

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 934 557**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6881 (2008.01)

G01N 27/447 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2014 E 19163862 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2022 EP 3533882**

54 Título: **Polimorfismos de un solo nucleótido del complejo principal de histocompatibilidad**

30 Prioridad:

15.10.2013 AU 2013903971

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

22.02.2023

73 Titular/es:

**ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US**

72 Inventor/es:

**SAYER, DAVID CHARLES;
HOGAN, HAYLEY MARIANNE y
MERCOLIA, KAROLINA**

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 934 557 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polimorfismos de un solo nucleótido del complejo principal de histocompatibilidad

5 Campo

La presente descripción se relaciona con la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el bloque genómico Gamma en la región central del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que puede usarse para emparejar donantes y receptores de trasplantes y determinar la susceptibilidad a la enfermedad.

10

Antecedentes

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es una región densa en genes de aproximadamente 4 Mb en el brazo corto del cromosoma 6. El MHC contiene muchos genes de la respuesta inmunitaria, que incluye los genes que codifican los antígenos leucocitarios humanos (HLA). El MHC también contiene muchos genes implicados en las respuestas inmunitaria e inflamatoria y se ha asociado con numerosos trastornos autoinmunitarios e inflamatorios.

15

El MHC generalmente se hereda como un bloque completo; sin embargo, se ha demostrado que la recombinación ocurre a frecuencias de aproximadamente 1/100 meiosis en regiones específicas dentro del MHC. Entre estos puntos calientes de recombinación se encuentran bloques genómicos de ADN de hasta varios cientos de kilobases de longitud. Por lo tanto, muchos individuos no emparentados dentro de una población tienen un haplotipo conservado o bloques recombinados de haplotipos conservados. Los haplotipos conservados se denominan "haplotipos extendidos" o "haplotipos ancestrales".

20

Hay 4 bloques genómicos principales dentro del MHC. Se desconocen los límites precisos de estos bloques genómicos y es probable que existan bloques genómicos más pequeños entre los bloques genómicos principales. Los bloques principales son el bloque alfa, que incluye HLA-A; el bloque beta, que incluye HLA-B y HLA-C; el bloque gamma, que incluye los genes Bf, C2 y C4; y el bloque delta, que incluye los genes HLA-DRB y DQB1. Los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1 se usan actualmente para emparejar donantes y receptores de trasplantes. El HLA-DPB1 probablemente se encuentra en un bloque centromérico separado del bloque delta debido a la alta tasa de recombinación observada entre los genes del bloque delta y el HLA-DPB1. Sin embargo, el HLA-DPB1 se tipifica con frecuencia para la compatibilidad de trasplantes. Se ha demostrado que la compatibilidad de HLA es crítica para un mejor resultado después del trasplante de células madre. Además, un estudio de Petersdorf y otros (2007) demostró que el resultado después de un trasplante de células madre no emparentadas mejoraba si los donantes y receptores HLA compatibles tenían compatibilidad de haplotipo en comparación con los pares de donante/receptor que tenían compatibilidad de HLA, pero sin compatibilidad de haplotipo. En este estudio, se extrajo el ADN genómico tanto del donante como del receptor y se hibridó con micromatrices que contenían sondas de oligonucleótidos configuradas para detectar vínculos físicos entre los alelos HLA. Este enfoque no es adecuado para la tipificación de HLA de rutina y, hasta ahora, no se ha descrito una prueba de rutina para evaluar o mejorar la probabilidad de compatibilidad de haplotipos.

25

30

35

40

En algunos aspectos de la biología molecular, un haplotipo se describe como el enlace físico que existe entre dos polimorfismos de nucleótidos. Cuando se hace referencia a HLA y MHC, el término haplotipo se usa para describir todo el MHC, que abarca al menos desde HLA-A hasta HLA-DQB1. Esta región abarca aproximadamente 4 Mb y generalmente se hereda intacta.

45

Algunos haplotipos permanecen intactos hasta por miles de generaciones y permanecen idénticos en secuencia excepto por una pequeña cantidad de SNP entre individuos no emparentados. Diferentes haplotipos ancestrales contienen combinaciones únicas de alelos HLA y tienen un contenido de secuencia único en muchas regiones a lo largo del MHC. Es probable que los individuos con compatibilidad de haplotipo/HLA con enfermedad de injerto contra huésped reducida (GVHD) en comparación con individuos con compatibilidad de HLA pero sin compatibilidad de haplotipo se deba a que los individuos sin compatibilidad de haplotipo comparten un haplotipo ancestral completo o parcial y, por lo tanto, también comparten muchas secuencias únicas.

50

El mejor donante de células madre es un gemelo idéntico, seguido por un hermano haploide HLA. La probabilidad relativamente baja de identificar un hermano haploide HLA a menudo resulta en la necesidad de identificar donantes no emparentados adecuados con HLA compatibles, a los que puede accederse a través de registros de donantes. Sin embargo, a pesar de ser compatible con HLA, la probabilidad de un resultado exitoso suele ser menor que la de los hermanos haploide. Se cree que una de las razones de esta disparidad en el resultado puede ser que los hermanos haploide son compatibles con otros genes o secuencias dentro del MHC que pueden contribuir al resultado del trasplante.

60

La GVHD es una complicación común después de un trasplante de tejido alogénico. Se asocia comúnmente con el trasplante de células madre o de médula ósea, pero el término también se aplica a otras formas de injerto de tejido. Las células inmunitarias (leucocitos) en el tejido (el injerto) reconocen al receptor (el hospedador) como "extraño". La forma aguda o fulminante de la enfermedad (aGVHD) normalmente se observa dentro de los primeros 100 días

65

posteriores al trasplante y es un desafío importante para los trasplantes debido a la morbilidad y mortalidad asociadas. La enfermedad aguda de injerto contra huésped se caracteriza por un daño selectivo en el hígado, la piel (erupción), las mucosas y el tracto gastrointestinal. Investigaciones más recientes indican que otros órganos diana de la enfermedad de injerto contra huésped incluyen el propio sistema inmunitario (el sistema hematopoyético, por ejemplo, la médula ósea y el timo) y los pulmones en forma de neumonitis idiopática.

La GVHD aguda se estadifica y se clasifica (0-IV) por el número y la extensión de la afectación de los órganos involucrados. Los pacientes con GVHD de grado IV generalmente tienen un mal pronóstico. Si la GVHD es grave y requiere inmunosupresión intensa con esteroides y agentes adicionales para controlarla, el paciente puede desarrollar infecciones graves como resultado de la inmunosupresión y puede morir a causa de la infección.

Por consiguiente, persiste la necesidad de un método de prueba para identificar donantes de trasplantes para receptores de manera que se reduzca el riesgo de que el receptor desarrolle aGVHD, y particularmente aGVHD en etapa IV (potencialmente mortal).

El documento WO2012/080359 describe un uso de marcadores genéticos en un método para predecir el riesgo o diagnosticar que un sujeto desarrolle una reacción de injerto contra huésped (GvHR) o enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Esta descripción se basa en marcadores de expresión en lugar de polimorfismos.

Alper y otros Exp Clin Immunogenet. 1992; 9(2):58-71 describe 10 haplotipos MHC extendidos y las implicaciones para el trasplante de tejido. No hay descripción ni sugerencia para identificar a un donante de trasplante o reducir la probabilidad de que un receptor de trasplante desarrolle GvHD en base a la información de SNP en el bloque gamma del MHC, y mucho menos de SNP específicos.

Resumen

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes inventores describen la identificación de nucleótidos de secuencia de ADN únicos o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en partes codificantes y no codificantes del bloque gamma del MHC, que se encuentra entre el bloque HLA-B/C (el bloque delta) y el bloque HLA-DRB/DQB (el bloque delta) del MHC. Varios de los SNP identificados son comunes a varios haplotipos ancestrales, mientras que otros SNP identificados son específicos de un haplotipo ancestral. Cuando se usan juntos, los SNP proporcionan un perfil de SNP del bloque gamma (GBSP). Los inventores han demostrado que la mayoría de los individuos aleatorios no emparentados y, por lo tanto, los individuos en los que es improbable que sean HLA compatibles, tienen GBSP únicos o no compatibles y es probable que los individuos que tienen GBSP idénticos sean HLA compatibles. En consecuencia, estos SNP o GBSP pueden usarse para identificar donantes de trasplante para un receptor que necesita un trasplante. Mediante el emparejamiento de los SNP o GBSP del bloque gamma del MHC tanto en el donante potencial de trasplante como en el receptor, se reduce el riesgo del receptor de trasplante de desarrollar GVHD en donantes distintos con HLA incompatible. Además, cuando se empareja el MHC con los SNP o GBSP tanto en el donante potencial de trasplante no emparentado como en el receptor cuando hay una sola incompatibilidad de tipo HLA, las posibilidades de supervivencia después de 5 años mejoran mucho.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un donante de trasplante para un receptor que necesita un trasplante, el método comprende:

- a) aislar una muestra de ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se obtiene del donante potencial de trasplante y/o del receptor
- b) determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC del receptor que necesita un trasplante;
- c) determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC de uno o más donantes potenciales de trasplante; e
- d) identificar un donante de trasplante en base a la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC tanto del donante de trasplante como del receptor que necesita un trasplante;

En donde el polimorfismo alélico de un solo nucleótido se selecciona a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.

El experto en la técnica apreciará que determinar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido puede comprender el análisis de una o más muestras de ácido nucleico del donante y/o del receptor, o alternativamente puede implicar la obtención de información predeterminada, tal como información de secuencia de ácido nucleico o la lectura de un análisis de ácido nucleico, de otra entidad, tal como un laboratorio de patología o un laboratorio de pruebas genéticas.

Por lo tanto, en una modalidad, determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo polinucleótido en el bloque gamma del MHC del receptor que necesita un trasplante y/o del donante potencial comprende obtener información alélica del polimorfismo de un solo nucleótido del bloque gamma del MHC predeterminado y/o información del haplotipo del bloque gamma del MHC.

5 En otra modalidad, determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC del receptor del donante potencial de trasplante comprende analizar una muestra de ácido nucleico del receptor y/o del donante potencial para determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido.

10 Para determinar la presencia o ausencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad, el análisis de la muestra de ácido nucleico comprende realizar una técnica seleccionada a partir de uno o más de ensayos PCR-SSP, hibridación de sonda específica de alelo, extensión de cebador específica de alelo, amplificación específica de alelo, secuenciación de ácido nucleico, digestión por nucleasa 5', un ensayo de baliza molecular, un ensayo de ligadura de oligonucleótidos, análisis de tamaño, análisis de polimorfismo de conformación monocatenario, electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante y secuenciación directa de nucleótidos.

15 La muestra de ácido nucleico se aísla a partir de una muestra biológica que se obtiene del donante potencial de trasplante y/o del receptor. La muestra biológica puede ser cualquier célula o tejido adecuado del que pueda extraerse el ADN genómico, por ejemplo, la muestra biológica puede ser linfocitos, sangre completa, hisopado bucal, una biopsia o tejido congelado.

20 Los presentes inventores han descubierto que emparejar el donante potencial de trasplante y el receptor para múltiples polimorfismos de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC reduce aún más el riesgo de que el donante desarrolle una enfermedad aguda de injerto contra huésped. Por lo tanto, en una modalidad, el método comprende determinar la presencia de 2 o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC tanto del donante potencial de trasplante como del receptor. En una modalidad preferida, los métodos de la invención comprenden determinar la presencia de al menos 25 alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC tanto del donante potencial de trasplante como del receptor.

25 En una modalidad, uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC están presentes en el gen C4, en donde el gen C4 es un gen C4A o un gen C4B. Alternativamente, uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido están presentes tanto en un gen C4A como en un gen C4B.

30 El alelo de polimorfismo de un solo nucleótido se selecciona a partir de uno o más de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.

35 En otra modalidad, el método comprende determinar la presencia de al menos 24 de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.

40 El experto apreciará que el método de la invención puede usarse junto con la detección de uno o más alelos en un gen o región distinta del bloque gamma del MHC y/o junto con la detección de un haplotipo HLA. Por lo tanto, en una modalidad, el método de la invención comprende, además, detectar la presencia de uno o más alelos adicionales o determinar uno o más haplotipos adicionales en el receptor y en el donante potencial de trasplante.

45 En una modalidad, el método comprende determinar uno o más alelos HLA y/o haplotipos HLA adicionales. En una modalidad particular, el método comprende determinar uno o más alelos o haplotipos de los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB, HLA-DQB y/o HLA-DPB.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un kit o una matriz en un método de acuerdo con la invención, en donde el kit comprende un reactivo de ácido nucleico que comprende sondas de oligonucleótidos específicos para uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC seleccionado a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.

55 En otra modalidad, las sondas de oligonucleótidos están marcadas de forma detectable.

60 En otra modalidad, el kit comprende sondas de oligonucleótidos específicas para cada uno de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y A20170.

Aún en otra modalidad, el kit comprende cebadores de oligonucleótidos para amplificar uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC. Los cebadores de oligonucleótidos pueden ser, por ejemplo, cebadores de amplificación por PCR específicos de alelo.

5 En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos son para amplificar uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el gen C4.

En una modalidad, el kit que comprende cebadores de oligonucleótidos comprende además la ADN polimerasa.

10 En una modalidad, el kit es adecuado para realizar uno o más ensayos PCR-SSP.

Aún en otra modalidad, el kit comprende una placa de múltiples pocillos.

Aún en otra modalidad, el kit comprende un control de amplificación negativo.

15 En una modalidad, el kit comprende cebadores de oligonucleótidos para amplificar uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido seleccionados a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.

20 En otra modalidad, el kit comprende cebadores de oligonucleótidos para amplificar cada uno de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y A20170.

25 En una modalidad particular, el kit comprende uno o más cebadores de oligonucleótidos que comprenden una secuencia seleccionada a partir de una cualquiera o más de las SEQ ID Nos: 3 a 50.

30 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar uno o más ensayos de PCR-SSP para detectar polimorfismos de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC, el método comprende:

- i) mezclar ADN genómico con una ADN polimerasa para formar una mezcla de ADN polimerasa,
- ii) formar una mezcla de reacción mediante la combinación de la mezcla de ADN polimerasa con cebadores de oligonucleótidos para amplificar un alelo de polimorfismo de un solo nucleótido del bloque gamma del MHC,
- 35 iii) someter la mezcla de reacción a ciclos térmicos para producir un producto de amplificación, en donde el polimorfismo alélico de un solo nucleótido se selecciona a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.

40 En una modalidad particular, el producto de amplificación se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa.

En una modalidad, el ADN genómico es ADN genómico humano de alto peso molecular.

45 Aún en otra modalidad, el ADN genómico está a una concentración de aproximadamente 20 ng/μl a aproximadamente de 100 ng/μl.

En una modalidad, el método comprende extraer el ADN genómico de una muestra biológica.

50 En una modalidad particular, el método comprende extraer el ADN genómico a partir de sangre completa con anticoagulante solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) o EDTA.

Aún en otra modalidad, el ADN genómico tiene una medida de relación de densidad óptica (OD) de $OD_{260/280} > 1,8$.

En otra modalidad, el método comprende detectar al menos 24 alelos de polimorfismo de un solo nucleótido.

55 A lo largo de esta descripción, la palabra "comprende", o variaciones tales como "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas establecidas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

60 La invención se describe a continuación mediante los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

65 Figura 1. Diagrama que muestra la ubicación de la región del bloque gamma del MHC en el cromosoma 6.

Figura 2. Imagen del gel de una prueba PCR-SSP para la detección del par SNP específico del haplotipo ancestral (AH) 8.1 que se encuentra en el gen C4 del complemento. La muestra 1 tiene los marcadores del bloque alfa, beta y delta del 8.1 AH y tiene una prueba positiva para los marcadores SNP del bloque gamma. Las muestras 2, 3 y 4 no tienen ningún marcador del 8.1 AH y son negativas para la prueba SSP para los marcadores SNP del bloque gamma. Tipos de HLA para muestras:

1: HLA-A*01:01; 24:02;	B*08:01;	DRB1*03:01, DQB1*02:01
2: HLA-A*02:01,	B*46:01,	DRB1*08:01 DQB1*06
3: HLA-A*30:02; 68:01,	B*42:01,	DRB1*03:02 DQB1*04
4: HLA-A*24:02,	B*52:01,	DRB1*15:01, DQB1*06:02

Figura 3. Tabla de SNP identificados en las diferentes muestras analizadas en comparación con la secuencia de referencia. Las secuencias en los recuadros negros son los SNP detectados por el ensayo Tipo Gamma. Las diferencias de secuencia que están en texto negro y recuadros blancos son diferencias de secuencia en comparación con la referencia, pero no son seleccionados únicamente por el ensayo Tipo Gamma. El ensayo Tipo Gamma #7 requiere la presencia de 2 x SNP que deben estar presentes en enlace entre sí. Un cuadro negro con un guion blanco (-) indica una eliminación relativa a la referencia. Las muestras se etiquetan de acuerdo con su haplotipo ancestral y se muestra el alotipo C4 de las muestras.

Figura 4. La incompatibilidad Tipo Gamma resulta en un mayor riesgo de aGVHD grave. Pacientes (x) compatibles (M) e incompatibles (MM) para Tipo Gamma y si el paciente se diagnosticó con GVHD aguda y el grado de GVHD aguda.

Figura 5. La compatibilidad Tipo Gamma resulta en mejores posibilidades de supervivencia a largo plazo.

Figura 6. Análisis de PCR SSP Tipo Gamma para individuos Tipo Gamma compatibles (A) y no compatibles (B) en donantes y pacientes no emparentados. Las flechas indican alelos de SNP no compatibles.

Figura 7. Resultados del estudio retrospectivo que muestran diferencias en la supervivencia, aGvHD grado III/IV y cGvHD en pares de pacientes y donantes no emparentados con GT compatible y GT no compatible.

Clave para el Listado de Secuencias

SEQ ID NO:1 - residuos de aminoácidos específicos del isotipo C4A.

SEQ ID NO:2 - residuos de aminoácidos específicos del isotipo C4B.

SEQ ID NOs:3-50 - cebadores de oligonucleótidos.

Descripción detallada

Técnicas Generales y Definiciones

A menos que se defina específicamente de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción se considerará que tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica (por ejemplo, en genética molecular, bioquímica e inmunología).

A menos que se indique de cualquier otra manera, las técnicas de genética molecular, bioquímicas e inmunológicas que se usan en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y se explican a lo largo de la literatura en fuentes tales como J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook and Russell., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edn, Cold Spring Harbour Laboratory Press (2001), R. Scopes, Protein Purification - Principles and Practice, 3ra edn, Springer (1994), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel y otros (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, que incluye todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan y otros (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (que incluye todas las actualizaciones hasta el presente).

El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de estos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADN complementario (ADNc), ARN mensajero (ARNm), oligonucleótido y polinucleótido.

Por "molécula de ácido nucleico aislada" se entiende una molécula de ácido nucleico que generalmente se ha separado de las secuencias de nucleótidos con las que se asocia o se une en su estado natural (si es que existe en la naturaleza). Preferentemente, el ácido nucleico aislado está al menos 60 % libre, con mayor preferencia al menos 75 % libre y con la máxima preferencia al menos 90 % libre de otros componentes con los que normalmente se asocia. El ácido nucleico puede aislarse de una muestra biológica mediante el uso de cualquier técnica conocida adecuada. Por ejemplo, el ADN genómico total puede extraerse a partir de las células mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y/o kits disponibles comercialmente, por ejemplo, mediante el uso del Mini Kit de sangre

QIAamp DNA o el Kit DNeasy Blood & Tissue suministrados por QIAGEN, o mediante el uso de métodos tales como extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.

El término "sonda" de acuerdo con la presente invención se refiere a un oligonucleótido monocatenario que se diseña para hibridar específicamente con un ácido nucleico que comprende un polimorfismo de un solo nucleótido del gen C4. Las sondas de la invención pueden tener una longitud de aproximadamente 5 a 150 nucleótidos. En una modalidad, la sonda puede usarse en secuenciación de alto rendimiento (próxima generación) mediante el uso de una técnica de captura de dianas. Por lo tanto, en una modalidad, la sonda puede ser adecuada para la captura de diana y tener una longitud de alrededor de 60 a 120 nucleótidos.

Alternativamente, la sonda puede tener aproximadamente de 10 a 25 nucleótidos. En determinadas modalidades, la longitud de la sonda es de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Los nucleótidos como se usa en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

La "muestra biológica" puede ser, por ejemplo, linfocitos, sangre completa, hisopado bucal, muestra de biopsia o tejido congelado o cualquier otra muestra que comprenda ADN genómico. Aunque puede usarse casi cualquier fuente de tejido para la determinación del genotipo molecular, los linfocitos de sangre periférica, por ejemplo, se usan con la mayor frecuencia. Además, es posible usar muestras que se obtienen por medios no invasivos, por ejemplo, mediante recolección de ADN basado en hisopados de mejillas o saliva. En la técnica se conocen varios métodos adecuados para extraer ADN de tales fuentes. Estos van desde la extracción con solventes orgánicos hasta la absorción en perlas recubiertas de sílice y columnas de intercambio aniónico. Además, los sistemas automatizados para extracción de ADN están disponibles comercialmente y pueden proporcionar ADN de buena calidad y alta pureza.

Como se usa en la presente descripción, los términos "trasplante" o "trasplantar" se refieren al injerto o a la introducción de tejido o células que se obtienen de un individuo (el donante) en o dentro del cuerpo de otro individuo (el receptor). Las células o el tejido que se extraen del donante y se trasplantan al receptor se denominan "injerto". Ejemplos de tejidos comúnmente trasplantados son médula ósea, células madre hematopoyéticas, órganos tales como hígado, corazón, piel, vejiga, pulmón, riñón, córnea, páncreas, islotes pancreáticos, tejido cerebral, hueso e intestino. En una modalidad, el trasplante es un trasplante de células madre hematopoyéticas.

El experto en la técnica entendería que el término "haplotipo" se refiere a una combinación de alelos que están ubicados cerca, o en loci adyacentes, en un cromosoma y que se heredan juntos, o un conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido en un solo cromosoma de un par de cromosomas que están asociados estadísticamente.

Bloque Gamma del MHC

Como se usa en la presente descripción, el término "bloque gamma del MHC" se refiere a la región genómica que se encuentra entre el bloque HLA-B/C (el bloque delta) y el bloque HLA-DRB/DQB (el bloque delta) del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto del cromosoma 6 (Figura 1). Los genes ubicados en el bloque gamma del MHC incluyen, entre otros, TNXB (OMIM 600985), CYP21A2 (OMIM 613815), C4A (OMIM 120810), STK19 (OMIM 604977), C4B (OMIM 120820), DOM3Z (OMIM 605996), SKIVL2 (OMIM 600478), RDBP (OMIM 154040), CFB (OMIM 138470), C2 (OMIM 613927) y EHMT2 (OMIM 604599).

El locus C4 del complemento humano está en la región de clase III del MHC y exhibe complejidad genética. Los genes C4 del complemento muestran duplicación segmentaria como parte de los casetes RCCX mono-, bi-, tri- o cuádrimodulares (Fernando y colaboradores, 2010). Por lo tanto, en teoría, pueden estar presentes de dos a ocho copias de genes C4 en un genoma humano diploide; con cada cromosoma 6 que comprende de una a cuatro copias de un solo gen C4. El gen C4 existe en dos formas: C4A (ácido) (referencia OMIM: 120810) o C4B (básico) (referencia OMIM: 120820), cada una de las cuales es polimórfica en sí misma. Como se usa en la presente descripción, el término "gen C4" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que puede ser una forma de gen C4A o C4B.

A nivel de nucleótidos, C4A y C4B comparten una homología de secuencia del 99 % en 41 exones. Cada isotipo se define por cinco cambios de nucleótidos en el exón 26, que contribuyen a cuatro residuos de aminoácidos específicos de isotipo desde 1120 a 1125: PCPVLVD (SEQ ID NO: 1) para C4A y LSPVIH (SEQ ID NO: 2) para C4B. Las proteínas C4A y C4B difieren en la reactividad química. C4A se une preferentemente a grupos amino, formando enlaces amida con proteínas tales como los complejos inmunitarios. C4B demuestra una mayor actividad hemolítica en determinados inmunoensayos en comparación con C4A y tiene una mayor afinidad por los grupos hidroxilo. Los genes C4 también pueden variar en tamaño, presentándose como formas largas (C4L) o cortas (C4S). Las formas largas (21 kb) o cortas (14,6 kb) del gen C4 están determinadas por la presencia o ausencia de una inserción de 6,4 kb del retrovirus endógeno humano, HERV-K(C4), en el intrón 9.

El método de la presente invención, descrito en la presente descripción se refiere a la determinación de la probabilidad de desarrollo de aGVHD y/o a la duración de la supervivencia del paciente trasplantado en un paciente mediante el análisis de compatibilidad de los alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC de uno o más donantes potenciales de trasplante con uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC en un receptor que necesita un trasplante. Por lo tanto, el método de la invención encuentra uso en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, el método de la invención puede usarse para identificar un donante candidato para un receptor de trasplante, en donde sería menos probable que un injerto del donante provoque aGVHD, particularmente la aGVHD grave, en el receptor en comparación con un donante de trasplante con menos alelos de polimorfismo de un solo nucleótido que sean compatibles con los del receptor.

Los presentes inventores han descubierto que emparejar un alelo de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC tanto del donante del trasplante como del receptor reduce el riesgo de que el receptor desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped aguda grave. Por lo tanto, en una modalidad, el método comprende determinar la presencia de un alelo de polimorfismo de un solo nucleótido tanto en el donante potencial de trasplante como en el receptor. Los presentes inventores han descubierto, además, que emparejar el donante potencial de trasplante y el receptor para alelos adicionales de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC reduce aún más el riesgo de que el donante desarrolle una enfermedad aguda de injerto contra huésped, y particularmente una enfermedad aguda de injerto contra huésped grave. Por lo tanto, en una modalidad, el método comprende determinar la presencia de 2 o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC tanto del donante potencial de trasplante como del receptor. En una modalidad particular, el método comprende determinar la presencia de 24 o 25 alelos de polimorfismo de un solo nucleótido tanto en el donante potencial de trasplante como en el receptor.

En una modalidad, los métodos de la invención comprenden determinar la presencia de uno o más alelos de SNP en las regiones codificantes o no codificantes de al menos un gen del bloque gamma del MHC seleccionado a partir de TNXB, CYP21A2, C4A, STK19, C4B, DOM3Z (OMIM 605996), SKIVL2, RDBP, CFB, C2 y EHMT2.

Los métodos de la invención comprenden determinar la presencia de uno o más alelos de SNP en el gen C4 seleccionados a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y A20170. El experto en la técnica comprenderá que las ubicaciones de estos alelos de SNP son relativas a la primera base del codón de iniciación del gen C4.

En una modalidad particular, los métodos de la invención comprenden determinar la presencia de cada uno de al menos 24 alelos de SNP seleccionados a partir de los alelos de SNP C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y A20170. En otra modalidad, los métodos de la invención comprenden detectar uno o más SNP adicionales en el gen C4.

Además, la determinación de la probabilidad de desarrollar aGVHD en un candidato a trasplante puede influir en la determinación de si el trasplante es realmente la forma de tratamiento más adecuada para su afección. En algunos casos, puede haber formas alternativas de terapia disponibles que proporcionarían un mejor pronóstico al paciente. Además, la predicción de una probabilidad de aGVHD sería indicativa de la necesidad de regímenes de tratamiento, o de regímenes de tratamiento posiblemente más agresivos que lo que pudiera recomendarse de cualquier otra manera. Tales terapias agresivas a menudo tienen efectos secundarios indeseables y, por lo tanto, preferentemente no se usan a menos que el pronóstico indique una necesidad. Por ejemplo, el tratamiento de pacientes con anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-TNF-alfa puede producir una mejoría de la aGVHD, pero puede aumentar el riesgo de infecciones. Además, varias terapias antiinflamatorias agresivas se encuentran disponibles.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los genomas de todos los organismos experimentan mutaciones espontáneas en el curso de su evolución continua, lo que genera formas variantes de las secuencias genéticas progenitoras. La coexistencia de múltiples formas de una secuencia genética da lugar a polimorfismos genéticos, que incluye los polimorfismos de un solo nucleótido, también conocidos como "SNP". Los SNP pueden surgir, además, en áreas del genoma sin función aparente, pero el SNP puede vincularse genéticamente a una secuencia variante en el genoma. Por lo tanto, el SNP puede correlacionarse estrechamente con la secuencia variante del genoma, en dependencia de cuán cercano sea el vínculo genético.

Los SNP son posiciones de una sola base en el ADN en las que diferentes alelos o nucleótidos alternativos existen en una población. Por ejemplo, dos fragmentos de ADN secuenciados de diferentes individuos, AAGCCTA a AAGCTTA, contienen una diferencia en un solo nucleótido. En este caso decimos que hay dos alelos. Los SNP más comunes tienen solo dos alelos.

Los polimorfismos de un solo nucleótido pueden caer dentro de secuencias codificantes de genes, regiones no codificantes de genes o en las regiones intergénicas (regiones entre los genes). Los SNP dentro de una secuencia codificante no cambian necesariamente la secuencia de aminoácidos de la proteína que se produce, debido a la degeneración del código genético.

Los SNP en la región codificante son de dos tipos, SNP sinónimos y no sinónimos. Los SNP sinónimos no afectan la secuencia de la proteína, mientras que los SNP no sinónimos cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína. Los SNP que no están en las regiones codificantes de proteínas aún pueden afectar el empalme de genes, la unión del factor de transcripción, la degradación del ARN mensajero o la secuencia del ARN no codificante. La expresión génica afectada por este tipo de SNP se denomina como un eSNP (expresión SNP) y puede estar aguas arriba o aguas abajo del gen.

Al definir una posición de SNP, un alelo de SNP o una secuencia de nucleótidos, la referencia a una adenina, una timina (uridina), una citosina o una guanina en un sitio particular en una hebra de una molécula de ácido nucleico también define la timina (uridina), adenina, guanina o citosina (respectivamente) en el sitio correspondiente de una cadena complementaria de la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, puede hacerse referencia a cualquiera de las cadenas para referirse a una posición de SNP particular, alelo de SNP o secuencia de nucleótidos. La posición de un SNP también puede determinarse por referencia a la primera base del codón de iniciación (también denominado codón de "inicio") del gen.

Detección de polimorfismos de un solo nucleótido

Puede usarse cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica que permita la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en una muestra. Además, la comparación puede hacerse con referencia a un control estándar o una muestra de control.

Los métodos que pueden usarse para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido incluyen PCR, LCR (reacción en cadena del ligando) y técnicas de hibridación. La "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") es una reacción en la que se hacen copias repetidas de un polinucleótido diana mediante el uso de un "par de cebadores" o "conjunto de cebadores" que consiste en un cebador "directo" y uno "inverso" y un catalizador de la polimerización, tal como una ADN polimerasa, y típicamente una enzima polimerasa estable térmicamente. Los métodos para PCR son conocidos en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en "PCR" (Ed. MJ. McPherson and S.G Moller (2000) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford). La PCR puede realizarse en el ADNc que se obtiene a partir de ARNm de transcripción inversa aislado de muestras biológicas.

Un cebador suele ser un oligonucleótido, generalmente de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, con un mínimo de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, que es capaz de hibridar de una forma específica de secuencia con la secuencia diana y extenderse durante la PCR. Las moléculas de ácido nucleico más largas, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de al menos 50 o 100 o más nucleótidos de longitud también pueden usarse como un cebador. Los amplicones o productos de PCR o fragmentos de PCR o productos de amplificación son productos de extensión que comprenden el cebador y las copias recién sintetizadas de las secuencias diana. Los sistemas de PCR multiplex contienen varios conjuntos de cebadores que resultan en la producción simultánea de más de un amplicón. Los cebadores también pueden contener secuencias adicionales y/o nucleótidos modificados o marcados para facilitar la captura o detección de amplicones. Los ciclos repetidos de desnaturalización por calor del ADN, hibridación de cebadores a sus secuencias complementarias y extensión de los cebadores hibridados con la polimerasa resultan en una amplificación exponencial de la secuencia diana. Los términos diana o secuencia diana o molde se refieren a las secuencias de ácido nucleico que se amplifican.

Otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Primeramente, se elabora un ADN complementario (ADNc) a partir de un molde de ARN, mediante el uso de una enzima transcriptasa inversa y, a continuación, se realiza una PCR en el ADNc resultante.

Otro método para la amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), descrita en el documento EP 0 320 308. En la LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias y, en presencia de la secuencia diana, cada par se unirá a hebras complementarias opuestas de la diana, de manera que ellas colinden. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se unirán para formar una sola unidad. Mediante ciclos de temperatura, como en la PCR, las unidades ligadas unidas se disocian de la diana y después sirven como "secuencias diana" para el ligamiento de los pares de sondas en exceso. Patente de EE.UU. Nº 4,883,750 describe un método similar a la LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana.

Los expertos en la técnica conocen otros métodos para la amplificación de moléculas de ácido nucleico e incluyen métodos de amplificación isotérmicos y sistemas de amplificación basados en la transcripción. Cualquier método adecuado para amplificar una construcción de ácido nucleico, o un fragmento de este, o una molécula de ácido nucleico aislada o exógena, o un fragmento de este, puede usarse en los métodos de la presente invención.

La PCR específica de alelo (tal como ASA, ARMS, SSP) es una técnica útil en el genotipado, ya que permite la detección de polimorfismos en un método localizado en cis. El método se ha popularizado como un método de genotipado rápido y relativamente fácil mediante numerosas aplicaciones particularmente en el campo del genotipado de HLA y otras aplicaciones de genotipado complejas tales como el genotipado ABO.

El método de genotipado, los kits y las composiciones descritos en la presente descripción pueden comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más cebadores o pares de cebadores directo/inverso. Particularmente, tales cebadores son para amplificar uno o más loci de alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el gen C4.

Las técnicas de hibridación implican la detección de la hibridación de dos o más moléculas de ácido nucleico, donde la detección se logra de diversas formas, que incluye el marcaje de las moléculas de ácido nucleico y la observación de la señal generada a partir de tal marcador. Las técnicas de hibridación pueden incluir cualquiera de las siguientes: transferencia Northern y Southern, reacción de sonda cíclica, ADN ramificado, ensayo Invader y captura híbrida. Las técnicas de hibridación también pueden usarse para identificar una secuencia específica de ácido nucleico presente en una muestra mediante el uso de micromatrices de secuencias de ácido nucleico conocidas para sondear una muestra. Las tecnologías de matriz pueden usar un ácido nucleico monocatenario conocido, donde cada cadena corta única se une en una ubicación conocida específica y después se añade la muestra de ácido nucleico y permite que las secuencias presentes en la muestra se hibriden con las cadenas inmovilizadas. La detección de esta hibridación se realiza después mediante marcaje, tal como marcaje del extremo, de los fragmentos de la muestra a detectar antes de la hibridación. Además, la hibridación puede determinarse mediante el uso de una técnica de hibridación fluorescente in situ.

Los métodos comunes de genotipado que pueden utilizarse en el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ensayos TaqMan, ensayos de baliza molecular, matrices de ácidos nucleicos, extensión de cebador específico de alelo, PCR específica de alelo, extensión de cebador en matriz, ensayos de extensión de cebador homogéneo, extensión de cebadores con detección por espectrometría de masas, pirosecuenciación, extensión de cebadores multiplex clasificados en matrices genéticas, ligadura con amplificación de círculo rodante, ligadura homogénea, ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA), reacción de ligadura múltiple clasificada en matrices genéticas, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, ensayos de etiqueta de extensión de una sola base y el ensayo Invader. Tales métodos pueden usarse en combinación con mecanismos de detección tales como, por ejemplo, detección de luminiscencia o quimioluminiscencia, detección de fluorescencia, detección de fluorescencia resuelta en el tiempo, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, polarización de fluorescencia, espectrometría de masas y detección eléctrica.

Otros métodos para detectar polimorfismos incluyen, pero no se limitan a, métodos en los que se usa protección contra agentes de escisión para detectar bases no apareadas en ARN/ARN o ARN/ADN, comparación de la movilidad electroforética de moléculas de ácido nucleico y ensayo del movimiento de fragmentos polimórficos en geles de poliácridamida que contienen un gradiente desnaturante mediante el uso de electroforesis en gel de gradiente desnaturante. Las variaciones de secuencia en ubicaciones específicas también pueden evaluarse mediante ensayos de protección de nucleasas tales como la protección de RNasa y SI o los métodos de escisión química.

En una modalidad, la detección de uno o más SNP o el haplotipado se realiza mediante el uso del ensayo TaqMan, que también se conoce como ensayo de nucleasa 5'. El ensayo TaqMan detecta la acumulación de un producto amplificado específico durante la PCR. El ensayo TaqMan utiliza una sonda de oligonucleótidos marcada con un colorante reportero fluorescente y un colorante inactivador. El colorante reportero se excita mediante la irradiación a una longitud de onda apropiada, transfiere energía al colorante inactivador en la misma sonda a través de un proceso llamado transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Cuando se une a la sonda, el colorante reportero excitado no emite una señal. La proximidad del colorante inactivador al colorante reportero en la sonda intacta mantiene una fluorescencia reducida para el reportero. El colorante reportero y el colorante inactivador pueden estar en los extremos 5' y 3', respectivamente, o viceversa. Alternativamente, el colorante reportero puede estar en el extremo 5' o 3' mientras que el colorante inactivador está unido a un nucleótido interno, o viceversa.

Durante la PCR, la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa escinde la sonda, de esta manera se separa el colorante reportero y el colorante inactivador y resulta en un aumento de la fluorescencia del reportero. La acumulación de producto de PCR se detecta directamente mediante el control del aumento de la fluorescencia del colorante reportero. La ADN polimerasa escinde la sonda entre el colorante reportero y el colorante inactivador solo si la sonda se hibrida con el molde que contiene el SNP diana que se amplifica durante la PCR, y la sonda se diseña para hibridarse con el sitio del SNP diana solo si un alelo de SNP particular está presente.

Las secuencias de cebador y sonda TaqMan preferidas pueden determinarse fácilmente mediante el uso del SNP y la información de secuencia de ácido nucleico asociada como se describe en la presente descripción. Pueden usarse varios programas informáticos, tales como Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, California), para obtener rápidamente conjuntos de cebador/sonda óptimos. Será evidente para un experto en la técnica que tales

cebadores y sondas para detectar los alelos de SNP son útiles en los métodos de la invención y pueden incorporarse fácilmente en un formato de kit.

5 En el ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA), una sonda se hibrida con un segmento de un ácido nucleico diana con su extremo 3' más alineado con el sitio del ácido nucleico. Una segunda sonda se hibrida con un segmento adyacente de la molécula de ácido nucleico diana directamente en 3' con respecto a la primera sonda. Las dos sondas yuxtapuestas se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana y se ligan en presencia de un agente de enlace tal como una ligasa si existe una complementariedad perfecta entre el nucleótido más 3' de la primera sonda con el sitio del ácido nucleico. Si hay una falta de coincidencia, no puede ocurrir una ligadura eficiente. 10 Después de la reacción, las sondas ligadas se separan de la molécula de ácido nucleico diana y se detectan como indicadores de la presencia de una secuencia de ácido nucleico. OLA también puede usarse para realizar la detección de ácidos nucleicos mediante el uso de matrices universales, en donde se puede introducir una secuencia de código postal en una de las sondas de hibridación y el producto resultante, o producto amplificado, hibrida con una matriz de código postal universal. Alternativamente, puede usarse OLA donde los códigos postales se 15 incorporan a las sondas OLA, y los productos de PCR amplificados se determinan mediante lectura de matriz de código postal universal o electroforética.

Alternativamente, pueden usarse métodos y programas informáticos SNPlex para la detección de SNP multiplexados mediante el uso de OLA seguido de PCR, en donde los códigos postales se incorporan a las sondas OLA, y los 20 productos de PCR amplificados se hibridan con un reactivo zipchute, y la identidad del SNP se determina a partir de la lectura electroforética del zipchute. En algunas modalidades, la OLA se realiza antes de la PCR (u otro método de amplificación de ácidos nucleicos). En otras modalidades, la PCR (u otro método de amplificación de ácidos nucleicos) se realiza antes de la OLA.

25 Otro método para determinar los SNP y los haplotipos de SNP se basa en la espectrometría de masas. La espectrometría de masas aprovecha la masa única de cada uno de los cuatro nucleótidos del ADN. Los ácidos nucleicos pueden genotiparse sin ambigüedades mediante espectrometría de masas midiendo las diferencias en la masa de ácidos nucleicos que tienen alelos de ácidos nucleicos alternativos. La tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF (ionización por desorción láser asistida por matriz - tiempo de vuelo) es la preferida para 30 determinaciones extremadamente precisas de la masa molecular, tal como para los SNP. Se han desarrollado numerosos enfoques para el análisis de genotipos basados en la espectrometría de masas. Los métodos de genotipado de ácidos nucleicos basados en espectrometría de masas preferidos incluyen ensayos de extensión de cebadores, que también pueden utilizarse en combinación con otros enfoques, tales como formatos tradicionales basados en gel y micromatrices. 35

Por lo general, el ensayo de extensión del cebador implica el diseño y la hibridación de un cebador con un amplicón de PCR molde cadena arriba (5') desde una posición del ácido nucleico diana. Se añade una mezcla de trifosfatos de didesoxinucleótidos (ddNTP) y/o trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) a una mezcla de reacción que contiene el molde. Por ejemplo, en algunas modalidades, esta es una molécula de ácido nucleico que contiene el SNP que normalmente se ha amplificado, tal como por PCR. También pueden añadirse cebador y ADN polimerasa. La extensión del cebador termina en la primera posición en el molde donde se produce un nucleótido complementario a uno de los ddNTP de la mezcla. El cebador puede estar adyacente inmediatamente (es decir, el nucleótido en el extremo 3' del cebador se hibrida con el nucleótido próximo al sitio del SNP diana) o dos o más nucleótidos eliminados de la posición del ácido nucleico. Si el cebador tiene varios nucleótidos eliminados de la posición del ácido nucleico diana, la única limitación es que la secuencia molde entre el extremo 3' del cebador y la posición del ácido nucleico no puede contener un nucleótido del mismo tipo que el que se va a detectar o esto provocará la terminación prematura de la extensión del cebador. 40 45

Alternativamente, si se añaden los cuatro ddNTP solos, sin dNTP, a la mezcla de reacción, el cebador siempre se extenderá por un solo nucleótido, correspondiente a la posición del SNP diana. En este caso, los cebadores están diseñados para unirse a un nucleótido cadena arriba de la posición del SNP (es decir, el nucleótido en el extremo 3' del cebador se hibrida con el nucleótido que está adyacente inmediatamente al sitio del SNP diana en el lado 5' del sitio del SNP diana). Es preferible la extensión de un solo nucleótido, ya que minimiza la masa total del cebador extendido, de esta manera se aumenta la resolución de las diferencias de masa entre los nucleótidos de SNP 50 alternativos. Además, los ddNTP etiquetados en masa pueden emplearse en las reacciones de extensión del cebador en lugar de los ddNTP no modificados. Esto aumenta la diferencia de masa entre los cebadores extendidos con estos ddNTP, de esta manera se proporciona una mayor sensibilidad y precisión, y es particularmente útil para tipificar posiciones de bases heterocigóticas. El etiquetado de masas también alivia la necesidad de procedimientos intensivos de preparación de muestras y disminuye el poder de resolución necesario del espectrómetro de masas. 55 60

Después, los cebadores extendidos pueden purificarse y analizarse mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la identidad del nucleótido presente en la posición del SNP diana. En un método de análisis, los productos de la reacción de extensión del cebador se combinan con cristales absorbentes de luz que forman una matriz. Después, la matriz se golpea con una fuente de energía, tal como un láser, para ionizar y desorber las moléculas de ácido nucleico en la fase gaseosa. Después, las moléculas ionizadas se expulsan a un tubo de vuelo y se aceleran por el tubo hacia un detector. El tiempo entre el evento de ionización, tal como un pulso láser, y la 65

colisión de la molécula con el detector es el tiempo de vuelo de esa molécula. El tiempo de vuelo se correlaciona con precisión con la relación masa-carga (m/z) de la molécula ionizada. Los iones con m/z más pequeños viajan por el tubo más rápido que los iones con m/z más grandes y, por lo tanto, los iones más ligeros llegan al detector antes que los iones más pesados. El tiempo de vuelo se convierte después en un m/z correspondiente y altamente preciso. De esta manera, los SNP pueden identificarse en función de las ligeras diferencias de masa y las diferencias correspondientes de tiempo de vuelo, inherentes a las moléculas de ácido nucleico que tienen diferentes nucleótidos en una sola posición de base.

Los ácidos nucleicos también pueden calificarse mediante secuenciación directa de ADN. Puede usarse una variedad de procedimientos de secuenciación automatizados, que incluye la secuenciación por espectrometría de masas. A la luz de las enseñanzas de la presente descripción, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente cebadores de secuenciación para tales procedimientos de secuenciación automatizados. La instrumentación comercial, tal como los analizadores de ADN 377, 3100, 3700, 3730 y 3730x1 de Applied Biosystems (Foster City, California), se usa comúnmente en la técnica para la secuenciación automatizada. Las secuencias de ácidos nucleicos también pueden determinarse mediante el empleo de un sistema de detección de mutaciones de alto rendimiento, tal como el Spectru Medixsystem.

En una modalidad, la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido se determina mediante el uso de una tecnología de secuenciación de próxima generación (NGC). Las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) incluyen instrumentos que son capaces de secuenciar más de 10^{14} pares de kilo de bases (kpb) de ADN por ejecución del instrumento. La secuenciación típicamente produce una gran cantidad de lecturas independientes, cada una de las cuales representa entre 10 y 1000 bases del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos generalmente se secuencian de forma redundante por certidumbre, con las réplicas por unidad de área denominadas como la cobertura (es decir, "cobertura 10 x" o "cobertura 100 x"). Los métodos de secuenciación de próxima generación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Metzker (2010).

Por lo tanto, los términos "Secuenciación de próxima generación" o "NGS" o "Secuenciación NG" como se usan en la presente descripción se refieren a cualquier método de secuenciación que determina la secuencia de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico individuales (por ejemplo, en secuenciación de una sola molécula) o proxis expandidos de manera clonal para moléculas de ácido nucleico individuales en forma de alto rendimiento (por ejemplo, más de 10^3 , 10^4 , 10^5 o más moléculas se secuencian simultáneamente).

Las plataformas para la secuenciación de próxima generación incluyen, pero no se limitan a, el sistema FLX del Secuenciador del Genoma (GS) de Roche/454, el Analizador del Genoma (GA) de Illumina/Solexa, el sistema de Detección de Ligadura de Oligonucleótidos de Soporte (SOLiD) de Life/APG, el sistema G.007 de Polonator, el sistema de Secuenciación de Genes HeliScope de Helicos BioSciences y el sistema PacBio RS de Pacific Biosciences.

En una modalidad, determinar la presencia de uno o más SNP implica la secuenciación de próxima generación dirigida (también denominada "captura de diana" o secuenciación de próxima generación de "captura de secuencia"). Tales tecnologías de enriquecimiento de dianas utilizan sondas de oligonucleótidos monocatenarios para capturar regiones genómicas candidatas de una muestra de ADN antes de la secuenciación (ver, por ejemplo, Shen y otros, 2013). Ahora existen varias estrategias de enriquecimiento de diana con el objetivo común de capturar regiones genómicas candidatas con alta precisión y exhaustividad, al mismo tiempo que se reducen los costos. Los métodos más usados utilizan la amplificación por PCR multiplex, la captura de híbridos, la circularización selectiva de dianas y la secuenciación selectiva de oligonucleótidos.

Alelos de HLA y tipificación HLA

El experto en la técnica apreciará que el método de la presente invención puede usarse junto con la tipificación de HLA. El término tipificación cuando se usa en relación con un alelo de HLA se refiere a la identificación de un alelo, es decir, la detección del alelo y la discriminación del alelo de otros alelos del mismo locus. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden implicar además la determinación de la presencia de uno o más SNP de HLA en un gen distinto de C4, o la determinación de un haplotipo de HLA para uno o más genes distintos del gen C4 en el donante potencial de trasplante y/o el receptor. Como se usa en la presente descripción, el término "haplotipo" se refiere a cualquier combinación de variantes o marcadores genéticos ("alelos") que normalmente se heredan juntos.

Los métodos de tipificación molecular de HLA se basan en la amplificación de suficientes copias de secuencias de HLA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otra técnica adecuada. La amplificación mediante PCR para la tipificación de HLA puede ser específica de locus, de grupo de alelos o alelos específicos, en dependencia de la técnica que se use. Los amplicones se analizan adicionalmente para detectar secuencias polimórficas específicas, tales como las que definen los alelos específicos de HLA o grupos de alelos relacionados que codifican un antígeno específico de HLA.

El polimorfismo en las moléculas de HLA ocurre en gran medida en los dominios proteicos que comprenden las regiones de unión a péptidos. Para las moléculas HLA de clase I, los métodos de tipificación del ADN se centran en

los exones 2 y 3, que codifican los dominios 1 y 2 de las cadenas pesadas HLA-A, B y Cw. Para las moléculas de clase II, el sitio de unión del péptido está compuesto por los primeros dominios de las cadenas alfa y beta que están codificados por el exón 2 de sus respectivos genes.

5 Para HLA-DR, solo la cadena beta es polimórfica. Por lo tanto, los esquemas de tipificación DR generalmente se concentran en el exón 2 de los genes DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5. Cabe señalar que los alelos del locus DRB1 codifican los antígenos DR 1-18 definidos serológicamente, mientras que los loci DRB3-5 codifican los antígenos DR52, DR53 y DR51, respectivamente. Todos los individuos portan el gen DRB1, pero la presencia de los genes DRB3-5 varía según los haplotipos específicos que portan diferentes genes DRB1. Por lo tanto, los individuos pueden tener tan solo un antígeno DR (si son homocigotos para DR1, 8 o 10) o hasta cuatro antígenos DR (por ejemplo, DR15, DR17, DR51, DR52). La atención adicional se ha centrado en los antígenos HLA-DQ y DP en los últimos años, debido a los informes de anticuerpos HLA específicos para las cadenas alfa y beta. En consecuencia, la tipificación completa para HLA-DQ y DP también debe considerar el exón 2 de la cadena alfa polimórfica.

15 Kits

La presente invención proporciona kits para identificar un donante de trasplante para un receptor. Tales kits pueden ser adecuados para la detección de especies de ácidos nucleicos o, alternativamente, pueden ser para la detección de un producto génico polipeptídico.

20 Para la detección de ácidos nucleicos, tales kits pueden contener un primer recipiente tal como un vial o tubo de plástico o una placa de microtitulación que contiene una o más sondas de oligonucleótidos. Los kits pueden contener opcionalmente un segundo recipiente que contiene los cebadores. La sonda puede hibridarse con el ADN que comprende un locus de polimorfismo de un solo nucleótido, o contener múltiples sondas que son capaces de hibridarse con múltiples loci de polimorfismo de un solo nucleótido. También podrían desarrollarse kits que contengan una sonda de oligonucleótidos inmovilizada sobre un soporte sólido, por ejemplo, mediante el uso de matrices.

30 Para la amplificación mediante PCR de un ácido nucleico, en el kit pueden incluirse cebadores de ácido nucleico que sean complementarios a al menos una porción de un ácido nucleico que comprende un locus de polimorfismo de un solo nucleótido. El conjunto de cebadores típicamente incluye al menos dos oligonucleótidos que son capaces de una amplificación específica del ADN. Pueden incluirse oligonucleótidos marcados con fluorescencia que permitirán la determinación cuantitativa de PCT (por ejemplo, química TaqMan, balizas moleculares). Además, pueden incluirse enzimas adecuadas para la amplificación de ADN.

35 El ácido nucleico de control puede incluirse con el kit con fines de comparación o validación.

Ejemplos

40 Ejemplo 1. Especificidad de Haplotipo Ancestral de SNP en el gen C4.

Se usaron cebadores específicos de secuencia (SSP) para detectar los pares de SNP específicos del haplotipo ancestral (AH) 8.1 en el gen C4 del complemento (Figura 2). La muestra 1 tiene los marcadores del bloque alfa, beta y delta del 8.1 AH y tiene una prueba positiva para los marcadores SNP del bloque gamma. Las muestras 2, 3 y 4 no tienen ningún marcador del 8.1 AH y son negativas para la prueba SSP para los marcadores SNP del bloque gamma.

50 La Tabla de la Figura 3 muestra que muchas muestras con alotipos C4 idénticos tienen un perfil de SNP diferente. Algunos de los SNP se encuentran en una variedad de muestras y algunos parecen exclusivos de una muestra (Haplotipo Ancestral). Estos datos sugieren que los perfiles de SNP son marcadores para el bloque Gamma del haplotipo ancestral MHC y no del alotipo de la muestra. Los ensayos Tipo Gamma #8 y #15 son ensayos SSP de control para C4A y C4B y no se incluyen en la lista.

55 Ejemplo 2. Kit ilustrativo de tipificación PCR

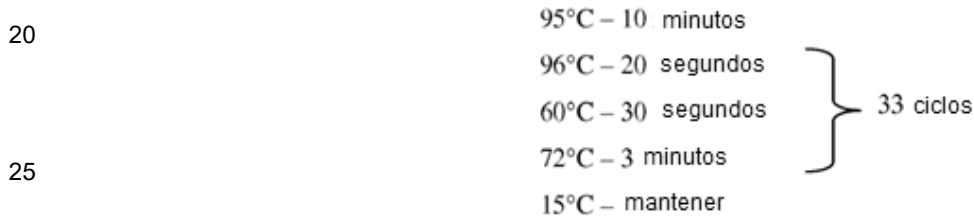
Los presentes inventores han desarrollado un kit de ensayo de PCT para emparejar pacientes y donantes para reducir el riesgo de enfermedad aguda de injerto contra huésped grave. El kit de PCR consta de 26 mezclas que contienen tampón de PCR, dNTP, MgCl₂ y cebadores específicos de secuencia, así como también un único vial de ADN polimerasa. Cada una de las mezclas para amplificar los polimorfismos de un solo nucleótido del gen C4 se proporciona en un único vial de 880 µl. Los polimorfismos de un solo nucleótido que se amplificarán en el ensayo son uno o más de: A13189, T14952, G12749, A13950-A14483, G12071, A11483, T9763, A12152, A14831, T14757, C16954, T9881, C9796, A12568-A12837, T19588, T10289, A11437, T14563, A20170, T17316, C10676, G15108, T10309 y/o C13193. El kit de ensayo comprende, además, mezclas de control para amplificar los fragmentos internos de los genes C4A y C4B.

65

Preferentemente, la muestra de ADN a analizar en el kit de ensayo es ADN genómico humano de alto peso molecular en un intervalo de concentración de 20-100 ng/μl en tampón Tris/EDTA y OD_{260/280} > 1,8, y que se ha extraído a partir de muestras de sangre completa con anticoagulante ACD o EDTA.

5 Etapas del ensayo de PCR

1. Todas las mezclas del ensayo PCR se configuran para cada muestra que se va a analizar.
2. Las mezclas de ensayo se descongelan rápidamente a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, las mezclas se agitan brevemente.
- 10 3. Se añaden 7,85 μl de cada mezcla a los pocillos de reacción. Se añaden 7,85 μl a un pocillo de control sin amplificación para cada muestra a analizar.
4. Se prepara una mezcla de ADN (64 μl) y ADN polimerasa (4,8 μl) para cada muestra que se va a tipificar en el ensayo.
5. Se dispensan 2,15 μl de la mezcla de ADN/polimerasa en cada pocillo de reacción.
- 15 6. Los pocillos de reacción se sellan y se mezclan suavemente mediante vórtice y centrifugación breve.
7. Los pocillos de reacción se colocan en un termociclador y se someten a las siguientes condiciones de amplificación:



8. Una vez finalizada la PCR, la placa de amplificación se retira del termociclador y se procesa directamente mediante electroforesis en gel de agarosa o se almacena a 4 °C hasta que se necesite.

30 Electroforesis en gel de agarosa e interpretación

1. La amplificación del control interno y los amplicones diana se confirma mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el uso de 2 μl de cada producto de PCR combinado con 5 μl de tampón de carga (pueden usarse volúmenes alternativos). Se recomienda el uso de geles de agarosa al 1 %.
- 35 2. No debe haber productos de PCR en el control sin amplificación para cada muestra analizada. Si es evidente una banda, es posible que se haya producido contaminación en algún nivel y debe repetirse la serie.
3. Todas las reacciones negativas deben amplificar el amplicón de control interno.
- 40 4. Todas las PCR positiva específicas de secuencia (SSP) resultarán en la amplificación del amplicón diana. Los tamaños esperados de los amplicones se enumeran en la Tabla 1.

45

50

55

60

65

Tabla 1. Tamaños esperados del producto de amplificación.

Número de reacción	Mezcla de reacción	Tamaño del amplicón de SSP diana	Tamaño del amplicón de control interno	
5	1	A13189	≈ 250 pb	≈ 450 pb
	2	T14952	≈ 360 pb	≈ 300 pb
	3	G12749	≈ 500 pb	≈ 300 pb
	4	C4B	≈ 550 pb	≈ 300 pb
	5	C4A	≈ 550 pb	≈ 300 pb
10	6	A13950-A14483	≈ 500 pb	≈ 300 pb
	7	G12071	≈ 250 pb	≈ 450 pb
	8	A11483	≈ 200 pb	≈ 450 pb
	9	T9763	≈ 350 pb	≈ 450 pb
	10	A12152	≈ 200 pb	≈ 450 pb
15	11	A14831	≈ 250 pb	≈ 450 pb
	12	T14757	≈ 350 pb	≈ 300 pb
	13	C16954	≈ 250 pb	≈ 450 pb
	14	T9881	≈ 250 pb	≈ 450 pb
	15	C9796	≈ 180 pb	≈ 450 pb
20	16	A12568-A12837	≈ 300 pb	≈ 450 pb
	17	T19588	≈ 320 pb	≈ 450 pb
	18	T10289	≈ 200 pb	≈ 450 pb
	19	A11437	≈ 500 pb	≈ 300 pb
	20	T14563	≈ 500 pb	≈ 300 pb
25	21	A20170	≈ 500 pb	≈ 300 pb
	22	T17316	≈ 350 pb	≈ 450 pb
	23	C10676	≈ 300 pb	≈ 450 pb
	24	G15108	≈ 450 pb	≈ 300 pb
	25	T10309	≈ 500 pb	≈ 300 pb
30	26	C13193	≈ 250 pb	≈ 450 pb
	27	Sin amplificación Control	Sin amplificación	Sin amplificación

Ejemplo 3. Emparejamiento de pacientes para tipo Gamma (SNP).

Los pacientes y los donantes se tipificaron para el panel de SNP mediante el uso del ensayo PCR-SSP. Los pares paciente/donante se definieron como incompatibles si el donante o el paciente eran positivos para al menos un SNP del panel de 26 SNP y el donante/paciente correspondiente no lo era (Figura 4 y Figura 5). La figura 4 muestra que la incompatibilidad Tipo Gamma resulta en un mayor riesgo de aGVHD grave. Pacientes (x) compatibles (M) e incompatibles (MM) para Tipo Gamma y si el paciente se diagnosticó con GVHD aguda y el grado de GVHD aguda. La figura 5 muestra que la compatibilidad Tipo Gamma mejora las posibilidades de supervivencia a largo plazo.

Ejemplo 4. Otro ejemplo del kit de tipificación de PCR Tipo Gamma.

Los presentes inventores han desarrollado un kit de ensayo de PCT adicional para emparejar pacientes y donantes para reducir el riesgo de GVHD aguda grave. El kit de PCR consta de 25 mezclas que contienen tampón de PCR, dNTP, MgCl₂ y cebadores específicos de secuencia, una mezcla de control sin amplificación y un solo vial de ADN polimerasa. Cada una de las mezclas para amplificar los polimorfismos de un solo nucleótido del gen C4 se proporciona en un pocillo individual de una placa de 32 pocillos. Los polimorfismos de un solo nucleótido que se amplificarán en el ensayo son uno o más de: A13189, T14952, G12749, G12071, A11483, T9763, A12152, A14831, T14757, C16954, T9881, C9796, A12568-A12837, T19588, T10289, A11437, T14563, A20170, T17316, C10676, G15108, T10309 y/o C13193. El kit de ensayo comprende, además, mezclas de control para amplificar los fragmentos internos de los genes C4A y C4B.

Preferentemente, la muestra de ADN a analizar en el kit de ensayo es ADN genómico humano de alto peso molecular en un intervalo de concentración de 20-100 ng/μl en tampón Tris/EDTA y OD_{260/280} > 1,8, y que se ha extraído a partir de muestras de sangre completa con anticoagulante ACD o EDTA.

Procedimiento

1. Configuración de PCR

1.1 Cada placa de reacción de 32 pozos contiene suficiente mezcla Tipo Gamma para una sola muestra. Descongelar rápidamente las mezclas Tipo Gamma/placa de reacción a temperatura ambiente. Una vez descongelado, agitar brevemente y girar la placa de 32 pocillos para asegurarse de que todas las mezclas lleguen al fondo de los pocillos.

1.2 Preparar una mezcla de ADN genómico y ADN polimerasa (ADN POL - TIPO GAMMA) para cada muestra que se tipificará de acuerdo con la Tabla 2 más abajo. Esto debe prepararse fresco para cada nuevo PCR. Pulsar en vórtex la solución 3-4 veces para mezclar.

Tabla 2. Composición de la mezcla de ADN/polimerasa necesaria por muestra

Reactivo	Volumen
ADN genómico	57,5 µL
ADN POL - Tipo GAMMA	2,5 µL

1.3 Se dispensan 2 µL de la mezcla de ADN/polimerasa en cada pocillo de reacción. Los pocillos de reacción se sellan y se mezclan suavemente. Los pocillos de reacción se centrifugan brevemente.

1.4 Los pocillos de reacción se colocan en un termociclador y se amplifican de acuerdo con las siguientes condiciones de ciclo térmico:

95°C - 10 minutos	
96°C - 20 segundos	}
61°C - 30 segundos	
72°C - 3 minutos	
	} 28 ciclos
96°C - 20 segundos	}
56°C - 30 segundos	
72°C - 3 minutos	
	} 5 ciclos
15°C - mantener	

1.5 La amplificación tarda aproximadamente 2,5 horas en completarse. Cuando se completa la PCR, la placa se retira del termociclador y los productos se analizan directamente mediante electroforesis en gel o se almacenan a 4 °C hasta que se necesiten.

2. Electroforesis en gel de agarosa e interpretación

2.1 La amplificación del control interno y los amplicones diana se confirman mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el uso de 2 µL de cada producto de PCR combinados con 5 µL de tampón de carga (los volúmenes alternativos de tampón de carga deben validarse antes de su uso). Se recomienda el uso de geles de agarosa al 2 %.

2.2 No debe haber productos de PCR en el pozo de control negativo (mezcla 26) para cada muestra analizada. Si una banda es evidente, puede haber ocurrido contaminación en algún nivel y debe repetirse la ejecución.

2.3 Todas las reacciones negativas Tipo Gamma deben amplificar el amplicón de control interno. Si no son evidentes ni la diana ni el amplicón de control interno, la reacción no puede interpretarse y debe registrarse un fallo (0) en la hoja de trabajo Tipo Gamma correspondiente.

2.4 Se observa y se registra una reacción Tipo Gamma positiva cuando se amplifica el amplicón diana. El tamaño esperado de cada amplicón diana se compara con la Tabla 1 cuando se les asigna una puntuación a las reacciones. Las reacciones positivas pueden tener un amplicón diana fuerte presente con un control interno muy débil o ausente. Esta es una reacción positiva aceptable. Cuando se les asigna una puntuación a las reacciones, registre los resultados mediante el uso del número '1' para reacciones negativas y '2' para reacciones positivas. Cualquier reacción fallida (como se describe en el punto 2.3) debe registrarse como '0'.

2.5 Los perfiles Tipo Gamma del paciente pueden compararse con los perfiles Tipo Gamma del donante para ayudar en la predicción de la compatibilidad de bloques gamma. Para hacer esto, la información pertinente de la muestra, que incluye el nombre, la identificación de la muestra y la concentración de ADN debe registrarse para cada paciente y donante potencial analizado en una hoja de trabajo. Pueden importarse copias de las imágenes de gel Tipo Gamma a la hoja de trabajo. A continuación, la imagen del gel puede interpretarse mediante la asignación de puntuación a las reacciones positivas en las que está presente la banda diana con "2" y las reacciones negativas en las que solo está presente la banda de control interno con "1". Las reacciones fallidas o 'sin amplificación', en las que tanto la diana como el control interno están ausentes, se puntúan con un "0". Estos resultados deben ingresarse en la hoja de trabajo para el paciente y los donantes.

2.6 Una vez que se han ingresado y puntuado todos los resultados, los resultados se comparan para ver si alguno de los donantes tipificados/ingresados son compatible Tipo Gamma con el paciente. Si se detecta contaminación o alguna reacción falla, es posible que sea necesario repetir las pruebas.

5 La Figura 6 muestra el análisis de PCR SSP Tipo Gamma para individuos Tipo Gamma compatibles (A) y no compatibles (B).

Ejemplo 5. Estudio retrospectivo Tipo Gamma.

10 Se realizó un estudio retrospectivo en 225 pares de donante-receptor no emparentados de trasplante de células madre hematopoyéticas (TPH), a partir de los trasplantes realizados entre 1996 y 2005 en tres centros brasileños. A cada individuo de los pares de trasplantes se le tipificó el HLA (A,B,C,DRB1,DQB1) mediante el uso de la tecnología Luminex. El ensayo Tipo Gamma se realizó con 23 SNP mediante análisis PCR-SSP, más los SNP específicos de isotipo C4A y C4B. Se registró una compatibilidad Tipo Gamma donde había una coincidencia completa en el perfil de SNP Tipo Gamma en un par trasplante/receptor. Se registró una incompatibilidad Tipo Gamma donde había una diferencia de al menos 1 SNP en el perfil de SNP.

El análisis de los tipos de HLA y los perfiles Tipo Gamma demostró que es más probable que los pares de HLA no compatibles sean Tipo Gamma no compatibles (Tabla 3).

20 Tabla 3. Los pares de HLA no compatibles tienen más probabilidades de ser Tipo Gamma no compatibles

	GT compatible	GT no compatible
HLA 9/10 compatible	16 (21 %)	61 (79 %)
HLA 10/10 compatible	77 (52 %)	71 (48 %)
Chi cuadrado $p < 0,001$		

Además, los presentes inventores encontraron que la compatibilidad Tipo Gamma en 10/10 pares de HLA compatible reduce el riesgo de cGvHD y aGvHD de Grado III/IV (Figura 7). Se demostró que la compatibilidad Tipo Gamma en 9/10 pares de HLA compatibles mejora significativamente la supervivencia, lo que puede ser el resultado de equilibrar la recaída de la enfermedad y la GvHD. A este respecto, los inventores encontraron que las tasas de supervivencia de los pacientes Tipo Gamma compatibles y 9/10 HLA compatibles superaban a los pacientes Tipo Gamma compatible y 10/10 HLA compatible.

35 En resumen, los presentes inventores determinaron que la secuencia genómica no HLA impactaba en el resultado del trasplante de células madre hematopoyéticas no emparentado. Esto sugiere que la compatibilidad Tipo Gamma y la tipificación de HLA de alta resolución resultan en la compatibilidad de loci no HLA críticos para el resultado del trasplante de células madre hematopoyéticas. Por lo tanto, el ensayo Tipo Gamma de la presente invención puede usarse para identificar al mejor donante para obtener mejores resultados después de un HSCT no emparentado.

40 Referencias

- Fernando y otros (2010) Hum Mutat, 31(7):866-874
- Metzker (2010) Nat Rev Genet, 11(1):31-46
- Petersdorf y otros, (2007) PLoS Med, 4(1): e8
- 45 Shen y otros, (2013) Genome Medicine, 5:50

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un donante de trasplante para un receptor que necesita un trasplante, el método comprende:
- 5
- a) aislar una muestra de ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se obtiene del donante potencial de trasplante y/o del receptor
 - b) determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido dentro de un gen ubicado en el bloque gamma del MHC del receptor que necesita un trasplante;
 - 10 c) determinar la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido dentro de un gen ubicado en el bloque gamma del MHC de uno o más donantes potenciales de trasplante; e
 - d) identificar un donante de trasplante en base a la presencia de uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido dentro de un gen ubicado en el bloque gamma del MHC tanto del donante de trasplante como del receptor que necesita un trasplante;
 - 15 en donde el polimorfismo alélico de un solo nucleótido se selecciona a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende, además, detectar la presencia de uno o más alelos adicionales o determinar uno o más haplotipos adicionales en el receptor y en el donante potencial de trasplante.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el método comprende, además, determinar uno o más alelos HLA y/o haplotipos HLA adicionales.
- 25 4. Uso de un kit o una matriz en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el kit comprende un reactivo de ácido nucleico que comprende sondas de oligonucleótidos para detectar uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC seleccionado a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.
- 30 5. El uso de un kit o matriz de la reivindicación 4, en donde las sondas de oligonucleótidos están marcadas de manera detectable.
- 35 6. El uso de un kit o matriz de la reivindicación 5, en donde el kit comprende cebadores de oligonucleótidos para amplificar uno o más alelos de polimorfismo de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC, opcionalmente en donde el kit es adecuado para realizar un ensayo de PCR-SSP.
- 40 7. Un método para realizar uno o más ensayos de PCR-SSP para detectar polimorfismos de un solo nucleótido en el bloque gamma del MHC, el método comprende:
- i) mezclar ADN genómico con una ADN polimerasa para formar una mezcla de ADN polimerasa,
 - 45 ii) formar una mezcla de reacción mediante la combinación de la mezcla de ADN polimerasa con cebadores de oligonucleótidos para amplificar un alelo de polimorfismo de un solo nucleótido del bloque gamma del MHC, y
 - iii) someter la mezcla de reacción a ciclos térmicos para producir un producto de amplificación, en donde el polimorfismo alélico de un solo nucleótido se selecciona a partir de C2321, T9763, C9796, T9819, T9881, T10289, T10309, C10676, A11437, A11483, G12071, A12152, A12568, A12837, G12749, A12877, A13189, C13193, A13950, A14483, T14563, T14757, A14831, T14952, G15108, C16954, T17316, T19588 y/o A20170.
- 50 8. El método de la reivindicación 7, en donde el producto de amplificación se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa.
- 55 9. El método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el ADN genómico es ADN genómico humano de alto peso molecular.
- 60 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el ADN genómico está a una concentración de aproximadamente 20 ng/μl a aproximadamente 100 ng/μl.
- 65 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende extraer el ADN genómico de una muestra biológica, opcionalmente, en donde el método comprende extraer el ADN genómico a partir de sangre completa con anticoagulante solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) o EDTA.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el ADN genómico tiene una medida de relación de densidad óptica (OD) de $OD_{260/280} > 1,8$.
 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde el método comprende detectar al menos 24 alelos de polimorfismo de un solo nucleótido.
- 5

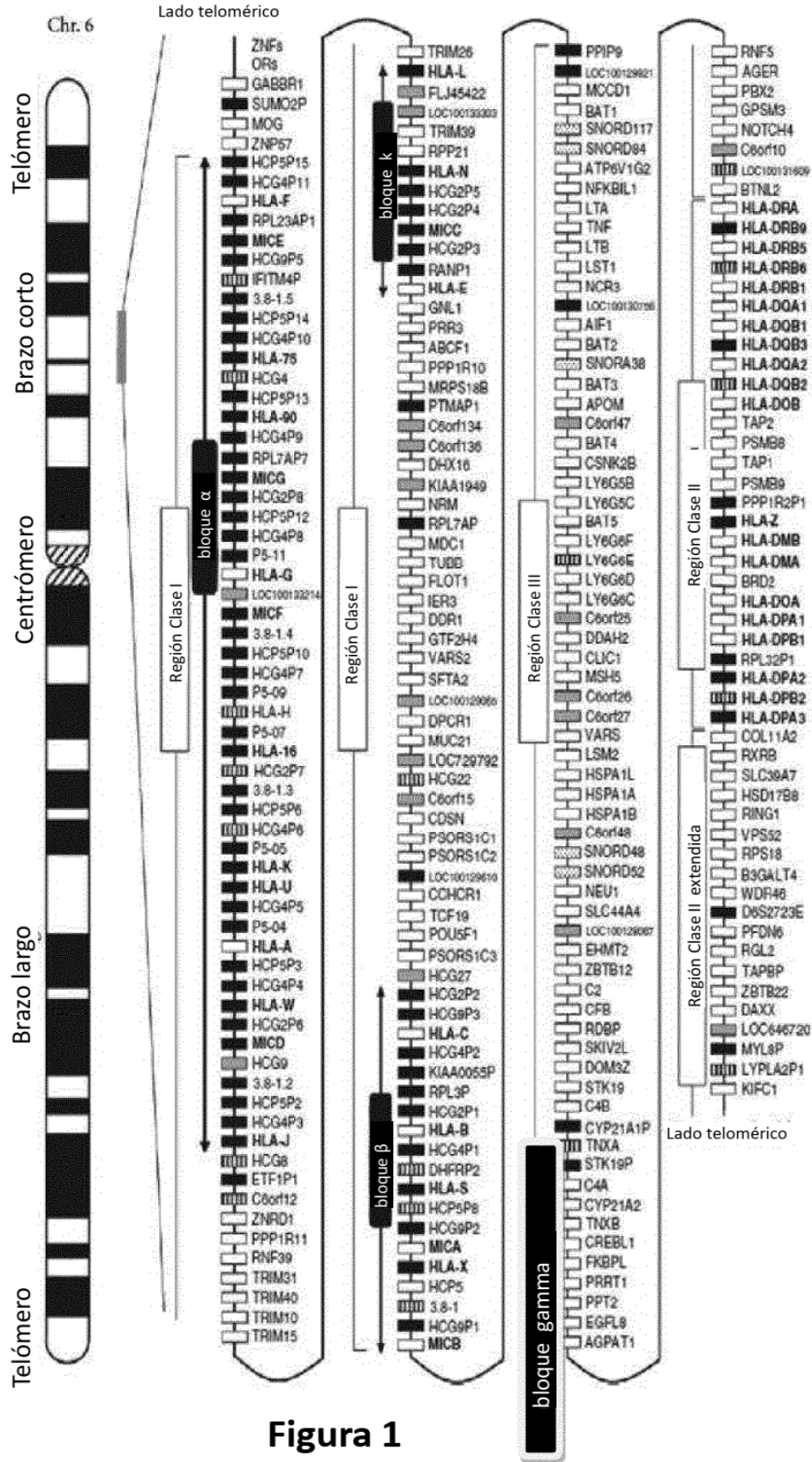


Figura 1

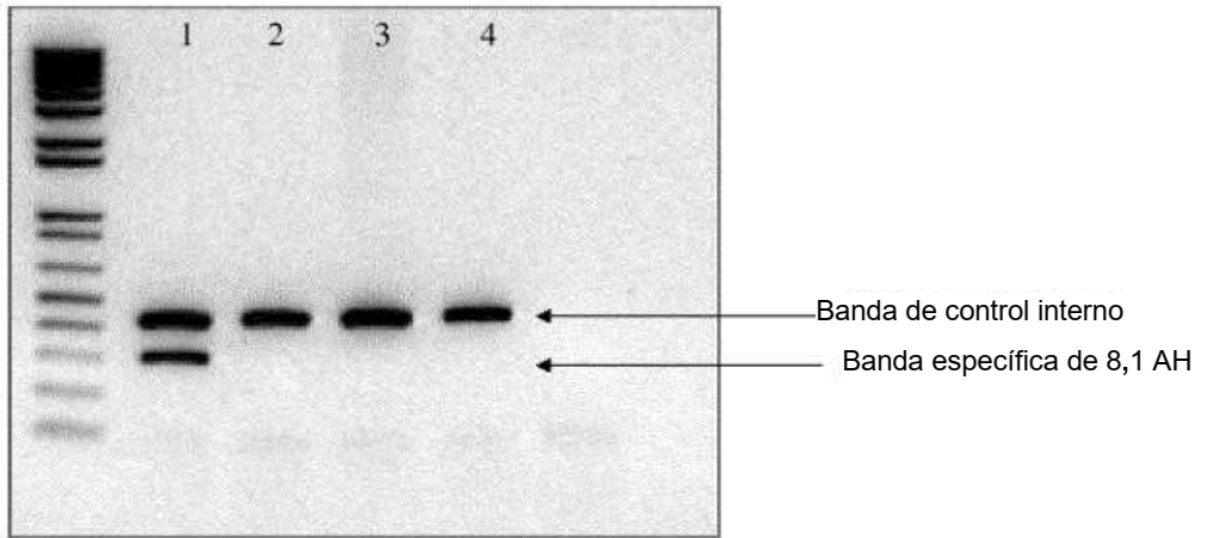


Figura 2

Posición de la secuencia de referencia (NG_011638.1)																									
Posición de Intrón/Exón)	128	I21	E40	E29	I38	I19	I19	I28	E29	I23	I30	E21	I21	E33	I13	E33	I19	I13	I23	E12	I12	E17	E12	E17	E34
Ensayo tipo Gamma #	25	22	24	12	13	11	11	20	21	14	17	7	7	10	23	4	6	19	16	1	5	9	2	18	3
Secuencia de referencia	C	A	G	G	C	G	G	C	G	T	A	G	C	T	C	G	A	C	G	T	C	G	C	C	C
ID muestra/ Haplotipo ancestral	Alotipo C4A-C4B																								
44,4	T	.	.	.	T	.	.	-	.	C	.	.	T	T
13,1	.	G	.	.	T	.	.	-	.	C	.	.	T	C
44,2	.	G	.	.	T	C	G
7,1	-	T	.	G	A
18,1	-	.	C	T
46,1	-	.	C
46,2	-	.	C	A
62,2	-	.	C
44,3	.	G	.	.	T	.	.	-	.	C	.	.	A	T
8,1	T	.	.	-	.	C
55,1	-	.	C
7,2	T	.	A	A	C	.	.	T
44,1	T	G	A	C	.	.	T
18,2	T	G	.	.	T	C
58,1	T	G	.	.	T	C
35,2	T	.	.	.	T	C
62,1	T	G	A	A	.	A	.	.	.	C	A	.
52,1	-	T	C	.	.	A
54,1	.	G	.	.	T	.	.	-	.	C	T
38,1	T	G	.	A	.	A	.	.	.	C	.	.	T
65,1	.	G	.	.	T	.	.	-	.	C	.	.	T	T
57,1	.	G	.	.	T	.	.	-	.	C	.	.	T
42,1	T	.	.	.	T	.	.	-	.	C	.	.	T
47,1	.	G	.	.	T	.	.	-	.	C

Figura 3

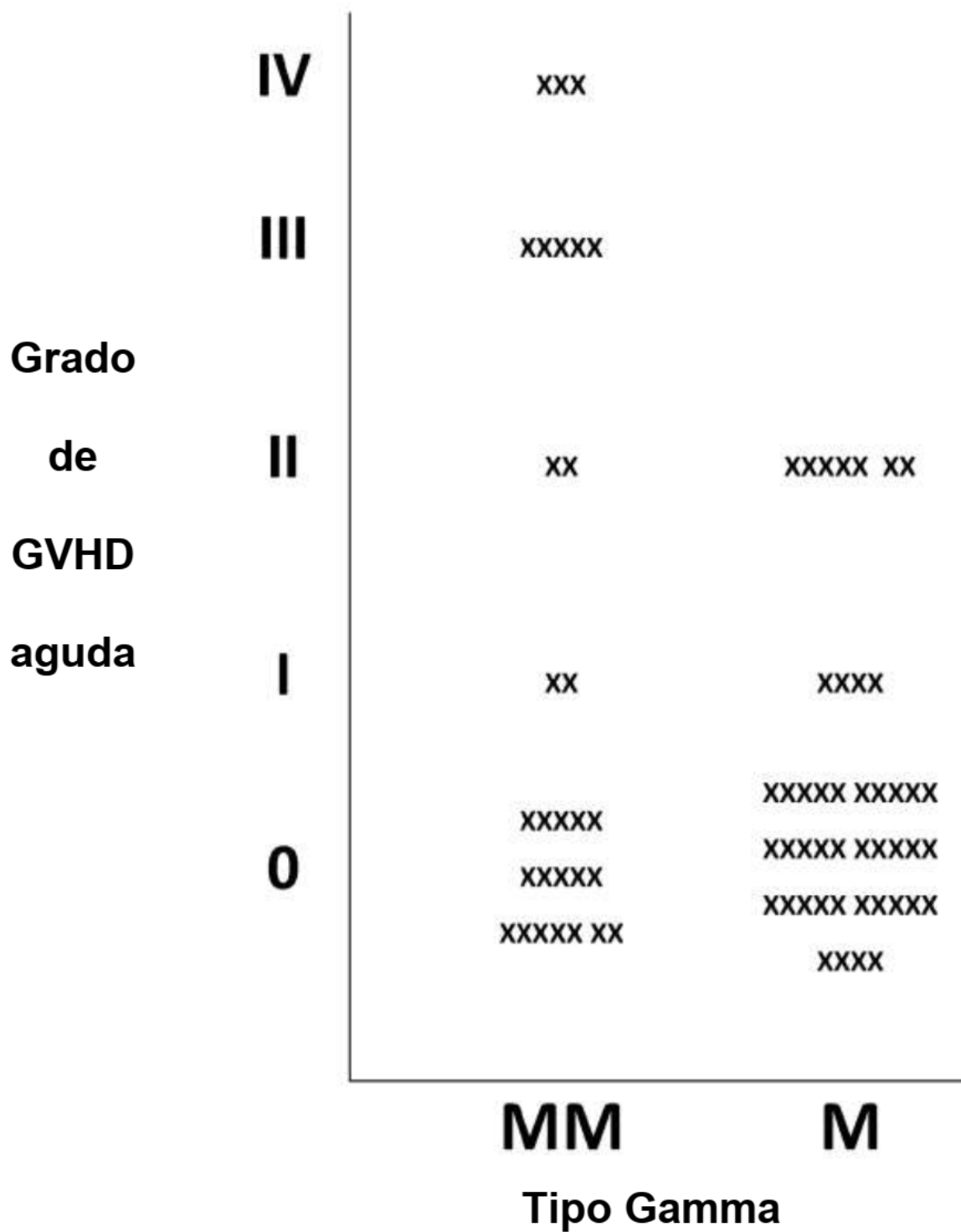


Figura 4

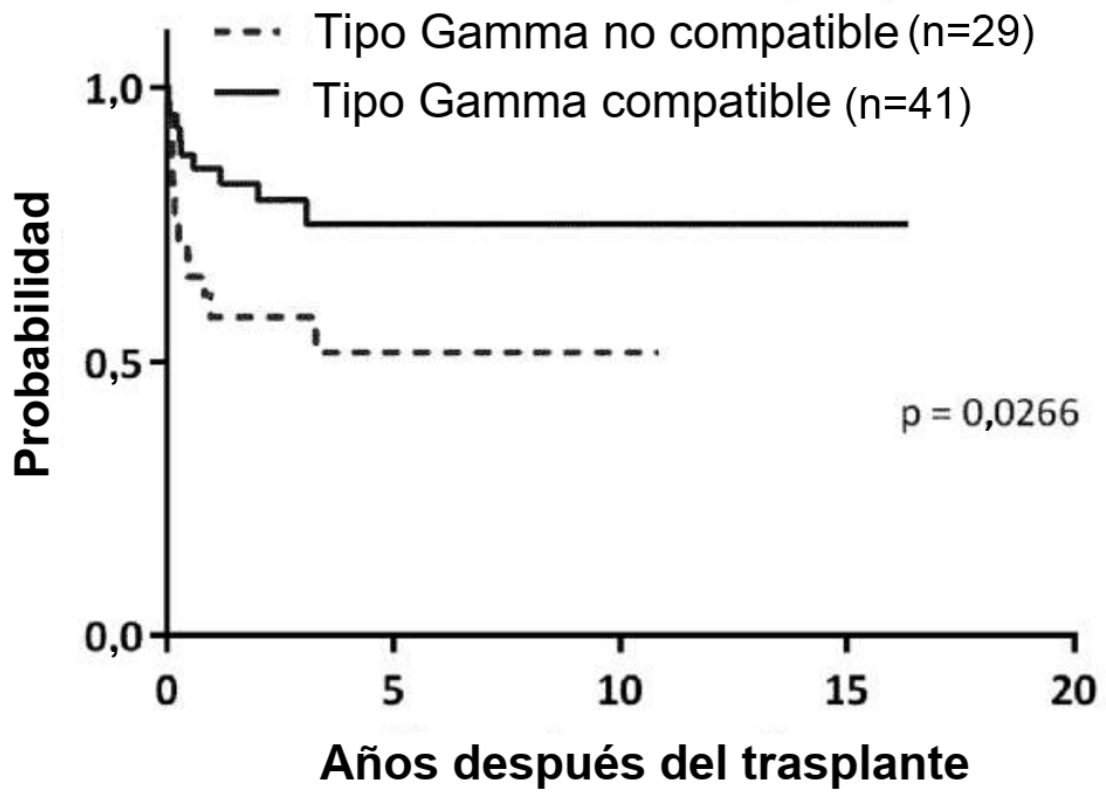
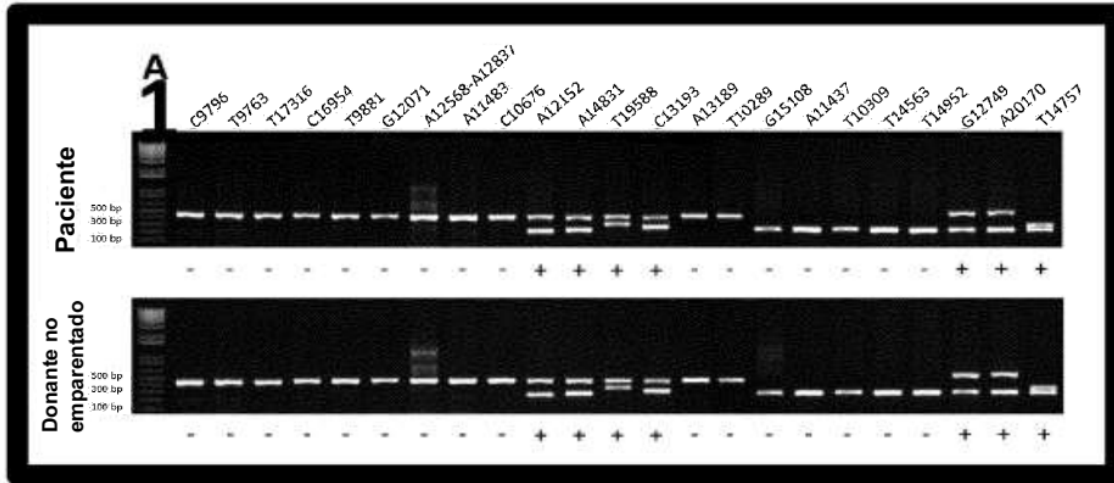


Figura 5

Compatible



No compatible

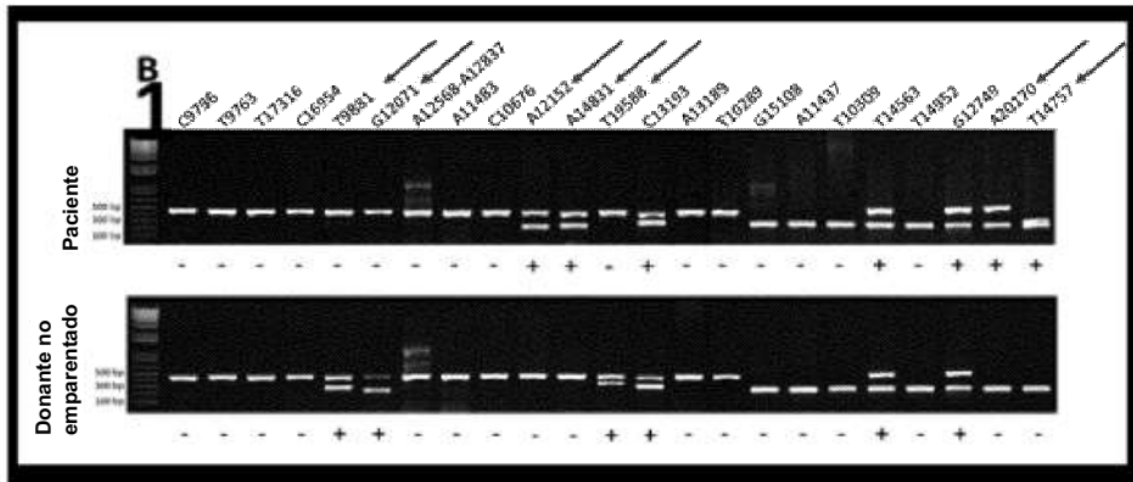


Figura 6

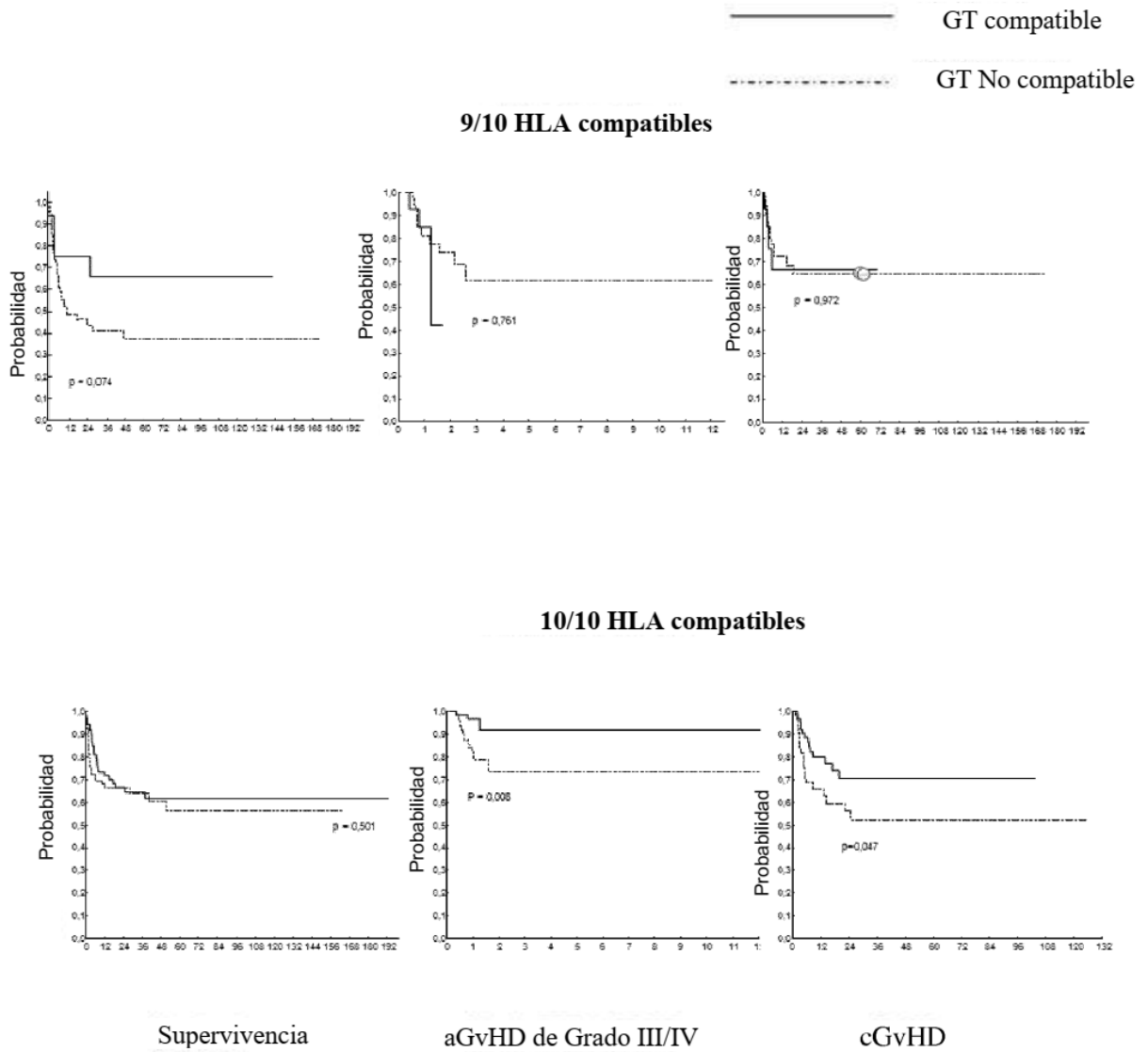


Figura 7