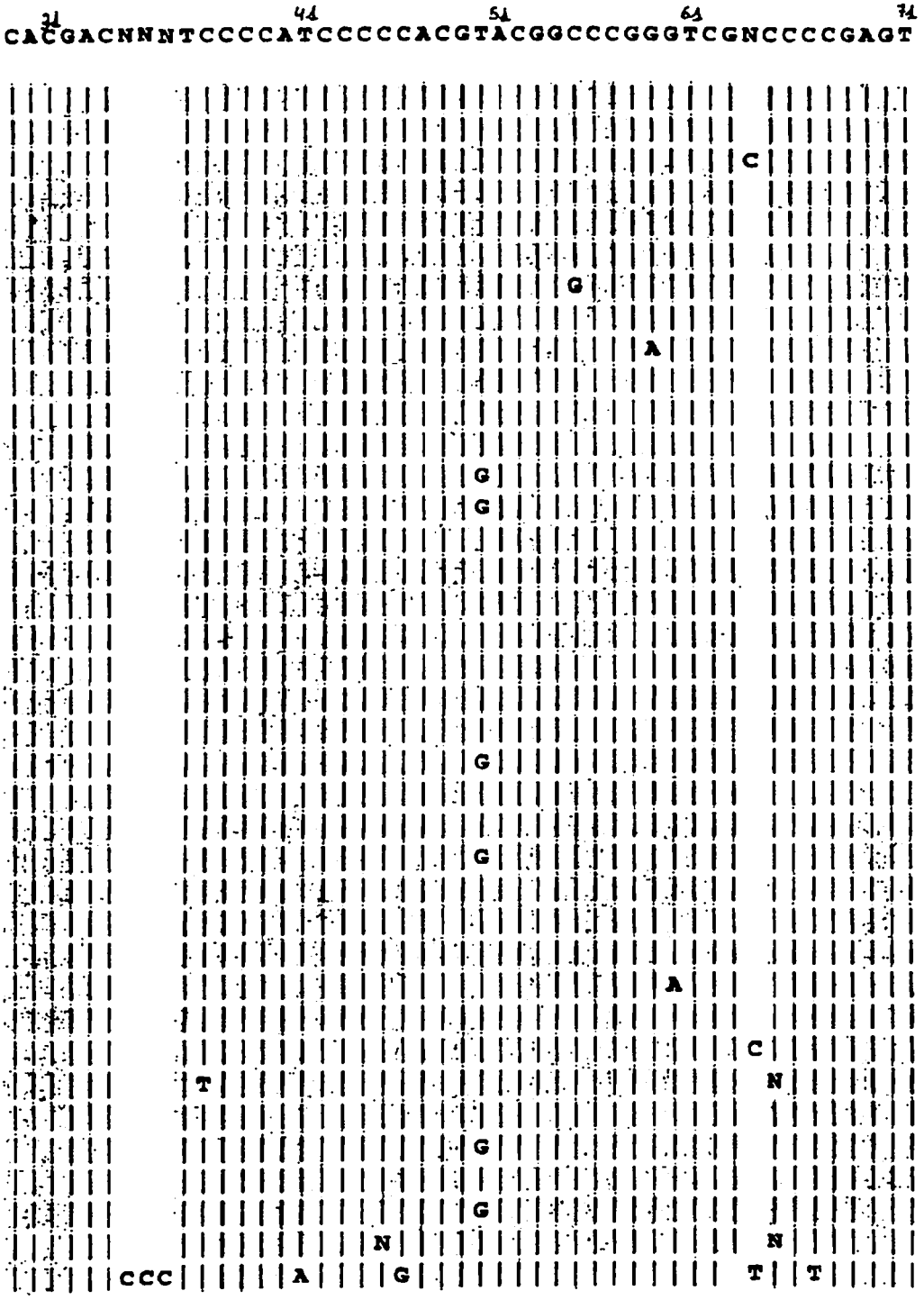


Fig. 2 (continuación 1)

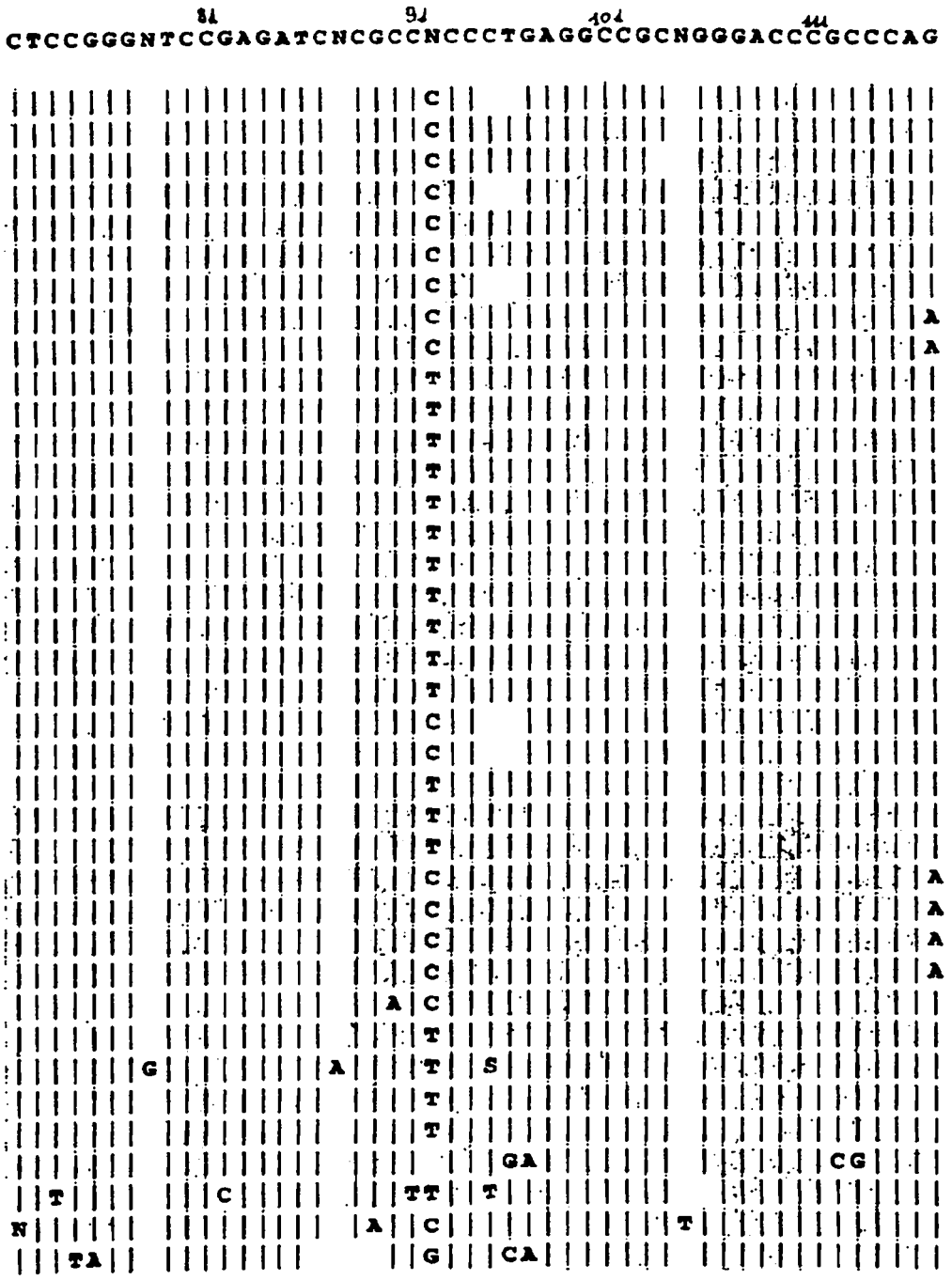


Fig. 2 (continuación 2)

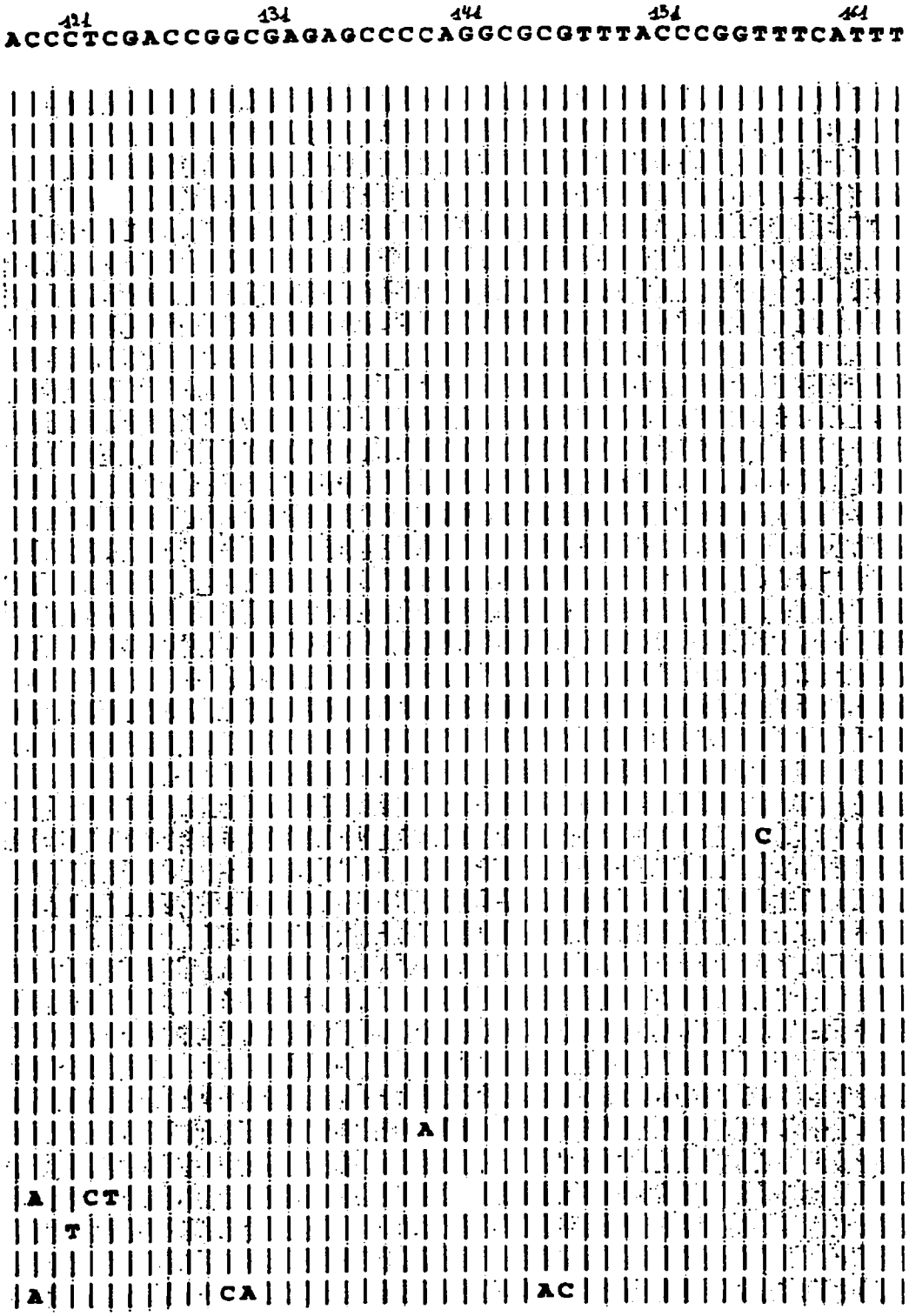


Fig. 2 (continuación 3)

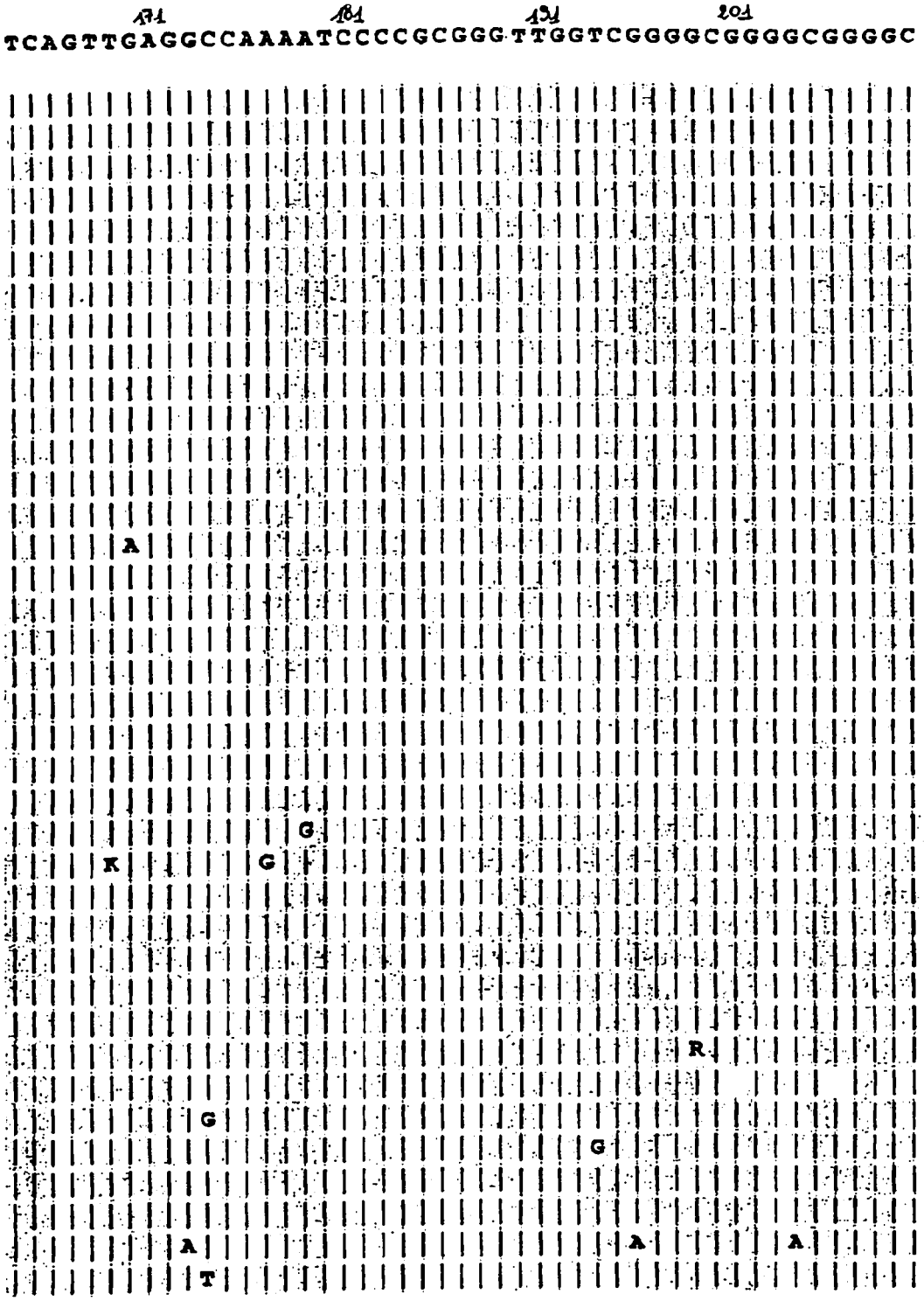


Fig. 2 (continuación 4)

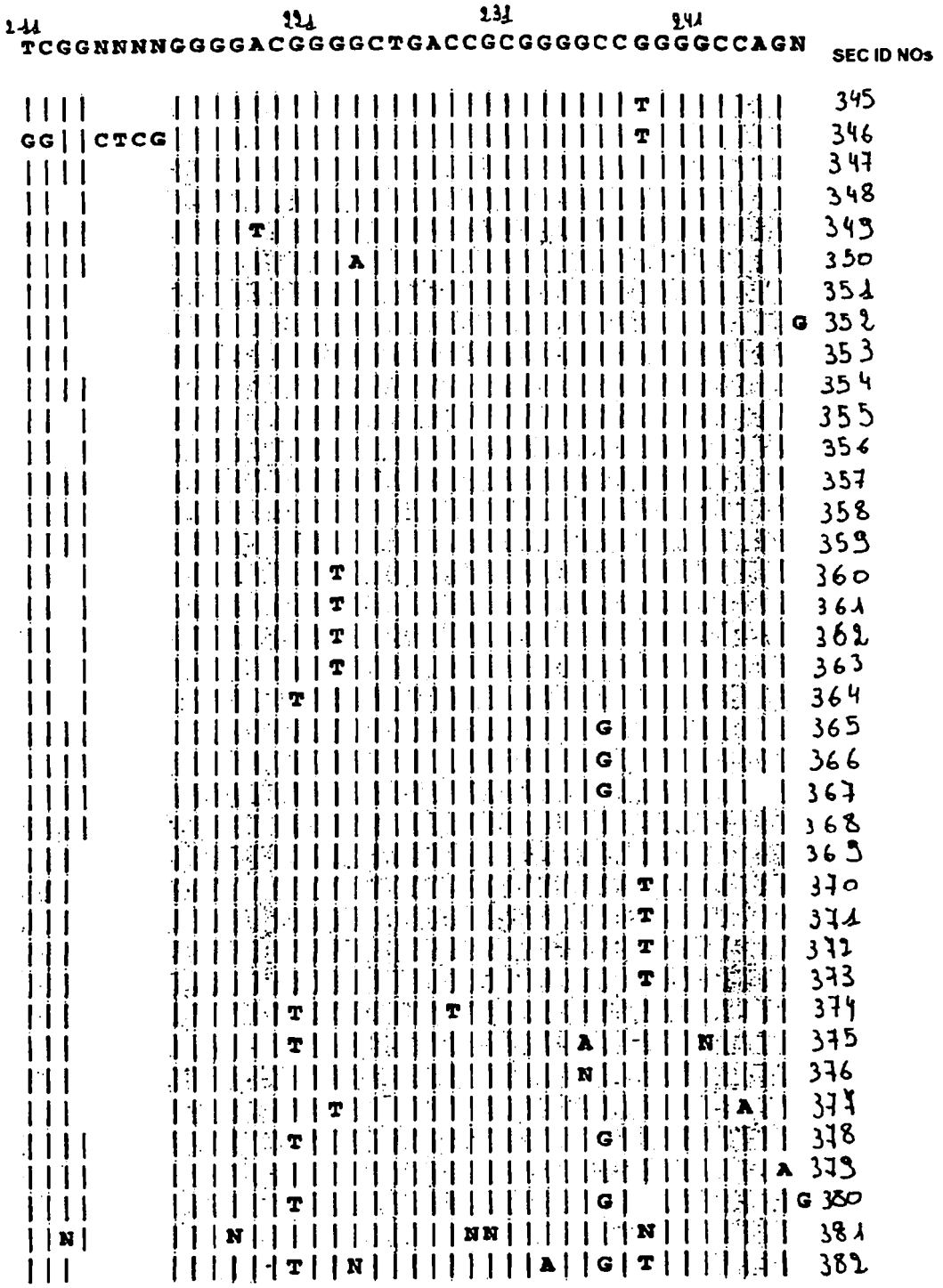


Fig. 2 (continuación 5)

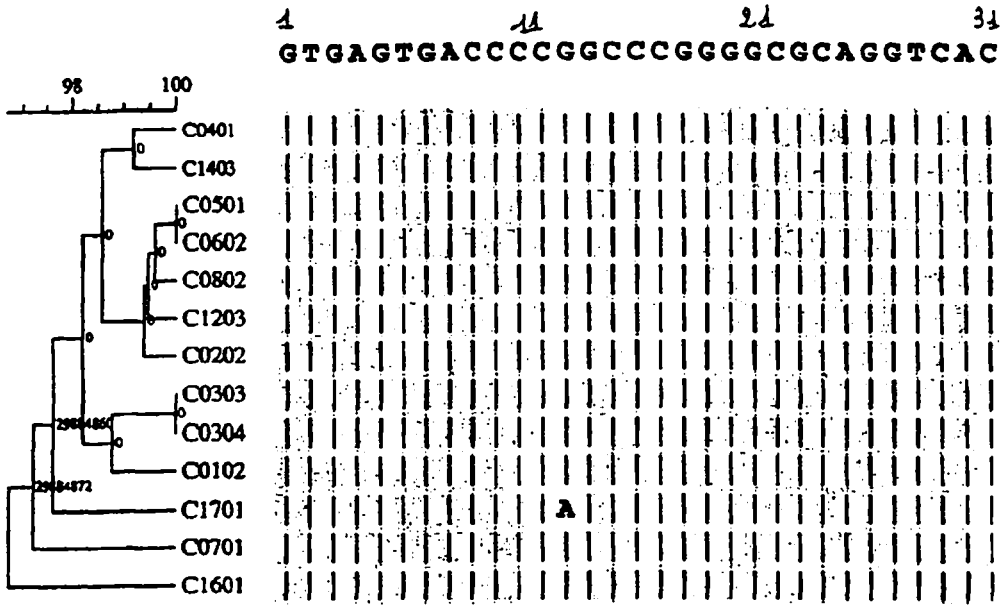

1
11
21
31
GTGAGTGACCCCGGCCCGGGGCGCAGGTCAC
98
100
C0401
C1403
C0501
C0602
C0802
C1203
C0202
C0303
C0304
C0102
C1701
C0701
C1601
A

Fig. 3



Fig. 3 (continuación 1)

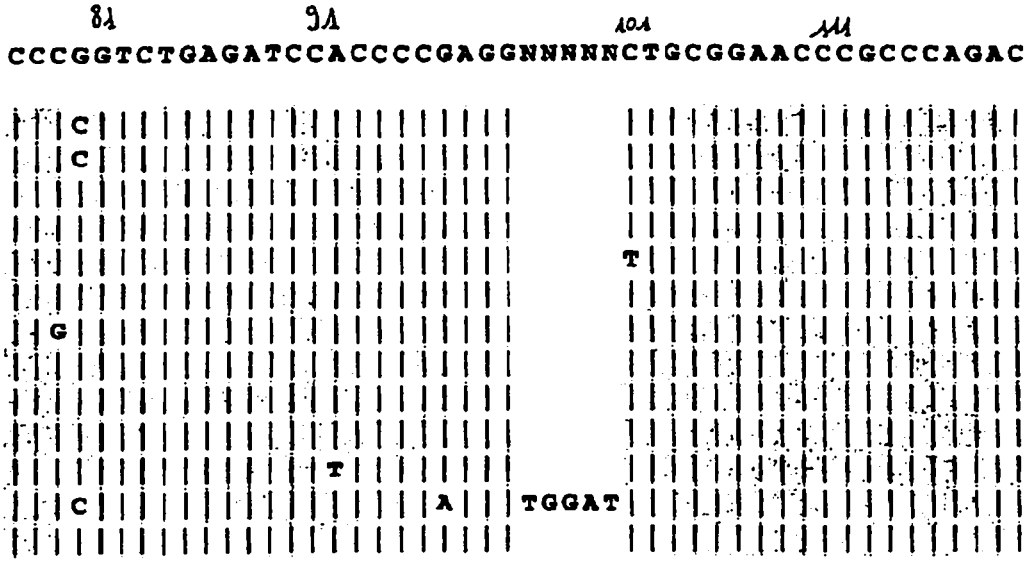


Fig. 3 (continuación 2)

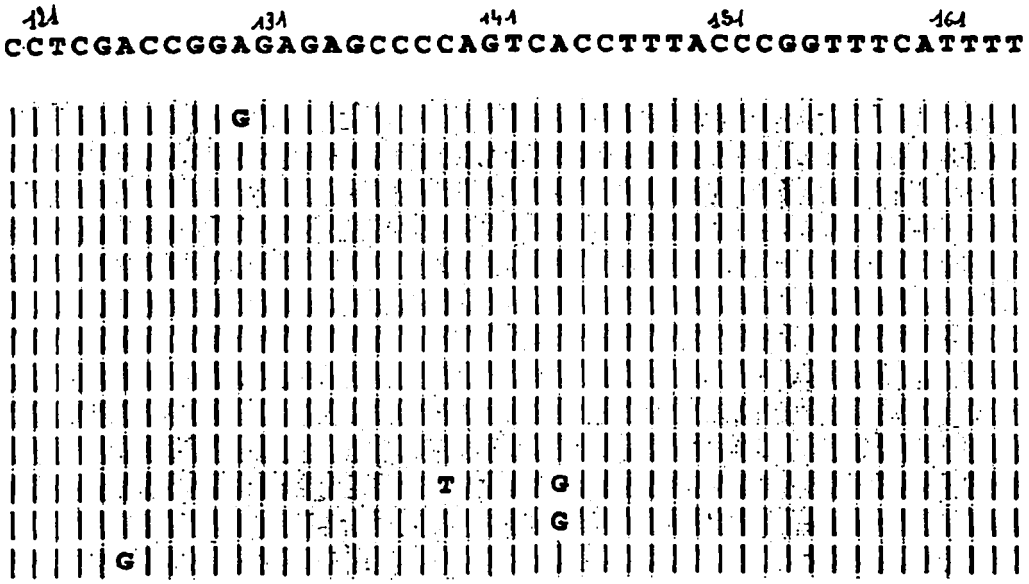


Fig. 3 (continuación 3)

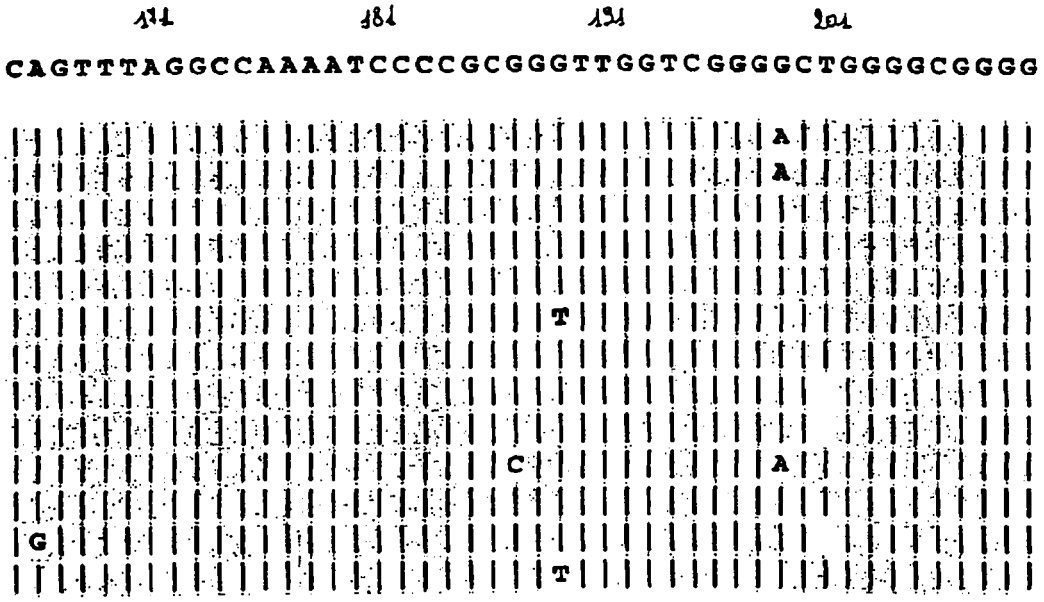


Fig. 3 (continuación 4)

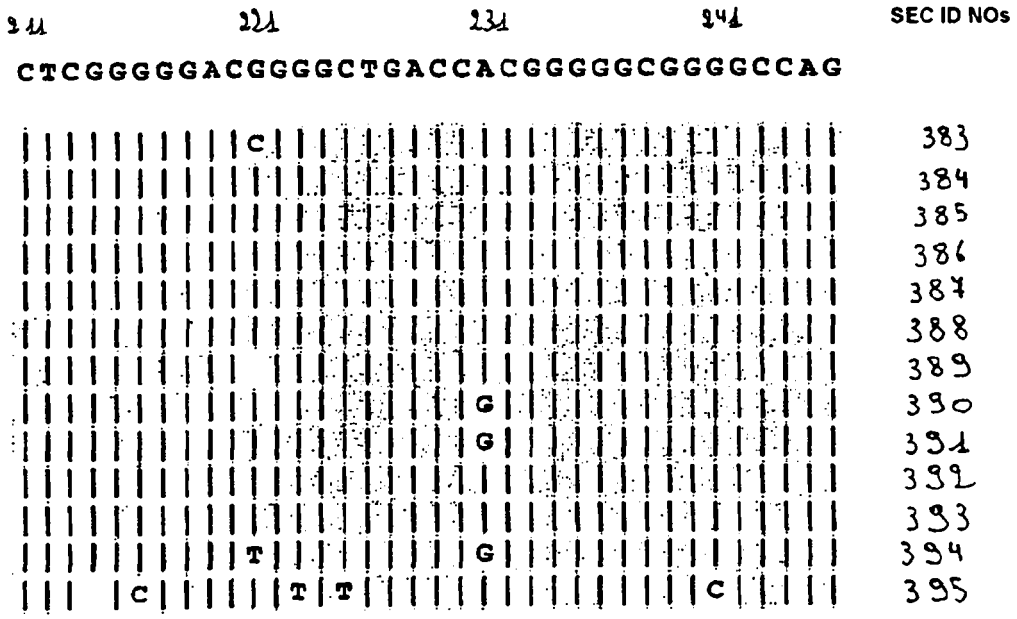


Fig. 3 (continuación 5)

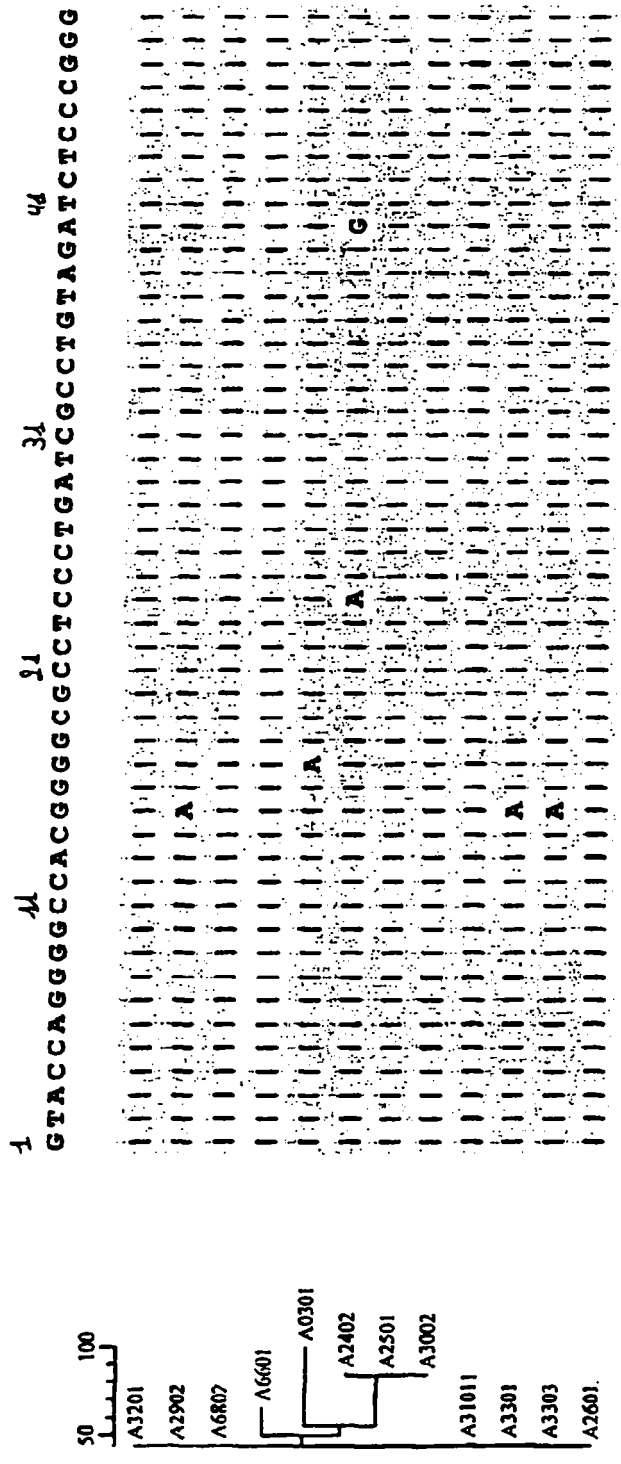

1
GTACCAGGGGCCACGGGGCGCCTCCCTGATCGCCTGTAGATCTCCCGGG
A3201
A2902
A6802
A6601
A0301
A2402
A2501
A3002
A31011
A3301
A3303
A2601
50
100

Fig. 4

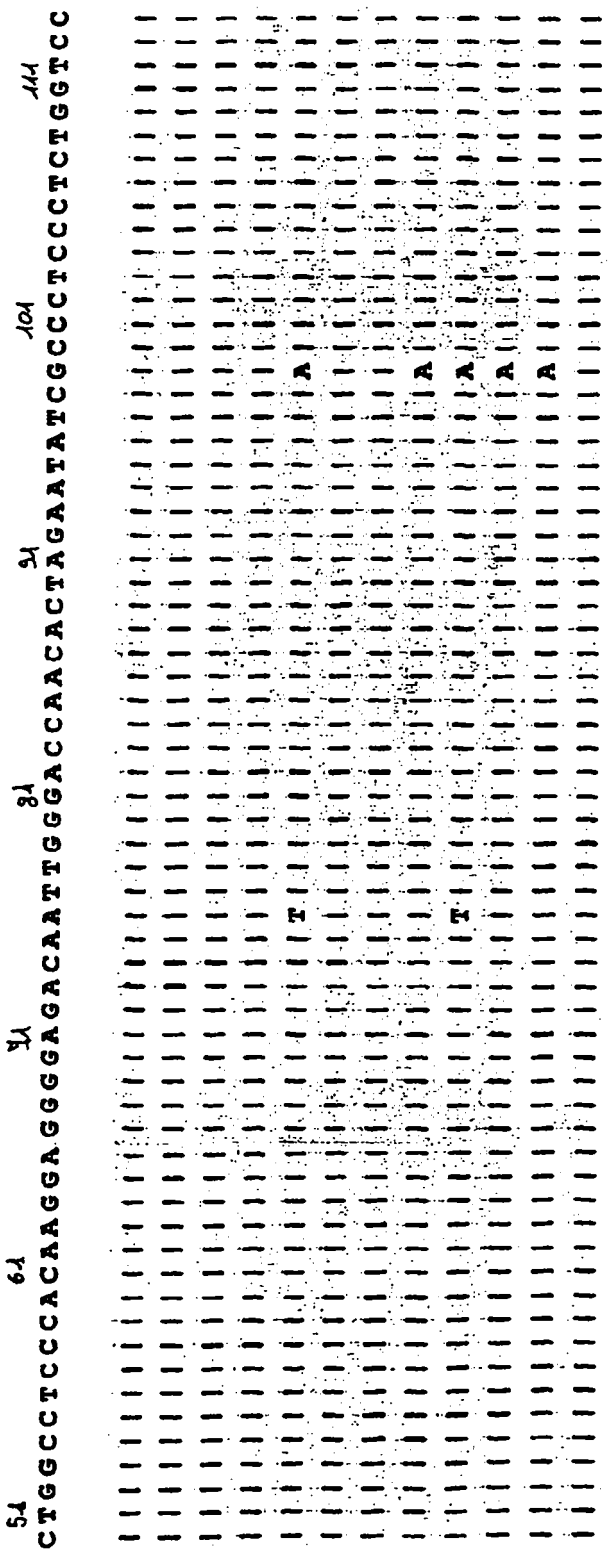


Fig. 4 (continuación 1)

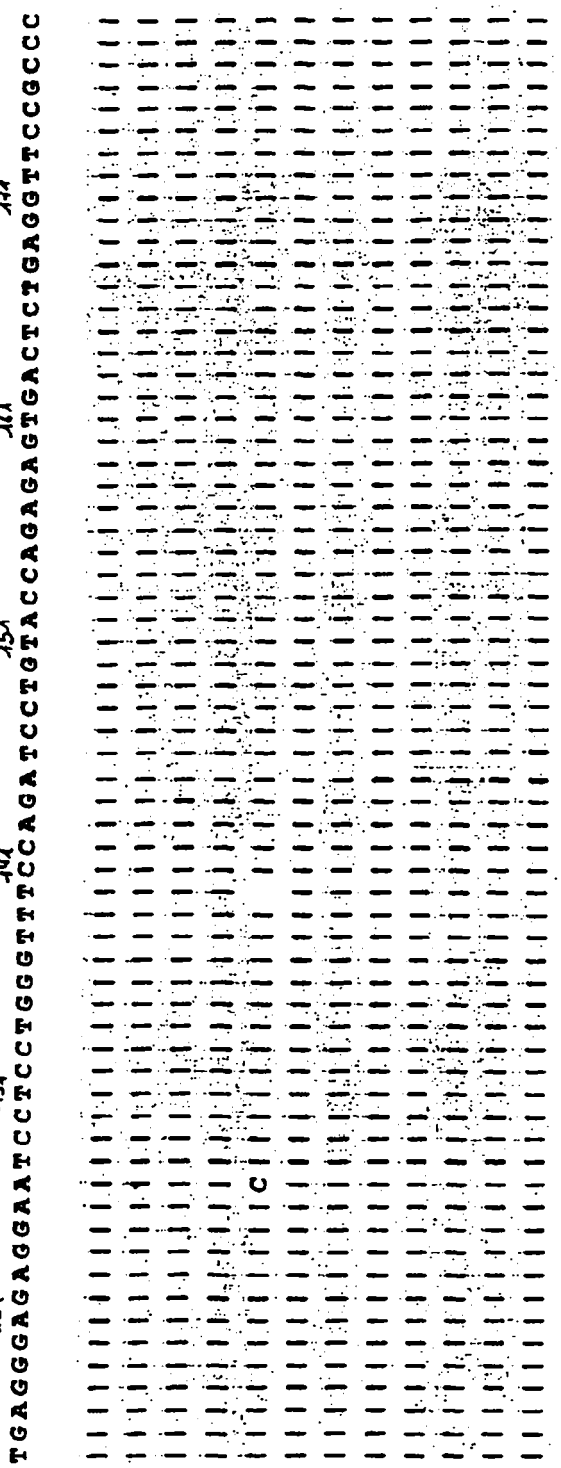


Fig. 4 (continuación 2)

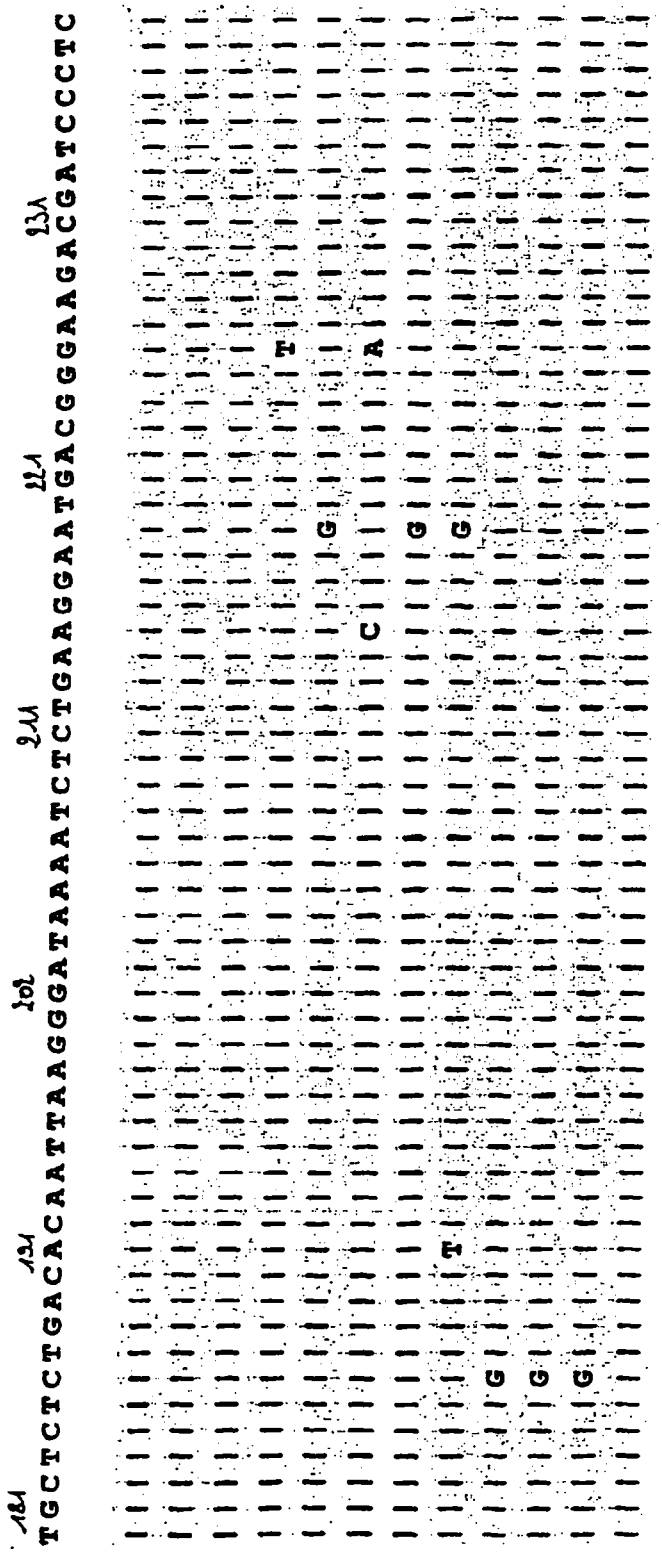


Fig. 4 (continuación 3)

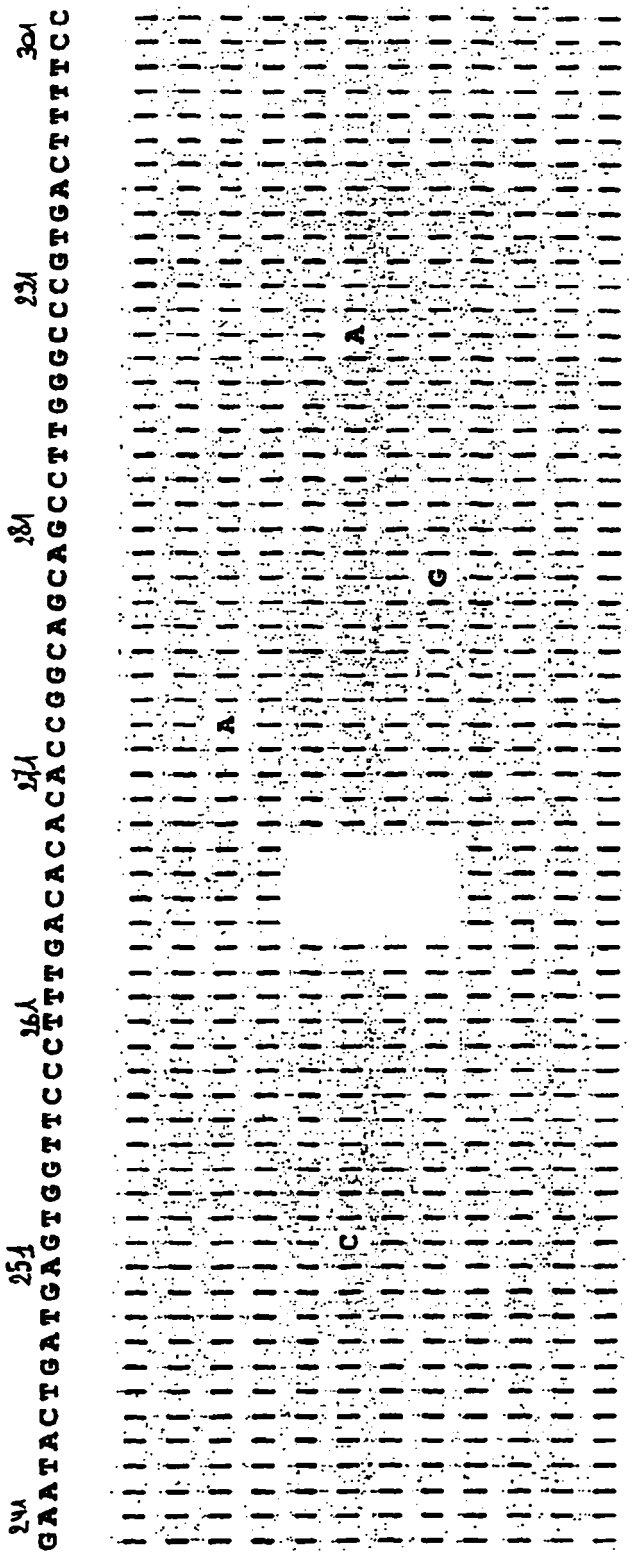


Fig. 4 (continuación 4)

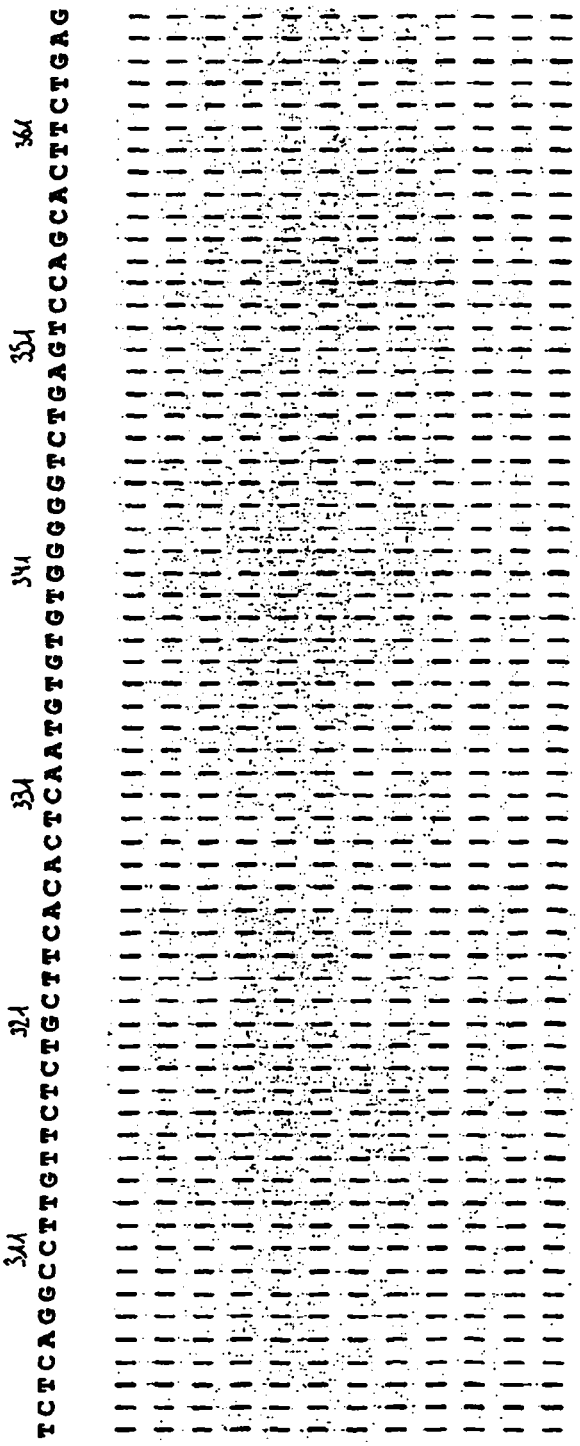


Fig. 4 (continuación 5)

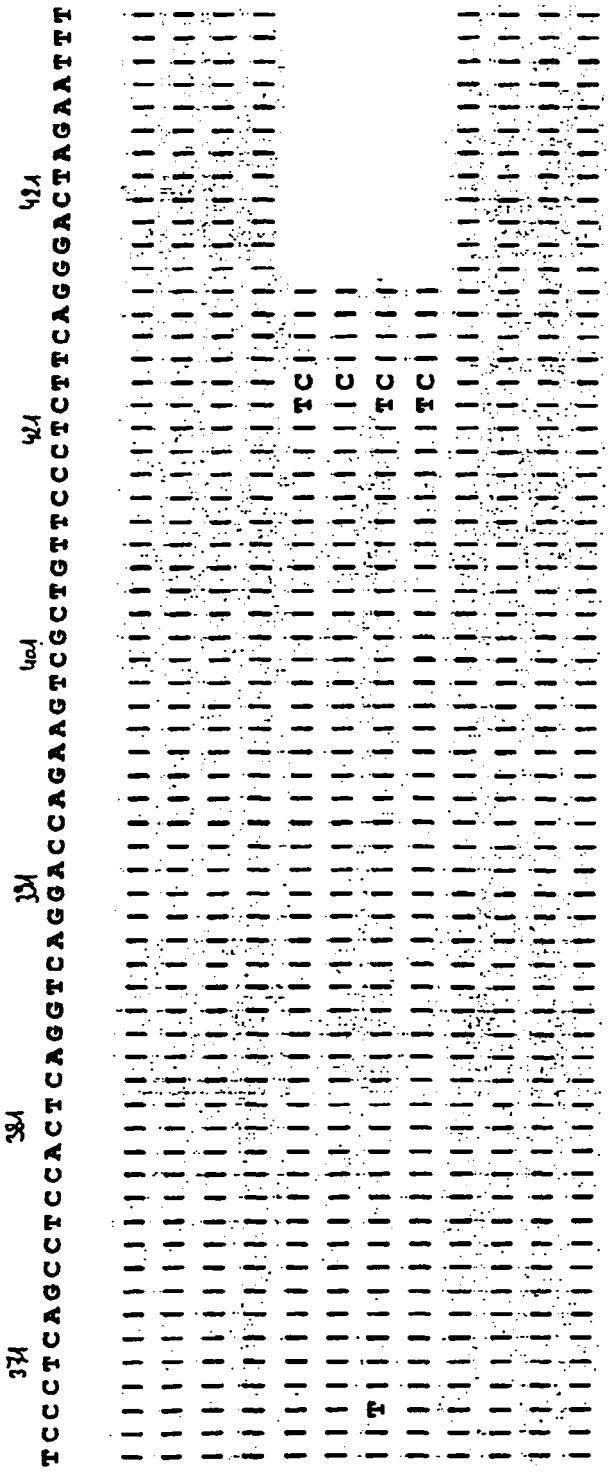


Fig. 4 (continuación 6)

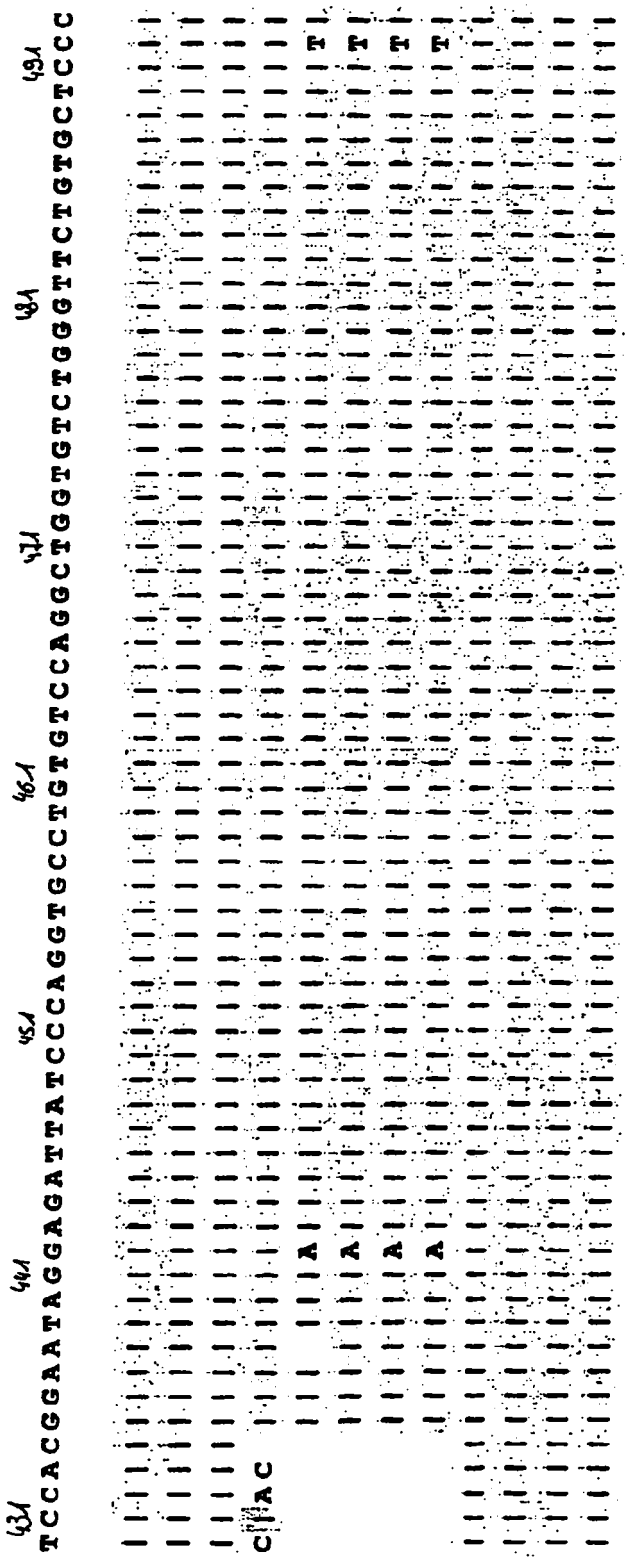


Fig. 4 (continuación 7)

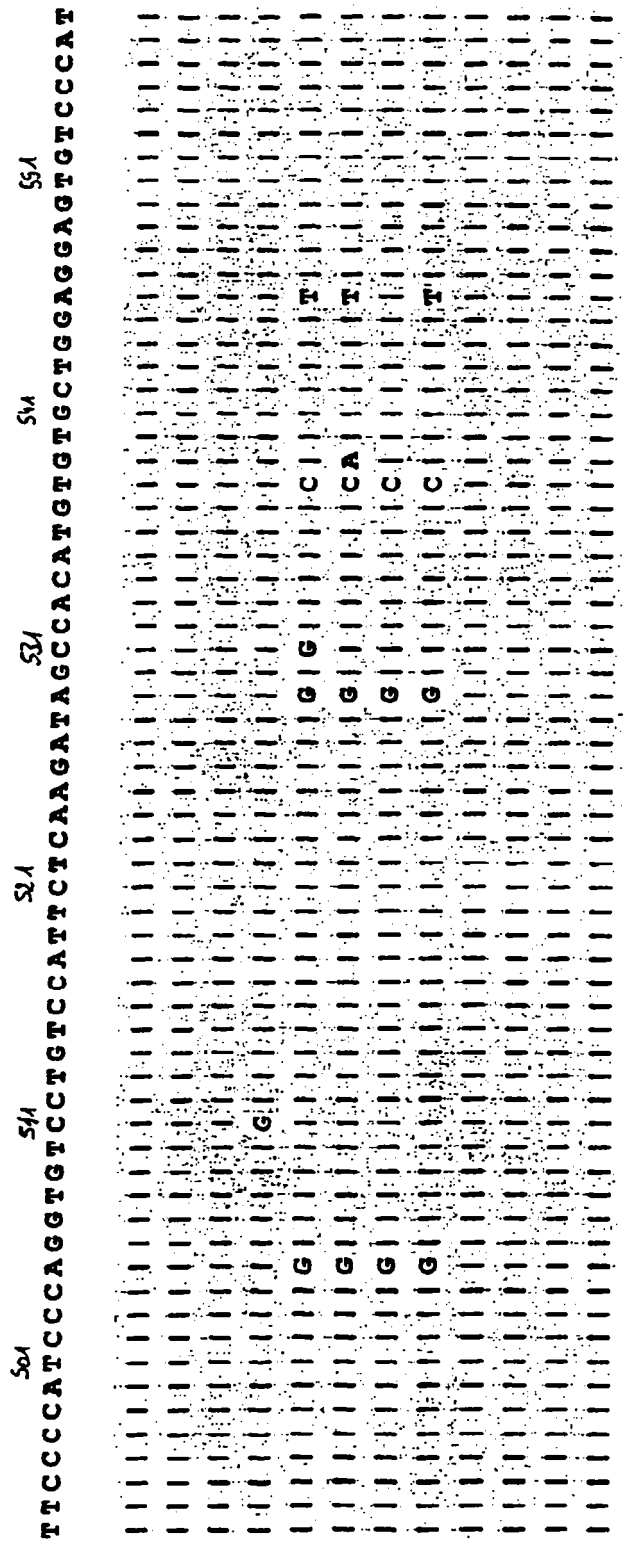


Fig. 4 (continuación 8)

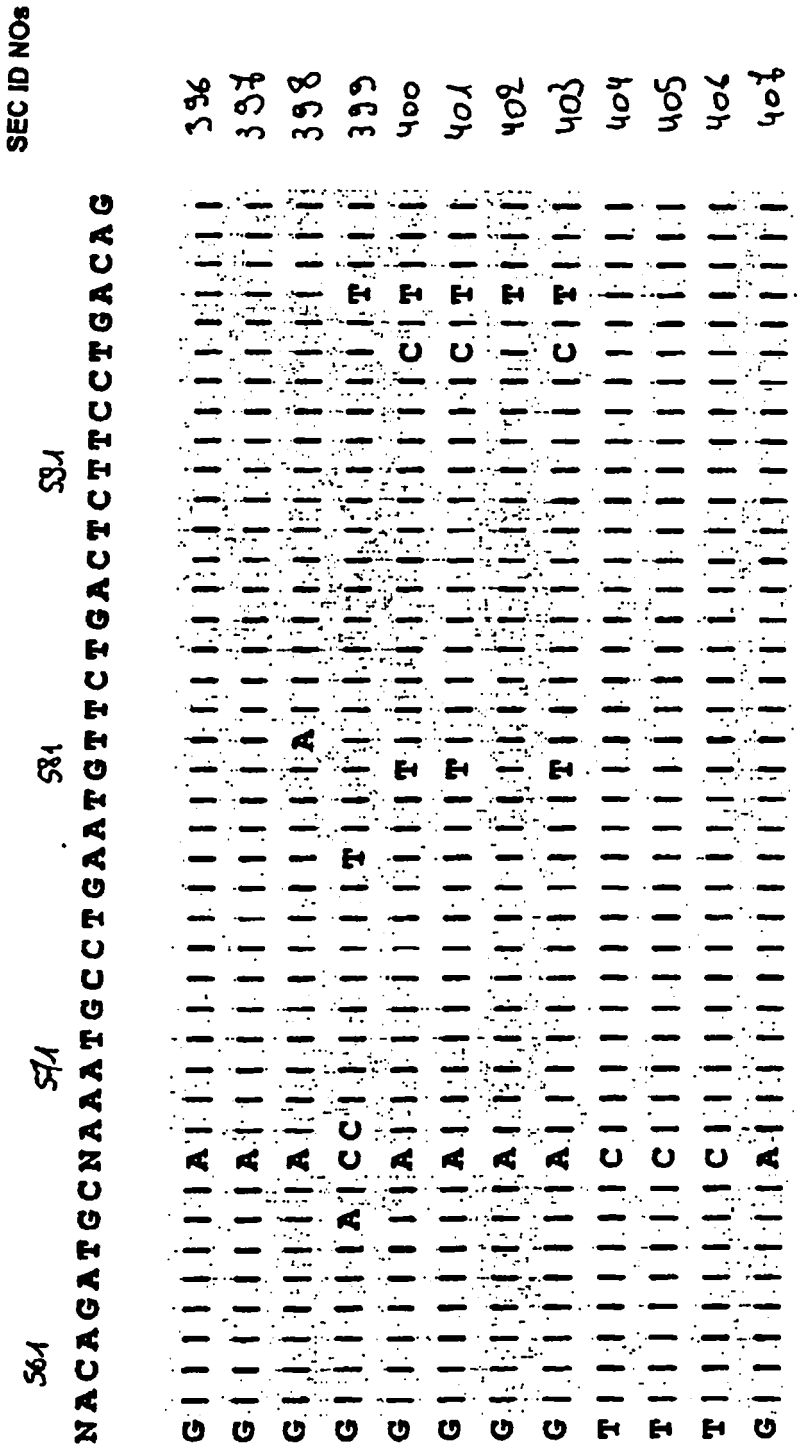


Fig. 4 (continuación 9)

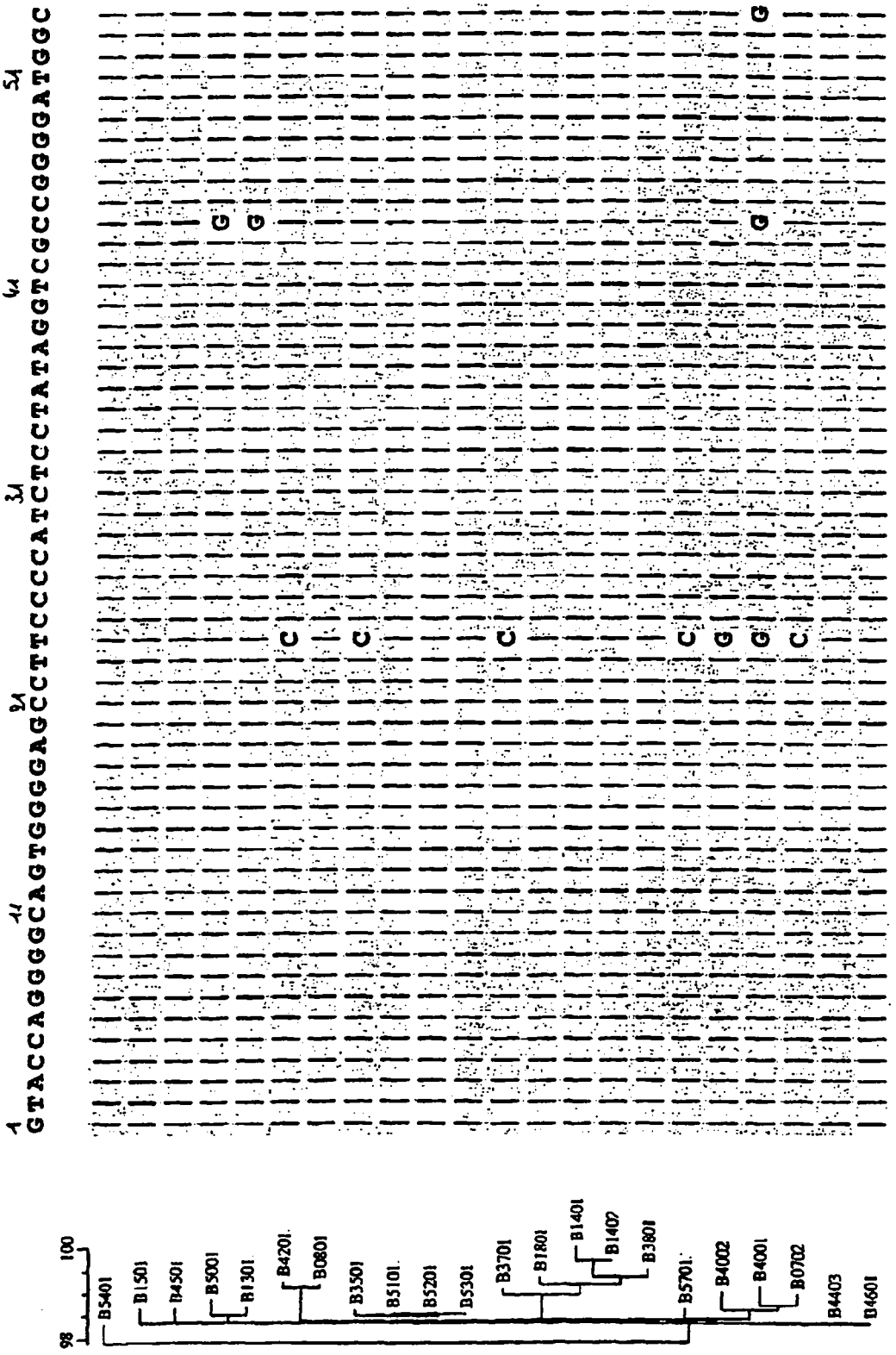

1 GTACCAGGGGCAGTGGGGAGCCTTCCCCATCTCCTATAGGTCGCCGGGGATGGC
11
21
31
41
51
B5401
B1501
B4501
B5001
B1301
B4201
B0801
B3501
B5101
B5201
B5301
B3701
B1801
B1401
B1402
B3801
B5701
B4002
B4001
B0702
B4403
B4601
100
98

Fig. 5

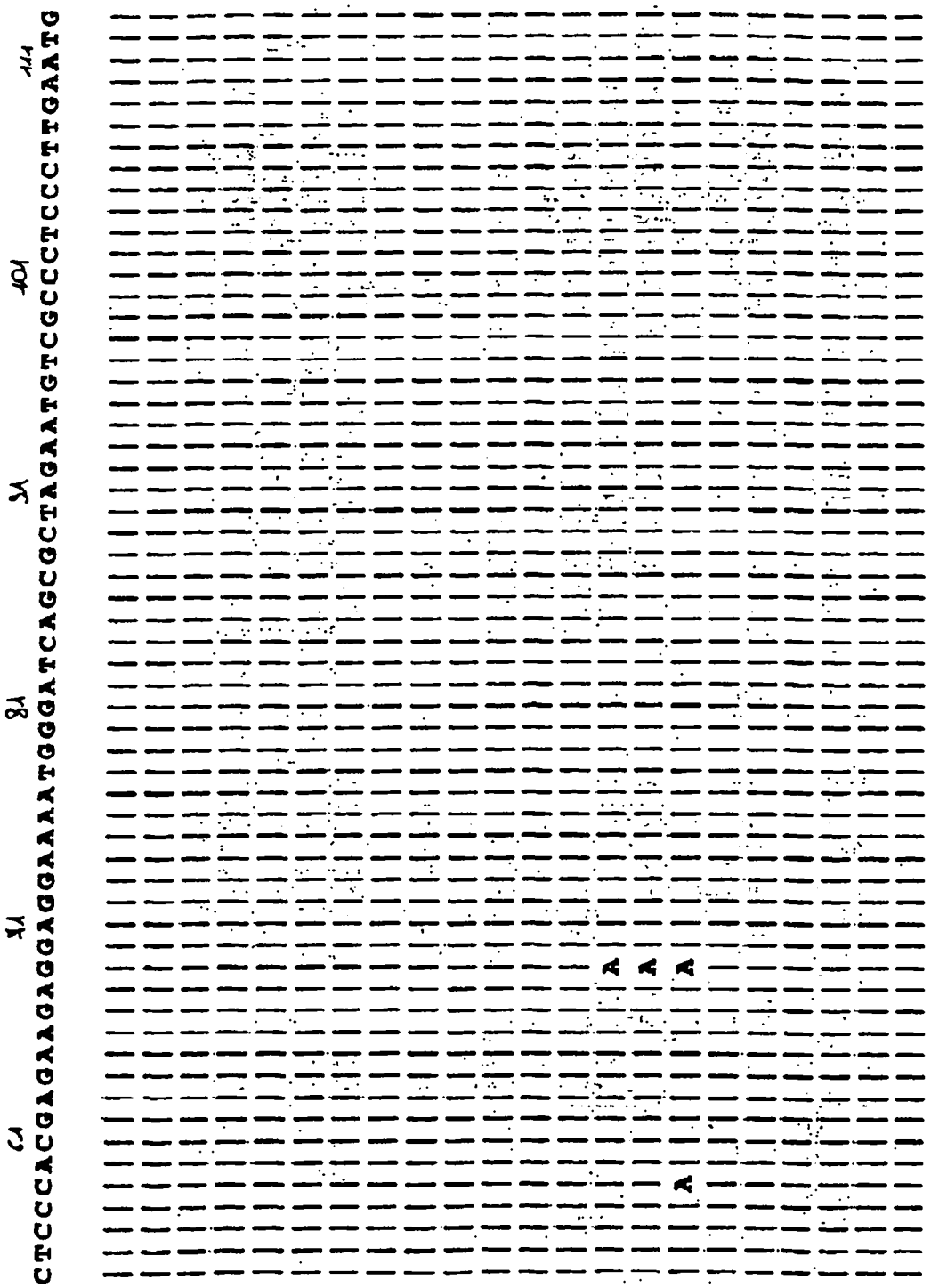


Fig. 5 (continuación 1)

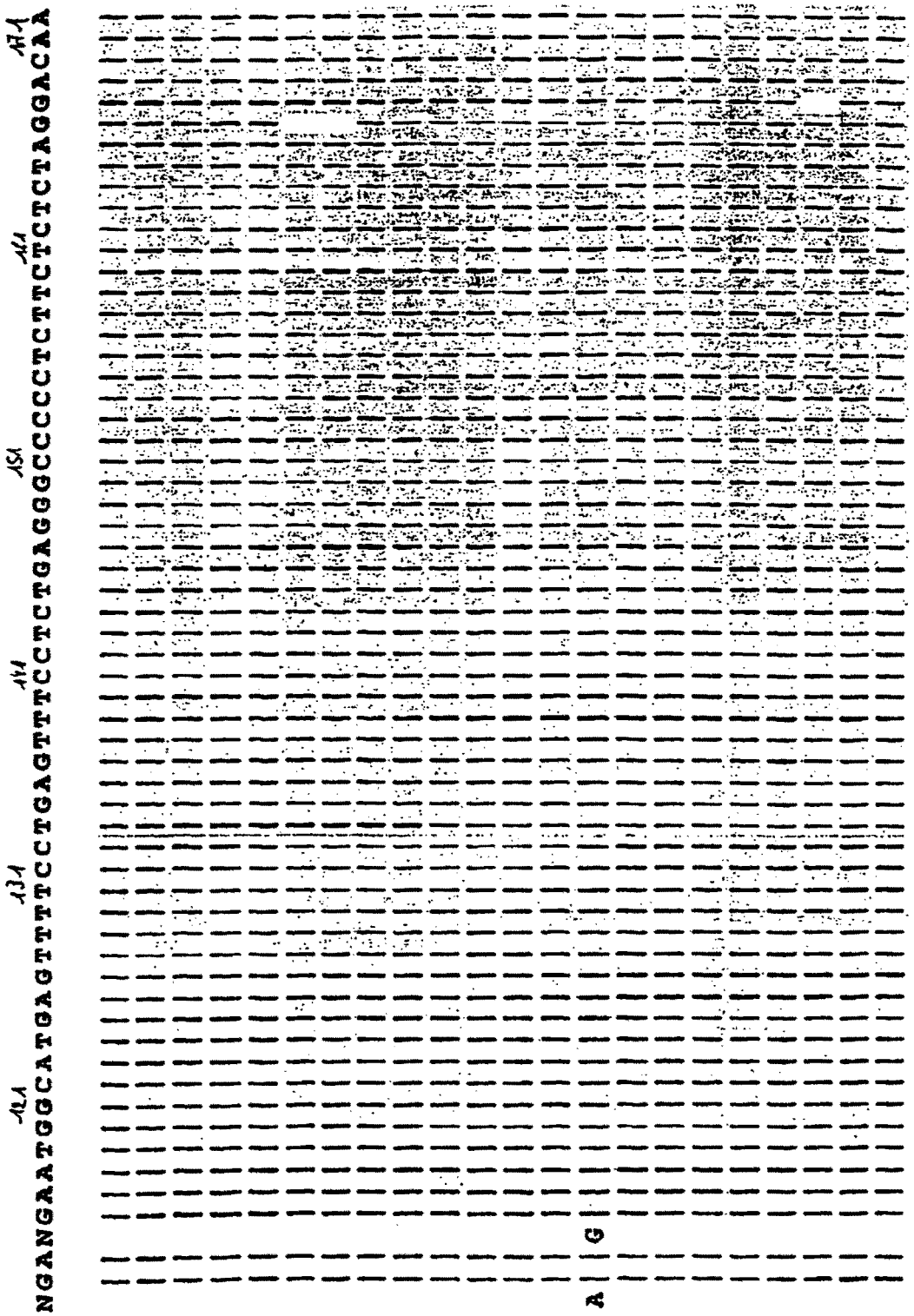


Fig. 5 (continuación 2)

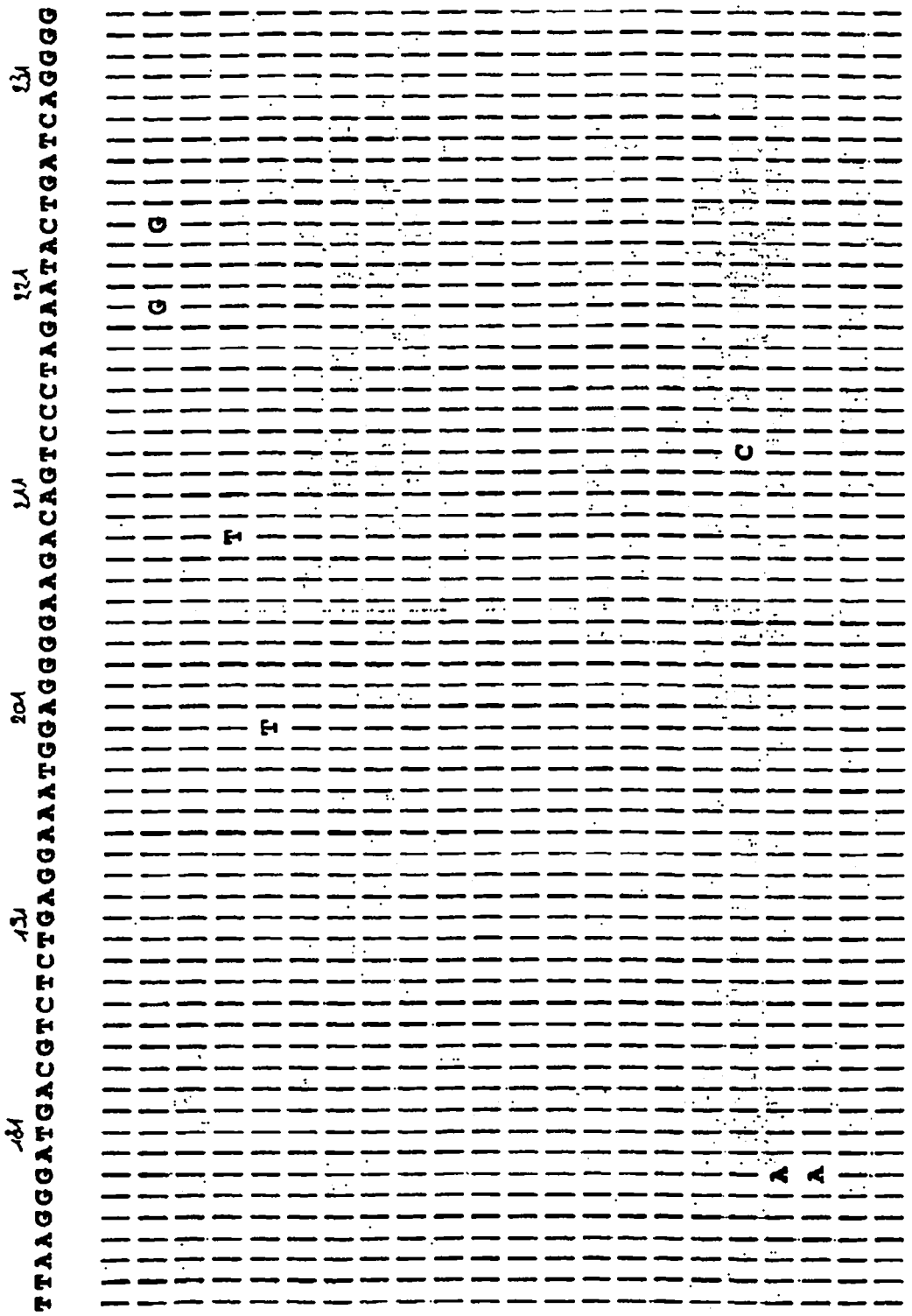


Fig. 5 (continuación 3)

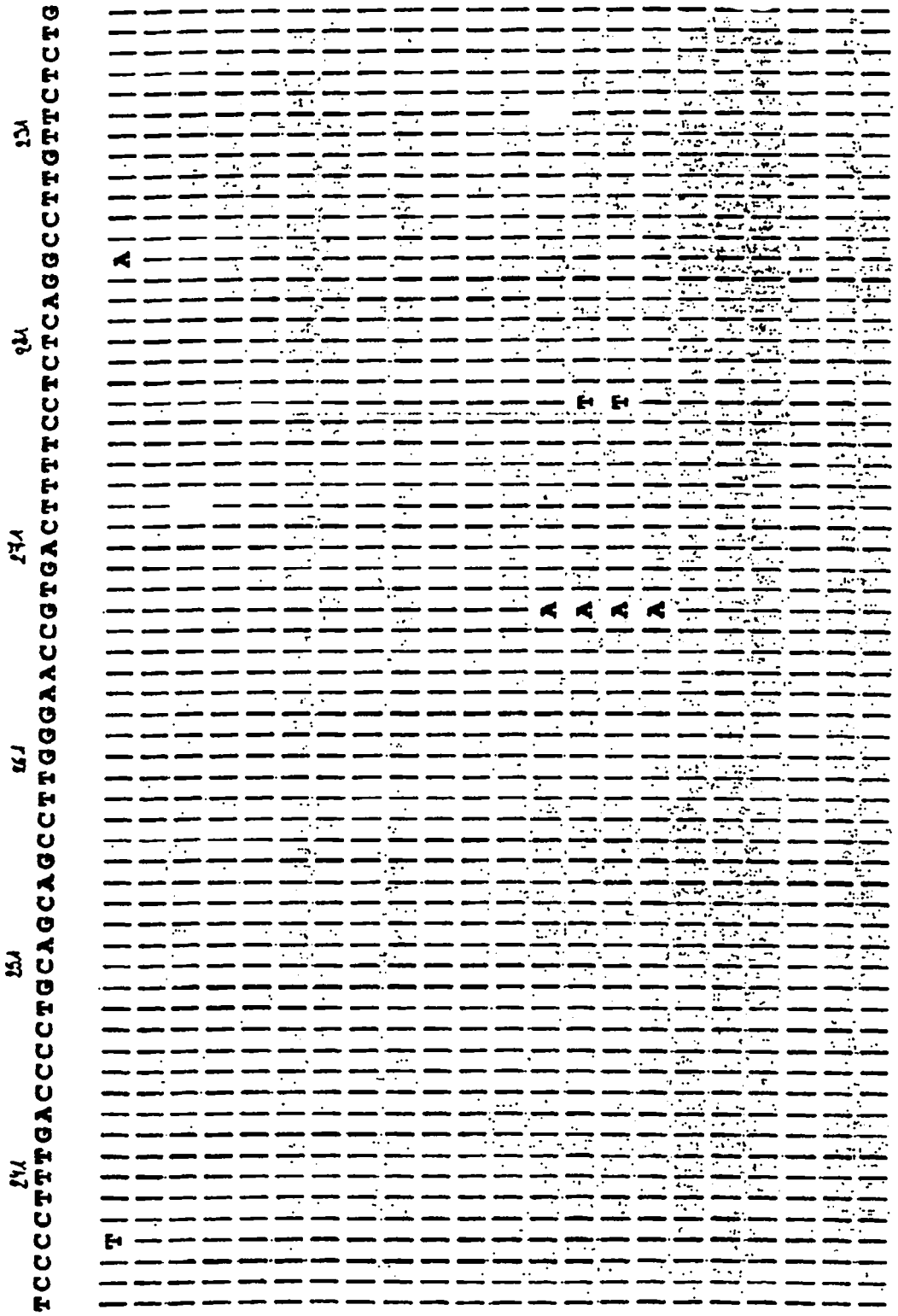


Fig. 5 (continuación 4)

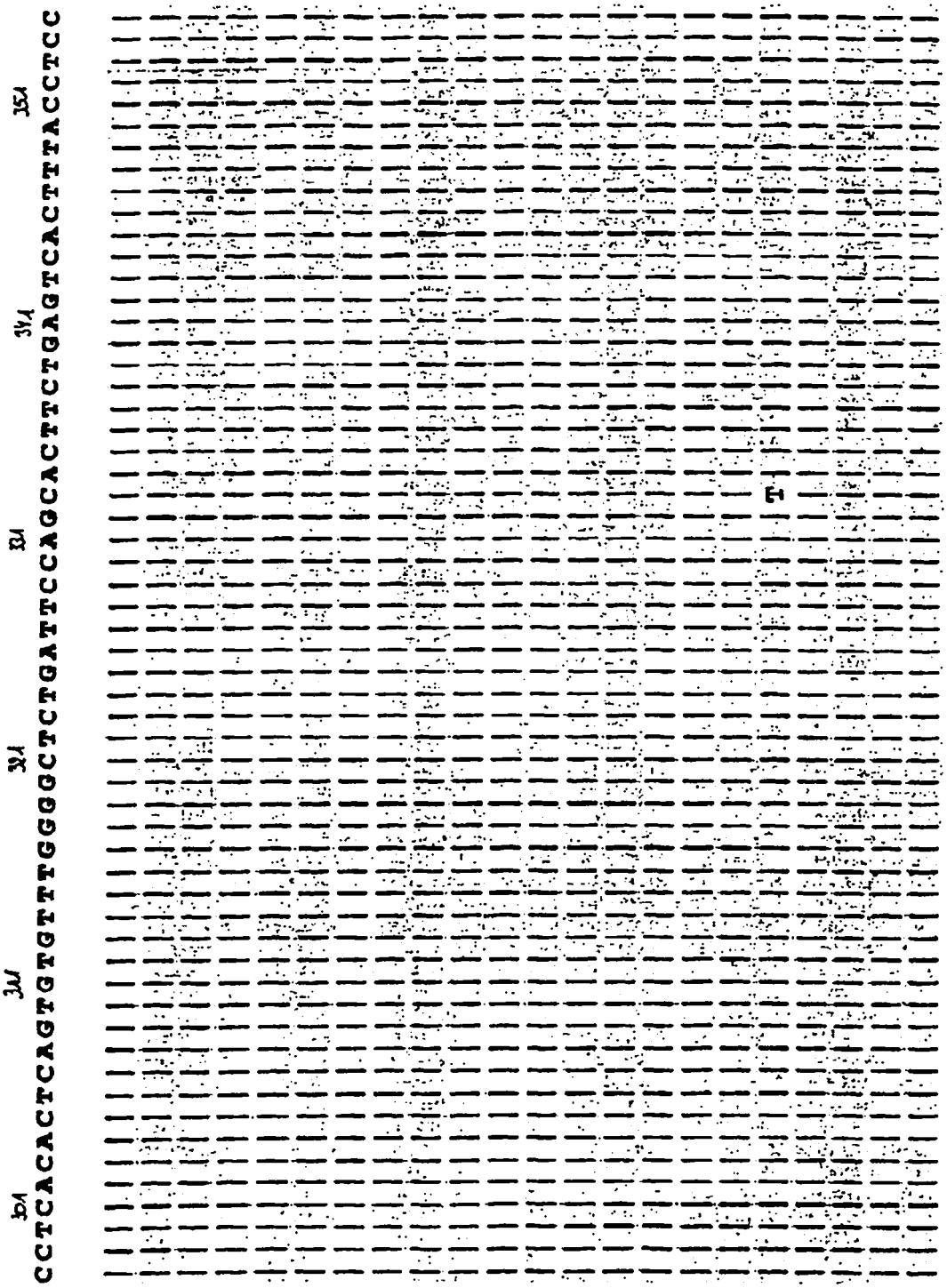


Fig. 5 (continuación 5)

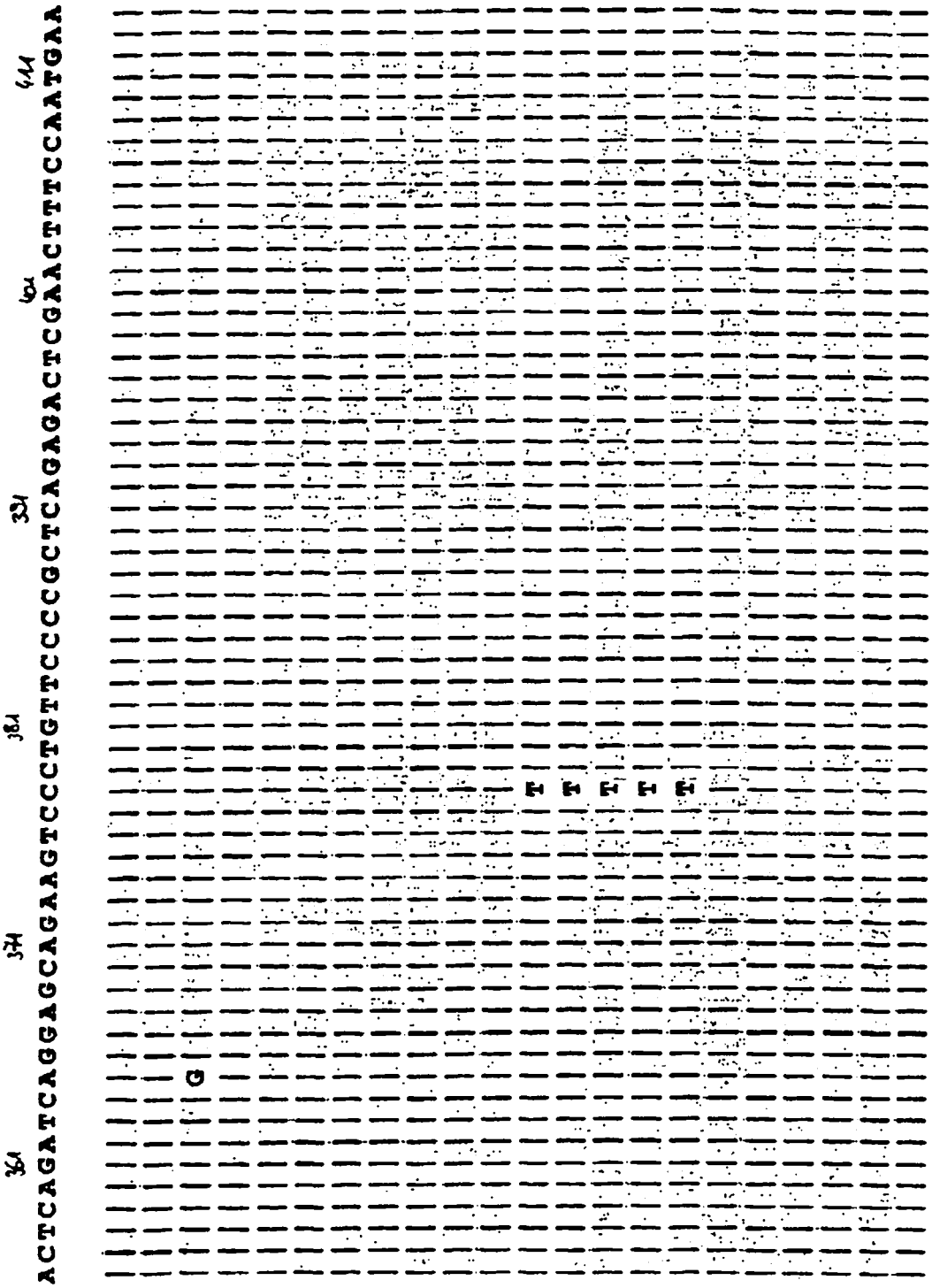


Fig. 5 (continuación 6)

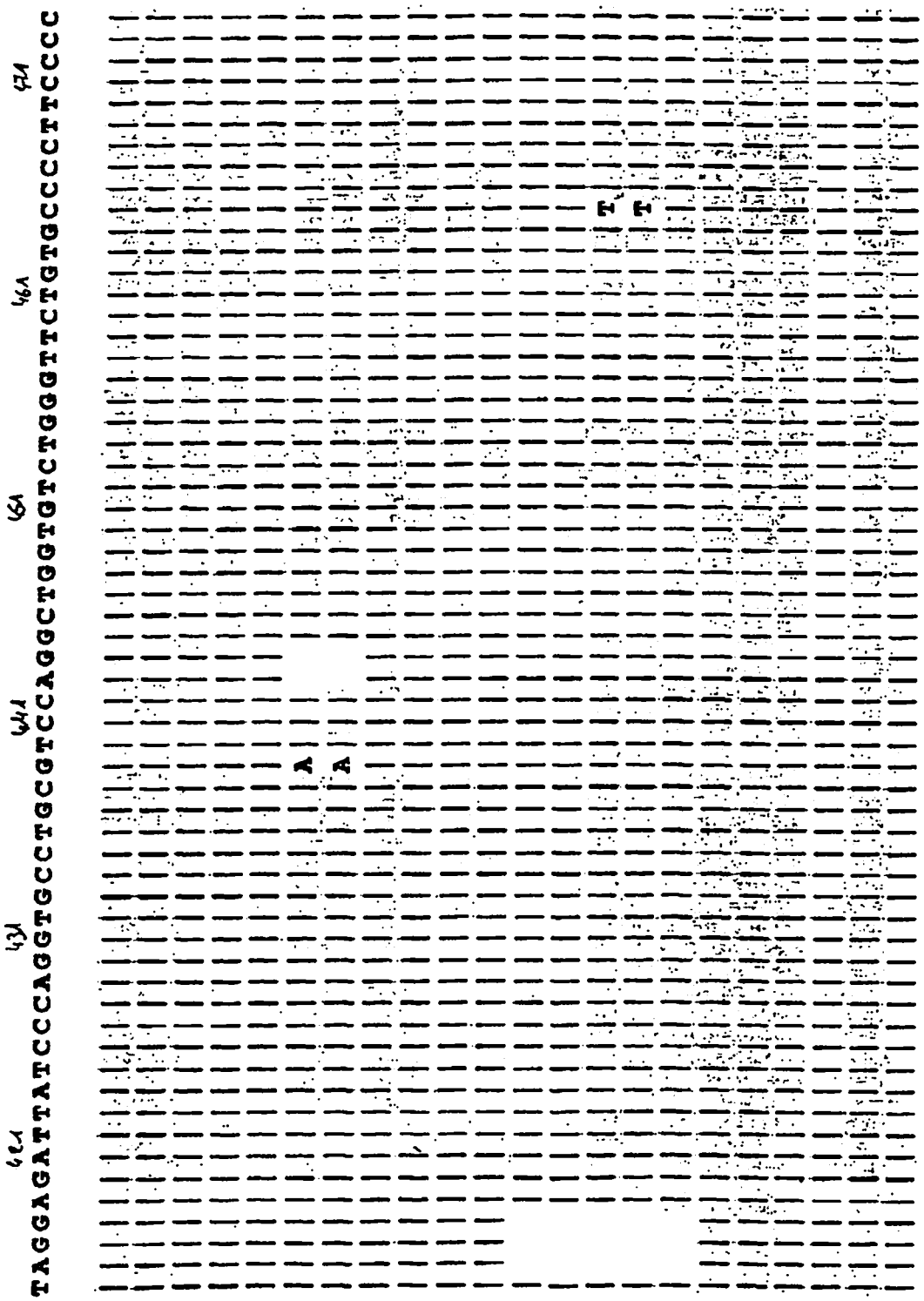


Fig. 5 (continuación 7)

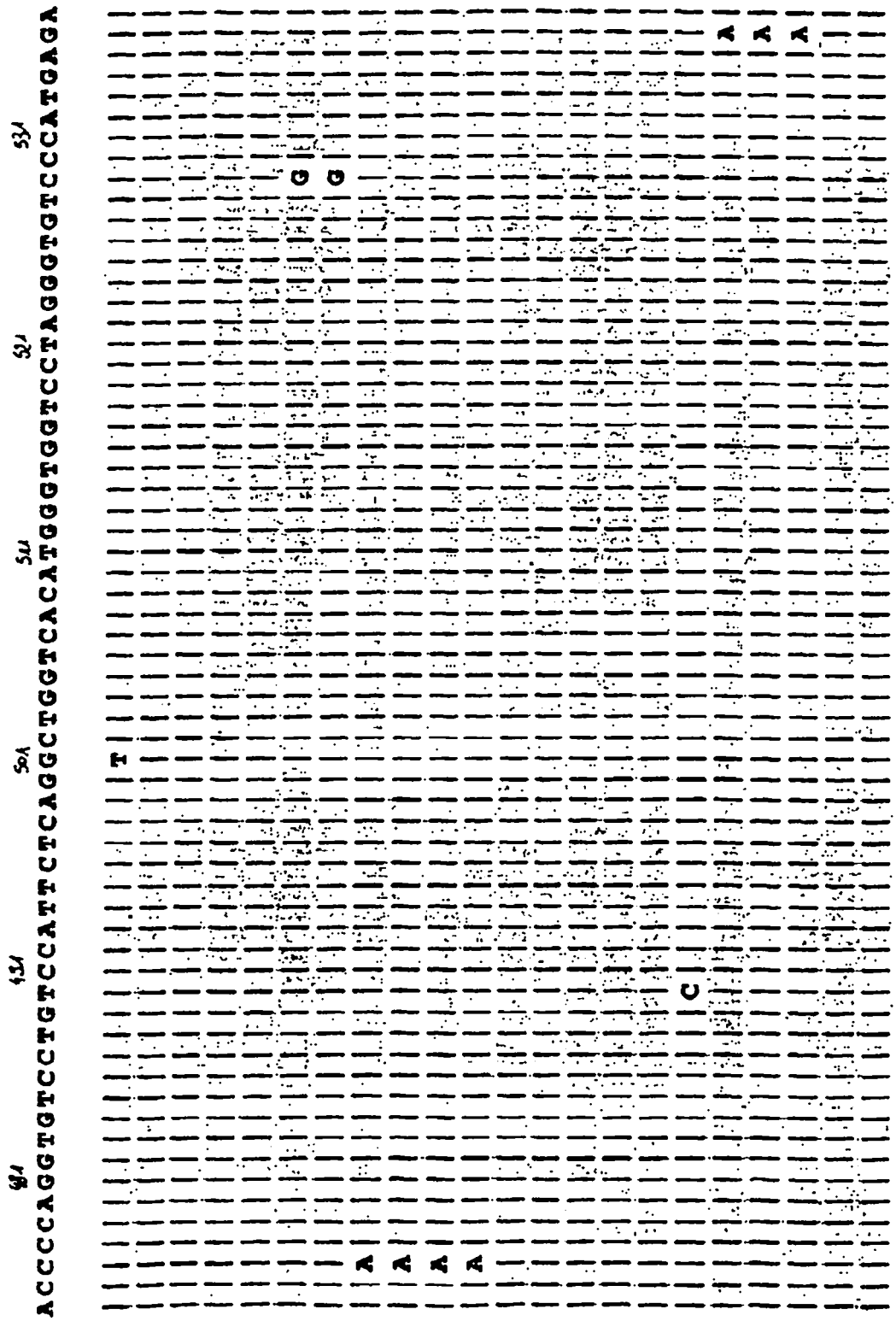


Fig. 5 (continuación 8)

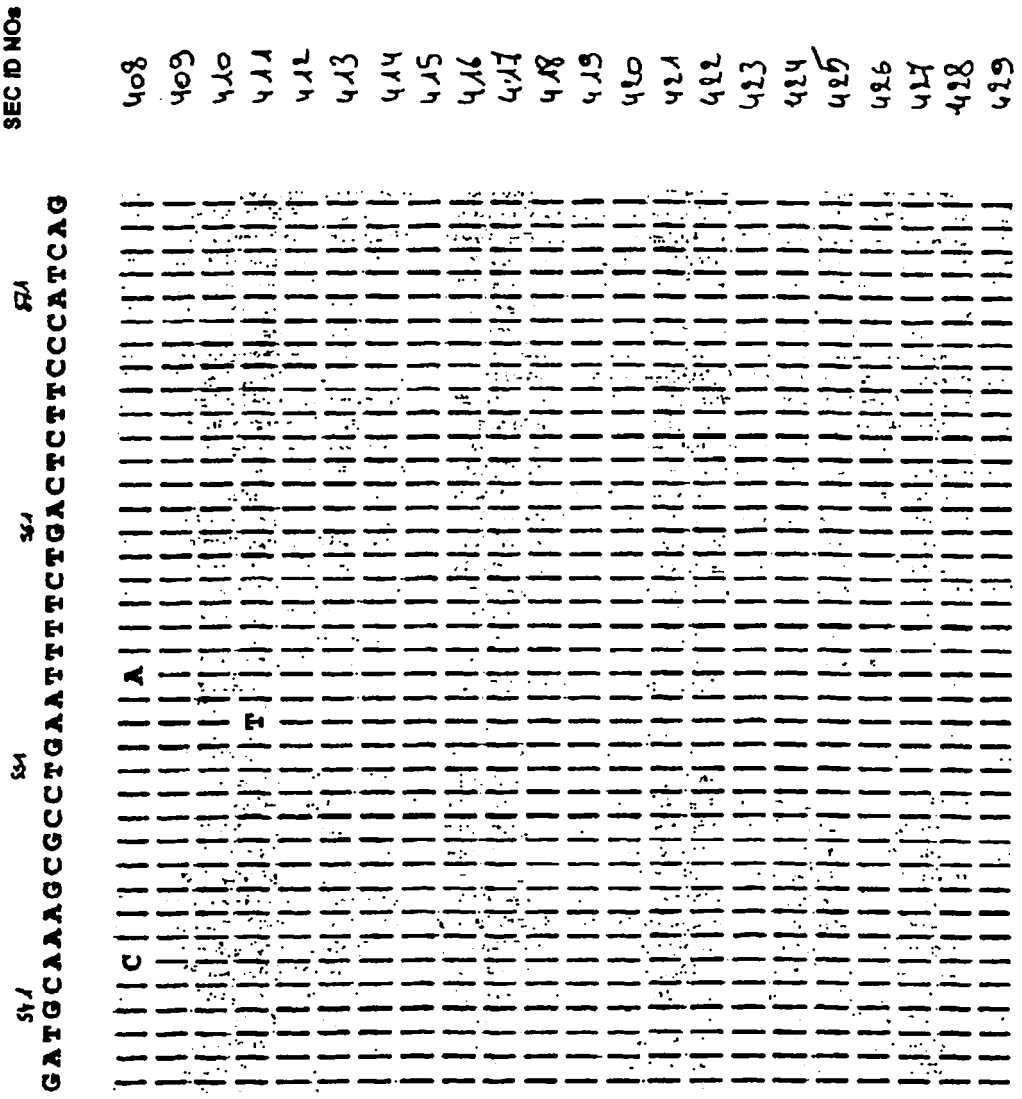


Fig. 5 (continuación 9)

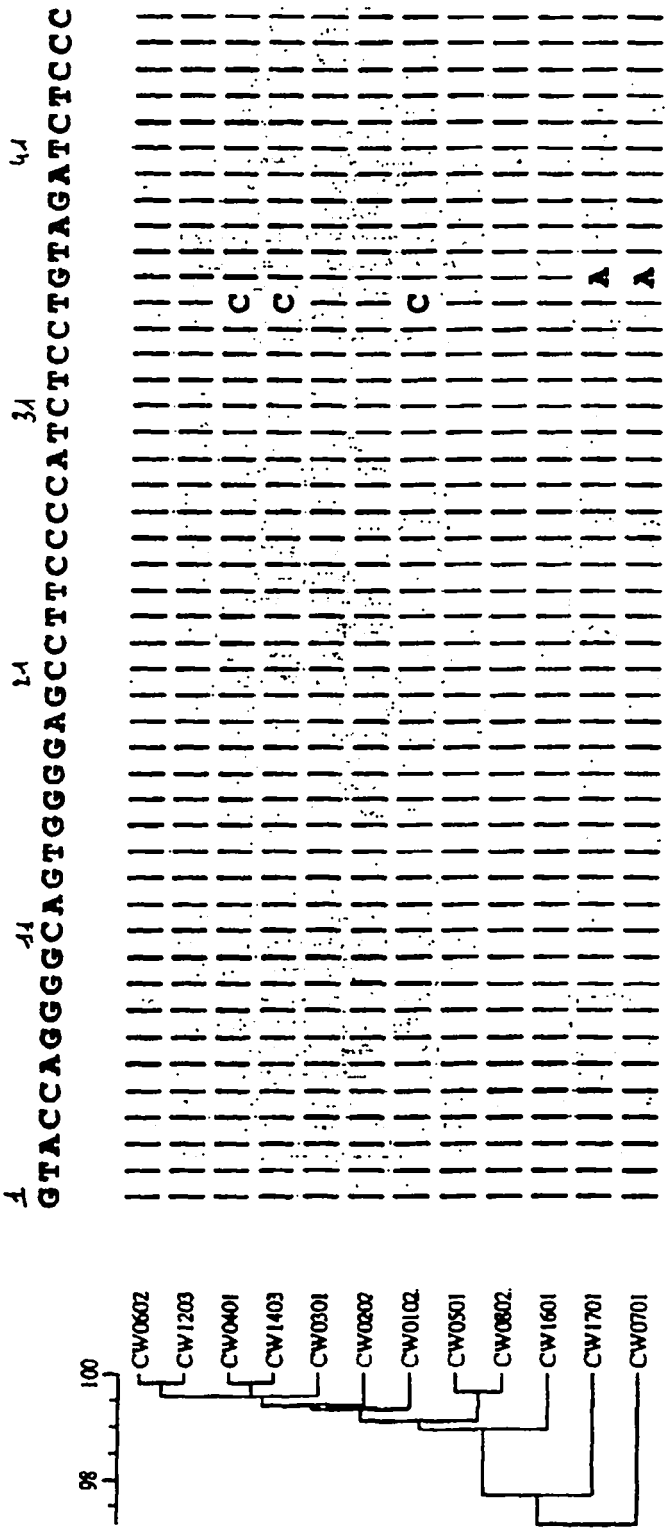

1
GTACCAGGGGCAGTGGGGAGCCTTCCCCATCTCCTGTAGATCTCCC
41
21
31
41
C
C
C
A
A
100
98
CW0602
CW1203
CW0401
CW1403
CW0301
CW0202
CW0102
CW0501
CW0802
CW1601
CW1701
CW0701

Fig. 6

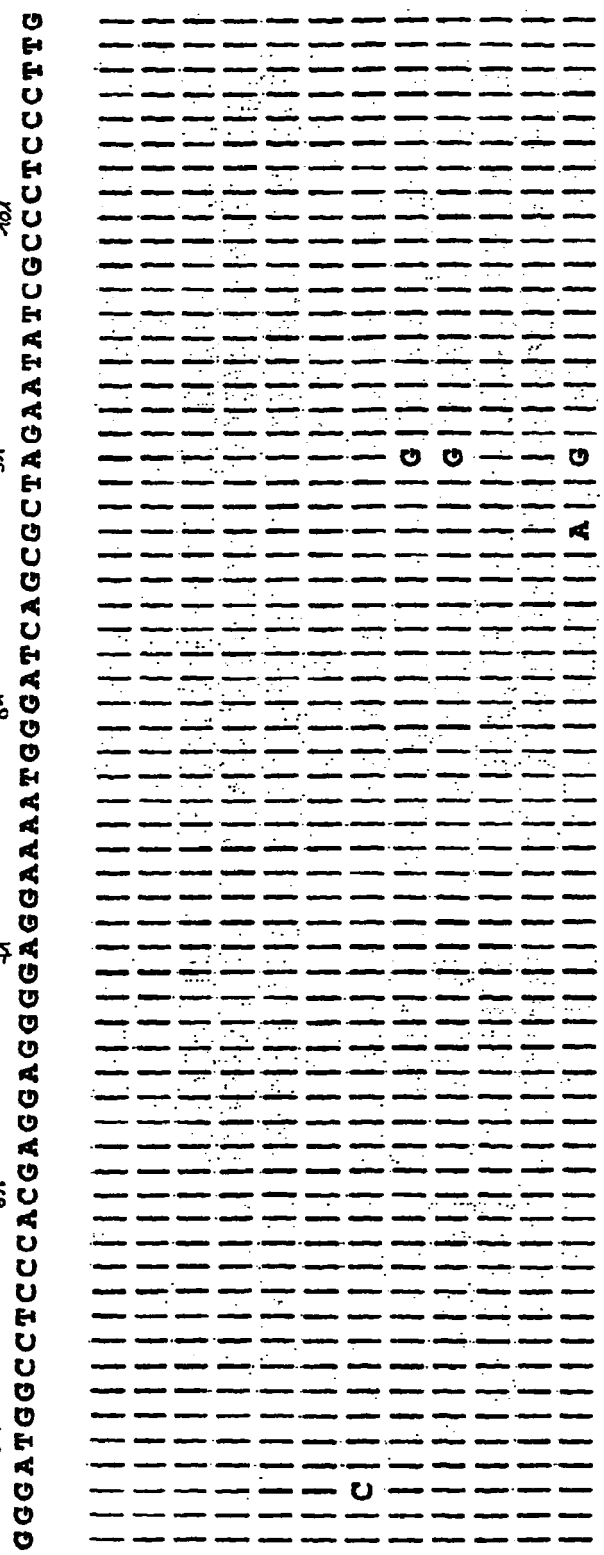


Fig. 6 (continuación 1)

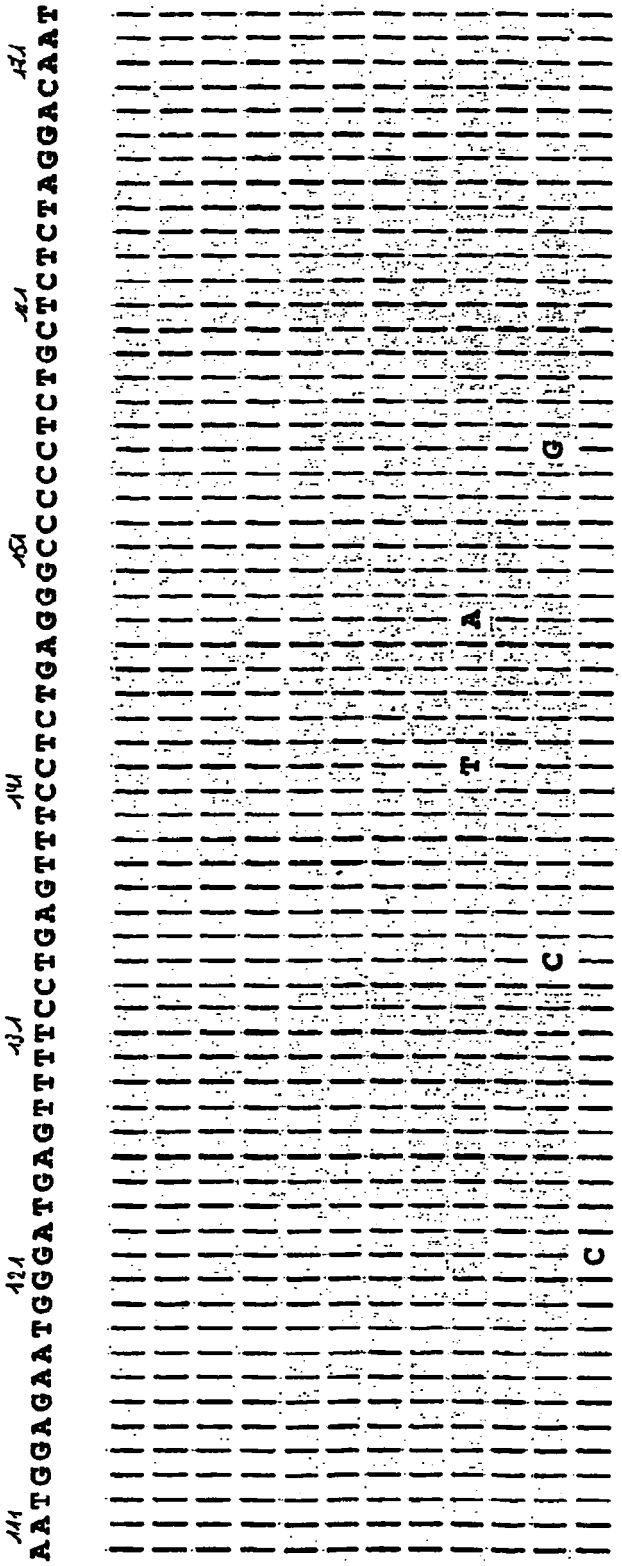


Fig. 6 (continuación 2)

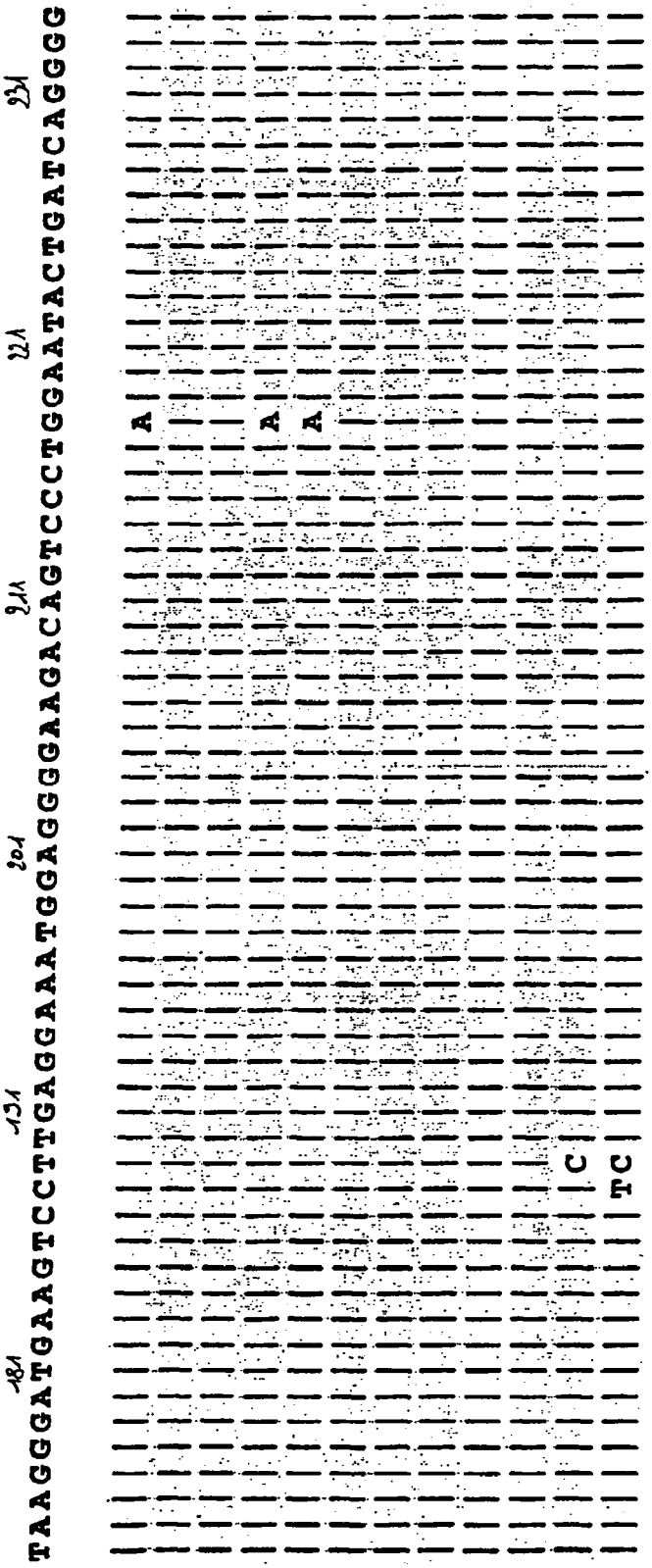


Fig. 6 (continuación 3)

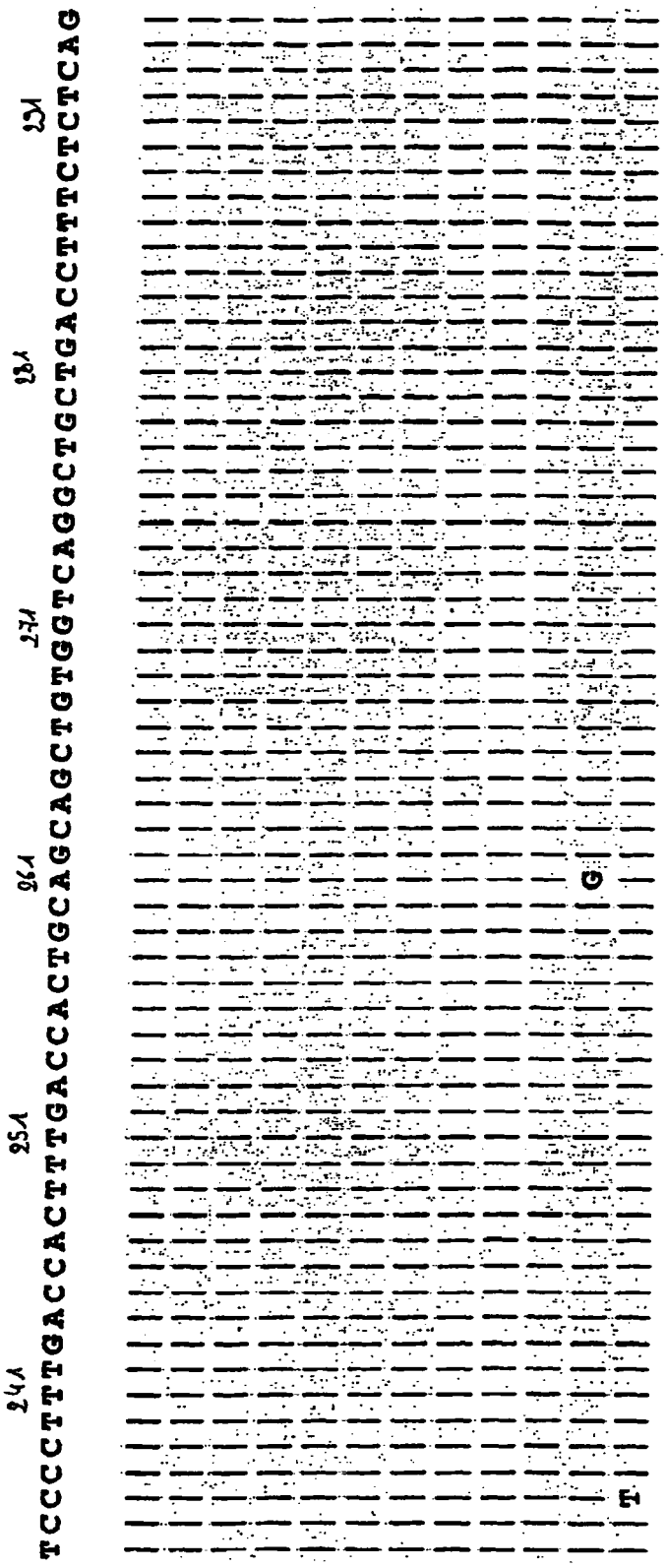


Fig. 6 (continuación 4)



Fig. 6 (continuación 5)



Fig. 6 (continuación 6)



Fig. 6 (continuación 7)

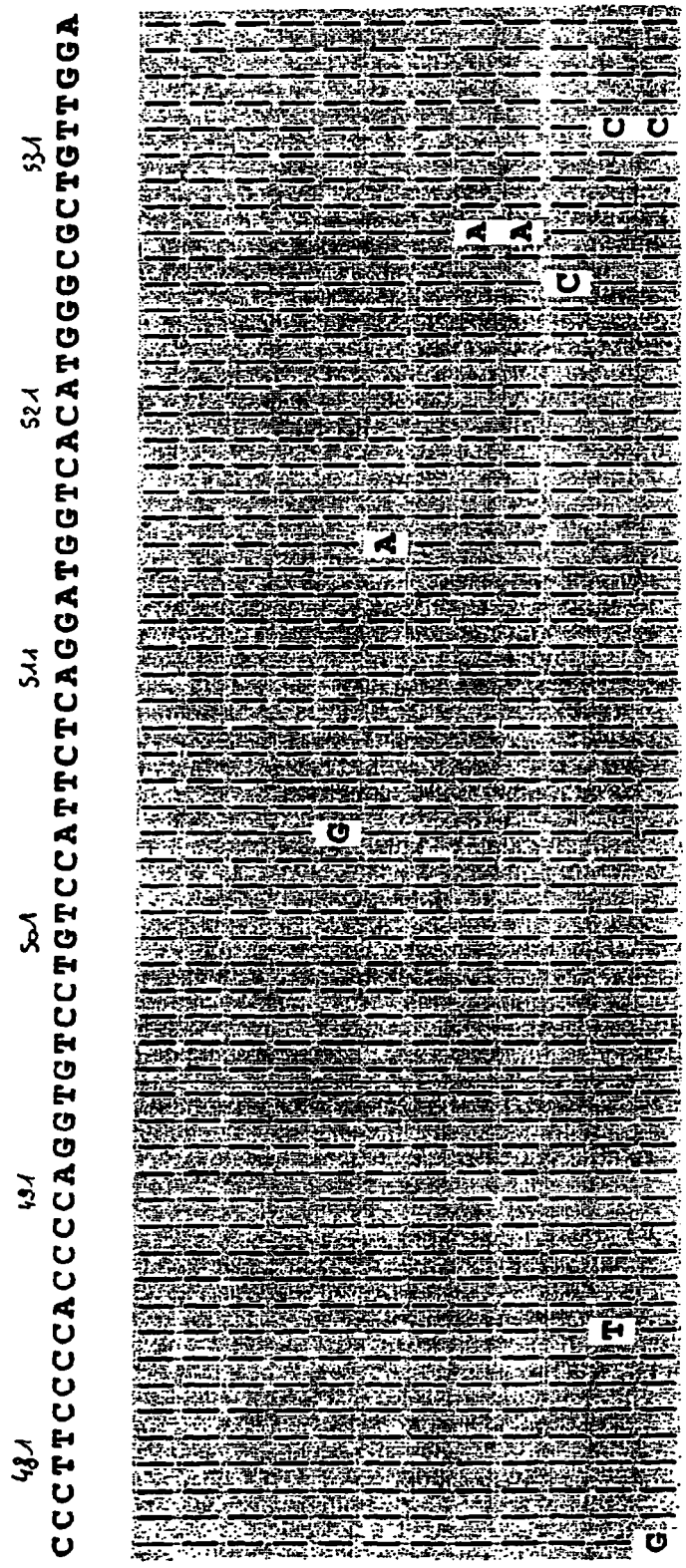


Fig. 6 (continuación 8)

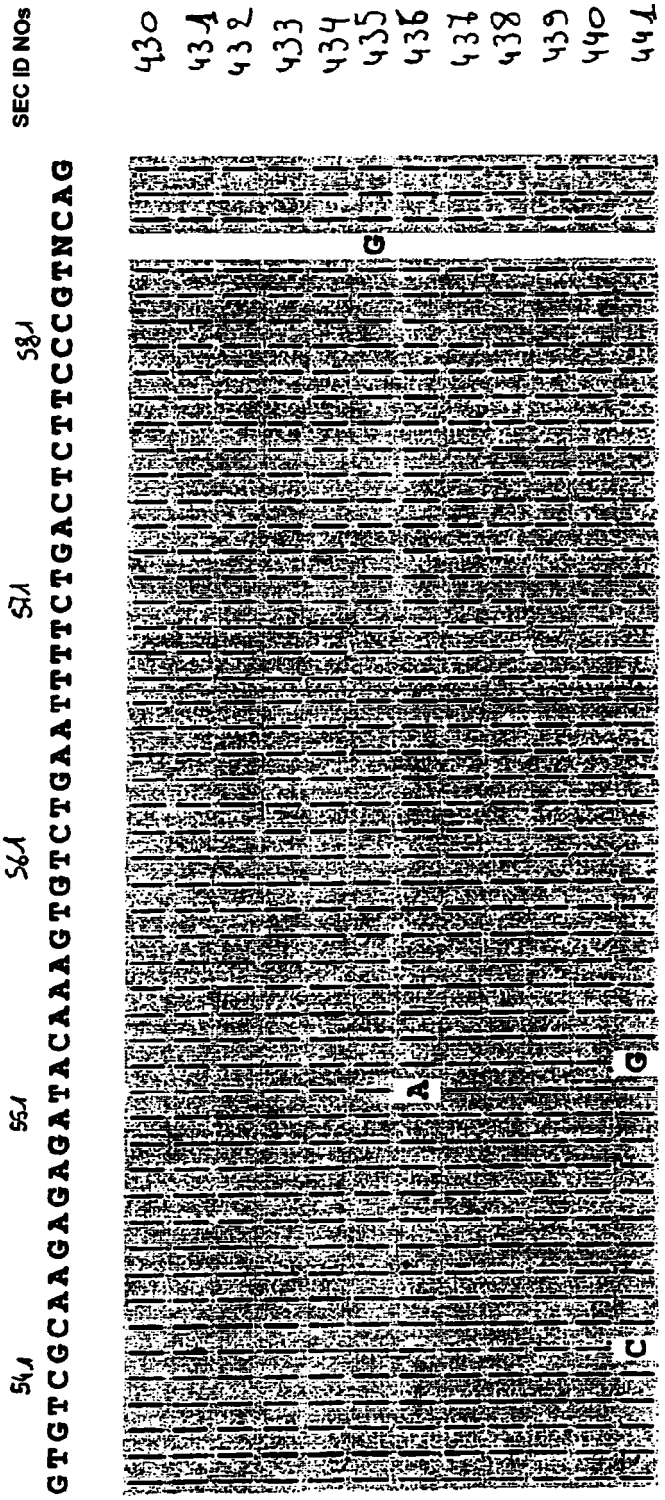


Fig. 6 (continuación 9)

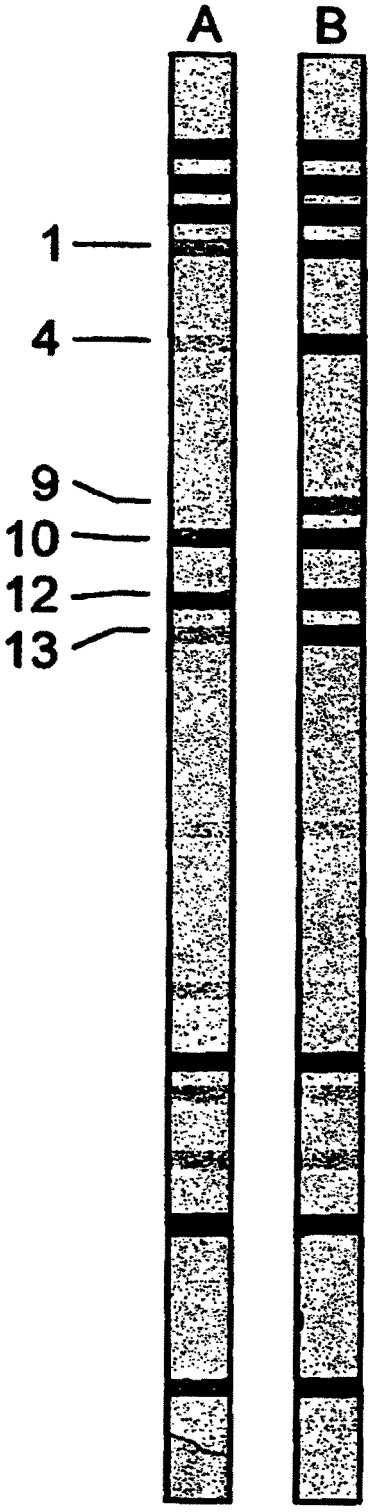


Fig. 7

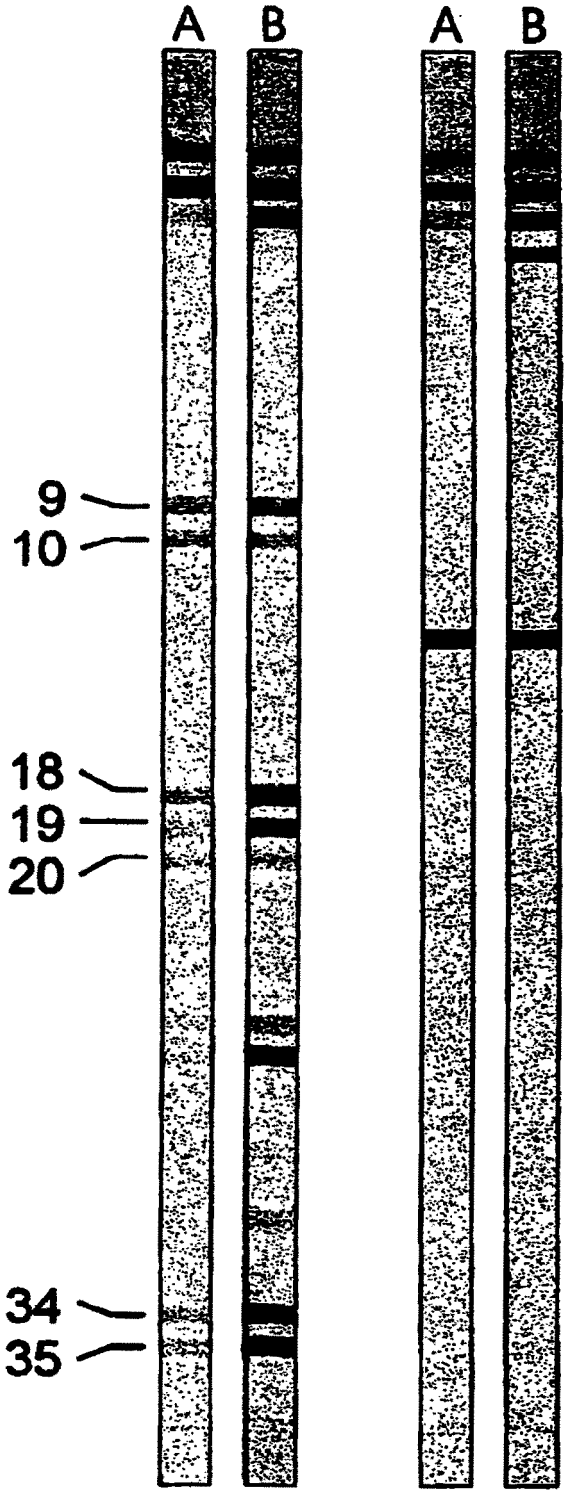


Fig. 8