



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 326 708**

⑫ Número de solicitud: 200502423

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑭ Fecha de presentación: **05.10.2005**

⑮ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2009**

Fecha de la concesión: **17.09.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **30.09.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
30.09.2010

⑲ Titular/es: **PROGENIKA BIOPHARMA, S.A.**
Ibaizabal Bidea, Edificio 801 - A 2ª Planta
48160 Derio, Vizcaya, ES

⑳ Inventor/es: **Simón Buela, Laureano;**
Martínez Martínez, Antonio y
Tejedor Hernández, Diego

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Métodos y productos para genotipado *in vitro*.**

㉓ Resumen:

Métodos y productos para genotipado *in vitro*.

El método de genotipado se basa en la combinación de un diseño experimental de DNA-chips de genotipado y en el desarrollo de un sistema secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por dichos DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación, lo que garantiza unos elevados niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que dichos DNA-chips puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico. De aplicación en el diagnóstico *in vitro*, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante DNA-chips, para la detección de variaciones génicas, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones génicas asociadas con enfermedades, o asociadas al genotipado de antígenos de interés, o asociadas con la resistencia a tratamientos farmacológicos.

ES 2 326 708 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para genotipado *in vitro*.

5 **Campo de la invención**

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico *in vitro*, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante DNA-chips, para la detección de variaciones génicas por ejemplo, polimorfismos o mutaciones génicas asociadas con enfermedades, o asociadas al genotipado de antígenos de interés, o asociadas con la resistencia a tratamientos farmacológicos.

Antecedentes de la invención*DNA-chips*

En el año 2001, el Consorcio para el Proyecto Genoma Humano y la empresa privada Celera presentaron un primer borrador completo del genoma humano con 30.000 genes. A partir de este momento se iniciaba la posibilidad del estudio del genoma completo o estudios a gran escala (high-throughput). Los denominados "DNA-chips", también denominados "microarrays", "DNAarrays" o "bio-chips de DNA" son herramientas que la Genómica Funcional puede usar para los estudios a gran escala que se plantean en la actualidad. La Genómica Funcional estudia los cambios en la expresión de los genes debidos al ambiente al que está sometido el individuo y a las características genéticas del mismo. Las secuencias de los genes presentan pequeñas variaciones interindividuales de un único nucleótido que reciben el nombre de SNP ("single nucleotide polymorphism") que en un pequeño tanto por ciento están implicados en cambios en la expresión de los genes que causan determinadas patologías. La mayoría de los estudios que aplican DNA-chips son de expresión génica aunque también se utilizan en la detección de SNPs.

El primer DNA-chip fue el "Southern blot" en el que moléculas de ácidos nucleicos marcadas se utilizaban para interrogar moléculas de ácidos nucleicos unidas a un soporte sólido. El soporte sobre el que se llevaba a cabo la interrogación en los primeros DNA-chips eran membranas de nylon. Aunque se partía de una buena idea, la técnica era todavía muy laboriosa.

Dos avances marcaron el arranque definitivo de los DNA-chips. Por una parte, el uso de un soporte sólido no poroso, como el vidrio, que facilitó la miniaturización y la detección basada en fluorescencia. Por otra parte, la adaptación de técnicas fotolitográficas utilizadas en la elaboración de semiconductores para la producción de DNA-chips conteniendo cada uno de ellos más de 400.000 oligonucleótidos distintos, en una región de aproximadamente 20 μm^2 , los denominados DNA-chips de alta densidad.

Concretamente un DNA-chip es un soporte sólido que contiene cientos de fragmentos de secuencias de genes diferentes representadas en forma de DNA, cDNA u oligonucleótidos inmovilizadas o unidas en su superficie en posiciones fijas. Los soportes son generalmente portaobjetos de vidrio para microscopio, membranas de nylon o "chips" de silicio. Es importante que estas secuencias o sondas estén unidas al soporte en un orden fijo ya que la localización robotizada de cada uno de ellos determina el gen cuya expresión se está midiendo. En función de la tecnología empleada para la producción de los DNA-chips se pueden clasificar en:

- DNA-chips de alta densidad: Los oligonucleótidos que se encuentran en la superficie del portaobjetos de vidrio han sido sintetizados "*in situ*", mediante una metodología denominada fotolitografía.

- DNA-chips de baja densidad: En este caso los oligonucleótidos, cDNA o fragmentos de PCR son depositados en forma de nanogotas en la superficie del cristal mediante un robot que imprime esas secuencias de DNA en el portaobjetos. Existen pocos ejemplos de DNA-chips de baja densidad y, al contrario que en los de alta densidad, son pocas las variaciones génicas detectadas: un DNA-chip para la detección de 5 mutaciones puntuales en el gen de la tirosinasa, un DNA-chip para la detección de mutaciones en p53 y k-ras, un DNA-chip para la detección de 12 mutaciones causantes de cardiomiopatía hipertrófica, un DNA-chip para el genotipado de cepas de *Escherichia coli* o DNA-chips para la detección de patógenos tales como *Cryptosporidium parvum* o *rotavirus*.

Según la estrategia de diseño de los oligonucleótidos se puede hablar de:

- "Standard tiling": Se diseñan 4 oligonucleótidos totalmente complementarios a la secuencia de referencia excepto en la posición central donde se interrogan las 4 posibilidades: A, C, G y T; un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para el genotipado de HIV-1 (Affymetrix). La posición central asegura máxima especificidad.

- "Alternative tiling": En este caso son 5 los oligonucleótidos diseñados, de forma que el quinto interroga una posible delección en la secuencia; un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para la detección de mutaciones en p53 (Affymetrix).

- "Block tiling": Se diseñan 4 oligonucleótidos totalmente complementarios a la secuencia normal y otros 4 totalmente complementarios a la secuencia mutante; el nucleótido que cambia se coloca en la posición central, pero 2 nucleótidos antes o después se coloca un "mismatch" que puede ser una de las cuatro bases (A, C, T o G); un ejem-

plo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para la detección de mutaciones en el citocromo p450 (Affymetrix). Dentro de esta última estrategia ["block tiling"] Affymetrix usa el "mismatch" para aumentar la especificidad de la hibridación no sólo en una posición sino en las posiciones -4, -1, 0, +1 y +4 para identificar el cambio producido en la posición central ó 0. Esta estrategia se denomina "Alternative block tiling" y un claro ejemplo es el DNA-chip para la

En el caso de estudios de expresión génica, las sondas depositadas en el vidrio se hibridan con los cDNAs sintetizados a partir de los mRNAs extraídos del tejido que se quiere analizar. Estas moléculas de cDNA han sido marcadas con un fluoróforo al sintetizarse; cuanto mayor sea el número de moléculas que se unen a su secuencia complementaria en el DNA-chip, mayor será la cantidad de fluoróforo que se detecta y mide tras excitarlo con un láser. Esta medida es, por tanto, reflejo del número de moléculas de cada mRNA que había en el tejido analizado y, consecuentemente, reflejo del nivel de expresión de cada gen representado en el DNA-chip, lo que se denomina un patrón de expresión de la célula. Estos DNA-chips de expresión contienen también sondas que representan genes de control ("house-keeping genes"), lo que permite normalizar los resultados y comparar múltiples experimentos de forma cuantitativa. Con un DNA-chip, se pueden determinar en un solo experimento los niveles de expresión de cientos o miles de genes de una célula. El cDNA de la muestra problema y de la muestra control se pueden marcar con dos fluoróforos distintos por lo que en el mismo DNA-chip se pueden estudiar las diferencias entre la expresión de los genes en la muestra control y en la muestra problema.

Los DNA-chips para la detección de polimorfismos genéticos, cambios o mutaciones en general, variaciones génicas, en la secuencia de DNA, comprenden unas superficies sólidas, típicamente de cristal, en las que está depositado un elevado número de secuencias génicas complementarias de cada una de las variaciones génicas que se desea estudiar. Una de las estrategias utilizadas para detectar variaciones génicas consiste en la hibridación de las secuencias que reconocen específicamente al alelo normal y al mutado con fragmentos de DNA procedentes de la muestra que se va a analizar, amplificados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y marcados con una molécula fluorescente. Al iluminar el DNA-chip con el láser se identifican aquellas secuencias que se han unido a la muestra problema y así se discrimina específicamente un paciente normal de un heterocigoto o un homocigoto mutante. Otra estrategia básica de detección de variaciones génicas con DNA-chips de genotipado consiste en llevar a cabo una reacción de amplificación o extensión sobre el propio DNA-chip.

Dentro de la estrategia de hibridación se puede hacer una subclasificación en función del método de análisis de la información para el genotipado:

- Aumento de la señal de hibridación: Esta estrategia compara la señal de hibridación de las sondas complementarias a los alelos normales y a los alelos mutantes. En general, las muestras mutadas deben presentar una mayor señal de hibridación en las sondas complementarias a los alelos mutantes que en el caso de los individuos normales.

- Pérdida de la señal de hibridación: Los cambios en la secuencia entre una muestra control y una muestra a estudio se pueden identificar por una caída en la señal de hibridación de los oligonucleótidos totalmente complementarios con la secuencia de referencia. En los individuos homocigotos se produce una pérdida completa de señal mientras que en los heterocigotos se produce una pérdida del 50% de la señal. En los DNA-chips para interrogar todas las bases de una secuencia de "n" nucleótidos ("oligonucleótido") de longitud en ambas hebras es necesario un mínimo de "2n" oligonucleótidos que solapan con el oligonucleótido anterior en toda la secuencia salvo en un nucleótido. Este diseño de los oligonucleótidos recuerda a los orígenes de los DNA-chips en membranas de nylon pero, en este caso, el tamaño de los oligonucleótidos es de 25 nucleótidos y no de 8 nucleótidos. El elevado número de oligonucleótidos empleados para reconstruir la secuencia hace que los errores derivados de la fluctuación en la señal de hibridación que se producen en la estrategia de ganancia de señal se minimicen. Por el contrario, el cambio exacto en la secuencia no se puede identificar con esta metodología; es necesario secuenciar posteriormente para conocer la mutación.

La segunda estrategia para la detección de variaciones génicas mediante el empleo de DNA-chips de genotipado, consistente en la amplificación o extensión sobre el propio DNA-chip, se aborda con tres aproximaciones:

- "Minisequencing": Un cebador específico de la mutación es inmovilizado en el portaobjetos y, después de una reacción de extensión con didesoxinucleótidos fluorescentes, se captura la imagen del DNA-chip con un escáner.

- "Primer extensión": Se inmovilizan dos oligonucleótidos por mutación y la reacción de extensión se lleva a cabo con un nucleótido fluorescente y los demás naturales siendo el material de partida RNA o el producto de una PCR.

- "Tag arrays". La reacción de extensión se lleva a cabo en solución con cebadores específicos que llevan una determinada secuencia o "tag" en 5'. El uso de DNA-chips con oligonucleótidos complementarios a esas secuencias o "tags" permite la captura de los productos resultantes de la extensión. Ejemplos ilustrativos de esta aproximación incluyen el DNA-chip de alta densidad "Gene-Flex" (Affymetrix), aunque también existen DNA-chips de baja densidad.

A la hora del diseño de herramientas para el diagnóstico genético, la sencillez experimental debe ser tenida muy en cuenta. Se debe analizar, por tanto, la complejidad técnica que supone para el usuario final el análisis de DNA-chips basados en hibridación diferencial frente a los basados en la metodología de extensión. La necesidad de un mayor

número de reacciones de amplificación y purificación supone una desventaja de la estrategia basada en técnicas de extensión o amplificación frente a la estrategia basada en la hibridación.

Sin embargo, en lo relativo a la especificidad y sensibilidad de los DNA-chips, la hibridación diferencial no consigue los valores tan altos asociados con la amplificación sobre el portaobjetos de vidrio. Es por ello necesario el desarrollo de algoritmos matemáticos que aumenten la especificidad y sensibilidad de la estrategia basada en el empleo de la metodología de hibridación (Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MN, Yohn CT, Tobi KP, Kashuk C, Mathews DJ, Shah N, Eichler EE, Warrington JA, Chakravarti A. *Genome Research*; 11:1913-1925 (2001)). Dentro de esta tecnología y de los DNA-chips de baja densidad, la elección es sin duda el uso de oligonucleótidos diferentes para detectar al alelo normal y al mutante ("aumento de la señal de hibridación").

La inutilidad de los DNA-chips existentes en la actualidad para detectar simultáneamente la presencia o ausencia de un número elevado de variaciones génicas, de manera sensible, específica y reproducible, ha impedido su aplicación como herramientas de uso rutinario para el diagnóstico clínico de enfermedades humanas. Los inventores han desarrollado un método secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación (algoritmo). Este método se basa en un novedoso diseño experimental, que asegura unos altos niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que los DNA-chips desarrollados en base a este método, puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un método de detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas y su empleo para el desarrollo de productos para genotipado. Dicho método se basa en la combinación de un novedoso diseño experimental de DNA-chips de genotipado y en el desarrollo de un sistema secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por dichos DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación (algoritmo), lo que garantiza unos altos niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que dichos DNA-chips puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico.

Método de genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se incluye la definición de algunos términos:

El término "polimorfismo" se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción igual o superior a un 1% en una población; en un caso particular, cuando dicha variación es la secuencia nucleotídica ocurre en un sólo nucleótido (A, C, T o G) se denomina SNP.

El término "mutación génica" se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción inferior al 1% en una población.

Los términos "variante alélica" o "alelo" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un polimorfismo que ocurre en un mismo locus en una misma población.

El término "variación génica" o "variante génica", tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye a las mutaciones, polimorfismos y variantes alélicas. Una variación o variante génica se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto, en adelante método de la invención, que comprende:

- extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
- amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
- someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
- poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan

4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;

- introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
- genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles.

Opcionalmente, tras el proceso de hibridación, puede llevarse a cabo sobre el propio soporte una reacción de amplificación, por ejemplo, mediante “primer extensión”, o, alternativamente, una reacción de ligación, por ejemplo, mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos (Oligonucleotide Ligation Assay u “OLA”), cuando dicho soporte es una superficie sólida, tal como un soporte de vidrio, plástico, una membrana, etc. En caso de seguir alguna de estas alternativas, el marcaje de los productos que contienen las variaciones génicas a identificar se lleva a cabo en esta etapa y no durante la reacción de amplificación ni durante el proceso de fragmentación.

La extracción del ácido nucleico (DNA o RNA) a partir de una muestra biológica que lo contiene procedente de un sujeto, tal como un ser humano, se puede llevar a cabo por métodos convencionales utilizando, opcionalmente, productos comerciales útiles para extraer dicho ácido nucleico. Prácticamente cualquier muestra biológica que contiene ácido nucleico puede ser utilizada para la puesta en práctica de la invención; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha muestra biológica puede ser una muestra de sangre, plasma, suero, secreciones, tejido, etc.

En una realización particular, el ácido nucleico a extraer es DNA. En otra realización particular, el ácido nucleico a extraer es RNA, típicamente, RNA total; esta última alternativa puede ser utilizada en caso de que la variación génica a estudiar esté situada en la secuencia codificante de un gen; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de obtención del cDNA correspondiente. La obtención de dicho cDNA se lleva a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante retrotranscripción utilizando los cebadores apropiados el RNA y como molde para la retrotranscripción.

Las etapas posteriores del método de la invención se llevan a cabo sobre el DNA extraído o sobre el cDNA correspondiente al RNA extraído. El término DNA, tal como se utiliza de aquí en adelante incluye tanto DNA como cDNA.

Las regiones de DNA que contienen las variaciones génicas a identificar (regiones DNA diana) se someten a una reacción de amplificación para obtener unos productos de amplificación que contienen las variaciones génicas a identificar. Aunque puede utilizarse cualquier técnica o método que permita la amplificación de todas las secuencias de DNA que contienen las variaciones génicas a identificar, en una realización particular, dichas secuencias se amplifican mediante una PCR multiplex. Para la realización de una PCR multiplex se requiere el empleo de unos pares de oligonucleótidos cebadores o iniciadores capaces de amplificar dichas regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas a identificar. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de dichas regiones DNA diana, preferentemente, pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR. De este modo, utilizando los pares de oligonucleótidos cebadores y las condiciones apropiadas, se pueden amplificar todas las regiones DNA diana necesarias para el genotipado de las variaciones génicas a analizar en el DNA-chip con el mínimo número posible de reacciones.

Opcionalmente, si se desea, durante la reacción de amplificación, puede llevarse a cabo el marcaje de los productos de amplificación con el fin de poder detectar posteriormente la hibridación entre las sondas inmovilizadas en el soporte y los fragmentos de DNA diana que contienen las variaciones génicas a detectar. El marcaje de los productos de amplificación puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, incorporando un nucleótido marcado durante la reacción de amplificación o bien utilizando cebadores marcados. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, por ejemplo, ³³P, ¹²⁵I, etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho marcaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, biotina (indicador), efectuándose la lectura mediante fluorimetría, etc., o bien, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, digoxigenina (indicador), etc., transformándose el sustrato de la enzima en un producto luminiscente o fluorescente y, efectuándose la lectura mediante quimio-luminiscencia, fluorimetría, etc.

En una realización particular, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de un nucleótido marcado directa o indirectamente con uno o más fluoróforos. En otra realización particular, el marcaje del

producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de cebadores marcados directa o indirectamente con uno o más fluoróforos.

Los productos de amplificación, opcionalmente marcados, se someten posteriormente a una reacción de fragmentación con el fin de aumentar la eficiencia de la hibridación posterior, obteniéndose de este modo unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar. La fragmentación de los productos de amplificación puede llevarse a cabo por cualquier método convencional, por ejemplo, poniendo en contacto los productos de amplificación con una Dnasa.

En caso de que los productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente durante la reacción de amplificación, y en caso de que, tras el proceso de hibridación, no se lleve a cabo una reacción de amplificación o ligación directamente en el soporte, los productos resultantes de la reacción de fragmentación (productos de fragmentación) se someten a un marcaje bien directo utilizando, por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos, etc. o bien indirecto utilizando, por ejemplo, pares de unión específica que incorporan fluoróforos, enzimas, etc., mediante métodos convencionales. En una realización particular, los productos de amplificación no han sido marcados previamente durante la reacción de amplificación, y los productos de fragmentación se someten a un marcaje directo o indirecto con uno o varios marcadores, por ejemplo, uno o varios fluoróforos, aunque pueden utilizarse otros marcadores conocidos por los expertos en la materia.

A continuación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con las sondas capaces de detectar las variaciones génicas correspondientes bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas. Dichas sondas están depositadas en un soporte sólido siguiendo una disposición predeterminada, constituyendo un DNA-chip (DNA-chip de la invención), cuyo diseño y desarrollo debe cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizado en el método de la invención en cuanto al diseño de las sondas, el número de sondas a depositar por variación génica a detectar, el número de réplicas de sondas a depositar, la distribución de las sondas sobre el soporte, etc. Las características propias de dicho DNA-chip de la invención se describen detalladamente más adelante.

La hibridación de los productos de fragmentación con las sondas capaces de detectar las variaciones génicas correspondientes depositadas en un soporte (DNA-chip de la invención) se lleva a cabo por métodos convencionales utilizando dispositivos convencionales. En una realización particular, la hibridación se lleva a cabo en una estación automática de hibridación. Para llevar a cabo la hibridación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con dichas sondas (DNA-chip de la invención) bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas. Unas condiciones de hibridación estables permiten establecer la hebra y la longitud apropiada de las sondas con el fin de maximizar la discriminación, tal como se menciona más adelante.

Como se ha mencionado previamente, si se desea, cuando dicho soporte es un soporte sólido, tras el proceso de hibridación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación, por ejemplo, mediante “primer extensión”, o, alternativamente, una reacción de ligación, por ejemplo, mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), al mismo tiempo que se realiza el marcaje de los oligonucleótidos depositados en el soporte. El marcaje de dichos oligonucleótidos puede ser un marcaje directo utilizando, por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos, etc. o indirecto utilizando, por ejemplo, pares de unión específica que incorporan fluoróforos, enzimas, etc., mediante métodos convencionales, tal como se ha mencionado previamente en relación con el marcaje de los productos de amplificación o de fragmentación.

En caso de que se desee llevar a cabo una reacción de amplificación post-hibridación utilizando, por ejemplo, la metodología “primer extensión”, tras la hibridación, se lleva a cabo una reacción de extensión (amplificación) de los oligonucleótidos hibridados sobre el soporte (portaobjetos de cristal). La extensión, con nucleótidos marcados o a través de un marcaje indirecto, sólo se producirá si el extremo 3' del oligonucleótido hibrida perfectamente con el producto de amplificación.

Asimismo, en caso de que se desee realizar una reacción de ligación post-hibridación utilizando, por ejemplo, la metodología “OLA”, tras la hibridación, se lleva a cabo una reacción de ligación de los oligonucleótidos hibridados sobre el soporte (portaobjetos de cristal) con los oligonucleótidos marcados diseñados para hibridar de forma adyacente. La ligación sólo se producirá si el extremo 3' de la sonda depositada sobre el soporte hibrida perfectamente con el producto de amplificación.

Finalizado el proceso de hibridación, o, en su caso, dichas reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, se procede a la captura de la imagen y a su cuantificación. Para ello, la imagen del DNA-chip hibridado y revelado es recogida con un dispositivo apropiado, por ejemplo, un escáner, procediéndose, a continuación, a cuantificar los valores absolutos de fluorescencia de cada sonda así como del ruido de fondo. Por tanto, en una realización particular, tras la hibridación, o tras las reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, el DNA-chip hibridado y revelado se introduce en un escáner donde es sometido a un escaneado para cuantificar la intensidad del marcaje en los puntos donde se ha producido la hibridación. Aunque prácticamente cualquier escáner puede ser utilizado, en una realización particular, dicho escáner es un escáner de fluorescencia confocal. En este caso, el DNA-chip se introduce en el escáner y se escanea la señal emitida por el marcaje al ser excitado por un láser, cuantificándose la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación. En una realización particular, dicho escáner es un escáner de luz blanca.

ES 2 326 708 B1

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de escáneres que pueden ser utilizados según la presente invención son escáneres de Axon, Agilent, Perkin Elmer, etc.

A continuación se procede al análisis de los datos y a su interpretación, lo que se lleva a cabo mediante el empleo del software de genotipado y algoritmo desarrollado por los inventores.

El análisis de los datos y su interpretación se lleva cabo, en general, mediante el empleo de programas informáticos (software); sin embargo, no todos los programas son apropiados requiriéndose programas que mejoren la calidad de la información obtenida. Los inventores han desarrollado un método secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por los DNA-chips de la invención que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método de la invención, en base a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles, tal como se describe a continuación. El algoritmo y software informático desarrollado por los inventores permite facilitar y automatizar la aplicación del método de la invención.

La ejecución del algoritmo y software informático desarrollado por los inventores para procesar secuencialmente e interpretar los datos experimentales generados por los DNA-chips de la invención comprende la realización de serie de etapas para caracterizar cada uno de las variaciones génicas de interés, concretamente:

- en primer lugar, a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas se les resta su propio ruido de fondo;
- a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada una de las 4 sondas utilizadas para caracterizar cada variación génica;
- el valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes;
- conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas, se calcula el ratio 1 y el ratio 2, en donde

Ratio 1 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación génica A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación génica A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 2 que detecta la variación génica B y puede calcularse mediante la ecuación:

$$\text{Ratio 1} = \frac{\text{Intensidad media sonda 1}}{\text{Intensidad media sonda 1} + \text{Intensidad media sonda 2}}$$

Ratio 2 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación génica A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación génica A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 4 que detecta la variación génica B y puede calcularse mediante la ecuación:

$$\text{Ratio 2} = \frac{\text{Intensidad media sonda 3}}{\text{Intensidad media sonda 3} + \text{Intensidad media sonda 4}}$$

- dichos ratios (ratio 1 y ratio 2) se sustituyen en tres funciones lineales, que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

AB Función 2

BB Función 3

en donde

AA representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación génica A;

AB representa el genotipo de un sujeto heterocigoto para las variaciones génicas A y B;

BB representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación génica B;

Función 1 es la Función Lineal que caracteriza a los pacientes con el genotipo AA y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

ES 2 326 708 B1

Función 2 es la Función Lineal para el genotipo AB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

Función 3 es la Función Lineal para el genotipo BB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

en donde las combinaciones lineales están formadas por constantes y cofactores que acompañan a las variables ratio 1 y ratio 2; y

- la función que presente un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el paciente para la variación génica analizada.

Las tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos se corresponden con las tres combinaciones lineales de los ratios 1 y 2 que maximizan la discriminación entre un grupo de sujetos homocigotos AA, heterocigotos AB y homocigotos BB mediante el cálculo de sus correspondientes ratios 1 y 2. El número mínimo de sujetos para calcular unas funciones fiables es 5. Por tanto, en una realización particular, la obtención de dichas funciones se lleva a cabo mediante el análisis de un mínimo de 5 pacientes por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica (AA, AB, BB). Con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 pacientes. Estos ratios sirven como variables de clasificación de los tres grupos para generar las funciones lineales. Con estas tres funciones lineales se evalúa la capacidad discriminativa de las dos parejas de sondas diseñadas. En caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, las sondas serían rediseñadas. Nuevos pacientes caracterizados para cada uno de los tres genotipos constituyen nuevos ratios 1 y 2 para perfeccionar las combinaciones lineales de los mismos que constituyen las funciones lineales y, en definitiva, mejorar la capacidad discriminativa del algoritmo basado en estas tres funciones.

En una realización particular en la que el escáner utilizado es un escáner de fluorescencia confocal, siempre que (i) los ratios 1 y 2 se encuentren dentro del rango de los ratios usados para construir las funciones lineales, (ii) la intensidad de fluorescencia media de las 4n réplicas (donde “n” es el número de réplicas de cada sonda, es decir 6, 8 ó 10), por ejemplo, 40 réplicas con respecto al ruido de fondo sea mayor de 5 y (iii) el coeficiente de variación de las réplicas esté por debajo de 0,25, el resultado clasificatorio de las funciones lineales se considera correcto. Las 3 funciones lineales para cada genotipo se construyen a partir de los 15 ratios 1 y 15 ratios 2 obtenidos del análisis con el DNA-chip de 5 pacientes (en una realización particular) por genotipo (5 AA, 5 AB y 5 BB); al analizar un nuevo paciente, se calcularán los ratios 1 y 2 y se sustituirán dichos ratios en las funciones; la función de mayor valor absoluto determina el genotipo. Además, los ratios 1 y 2 del nuevo paciente, por ejemplo AA, deben estar incluidos en los 5 ratios 1 y 2 que permitieron construir la función lineal que determina el grupo AA (se trata, pues, de una doble comprobación).

Asimismo, cuando se utiliza un escáner de fluorescencia confocal, para dar por buena una hibridación completa es necesario que (a) la relación intensidad frente a ruido de fondo de todas las sondas del DNA-chip esté por encima de 15; (b) la media de todos los ratios debe superar 0,6 como control de especificidad y sensibilidad; (c) el coeficiente de variación de todas las réplicas debe ser inferior a 0,25; (d) el ratio del control externo debe estar por encima de 0,6 y (e) el control negativo nunca debe ser superior a 3 veces el ruido de fondo. Todas las condiciones (a)-(e) deben ser cumplidas simultáneamente para dar por buena la hibridación completa utilizando un escáner de fluorescencia confocal.

Por tanto, según la invención, el genotipado de cada una de las variaciones génicas se lleva a cabo a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica, en la que se eliminan los valores extremos (“outliers”); en una realización particular, dichos valores extremos eliminados constituyen entre el 10% y el 50% de los valores obtenidos. Asimismo, el algoritmo desarrollado por los inventores para el genotipado de cada una de dichas variaciones génicas sujetas a estudio permite detectar cada una de las variaciones génicas en base a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles (AA, AB y BB). Dicho algoritmo comprende una secuencia con los siguientes pasos: utilización de 4 sondas replicadas 6, 8 ó 10 veces; cálculo de la media acotada para calcular la intensidad media de las réplicas; cálculo de los ratios 1 y 2 correspondientes a las 2 parejas de sondas (para la detección de las variaciones génicas A y B); sustitución de los ratios 1 y 2 obtenidos en las ecuaciones lineales obtenidas a partir de los ratios 1 y 2 que discriminaron los “n” pacientes control con genotipo AA, los “n” pacientes control con genotipo AB y los “n” pacientes control con genotipo BB de cada variación génica (en una realización particular “n” es 5); y determinar el genotipo de cada paciente para cada variación génica incluida en el DNA-chip en base al mayor valor absoluto. Por último se comprueba que los ratios se corresponden con los ratios de los “n” pacientes control que determinan cada genotipo. Se han probado otros análisis como por ejemplo, no usar réplicas, no calcular la media acotada, agrupar las réplicas, etc. y se ha observado que no funciona, tener en cuenta sólo los ratios hace que el análisis informático sea más lento, sin embargo, las funciones agilizan el análisis y permiten discriminar más y mejor.

El método de la invención constituye, por tanto, un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo, sensible, específico y reproducible de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto. El método de la invención permite identificar cambios de nucleótidos, inserciones, duplicaciones, deleciones, etc. y determinar el genotipo de un sujeto para una variación génica dada.

Para la puesta en práctica del método de la invención se han desarrollado unos DNA-chips de genotipado útiles para detectar variaciones génicas, cuyas características se mencionan más adelante.

5 *DNA-chips de genotipado*

La utilización clínica del método de la invención en la detección de variaciones génicas humanas asociadas a enfermedades o a antígenos de interés requiere la validación previa de los DNA-chips de genotipado utilizados en la puesta en práctica del método de la invención, los cuales presentan un diseño característico.

10

En general, un DNA-chip de genotipado adecuado para la puesta en práctica del método de la invención, en adelante DNA-chip de la invención, comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas útiles para detectar variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes, en donde, por cada variación génica, hay 4 sondas, de las cuales 2 sondas detectan una primera variación génica y las otras 2 detectan una segunda variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas y las dos sondas no tienen porqué ser iguales. Dichas sondas están depositadas siguiendo un patrón determinado y distribuidas homogéneamente entre las 2 áreas que constituyen el DNA-chip pero no agrupadas por variación génica a detectar, es decir, que están distribuidas a lo largo y ancho del chip y además no agrupadas dentro de una misma variación génica.

15

El DNA-chip de la invención también puede contener, si se desea, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de amplificación y/o hibridación.

20

Sondas

25

Diseño de las sondas

Con el fin de disminuir al máximo la tasa de falsos positivos y negativos se diseñan dos parejas de sondas para detectar cada variación génica. Cada pareja de sondas está constituida por una sonda específica para la detección de una variación génica (e.g., el alelo normal) y por otra sonda diseñada para la detección de otra variación génica (e.g., el alelo mutante). En el caso de mutaciones puntuales, la base que difiere entre el alelo normal y el mutante (base a interrogar) se coloca en la posición central de la sonda, lo que asegura la máxima especificidad en la hibridación. En el caso de inserciones, duplicaciones o deleciones son varias las bases que se pueden interrogar. Sin embargo, el diseño se hace completamente equivalente considerando como posición central el primer nucleótido que es diferente en la secuencia normal con respecto a la secuencia mutada.

30

35

La capacidad de las sondas específicas de variaciones génicas para discriminar entre las variaciones génicas (e.g., el alelo normal y el alelo mutante) depende de las condiciones de hibridación, de la secuencia que flanquea a la mutación y de la estructura secundaria de la secuencia en la que se quiere detectar la mutación. Unas condiciones de hibridación estables permiten establecer la hebra y la longitud apropiada de las sondas con el fin de maximizar la discriminación. Partiendo de sondas de 25 nucleótidos que detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y otra variación génica (e.g., el alelo mutante) en ambas hebras (hebra sentido y hebra antisentido), se requiere, en general, una media de 8 sondas ensayadas experimentalmente para quedarse con las dos parejas definitivas.

40

En una realización particular, para cada variación génica a detectar mediante el DNA-chip de la invención, las sondas diseñadas interrogan ambas hebras, con longitudes típicamente comprendidas entre 19 y 27 nucleótidos, y la temperatura de hibridación varía entre 75°C y 85°C.

45

En caso de que el método de la invención incluye el empleo de la metodología “primer extensión” u “OLA”, se diseñan igualmente 4 sondas, 2 de dichas sondas detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y las otras 2 sondas detectan la otra variación génica (e.g., el alelo mutante). En este caso, la base interrogada no se coloca en la posición central sino en la posición 3’ de la sonda. En el caso de la metodología “OLA”, se diseñan unos oligonucleótidos marcados directa o indirectamente que hibridan a continuación de las sondas depositadas en el soporte sólido para permitir la reacción de ligación.

50

55

Dado que el método de la invención puede ser utilizado para la detección de variaciones génicas humanas asociados a enfermedades o antígenos de interés, la naturaleza de las sondas presentes en el DNA-chip de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo ya que, en cada caso, se pueden seleccionar las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar; Por ejemplo, dichas sondas pueden ser unas sondas útiles para la detección de variaciones génicas asociadas a diversas enfermedades, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), así como para la detección de variaciones génicas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos y a reacciones adversas a fármacos. En las Tablas 1-3 se incluye una relación de variaciones génicas asociadas a IBD, a antígenos eritrocitarios humanos y a reacciones adversas a fármacos, respectivamente; no obstante, se pueden ir incorporando en los DNA-chips de la invención sondas que permitan la identificación de otras variaciones génicas asociadas con dichas enfermedades o con el reconocimiento de antígenos de interés a medida que se vayan identificando.

60

65

Disposición de las sondas en el soporte

Según la invención, se usan 4 sondas (es decir, 2 parejas de sondas) por cada variación génica a detectar que se depositan sobre el soporte sólido siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar. Dos de dichas sondas detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y las otras dos sondas detectan otra variación génica (e.g., el alelo mutante). El número de réplicas de cada una de dichas sondas en el DNA-chip de la invención es de 10, 8 ó 6 réplicas. En una realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 10 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica; en otra realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 8 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica; y, en otra realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 6 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica.

La disposición (colocación) de las sondas en el soporte está predeterminada. En una realización particular, las sondas depositadas en el soporte, aunque mantienen una disposición predeterminada, no están agrupadas por variación génica sino que tienen una distribución al azar, la cual, si se desea, puede ser siempre la misma.

Controles

El DNA-chip de la invención también puede contener, si se desea, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de amplificación y/o hibridación.

En una realización particular, el DNA-chip de la invención comprende unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de hibridación. En general, cada uno de los subarrays, típicamente 16, que constituyen un DNA-chip, está flanqueado por unos controles externos de hibridación que permiten localizar fácilmente los puntos sobre el soporte. Aunque con la misma secuencia, el DNA-chip dispone de dos controles externos de hibridación marcados, por ejemplo, con un fluoróforo (e.g., Cy3, Cy5, etc.), que sirven para evaluar la calidad de la hibridación en ambos canales. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del control externo es la siguiente (5'→3'):

CEH: GTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGAGTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGA

y las secuencias de los oligonucleótidos para su detección son las siguientes:

ON1: CTTGACGACTCCTGAACGG

ON2: CTTGACGACACCTGAACGG

Soporte

El soporte sobre el que están depositadas la pluralidad de sondas puede ser cualquier superficie sólida sobre la que se puedan unir oligonucleótidos. Prácticamente cualquier soporte sobre el que pueda unirse o inmovilizarse un oligonucleótido, utilizado en la producción de DNA-chips, puede ser utilizado para la puesta en práctica de esta invención. A modo ilustrativo, dicho soporte puede ser un soporte no poroso, por ejemplo, un soporte de cristal, silicio, plástico, etc., o bien un soporte poroso, por ejemplo, membranas (nylon, nitrocelulosa, etc.), micropartículas, etc. En una realización particular, dicho soporte es un portaobjetos (porta) de cristal.

Unión de las sondas al soporte

Las sondas se inmovilizan (unen) sobre el soporte utilizando técnicas convencionales de inmovilización de oligonucleótidos sobre la superficie de los soportes. Dichas técnicas dependen, entre otros factores, de la naturaleza del soporte utilizado [porosa (membranas, micropartículas, etc.) o no porosa (cristal, plástico, silicio, etc.)]. En general, las sondas pueden inmovilizarse sobre el soporte mediante el empleo de técnicas de inmovilización no covalentes o bien mediante el empleo de técnicas de inmovilización basadas en la unión covalente de las sondas a la superficie del soporte mediante procedimientos químicos.

La preparación de soportes no porosos (e.g., cristal, silicio, plástico, etc.) requiere, en general, un tratamiento previo con grupos reactivos (e.g., amino, aldehído, etc.) o bien recubrir la superficie del soporte con un miembro de un par de unión específica (e.g., avidina, estreptavidina, etc.). Asimismo, en general, resulta conveniente activar previamente las sondas a inmovilizar mediante grupos tiol, amino, etc., o biotina, etc., con el fin de conseguir una inmovilización específica de las sondas sobre el soporte.

La inmovilización de las sondas en el soporte puede llevarse a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas basadas en la síntesis *in situ* de las sondas sobre el propio soporte (e.g., fotolitografía, síntesis química directa, etc.), o mediante técnicas basadas en el empleo de brazos robotizados que depositan la sonda correspondiente presintetizada (impresión sin contacto, impresión por contacto, etc.), etc..

La disposición (colocación) de las sondas en el soporte está predeterminada. En una realización particular, las sondas depositadas en el soporte sólido, aunque mantienen una disposición predeterminada, no están agrupadas por variación génica sino que tienen una distribución al azar, la cual, si se desea, puede ser siempre la misma.

5 En una realización particular, el soporte es un portaobjetos de cristal, y, en este caso, las sondas, en el número de réplicas establecido (6, 8 ó 10), se imprimen en portas de cristal previamente tratados, por ejemplo, aminosilanizados, usando un equipo de producción automática de DNA-chips por deposición de los oligonucleótidos en el portaobje-
10 tos de cristal ("microarrayer") bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado (80°C), manteniendo controlada la humedad y temperatura durante el proceso de deposición, típicamente entre 40-50% de humedad relativa y 20°C de temperatura.

Las réplicas (sondas) se distribuyen en las placas de impresión, que contienen los oligonucleótidos en solución, de forma que las impriman un número de puntas distintas igual a la mitad de las réplicas. Las réplicas se distribuyen homogéneamente entre las áreas o sectores (sub-arrays) que constituyen el DNA-chip. El número de réplicas así como
15 su homogénea distribución a lo largo y ancho del DNA-chip minimizan la variabilidad experimental proveniente de los procesos de impresión e hibridación. Asimismo, se imprimen controles positivos y negativos de hibridación. En general, cada uno de los sub-arrays que constituyen el DNA-chip está flanqueado por unos controles externos de hibridación que permiten localizar fácilmente los puntos sobre el soporte. Aunque con la misma secuencia, el DNA-chip dispone de dos controles externos de hibridación marcados, por ejemplo, con un fluoróforo (e.g., Cy3, Cy5, etc.),
20 que sirven para evaluar la calidad de la hibridación en ambos canales. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del control externo es la identificada previamente como "CEH" y las secuencias de los oligonucleótidos para su detección son las identificadas previamente como ON1 y ON2.

Para controlar la calidad del proceso de fabricación del DNA-chip en términos de señal de hibridación, ruido de
25 fondo, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad de cada réplica (coeficiente de variación) así como del tamaño y forma de los puntos impresos (sondas) se puede utilizar un DNA comercial. A modo ilustrativo, como control de calidad de la impresión de los DNA-chips de la invención, se lleva a cabo la hibridación con un DNA comercial (e.g., k562 DNA High Molecular Weight, Promega) de uno de cada un número determinado de soportes cargados con las sondas, por ejemplo, cada 20 soportes impresos. En primer lugar, se analiza la forma y tamaño de los puntos
30 impresos. En esta hibridación se controlan los mismos parámetros que se han explicado previamente para aceptar un genotipado con el DNA-chip de la invención en cuanto a la relación entre la intensidad y el ruido de fondo del DNA-chip, especificidad - sensibilidad media y reproducibilidad de las réplicas (coeficiente de variación). Asimismo se comprueba el correcto genotipado de ese DNA control.

35 Los DNA-chips de la invención pueden ser utilizados, en combinación con el método de la invención, para detectar prácticamente cualquier variación génica humana de interés, por ejemplo, variaciones génicas humanas asociadas a enfermedades o antígenos de interés, tales como variaciones génicas humanas asociadas a IBD, variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios, o variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos, para lo cual se utilizarán las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar. Una ventaja de los DNA-chips de la
40 invención radica en que pueden incorporar sondas que permitan la identificación de otras variaciones génicas asociadas con dichas enfermedades o con el reconocimiento de antígenos de interés a medida que se vayan identificando tales variaciones génicas; para ello, se deberán diseñar las sondas y los DNA-chips de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, tal como se ha mencionado previamente.

45 Los inventores han diseñado, producido y validado la utilización clínica del método de la invención en la detección de variaciones génicas asociadas a IBD, así como en la detección de variaciones génicas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos y a reacciones adversas a fármacos mediante el desarrollo (diseño y producción) de los DNA-chips correspondientes.

50 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas asociadas a IBD que pueden ser identificados se recogen en la Tabla 1; no obstante, la relación de variaciones génicas contenida en dicha tabla puede incrementarse con otras variaciones génicas que vayan identificándose posteriormente y que estén asociadas a IBD;

55 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios que pueden ser identificados se recogen en la Tabla 2; no obstante, la relación de variaciones génicas contenida en dicha tabla puede incrementarse con otras variaciones génicas que vayan identificándose posteriormente y que estén asociadas a antígenos eritrocitarios.

60 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos que pueden ser identificados se recogen en la Tabla 3; no obstante, la relación de variaciones génicas contenida en dicha tabla puede incrementarse con otras variaciones génicas que vayan identificándose posteriormente y que estén asociadas a reacciones adversas a fármacos.

ES 2 326 708 B1

TABLA 1

Variaciones génicas asociadas a IBD

5	el polimorfismo G2677T/A/C Ala893Ser,Thr/Pro del gen Multidrug resistance protein (MDR1);
	el polimorfismo C3435T del gen Multidrug resistance protein (MDR1);
10	los polimorfismos R702W, G908R, 1007insC en el gen CARD15;
	el polimorfismo T612C Y113H en el gen Microsomal epoxide hydrolase (EPXH1);
	el polimorfismo -(-2518)G/A del gen Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1);
15	los polimorfismos (-1082) G/A y G15R G43A en el gen Interleucina 10 (IL10);
	el polimorfismo (-295)T/C en el gen Interleucina 16 (IL16);
20	el polimorfismo (-843)C/T en el gen Fas ligando;
	los polimorfismos 94delATTG y -263A/G en el gen Nuclear factor kappa-B (NFKB1);
	polimorfismo en 3'UTR (G/A) del gen Nuclear factor kappa-B inhibitor alpha: (NFKBIA);
25	el polimorfismo G2964A en el gen Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6);
	el polimorfismo TCA/TCC del codón 35 en el gen Interleucina 18 (IL18);
30	los polimorfismos E474E, Q476Q, D510D, P588P, -177A/G, A165A, R202Q en el gen Mediterranean fever gene (MEFV);
	el polimorfismo 113G/A (R30Q) en el gen Discs, large homolog 5 (DLG5);
	el polimorfismo A2033T en el gen Colony stimulating factor receptor 1 (CSFR1);
35	el polimorfismo 1672C/T (L503F) en el gen Organic cation transporter (OCTN1, SLC22A4);
	el polimorfismo (-207G/C) en el gen Organic cation transporter (OCTN2, SLC22A5);
40	los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile en el gen Toll-like receptor 4 (TLR4);
	los polimorfismos (-511)A/C y 3954 TaqI RFLP en el gen Interleucina 1 beta (IL1 β);
	el polimorfismo Ala16Val en el gen Superoxide dismutase 2 (SOD2);
45	el polimorfismo Pro12Ala en el gen Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG);
	los polimorfismos K469E, R241G en el gen Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1);
	los polimorfismos IGR2060a_1, IGR2198a_1, IGR3096a_1 en el locus IBD5;
50	el polimorfismo 1267A/G (Gln351 Gln) en el gen Heat shock protein 70 (HSP70-2);
	el polimorfismo 1237C/T en el gen Toll-like receptor 9 (TLR9);
	el polimorfismo C677T V222A en el gen Methylenetetrahydrofolate reductase (MTFHR);
55	los polimorfismos (-590)C/T, (-34)C/T en el gen Interleucina 4 (IL4);
	los polimorfismos Gly54Asp (A/G), Gly57Glu (A/G), Arg52Cys (C/T) en el gen Mannan-binding lectin (MBL);
60	el polimorfismo (-6) A/T en el gen Angiotensinogen precursor (AGT);
	el polimorfismo 4G/5G en el gen Plasminogen activator inhibitor (PAI);
	los polimorfismos (-857C/T), (-308G/A), (-238 G/A) en el gen Tumor necrosis factor alpha (TNF α);
65	los polimorfismos G238C, G460A, A719G en el gen TPMT;

ES 2 326 708 B1

TABLA 1 (continuación)

los polimorfismos Trp14Gly, Thr24Ala, Met129Val, Lys173Glu, Gly175Ser del gen MICA que discriminan a los alelos MICA*007 y MICA*008;

el polimorfismo de la región promotora (-377 a -222) característico del alelo 7 del gen SLC11A1=NRAMP1;

el polimorfismo (-159)T/C del gen CD14;

el polimorfismo G4985T (Val158Phe) del gen CD16A=FCGR3A;

el polimorfismo -25385C/T del gen NR1I2;

el polimorfismo (T/A) Cys10Stop del gen TUCAN/CARD8/CARDINAL;

el polimorfismo 738T/C Cys224Arg del gen IKBL;

los polimorfismos G593A y T620C del gen TNFRSF1 B=TNFR2;

el polimorfismo Asp643Asn del gen MEKK1;

los polimorfismos 159G/A/C y 282C/T del gen HLA-DQ para la identificación de los alelos DQB1*0401 y DQB1*0402;

los polimorfismos 109T/C, 119T/C/G/A, 122A/C/G/T, 129A/G, 161G/A/T, 175A/T/C/G, 184A/C/delA, 286C/A/T, 305C/G para la identificación de alelos DR2, DR9, DRB1*0103, DR4, DR7, DRB3*0301 y DR3 del gen HLA-DRB1;

los polimorfismos 2018T/C y 2073C/T del gen IL1RN; y

el polimorfismo 3954 C/T (TAQI) del gen ILR1B

TABLA 2

Variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios

el polimorfismo GG87_88insG (Genotipo O4) (BC008) en el exón 2 del gen ABO,

el polimorfismo G188A+C189T (Genotipo O1v) (BC012) en el exón 4 del gen ABO,

los polimorfismos 261delG (Genotipo O1/O1v) (BC001), C322T (Genotipo O5) (BC009) en el exón 6 del gen ABO,

los polimorfismos C467T (P156L) (Genotipo A2) (BC014), G542A (Genotipo O8) (BC013), T646A (Genotipo Ax/O1v) (BC015), G703A (Genotipo G235S) (B) (BC002), C796A (Genotipo L266M) (B) (BC003), G802A (Genotipo O2) (BC004), G803C (Genotipo G268A) (B, cisAB-1) (BC005), 798-804insG (Genotipo O3, Ael) (BC007), C893T (Genotipo O6) (BC010), C927A (Genotipo O7) (BC011), 1059-1061delC (D FS354+21aa) (Genotipo A2) (BC006) en el exón 7 del gen ABO,

los polimorfismos C8G (S3C) (Genotipo weak D type 3) (BC040), G48A (W16X) (Genotipo RHD W16X) (BC046), C121T (Q41X) (Genotipo RHD Q41X) (BC047) en el exón 1 del gen RHD,

los polimorfismos A178C, G203A, T307C (exon scanning) (BC016, BC017, BC018), T161C (L54P) (Genotipo DMH) (BC033), G270A (W90X) (Genotipo RHD W90X) (BC047), T329C (L110P) (Genotipo DVII) (BC028) en el exón 2 del gen RHD,

los polimorfismos C340T (Genotipo weak D type 17) (BC043), C410T (Genotipo DIIIiv) (BC059), C446A (A149D) (Genotipo weak D type 5) (BC041), A455C (Genotipo DIIIa, DIIIiv, DIVa) (BC060), IVS3+1G>A (Genotipo alelo negativo) (BC049) en el exón 3 del gen RHD,

los polimorfismos 488del4 (Genotipo alelo negativo) (BC050), A497C (H166P) (Genotipo DFW) (BC030), T509C (M170T) (Genotipo DOL) (BC027), A514T (Genotipo DFRI) (BC065), T544A, G577A, A594T (Genotipo DVI-I weak D type 4) (exon scanning), (BC019, BC020, BC021) en el exón 4 del gen RHD,

ES 2 326 708 B1

TABLA 2 (continuación)

5	los polimorfismos G635T (G212V) (Genotipo RHD G212V) (BC051), T667G (Genotipo DIIIa, weak D type 4, Dva, DAR, DOL, DCS) (BC061), G676C (Genotipo DCS, G686A (Genotipo DHR) (BC031), G697C (E233Q), (Genotipo G712A (M238V) (DVII, weak D type 4, DV, DCS) (BC022, BC023), A712G (genotipo alelo negativo) (BC023) en el exón 5 del gen RHD,
10	los polimorfismos T807G (Genotipo pseudogene) (BC044), T809G (Genotipo weak D type 1) (BC038), G845A (G282D) (Genotipo weak D type 15, DIM) (BC037), C848T (T2831) (Genotipo DHMI) (BC029), G854A (C285Y) (Genotipo DIM) (BC032), G885T (M295I) (Genotipo alelo negativo M295I) (BC053), 906insGGCT (Genotipo alelo negativo) (BC054), G916A, A932G (consenso exon scanningconsenso exon scanning) (BC062, BC063), IVS6+Idel4 (Genotipo alelo negativo) (BC055) en el exón 6 del gen RHD, polimorfismos G941T (G314V) (Genotipo alelo negativo) (BC056), C990G (Y330X) (Genotipo alelo negativo) (BC057), G1016A (G339E) (Genotipo weak D type 7) (BC042), T1025C (I342T) (exon scanning) (BC024), G1048C (Genotipo DIVa, DIVb) (BC094), G1057A (G353R) (Genotipo DNU) (BC034), C1061A (A354N) (Genotipo DII) (BC036), G1063A (G355S) (Genotipo DNB) (BC026), T1073C (Genotipo DWI) (BC035) en el exón 7 del gen RHD,
20	el polimorfismo IV8+1G>A (Genotipo alelo negativo) (BC058) en el exón 8 del gen RHD,
	los polimorfismos G1154C (G385A) (Genotipo weak D type 2) (BC039), A1193T (Genotipo DIVb) (BC064), G1227A (K409K) (Genotipo K409K) (BC045) en el exón 9 del gen RHD,
25	los polimorfismos G106A (A36T) (Genotipo Cx) (BC068), A122G (Q41R) (Genotipo Cw) (BC067) en el exón 1 del gen RHCE,
	el polimorfismo T307C (S103P) (Genotipo Rhc) (BC066) en el exón 2 del gen RHCE,
30	el polimorfismo C410T (A137V) (BC059) en el exón 3 del gen RHCE,
	los polimorfismos C676G (P226A) (Genotipo Ee) (BC025, BC069), C733G (L245V) (Genotipo VS) (BC070) en el exón 5 del gen RHCE,
35	el polimorfismo G1006T (G336C) (Genotipo VS-/VS+) (BC071) en el exón 7 del gen RHCE,
	los polimorfismos A697T (Genotipo Kk) (BC073), C698T (T193M) (Genotipo Kk) (BC072) en el exón 6 del gen KELL,
40	los polimorfismos T961C (R281W) (Genotipo KpaKpb) (BC074), G962A (R281Q) (Genotipo KpbKpc) (BC075) en el exón 8 del gen KELL,
	el polimorfismo G1208A (S363N) (Genotipo Kmod-1) (BC077) en el exón 10 del gen KELL,
	el polimorfismo C1910T (L597P) (Genotipo JsaJsb) (BC076) en el exón 17 del gen KELL,
45	el polimorfismo I5AG>AA (Genotipo Jknull) (BC079) en el exón 6 del gen SLC14A1 (grupo sanguíneo KIDD),
	los polimorfismos G838A (D280N) (Genotipo JkaJkb) (BC078), T871C (S291P) (Genotipo Jknull) (BC080) en el exón 9 del gen SLC14A1 (grupo sanguíneo KIDD),
50	los polimorfismos T-33C (Genotipo FyGATA) (BC082), G125A (D42G) (Genotipo FyaFyb) (BC081), C265T (R89C) (Genotipo Fyx) (BC083) en el gen DARC (grupo sanguíneo DUFFY),
	los polimorfismos C59T, G71 A, T72G (S20L, G42E, G42E) (Genotipo MN) (BC084, BC085) en el exón 2 del gen GYPA,
55	el polimorfismo T143C (M48T) (Genotipo Ss) (BC086) en el exón 4 del gen: GYPB,
	los polimorfismos C790A (Genotipo GpMUR Milll) (BC089), C850G (Genotipo GpMUR Milll) (BC090) en el exón 3 del gen GYPE,
60	los polimorfismos C230T (Genotipo U) (BC087), I5+5GT (Genotipo U) (BC088) en el exón 5 del gen GYPB,
	el polimorfismo T2561 C (P854L) (Genotipo DiaDib) (BC091) en el exón 19 del gen SLC4A1 (grupo sanguíneo DIEGO),
65	el polimorfismo A793G (Genotipo DoaDob) (BC092) en el exón 2 del gen DOMBROCK,
	el polimorfismo C134T (A45V) (Genotipo CoaCob) (BC093) en el exón 1 del gen COLTON.

ES 2 326 708 B1

TABLA 3

Variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos

- 5 el polimorfismo Arg389Gly en el Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1),
los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu en el Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2),
10 el polimorfismo Ser9Gly del Receptor dopaminérgico D3 (DRD3),
los polimorfismos His452Tyr y T102C del Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A),
el polimorfismo Val108Met de Catecol-O-metiltransferasa (COMT),
15 el polimorfismo Ile105Val de Glutation S transferasa clase 1 (GSTP1),
el polimorfismo Gly460Trp de Aducina 1 (ADD1),
el polimorfismo Arg399Gln de la Proteína de reparación de DNA XRCC1,
20 el polimorfismo Ile462Val del citocromo P450 1A1 (CYP1A1),
el polimorfismo A1166C del Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1),
el polimorfismo C-58T del receptor B2 de bradikina (BDKRB2),
25 el polimorfismo Met235Thr de Angiotensinógeno (AGT),
los polimorfismos C430T, A1075C, 818delA, T1076C y C1080G del citocromo P450 2C9 (CYP2C9),
30 los polimorfismos H324P, V136V, V11M, C882G, C1038T, G4180C, A1847G, C-1584G, C100T, 138insT, C1023T, G1659A, 1707T/del, G1758A/T, 1863ins9bp, 1973insG, 2539delAACT, 2549A/del, 2613delAGA, C2850T, G3183A, C3198G, T3277C, G4042A y 4125insGTGCCCACT del citocromo P450 2D6 (CYP2D6),
los polimorfismos A805T, G416A, A1196G y C792G del citocromo P450 2C8 (CYP2C8),
35 los polimorfismos T341C, C481T, A803G, C282T, G590A, G857A y G191A de N-acetiltransferasa 2 (NAT2),
los polimorfismos G636A, G681A, C680T, A1G, IVS5+2T>A, T358C, G431A y C1297T del citocromo P450 2C19 (CYP2C19),
40 el polimorfismo C2664T del receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B),
el polimorfismo C3435T de la glicoproteína P (ABCB1),
los polimorfismos A719G y G238C de Tiopurinmetiltransferasa (TPMT),
45 el polimorfismo C677T de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (TPMT),
los polimorfismos Asp70Gly y Ala539Thr de Butirilcolinesterasa (BCHE),
50 el polimorfismo A-392G del citocromo P450 3A4 (CYP3A4),
los polimorfismos A-163C, A-3860G, G3534A y C558A del citocromo P450 1A2 (CYP1A2),
los polimorfismos G14690A, C3699T, G19386A, T29753C y G6986A del citocromo P450 3A5 (CYP3A5),
55 el polimorfismo 44bp delección del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4),
el polimorfismo delAGA (alelo*B) de Glutation S-transferasa M3 (GSTM3),
el polimorfismo alelo nulo de Glutation S-transferasa M1 (GSTM1),
60 el polimorfismo alelo nulo de Glutation S-transferasa n1 (GSTT1),
los polimorfismos Cys112Arg y Arg158Cys de apolipoproteína E (APOE),
el polimorfismo G-308A de Tumor necrosis factor (TNF), y
65 el polimorfismo G-1082A de Interleukina 10 (IL10)

Las secuencias de todos los genes mencionados en las Tablas 1-3 son conocidas y están recogidas, entre otras, en las siguientes páginas webs: GeneBank (NCBI), GeneCard (Weizmann Institute of Sciences) y Snpper.chip.org (Innate Immunity PGA).

Kits

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la puesta en práctica del método de la invención, en adelante kit de la invención, que comprende:

- un DNA-chip de la invención que comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas que permiten la detección de variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes;
- un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método de la invención que comprende el empleo de un algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método; y, opcionalmente,
- un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación del método de la invención.

El kit de la invención puede contener, además, si se desea, unos controles positivos y negativos de la reacción de hibridación.

Las características del DNA-chip de la invención, método de la invención y algoritmo proporcionado por esta invención ya han sido descritas previamente.

El kit de la invención puede ser utilizado para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a enfermedades o antígenos de interés, y para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, para lo cual se seleccionarán las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas humanas asociadas con enfermedades incluyen las variaciones genéticas asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), tales como las variaciones génicas humanas seleccionadas del grupo de variaciones génicas mencionadas en la Tabla 1 y combinaciones de las mismas.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas humanas asociadas con antígenos de interés incluyen las variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos, tales como las variaciones génicas humanas seleccionadas del grupo de variaciones génicas mencionadas en la Tabla 2 y combinaciones de las mismas.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas humanas asociadas con reacciones adversas a fármacos incluyen las variaciones génicas humanas seleccionadas del grupo de variaciones génicas mencionadas en la Tabla 3 y combinaciones de las mismas.

Oligonucleótidos cebadores

Como se ha indicado previamente, para la validación del método de la invención, se han diseñado y validado unos oligonucleótidos cebadores capaces de amplificar, mediante PCR multiplex, las regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas humanas asociadas, por ejemplo, a IBD, o a reacciones adversas a fármacos cuyas secuencias corresponden a:

- SEQ ID NO: 1-124 (en el Ejemplo 3 se indican las parejas de oligonucleótidos cebadores que amplifican las regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas humanas asociadas a IBD a amplificar)
- SEQ ID NO: 125-254 (en el Ejemplo 5 se indican las parejas de oligonucleótidos cebadores que amplifican las regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos a amplificar).

Dichos oligonucleótidos cebadores presentan la ventaja de que permiten la amplificación específica de dichas regiones DNA diana en un número de reacciones PCR muy bajo, concretamente:

- en el caso de la detección de variaciones génicas asociadas a IBD se amplifican, en tan sólo 3 reacciones de PCR multiplex, los 42 fragmentos necesarios para el genotipado de las 77 variaciones génicas que se analizan en el DNA-chip de la invención para la detección de variaciones génicas asociadas a IBD indicadas en el Ejemplo 3;

- en el caso del DNA-chip que permite la detección de variaciones génicas asociadas a las reacciones adversas a fármacos se amplifican, en tan sólo 4 reacciones de PCR multiplex, los 65 fragmentos necesarios para el genotipado de las 89 variaciones génicas que se analizan en el DNA-chip de la invención para la detección de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos indicadas en el Ejemplo 5.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Detección de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos, utilizando un DNA-chip, para la identificación de grupos sanguíneos humanos

1.1 Diseño del DNA-chip para genotipado de grupos sanguíneos

Se diseñó y fabricó un DNA-chip para detectar variaciones génicas humanas asociadas a algunos antígenos eritrocitarios que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos. Ejemplos ilustrativos de dichas variaciones génicas humanas asociados a antígenos eritrocitarios humanos que pueden ser determinados utilizando este DNA-chip se mencionan en la Tabla 2.

En este caso concreto, el DNA-chip diseñado y fabricado consta de un soporte (portaobjetos de cristal) que contiene sobre su superficie una pluralidad de sondas que permiten la detección de las variaciones génicas mencionadas anteriormente. Estas sondas son capaces de hibridar con las secuencias diana amplificadas de los genes que codifican los antígenos eritrocitarios cuya variación génica se desea estudiar. Las secuencias de DNA de cada una de las sondas utilizadas son las siguientes [en general, se indica el nombre del gen, la mutación (cambio de nucleótido, "ins": inserción, "del": delección), el genotipo y el exón).

ABO G261delG GENOTIPO: ABO O1/O1v [sondas para detectar el polimorfismo

G261delG (Genotipo ABO O1/O1v) en el exón 6 del gen ABO]

EXON 6

BC001OV01	CAGCCAAGGGGTACCACGAGGACA	25
BC001OV02	CCAGCCAAGGGGTACCACGAGGACA	25
BC001OV03	CCAGCCAAGGGGTACCACGAGGACAT	27
BC001OV04	GCCAGCCAAGGGGTACCACGAGGACAT	27

ABO G703A GENOTIPO: ABO B

EXON 7

BC002OV01	ACCCTGCACCCCGGCTTCTACGGAA	25
BC002OV02	ACCCTGCACCCAGCTTCTACGGAA	25
BC002OV03	CACCCTGCACCCCGGCTTCTACGGAAG	27
BC002OV04	CACCCTGCACCCAGCTTCTACGGAAG	27

ABO C796A GENOTIPO: ABO B**EXON7**

BC003OV01	AGAACCCCCCCCAGGTAGTAGAAATC	25
BC003OV02	AGAACCCCCCCCATGTAGTAGAAATC	25
BC003OV03	AAGAACCCCCCCCAGGTAGTAGAAATCG	27
BC003OV04	AAGAACCCCCCCCATGTAGTAGAAATCG	27

ABO G802A GENOTIPO: ABO O2**EXON7**

BC004OV01	CCCCGAAGAACCCCCCCCAGGTAGTA	25
BC004OV02	CCCCGAAGAACCTCCCCAGGTAGTA	25
BC004OV03	CCCGAAGAACCCCCCCCAGGTAGT	23
BC004OV04	CCCGAAGAACCTCCCCAGGTAGT	23

ABO G803C GENOTIPO: ABO B2,cisAB-1**EXON7**

BC005OV01	CCCCCGAAGAACCCCCCCCAGGTAGT	25
BC005OV02	CCCCCGAAGAACGCCCCCAGGTAGT	25
BC005OV03	ACCCCCGAAGAACCCCCCCCAGGTAGTA	27
BC005OV04	ACCCCCGAAGAACGCCCCCAGGTAGTA	27

ABO CCC1059-1061 GENOTIPO: ABO A2**EXON7**

BC006OV01	CGGTCCGGAACCCGTGAGCGGCTGC	25
BC006OV02	CGGTCCGGAACCGTGAGCGGCTGCC	25
BC006OV03	GCGGTCCGGAACCCGTGAGCGGCTGCC	27
BC006OV04	GCGGTCCGGAACCGTGAGCGGCTGCCA	27

ABO GGGGGGG G798_804insG GENOTIPO: ABO O3,Ael**EXON7**

ES 2 326 708 B1

BC007OV01	CCCCGAAGAACCCCCCCCAG	19
BC007OV02	CCCGAAGAACCCCCCCCAG	19
BC007OV03	CCCCCGAAGAACCCCCCCCAGG	21
BC007OV04	CCCCGAAGAACCCCCCCCAGG	21

ABO GG87_88insG GENOTIPO: ABO O4

EXON2

BC008OV01	TGCTTGTCTTGGTCTTGTGTTGGGTA	25
BC008OV02	TGCTTGTCTTGGGTCTTGTGTTGGGT	25
BC008OV03	GCTTGTCTTGGTCTTGTGTTGGGT	23
BC008OV04	GCTTGTCTTGGGTCTTGTGTTGGG	23

ABO C322T GENOTIPO: ABO O5

EXON6

BC009OV01	GGAGCCTGAACTGCTCGTTGAGGAT	25
BC009OV02	GGAGCCTGAACTACTCGTTGAGGAT	25
BC009OV03	TGGAGCCTGAACTGCTCGTTGAGGATG	27
BC009OV04	TGGAGCCTGAACTACTCGTTGAGGATG	27

ABO C893T GENOTIPO: ABO O6

EXON7

BC010OV01	TCGTGCCACACGGCCTCGATGCCGT	25
BC010OV02	TCGTGCCACACGACCTCGATGCCGT	25
BC010OV03	CGTGCCACACGGCCTCGATGCCG	23
BC010OV04	CGTGCCACACGACCTCGATGCCG	23

ABO C927A GENOTIPO: ABO O7

EXON7

BC011OV01	CCTGAACAAGTACCTGCTGCGCCAC	25
BC011OV02	CCTGAACAAGTAACTGCTGCGCCAC	25
BC011OV03	ACCTGAACAAGTACCTGCTGCGCCACA	27
BC011OV04	ACCTGAACAAGTAACTGCTGCGCCACA	27

ABO G188A/C189T GENOTIPO: ABO O1v

EXON4

BC012OV01	ACCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGCC	25
BC012OV02	ACCATCTGCAGCATGTCTCGTTGCC	25
BC012OV03	CCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGC	23
BC012OV04	CCATCTGCAGCATGTCTCGTTGC	23

ABO G542A GENOTIPO: ABO O8

EXON7

BC013OV01	GACACGTCCTGCCAGCGCTTGTAGG	25
BC013OV02	GACACGTCCTGCTAGCGCTTGTAGG	25
BC013OV03	ACACGTCCTGCCAGCGCTTGTAG	23
BC013OV04	ACACGTCCTGCTAGCGCTTGTAG	23

ABO C467T GENOTIPO: ABO A2

EXON7

BC014OV01	GGCACCGCGGCCGGCTGGTCGGTGA	25
BC014OV02	GGCACCGCGGCCAGCTGGTCGGTGA	25
BC014OV03	GGGCACCGCGGCCGGCTGGTCGGTGAA	27
BC014OV04	GGGCACCGCGGCCAGCTGGTCGGTGAA	27

ABO T646A GENOTIPO: ABO Ax /O1v

EXON7

BC015OV01	GTGGACATGGAGTTCCGCGACCACG	25
BC015OV02	GTGGACATGGAGATCCGCGACCACG	25
BC015OV03	CGTGGACATGGAGTTCCGCGACCACGT	27
BC015OV04	CGTGGACATGGAGATCCGCGACCACGT	27

RHD A178C GENOTIPO: RHD DIIb

EXON2

BC016OV01	GTGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCT	25
BC016OV02	GTGATGGCGGCCCTTGGCTTGGGCT	25
BC016OV03	TGATGGCGGCCATTGGCTTGGGC	23
BC016OV04	TGATGGCGGCCCTTGGCTTGGGC	23

RHD G203A GENOTIPO: RHD DIIb

EXON2

ES 2 326 708 B1

BC017OV01	TCCTCACCTCGAGTTTCCGGAGACA	25
BC017OV02	TCCTCACCTCGAATTTCCGGAGACA	25
BC017OV03	TTCCTCACCTCGAGTTTCCGGAGACAC	27
BC017OV04	TTCCTCACCTCGAATTTCCGGAGACAC	27

RHD T307C GENOTIPO: RHD DIIIb EXON2

BC018OV01	AGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGG	25
BC018OV02	AGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGG	25
BC018OV03	GAGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGGT	27
BC018OV04	GAGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGGT	27

RHD T544A GENOTIPO: RHD EXON SCANNING EXON4

BC019OV01	TATTTTGGGCTGTCTGTGGCCTGGT	25
BC019OV02	TATTTTGGGCTGACTGTGGCCTGGT	25
BC019OV03	TTTTGGGCTGTCTGTGGCCTG	21
BC019OV04	TTTTGGGCTGACTGTGGCCTG	21

RHD G577A GENOTIPO: RHD EXON SCANNING EXON4

BC020OV01	AGCCTCTACCCGAGGGAACGGAG	23
BC020OV02	AGCCTCTACCCAAGGGAACGGAG	23
BC020OV03	GCCTCTACCCGAGGGAACGGA	21
BC020OV04	GCCTCTACCCAAGGGAACGGA	21

RHD A594T GENOTIPO: RHD EXON SCANNING EXON4

BC021OV01	ACGGAGGATAAAGATCAGACAGC	23
BC021OV02	ACGGAGGATAATGATCAGACAGC	23
BC021OV03	CGGAGGATAAAGATCAGACAG	21
BC021OV04	CGGAGGATAATGATCAGACAG	21

RHD G697C GENOTIPO: RHD Dva(kou,to,yh,sm) EXON5

ES 2 326 708 B1

BC022OV01	AGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAATG	25
BC022OV02	AGAAGTCCAATCCAAAGGAAGAATG	25
BC022OV03	GAAGTCCAATCGAAAGGAAGAAT	23
BC022OV04	GAAGTCCAATCCAAAGGAAGAAT	23

RHD G712A GENOTIPO: RHD Dva(to,yh)
EXON5

BC023OV01	GGAAGAATGCCGTGTTCAACACC	23
BC023OV02	GGAAGAATGCCATGTTCAACACC	23
BC023OV03	GAAGAATGCCGTGTTCAACAC	21
BC023OV04	GAAGAATGCCATGTTCAACAC	21

RHD T1025C GENOTIPO: RHD DAR(weakDtype4.2)
EXON7

BC024OV01	TGGAGAGATCATCTACATTGTGC	23
BC024OV02	TGGAGAGATCACCTACATTGTGC	23
BC024OV03	GGAGAGATCATCTACATTGTG	21
BC024OV04	GGAGAGATCACCTACATTGTG	21

RHD G676C GENOTIPO: RHD DCS,Dva(kou,yh)
EXON5

BC025OV01	AGTTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAA	25
BC025OV02	AGTTTCAACTCTCCTCTGCTGAGAA	25
BC025OV03	AATTTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAG	27
BC025OV04	AAGTTTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAG	27

RHD G1063A GENOTIPO: RHD DNB
EXON7

BC026OV01	ACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGT	25
BC026OV02	ACCGTCGGAGCCAGCAATGGCATGT	25
BC026OV03	TACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGTG	27
BC026OV04	TACCGTCGGAGCCAGCAATGGCATGTG	27

RHD T509C GENOTIPO: RHD DFRI,DOL
EXON4

BC027OV01	ACATGAACATGATGCACATCTACGT	25
BC027OV02	ACATGAACATGACGCACATCTACGT	25
BC027OV03	CACATGAACATGATGCACATCTACGTG	27
BC027OV04	CACATGAACATGACGCACATCTACGTG	27

RHD T329C GENOTIPO: RHD DVII
EXON2

BC028OV01	TGGTCATCACACTGTTTCAGGTATTG	25
BC028OV02	TGGTCATCACACCGTTTCAGGTATTG	25
BC028OV03	GGTCATCACACTGTTTCAGGTATT	23
BC028OV04	GGTCATCACACCGTTTCAGGTATT	23

RHD C848T GENOTIPO: RHD DHMI
EXON6

BC029OV01	GCTGTGGGTACCTCGTGTCAC	21
BC029OV02	GCTGTGGGTATCTCGTGTCAC	21
BC029OV03	GGCTGTGGGTACCTCGTGTCACC	23
BC029OV04	GGCTGTGGGTATCTCGTGTCACC	23

RHD A497C GENOTIPO: RHD DFW
EXON4

BC030OV01	AGACAGACTACCACATGAACATGAT	25
BC030OV02	AGACAGACTACCCCATGAACATGAT	25
BC030OV03	GACAGACTACCACATGAACATGA	23
BC030OV04	GACAGACTACCCCATGAACATGA	23

RHD G686A GENOTIPO: RHD DHR
EXON5

BC031OV01	CTGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCGA	25
BC031OV02	CTGCTCTGCTGAAAAGTCCAATCGA	25
BC031OV03	TGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCG	23
BC031OV04	TGCTCTGCTGAAAAGTCCAATCG	23

RHD G854A GENOTIPO: RHD DIM
EXON6

ES 2 326 708 B1

BC032OV01	TGGGTACCTCGTGTACCTGATCCC	25
BC032OV02	TGGGTACCTCGTATCACCTGATCCC	25
BC032OV03	GGGTACCTCGTGTACCTGATCC	23
BC032OV04	GGGTACCTCGTATCACCTGATCC	23

RHD T161C GENOTIPO: RHD DMH
EXON2

BC033OV01	TTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGC	25
BC033OV02	TTGGCCAAGATCCGACCGTGATGGC	25
BC033OV03	GTTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGCG	27
BC033OV04	GTTGGCCAAGATCCGACCGTGATGGCG	27

RHD G1057A GENOTIPO: RHD DNU
EXON7

BC034OV01	CTTGATACCGTCGGAGCCGGCAATG	25
BC034OV02	CTTGATACCGTCAGAGCCGGCAATG	25
BC034OV03	GCTTGATACCGTCGGAGCCGGCAATGG	27
BC034OV04	GCTTGATACCGTCAGAGCCGGCAATGG	27

RHD T1073C GENOTIPO: RHD DWI
EXON7

BC035OV01	CCGGCAATGGCATGTGGGTCACTGG	25
BC035OV02	CCGGCAATGGCACGTGGGTCACTGG	25
BC035OV03	CGGCAATGGCATGTGGGTCACTG	23
BC035OV04	CGGCAATGGCACGTGGGTCACTG	23

RHD C1061A GENOTIPO: RHD DII, DIV IV
EXON7

BC036OV01	ATACCGTCGGAGCCGGCAATGGCAT	25
BC036OV02	ATACCGTCGGAGACGGCAATGGCAT	25
BC036OV03	GCCGGCAATGGCATGTGGGTCACTGGG	27
BC036OV04	GCCGGCAATGGCACGTGGGTCACTGGG	27

RHD G845A GENOTIPO: RHD weak D type 15
EXON6

BC037OV01	GCGTGGCTGTGGGTACCTCGTGTCA	25
BC037OV02	GCGTGGCTGTGGATACCTCGTGTCA	25
BC037OV03	GATACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATG	27
BC037OV04	GATACCGTCGGAGACGGCAATGGCATG	27

RHD T809G GENOTIPO: RHD weak D type 1,psi
EXON6

BC038OV01	TGCAGACTTATGTGCACAGTGCGGT	25
BC038OV02	TGCAGACTTATGGGCACAGTGCGGT	25
BC038OV03	GCAGACTTATGTGCACAGTGCGG	23
BC038OV04	GCAGACTTATGGGCACAGTGCGG	23

RHD G1154C GENOTIPO: RHD weak D type 2
EXON9

BC039OV01	GCATTTAAACAGGTTTGCTCCTAAA	25
BC039OV02	GCATTTAAACAGCTTTGCTCCTAAA	25
BC039OV03	TGCATTTAAACAGGTTTGCTCCTAAAT	27
BC039OV04	TGCATTTAAACAGCTTTGCTCCTAAAT	27

RHD C8G GENOTIPO: RHD weak D type 3
EXON1

BC040OV01	ACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCG	25
BC040OV02	ACAGGATGAGCTGTAAGTACCCGCG	25
BC040OV03	CACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCGG	27
BC040OV04	CACAGGATGAGCTGTAAGTACCCGCGG	27

RHD C446A GENOTIPO: RHD weak D type 5
EXON3

BC041OV01	TGGAGGTGACAGCTTTAGGCAACCT	25
BC041OV02	TGGAGGTGACAGATTTAGGCAACCT	25
BC041OV03	GGAGGTGACAGCTTTAGGCAACC	23
BC041OV04	GGAGGTGACAGATTTAGGCAACC	23

RHD G1016A GENOTIPO: RHD weak D type 7
EXON7

ES 2 326 708 B1

BC042OV01	TGGGTCTGCTTGGAGAGATCATCTA	25
BC042OV02	TGGGTCTGCTTGAAGAGATCATCTA	25
BC042OV03	GGGTCTGCTTGGAGAGATCATCT	23
BC042OV04	GGGTCTGCTTGAAGAGATCATCT	23

RHD C340T GENOTIPO: RHD weak D type 17
EXON3

BC043OV01	TCCCCCAGTATTCGGCTGGCCACCA	25
BC043OV02	TCCCCCAGTATTTGGCTGGCCACCA	25
BC043OV03	CTCCCCCAGTATTCGGCTGGCCACCAT	27
BC043OV04	CTCCCCCAGTATTTGGCTGGCCACCAT	27

RHD T807G GENOTIPO: RHD PSI
EXON6

BC044OV01	TTTGCAGACTTATGTGCACAGTGCG	25
BC044OV02	TTTGCAGACTTAGGTGCACAGTGCG	25
BC044OV03	TTGCAGACTTATGTGCACAGTGC	23
BC044OV04	TTGCAGACTTAGGTGCACAGTGC	23

RHD G1227A GENOTIPO: RHD K409K Dnull
EXON9

BC045OV01	AGTTTTCTGGAAGGTAAGATTTTTC	25
BC045OV02	AGTTTTCTGGAAAGTAAGATTTTTC	25
BC045OV03	AAGTTTTCTGGAAGGTAAGATTTTTC	27
BC045OV04	AAGTTTTCTGGAAAGTAAGATTTTTC	27

RHD G48A GENOTIPO: RHD W16X Dnull
EXON1

BC046OV01	CCTGCCCCTCTGGGCCCTAACACTG	25
BC046OV02	CCTGCCCCTCTGAGCCCTAACACTG	25
BC046OV03	CTGCCCCTCTGGGCCCTAACACT	23
BC046OV04	CTGCCCCTCTGAGCCCTAACACT	23

RHD C121T GENOTIPO: RHD Q41X Dnull
EXON1

BC047OV01	TCCTTAGAGGATCAAAAGGGGCTCG	25
BC047OV02	TCCTTAGAGGATTAAGGGGCTCG	25
BC047OV03	CCTTAGAGGATCAAAAGGGGCTC	23
BC047OV04	CCTTAGAGGATTAAGGGGCTC	23

RHD G270A GENOTIPO: RHD W90X Dnull
EXON2

BC048OV01	TGGTGTGCAGTGGGCAATCCTGCTG	25
BC048OV02	TGGTGTGCAGTGAGCAATCCTGCTG	25
BC048OV03	GGTGTGCAGTGGGCAATCCTGCT	23
BC048OV04	GGTGTGCAGTGAGCAATCCTGCT	23

RHD IVS3+1G>A GENOTIPO: RHD IVS3+1G>A Dneg
EXON3

BC049OV01	AATATCTTCAACGTGAGTCATGGTG	25
BC049OV02	AATATCTTCAACATGAGTCATGGTG	25
BC049OV03	ATATCTTCAACGTGAGTCATGGT	23
BC049OV04	ATATCTTCAACATGAGTCATGGT	23

RHD 488del4 GENOTIPO: RHD 488del4 Dnull
EXON4

BC050OV01	TTTATTGCAGACAGACTACCACATG	25
BC050OV02	TTTATTGCAGACTACCACATGAACA	25
BC050OV03	TTATTGCAGACAGACTACCACAT	23
BC050OV04	TTATTGCAGACTACCACATGAAC	23

RHD G635T GENOTIPO: RHD G212V Dnull
EXON5

BC051OV01	CTGGCCCCCAGGCGCCCTCTTCT	23
BC051OV02	CTGGCCCCCAGTCGCCCTCTTCT	23
BC051OV03	TGGCCCCCAGGCGCCCTCTTC	21
BC051OV04	TGGCCCCCAGTCGCCCTCTTC	21

RHD del711 GENOTIPO: RHD del711 Dnull
EXON5

ES 2 326 708 B1

BC052OV01	AAGGAAGAATGCCGTGTTCAACACC	25
BC052OV02	AAGGAAGAATGCCGTGTTCAACACCT	25
BC052OV03	AGGAAGAATGCCGTGTTCAACAC	23
BC052OV04	AGGAAGAATGCCGTGTTCAACACC	23

RHD G885T GENOTIPO: RHD M295I Dnull, weak D type11
EXON5

BC053OV01	GCTTGCCATGGTGCTGGGT	19
BC053OV02	GCTTGCCATTGTGCTGGGT	19
BC053OV03	GGCTTGCCATGGTGCTGGGTC	21
BC053OV04	GGCTTGCCATTGTGCTGGGTC	21

RHD 906insTGGCT GENOTIPO: RHD 906insTGGCT Dnull
EXON6

BC054OV01	CTTGTGGCTGGGCTGATCTCCGTCG	25
BC054OV02	CTTGTGGCTGGGGGCTCTGATCTCC	25
BC054OV03	TTGTGGCTGGGCTGATCTCCGTC	23
BC054OV04	TTGTGGCTGGGGGCTCTGATCTC	23

RHD IVS6+1del4 GENOTIPO: RHD IVS6+1del4 Dnull
EXON6

BC055OV01	AGTACCTGCCGGTAAGAACTAGAC	25
BC055OV02	AGTACCTGCCGGAACTAGACAAC	25
BC055OV03	GTACCTGCCGGTAAGAACTAGA	23
BC055OV04	GTACCTGCCGGAACTAGACAAC	23

RHD G941T GENOTIPO: RHD G314V Dnull
EXON7

BC056OV01	CTTGTCCACAGGGGTGTTGTAACCG	25
BC056OV02	CTTGTCCACAGGTGTGTTGTAACCG	25
BC056OV03	TTGTCCACAGGGGTGTTGTAACC	23
BC056OV04	TTGTCCACAGGTGTGTTGTAACC	23

RHD C990G GENOTIPO: RHD Y330X Dnull
EXON7

BC057OV01	CATCATGGGCTACAACTTCAGCTTG	25
BC057OV02	CATCATGGGCTAGAACTTCAGCTTG	25
BC057OV03	ATCATGGGCTACAACTTCAGCTT	23
BC057OV04	ATCATGGGCTAGAACTTCAGCTT	23

RHD IVS8+1G>A GENOTIPO: RHD IVS8+1G>A Dnull
EXON8

BC058OV01	GTCTCCTGACAGGTCAGTGTGAGGC	25
BC058OV02	GTCTCCTGACAGATCAGTGTGAGGC	25
BC058OV03	TCTCCTGACAGGTCAGTGTGAGG	23
BC058OV04	TCTCCTGACAGATCAGTGTGAGG	23

RHD C410T GENOTIPO: RHD DIII IV
EXON3

BC059OV01	GGTCAACTTGGCGCAGTTGGTGG	23
BC059OV02	GGTCAACTTGGTGCAGTTGGTGG	23
BC059OV03	GTCAACTTGGCGCAGTTGGTG	21
BC059OV04	GTCAACTTGGTGCAGTTGGTG	21

RHD A455C GENOTIPO: RHD DIIIa,DIIIc,DIII IV,DIVa
EXON3

BC060OV01	CAGCTTTAGGCAACCTGAGGATGGT	25
BC060OV02	CAGCTTTAGGCACCCTGAGGATGGT	25
BC060OV03	ACAGCTTTAGGCAACCTGAGGATGGTC	27
BC060OV04	ACAGCTTTAGGCACCCTGAGGATGGTC	27

RHD T667G GENOTIPO: RHD DIIIa,DVa(kou,yh), DCS,DAR
(weakDtype4.2), weakDtype4,weakDtype4.1,weakDtype29,DIII V,DOL
EXON5

BC061OV01	CTGGCCAAGTTTCAACTCTGC	21
BC061OV02	CTGGCCAAGTGTCAACTCTGC	21
BC061OV03	TGGCCAAGTTTCAACTCTG	19
BC061OV04	TGGCCAAGTGTCAACTCTG	19

RHD G916A RHD sonda consenso exon scanning
EXON6

BC062OV01	GGCTGATCTCCGTCGGGGGAGCC	23
BC062OV02	GGCTGATCTCCATCGGGGGAGCC	23
BC062OV03	GCTGATCTCCGTCGGGGGAGC	21
BC062OV04	GCTGATCTCCATCGGGGGAGC	21

RHD A932G RHD sonda consenso exon scanning
EXON6

BC063OV01	GGGGAGCCAAGTACCTGCCGGTAAG	25
BC063OV02	GGGGAGCCAAGTGCCTGCCGGTAAG	25
BC063OV03	GGGAGCCAAGTACCTGCCGGTAA	23
BC063OV04	GGGAGCCAAGTGCCTGCCGGTAA	23

RHD A1193T GENOTIPO: RHD DIVb
EXON9

BC064OV01	GCACCTCATGAGGCTAAATAT	21
BC064OV02	GCACCTCATGTGGCTAAATAT	21
BC064OV03	AGCACCTCATGAGGCTAAATATT	23
BC064OV04	AGCACCTCATGTGGCTAAATATT	23

RHD A514T GENOTIPO: RHD DFRI
EXON4

BC065OV01	AACATGATGCACATCTACGTGTTCG	25
BC065OV02	AACCTGAGGCACTTCTACGTGTTCG	25
BC065OV03	ACATGATGCACATCTACGTGTTC	23
BC065OV04	ACCTGAGGCACTTCTACGTGTTC	23

RHCE T307C GENOTIPO: RHCE Rhc
EXON2

BC066OV01	AGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGG	25
BC066OV02	AGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGG	25
BC066OV03	GAGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGGT	27
BC066OV04	GAGCCAGTTCCTCCTGGGAAGGTGGT	27

RHCE A122G GENOTIPO: RHCE Cw**EXON1**

BC067OV01	CTTAGAGGATCAAAAGGGGCTCG	23
BC067OV02	CTTAGAGGATCGAAAGGGGCTCG	23
BC067OV03	TTAGAGGATCAAAAGGGGCTC	21
BC067OV04	TTAGAGGATCGAAAGGGGCTC	21

RHCE G106A GENOTIPO: RHCE Cx**EXON1**

BC068OV01	ACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGG	25
BC068OV02	ACCCACTATGACACTTCCTTAGAGG	25
BC068OV03	TACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGGA	27
BC068OV04	TACCCACTATGACACTTCCTTAGAGGA	27

RHCE C676G GENOTIPO: RHCE E/e**EXON5**

BC069OV01	AGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAA	25
BC069OV02	AGTGTCAACTCTGCTCTGCTGAGAA	25
BC069OV03	AAGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAG	27
BC069OV04	AAGTGTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAG	27

RHCE C733G GENOTIPO: RHCE VS**EXON5**

BC070OV01	ACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTG	25
BC070OV02	ACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGTG	25
BC070OV03	CACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTGT	27
BC070OV04	CACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGTGT	27

RHCE G1006T GENOTIPO: RHCE VS/V-**EXON7**

BC071OV01	TTCAGCTTGCTGGGTCTTGCTTGGA	25
BC071OV02	TTCAGCTTGCTGTGTCTTGCTTGGA	25
BC071OV03	CTTCAGCTTGCTGGGTCTTGCTTGAG	27
BC071OV04	CTTCAGCTTGCTGTGTCTTGCTTGAG	27

KELL T698C GENOTIPO: KELL K/k**EXON6**

BC072OV01	AGAAGTCTCAGCATTCGGTTAAAGT	25
BC072OV02	AGAAGTCTCAGCGTTCGGTTAAAGT	25
BC072OV03	CAGAAGTCTCAGCATTCGGTTAAAGTT	27
BC072OV04	CAGAAGTCTCAGCGTTCGGTTAAAGTT	27

KELL A697T GENOTIPO: KELL K**EXON6**

BC073OV01	AACTTTAACCGAACGCTGAGACTTC	25
BC073OV02	AACTTTAACCGATCGCTGAGACTTC	25
BC073OV03	AACTTTAACCGAACGCTGAGACTTCT	27
BC073OV04	AACTTTAACCGATCGCTGAGACTTCT	27

KELL T961C GENOTIPO: KELL Kpa/Kpb**EXON8**

BC074OV01	ACTGGAACAGCCATGAAGTGATGGA	25
BC074OV02	ACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGA	25
BC074OV03	AACTGGAACAGCCATGAAGTGATGGAG	27
BC074OV04	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGAG	27

KELL G962A GENOTIPO: KELL Kpc**EXON8**

BC075OV01	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGG	25
BC075OV02	AACTGGAACAGCTGTGAAGTGATGG	25
BC075OV03	AACTGGAACAGCCGTGAAGTGATGGA	27
BC075OV04	AACTGGAACAGCTGTGAAGTGATGGA	27

KELL C1910T GENOTIPO: KELL Jsa/Jsb**EXON17**

BC076OV01	TGGGGGCTGCCCCGCCTGTGACA	23
BC076OV02	TGGGGGCTGCCTCGCCTGTGACA	23
BC076OV03	GGGGGCTGCCCCGCCTGTGAC	21
BC076OV04	GGGGGCTGCCTCGCCTGTGAC	21

KELL G1208A GENOTIPO: KELL Kmod-1**EXON10**

BC077OV01	AAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGT	25
BC077OV02	AAGATCATGTGGTTCTGCAGAAAGT	25
BC077OV03	TAAGATCATGTGGCTCTGCAGAAAGTC	27
BC077OV04	TAAGATCATGTGGTTCTGCAGAAAGTC	27

KIDD G838A GENOTIPO: KIDD Jka/Jkb**EXON9**

BC078OV01	GCCCCATTTGAGGACATCTACTTTG	25
BC078OV02	GCCCCATTTGAGAACATCTACTTTG	25
BC078OV03	CCCCATTTGAGGACATCTACTTT	23
BC078OV04	CCCCATTTGAGAACATCTACTTT	23

KIDD Intron5G>A GENOTIPO: KIDD Jknull**EXON6**

BC079OV01	TCTTGCCCCACAGGTCATTAATAGC	25
BC079OV02	TCTTGCCCCACAAGTCATTAATAGC	25
BC079OV03	GCTATTAATGACCTGTGGGGCAAGA	25
BC079OV04	GCTATTAATGACTTGTGGGGCAAGA	25

KIDD T871C GENOTIPO: KIDD Jknull**EXON9**

BC080OV01	GGTTTCAACAGCTCTCTGGCCTGCA	25
BC080OV02	GGTTTCAACAGCCCTCTGGCCTGCA	25
BC080OV03	GGGTTTCAACAGCTCTCTGGCCTGCAT	27
BC080OV04	GGGTTTCAACAGCCCTCTGGCCTGCAT	27

DUFFY G125A GENOTIPO: DUFFY Fya/Fyb

BC081OV01	ATGGAGACTATGGTGCCAACCTGGA	25
BC081OV02	ATGGAGACTATGATGCCAACCTGGA	25
BC081OV03	GATGGAGACTATGGTGCCAACCTGGAA	27
BC081OV04	GATGGAGACTATGATGCCAACCTGGAA	27

DUFFY T-33C GENOTIPO: DUFFY FyGATA-1
PROMOTER

BC082OV01	CCTTGGCTCTTATCTTGGAAGCACA	25
BC082OV02	CCTTGGCTCTTACCTTGGAAGCACA	25
BC082OV03	CTTGGCTCTTATCTTGGAAGCAC	23
BC082OV04	CTTGGCTCTTACCTTGGAAGCAC	23

DUFFY C265T GENOTIPO: DUFFY Fyx

BC083OV01	CCTCTCTTCCGCTGGCAGC	19
BC083OV02	CCTCTCTTCCGCTGGCAGC	19
BC083OV03	ACCTCTCTTCCGCTGGCAGCT	21
BC083OV04	ACCTCTCTTCCGCTGGCAGCT	21

MNS C59T GENOTIPO: MNS MN

EXON2GYPA

BC084OV01	GCATATCAGCATCAAGTACCACTGG	25
BC084OV02	GCATATCAGCATTAAGTACCACTGA	25
BC084OV03	CATATCAGCATCAAGTACCACTG	23
BC084OV04	CATATCAGCATTAAGTACCACTG	23

MNS G71A T72G GENOTIPO: MNS MN

EXON2GYPA

BC085OV01	CAAGTACCACTGGTGTGGCAATGCA	25
BC085OV02	TAAGTACCACTGAGGTGGCAATGCA	25
BC085OV03	TCAAGTACCACTGGTGTGGCAATGCAC	27
BC085OV04	TTAAGTACCACTGAGGTGGCAATGCAC	27

MNS T143C GENOTIPO: MNS S/s

EXON4GYPB

BC086OV01	TTATAGGAGAAATGGGACAACTTGT	25
BC086OV02	TTATAGGAGAAACGGGACAACTTGT	25
BC086OV03	TTTATAGGAGAAATGGGACAACTTGTC	27
BC086OV04	TTTATAGGAGAAACGGGACAACTTGTC	27

MNS C230T GENOTIPO: MNS U**EXON5GYPB**

5

BC087OV01	GTATTATTGGAACGATCCTCTTAAT	25
BC087OV02	GTATTATTGGAATGATCCTCTTAAT	25
BC087OV03	GGTATTATTGGAACGATCCTCTTAATT	27
BC087OV04	GGTATTATTGGAATGATCCTCTTAATT	27

10

15

MNS INTRON5+5GT GENOTIPO: MNS U**EXON5GYPB**

20

BC088OV01	TGATAAAGGTGAGAATTCAGTTTTT	25
BC088OV02	TGATAAAGGTGATAATTCAGTTTTT	25
BC088OV03	AAAAACTGAATTCTCACCTTTATCA	25
BC088OV04	AAAAACTGAATTATCACCTTTATCA	25

25

30

MNS C790A GENOTIPO: MNS GP.Mur(Mi.III)**EXON3**

35

BC089OV01	TATATGCAGATACGCACAAACGGGA	25
BC089OV02	TATATGCAGATAAGCACAAACGGGA	25
BC089OV03	TTATATGCAGATACGCACAAACGGGAC	27
BC089OV04	TTATATGCAGATAAGCACAAACGGGAC	27

40

45

MNS C850G GENOTIPO: MNS MNS GP.Mur(Mi.III)**EXON3**

50

BC090OV01	GGGGAAACAGTTGTAACAGAAATTT	25
BC090OV02	GGGCAAACAGTTCTAACAGAAATTT	25
BC090OV03	AGGGGAAACAGTTGTAACAGAAATTC	27
BC090OV04	AGGGCAAACAGTTCTAACAGAAATTC	27

55

DIEGO T2561C GENOTIPO: DIEGO Dia/Dib**EXON19**

60

BC091OV01	GCCAGGGAGGCCAGCGTGGACTTCA	25
BC091OV02	GCCAGGGAGGCCGGCGTGGACTTCA	25
BC091OV03	CCAGGGAGGCCAGCGTGGACTTC	23
BC091OV04	CCAGGGAGGCCGGCGTGGACTTC	23

65

DOMBROCK A793G**GENOTIPO: DOMBROCK Doa/Dob****EXON2**

BC092OV01	ACTGCAACCAGTTTCCTCTTGGGTG	25
BC092OV02	ACTGCAACCAGTCTCCTCTTGGGTG	25
BC092OV03	AACTGCAACCAGTTTCCTCTTGGGTGG	27
BC092OV04	AACTGCAACCAGTCTCCTCTTGGGTGG	27

COLTON C134T**GENOTIPO: COLTON Coa/Cob****EXON1**

BC093OV01	TTGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTGT	25
BC093OV02	TTGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTGT	25
BC093OV03	TGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTG	23
BC093OV04	TGTCCTGGACCGCCGTCTGGTTG	23

RHD G1048C**GENOTIPO: RHD DIVa/DIVb****EXON7**

BC094OV01	GCTGGTGCTTGATACCGTCGG	21
BC094OV02	GCTGGTGCTTCATACCGTCGG	21
BC094OV03	TGCTGGTGCTTGATACCGTCGGA	23
BC094OV04	TGCTGGTGCTTCATACCGTCGGA	23

1.2 Producción del DNA-chip para genotipado de grupos sanguíneos: Impresión y procesamiento de los portaobjetos de vidrio

Las sondas capaces de detectar las distintas variaciones génicas identificadas previamente se imprimen en el soporte (portaobjetos de cristal) aminosilanizado empleando DMSO como tampón de impresión. La impresión se lleva a cabo con un *spotter* o impresor de oligonucleótidos (sondas) controlando la temperatura y la humedad relativa.

La unión de las sondas al soporte (portaobjetos de cristal) se lleva a cabo mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado tal y como se describe en la documentación aportada por el fabricante (Por ejemplo, Corning Lifesciences <http://www.corning.com>). La humedad relativa durante el proceso de deposición se mantiene entre el 40-50% y la temperatura en torno a 20°C.

1.3 Validación de la utilidad clínica del DNA-chip para la identificación de grupos sanguíneos humanos: Detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos eritrocitarios

1.3.1 Preparación de la muestra a hibridar

Se extrae DNA del individuo a partir de una muestra de sangre mediante un protocolo estándar de filtración (Por ejemplo, kits comerciales de Macherey Nagel, Qiagen, etc).

Se amplifican todos los exones e intrones de interés mediante PCR multiplex utilizando las parejas de oligonucleótidos cebadores apropiadas. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de fragmentos génicos en los que pueda existir la variación génica a detectar, ventajosamente, aquellos pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR; en particular, se seleccionaron unos oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar, en tan

sólo 3 reacciones de PCR multiplex, los 36 fragmentos necesarios para el genotipado de las 94 variaciones génicas previamente mencionadas analizadas utilizando el DNA-chip de la invención para la detección de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios.

Los oligonucleótidos cebadores útiles para llevar a cabo la PCR multiplex para la detección de variaciones génicas asociadas a antígenos eritrocitarios humanos pueden ser diseñados por los expertos en la materia utilizando las secuencias de los genes correspondientes tal y como se describen en GenBank usando por ejemplo los softwares:

Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cqi-bin/primer3/primer3> [www.cai](http://www.cai.com)) o

Web Primer (<http://sea.veastaenome.org/cqi-bin/web-primer>)

Las PCR multiplex se llevan a cabo simultáneamente bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que permiten la amplificación específica de los fragmentos de los genes en los que pueda existir la variación génica a detectar. Finalizada la PCR multiplex se comprueba, en gel de agarosa, que ha tenido lugar reacción de amplificación.

A continuación, la muestra a hibridar (producto de la amplificación) se somete a fragmentación con una Dnasa y los productos resultantes del proceso de fragmentación se someten a una reacción de marcaje indirecto. Una transferasa terminal incorpora un nucleótido unido a un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, biotina, al final de estos pequeños fragmentos.

Antes de aplicar la muestra sobre el DNA-chip se procede a desnaturalizar la muestra mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos y, posteriormente, se añade el tampón de hibridación "ChipMap Kit Hybridization Buffer" (Ventana Medical System).

1.3.2 Hibridación

La hibridación se lleva a cabo de forma automática en la estación de hibridación Ventana Discovery (Ventana Medical Systems), desarrollada para tal fin.

Se realiza una prehibridación o bloqueo del portaobjetos con BSA. A continuación, se aplica la muestra junto con la solución de hibridación [ChipMap Kit Hybridization Buffer (Ventana Medical System)] y se mantiene durante 1 hora a 45°C siguiendo el protocolo Ventana 9.0 Europe (Ventana Medical System). Finalmente, el portaobjetos se somete a la acción de diferentes soluciones de lavado [ChipMap hybridisation Kit Buffers (Ventana Medical System)]. Una vez finalizado el proceso de hibridación se procede al lavado final y secado del portaobjetos.

Finalizada la hibridación, el revelado con estreptavidina-Cy3 marca los puntos (sondas) en los que se ha producido la hibridación.

1.3.3. Escaneado del portaobjetos

Se introduce el portaobjetos en el escáner de fluorescencia confocal, por ejemplo Axon escaner 4100A, y se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

1.3.4 Cuantificación de la imagen

El software del propio escáner permite la cuantificación en la imagen obtenida de la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.

1.3.5 Interpretación de los resultados: Determinación del genotipo del individuo, respecto a las variaciones génicas humanas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos analizados, e identificación del grupo sanguíneo del individuo

A partir de la señal que se obtiene con las sondas que detectan las diferentes variaciones génicas se establece el genotipo del individuo. Para ello, brevemente, en primer lugar, a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas se les resta su propio ruido de fondo; a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada uno de las 4 sondas que se usan para caracterizar cada variación génica. El valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes. Conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas se calculan dos ratios (ratio 1 y ratio 2):

$$\text{Ratio 1} = \frac{\text{Intensidad media sonda 1}}{\text{Intensidad media sonda 1} + \text{Intensidad media sonda 2}}$$

$$\text{Ratio 2} = \frac{\text{Intensidad media sonda 3}}{\text{Intensidad media sonda 3} + \text{Intensidad media sonda 4}}$$

ES 2 326 708 B1

Estos ratios se sustituyen en tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

AB Función 2

BB Función 3

La función que presente un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el paciente.

En este caso, la obtención de dichas funciones lineales se lleva a cabo mediante el análisis de 5 sujetos por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica (AA, AB, BB). Con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 sujetos. Estos ratios sirven como variables de clasificación de los tres grupos para generar las funciones lineales. Con estas tres funciones lineales se evalúa la capacidad discriminatoria de las dos parejas de sondas diseñadas. En caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, las sondas serían rediseñadas. Nuevos sujetos caracterizados para cada uno de los tres genotipos constituyen nuevos ratios 1 y 2 para perfeccionar las combinaciones lineales de los mismos que constituyen las funciones lineales y, en definitiva, para mejorar la capacidad discriminatoria del algoritmo basado en estas tres funciones.

Siempre que los ratios 1 y 2 se encuentren dentro del rango de los ratios usados para construir los grupos, la intensidad de fluorescencia media de las 40 réplicas con respecto al ruido de fondo sea mayor de 5 y el coeficiente de variación de todas las réplicas del DNA-chip esté por debajo de 0,25 (utilizando un escáner de fluorescencia confocal) el resultado de las funciones lineales se considera correcto.

Para dar por buena una hibridación completa es necesario que la relación intensidad frente a ruido de fondo de todas las sondas del DNA chip esté por encima de 15. Asimismo, la media de todos los ratios debe superar 0,6 como control de especificidad y sensibilidad. El ratio del control externo debe estar por encima de 0,6 y el control negativo nunca debe ser superior a 3 veces el ruido de fondo. Estos parámetros son consistentes con la realización particular de un escáner de fluorescencia confocal.

Resumiendo, cada mutación presenta en el portaobjetos 4 sondas (repetidas 10 veces) para su detección. Dos de dichas sondas detectan una variación génica y las otras dos la otra variación génica. La base interrogada se localiza siempre en la posición central.

En el caso de un sujeto homocigoto para la variación génica A, este no presentará variación génica B; por consiguiente, en la imagen que se obtiene del soporte de cristal las sondas que detectan la variación génica B presentan una señal de hibridación notablemente inferior a la presentada por la variación génica A y viceversa; en este caso, los ratios 1 y 2 tenderán a 1 y los sujetos serán asignados como homocigotos AA por el software de análisis.

Por otro lado, un sujeto heterocigoto para una variación génica determinada presenta ambas la variaciones génicas; por tanto, las sondas que los detectan presentan una señal de hibridación equivalente. Los ratios 1 y 2 tenderán a 0,5 y los sujetos serán asignados como heterocigotos AB por el software de análisis.

Ejemplo 2

Identificación del grupo sanguíneo de 15 individuos donantes de sangre, utilizando el DNA-chip para el genotipado de grupos sanguíneos

Extracción de DNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA por métodos convencionales de 15 donantes de sangre que respondían a los grupos serológicos A y O. El análisis genético mediante secuenciación de la región de interés corroboró que 5 de los donantes presentaban genotipo 188G189C (determinación serológica A), otros 5 donantes presentaban genotipo 188GA189CT (determinación serológica O) y los restantes 5 donantes presentaban genotipo 188A189T (determinación serológica O).

Diseño de las sondas

Se diseñaron 4 sondas para la detección del polimorfismo ABO G188A/C189T genotipo ABO O1v, tal y como se ha descrito previamente en la descripción de la invención, cuyas secuencias se recogen a continuación (Ejemplo 1):

BC012OV01	ACCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGCC	25
BC012OV02	ACCATCTGCAGCATGTCTCGTTGCC	25
BC012OV03	CCATCTGCAGCGCGTCTCGTTGC	23
BC012OV04	CCATCTGCAGCATGTCTCGTTGC	23

Producción del DNA-chip para la detección de las variaciones aénicas humanas asociadas a determinados antígenos eritrocitarios humanos

Las sondas diseñadas se imprimieron en el portaobjetos de cristal con un microarrayer tal y como se describe en el Ejemplo 1.2.

PCR y marcaje de la muestra

Se amplificó, mediante PCR multiplex utilizando cebadores específicos, la región del gen ABO que permitía el análisis de la variación génica de interés (ABO G188A/C189T genotipo ABO O1v). El producto de la amplificación fue fragmentado y marcado tal y como se indica en el Ejemplo 1.3.1.

Hibridación de las muestras

La hibridación se llevó a cabo en una estación automática de hibridación, tal y como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1.3.2.

Análisis de los resultados

El portaobjetos se introdujo en el escáner y se procedió a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser (Ejemplo 1.3.3) y a cuantificar la imagen obtenida de la señal de los puntos donde se ha producido hibridación (Ejemplo 1.3.4).

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el algoritmo previamente descrito en el Ejemplo 1.3.5. El empleo de dicho algoritmo permitió caracterizar esta variación génica para los 15 sujetos con una coincidencia del 100% con respecto a los métodos serológicos y de secuenciación.

La Figura 1 muestra la representación de los ratios 1 y 2 y permite caracterizar a los 15 pacientes.

Las funciones lineales para los tres grupos se exponen en la Tabla 5, en donde el número de réplicas de las 4 sondas usadas fue 10; "X" es el ratio 1; "Y" es el ratio 2; "0" se corresponde con el genotipo 188A189T; "1" se corresponde con el genotipo: 188GA189CT; y "2" se corresponde con el genotipo 188G189C.

TABLA 5

Coefficientes de la función de clasificación			
CLASE	0	1	2
X	7,338994	101,6024	176,7265
Y	1227,301	603,8602	81,12664
(Constante)	-499,132	-163,927	-27,3071

Un donante con genotipo 188G189C presentó unos ratios 1 y 2 de 0,77 y 0,82, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los donantes para 10 réplicas de cada una de las 4 sondas.

Las funciones lineales obtenidas para 8 réplicas de cada una de las 4 sondas, se recogen en la Tabla 6.

TABLA 6

Coefficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	178,1139	272,6293	417,9721
Y	-42,2919	59,0597	132,0375
(Constante)	-16,0985	-82,5103	-225,228

ES 2 326 708 B1

El mismo donante con genotipo 188G189C presentó igualmente unos ratios 1 y 2 de 0,77 y 0,82, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 8 réplicas de cada una de las 4 sondas.

Las funciones lineales obtenidas para 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, se recogen en la Tabla 7.

TABLA 7

Coefficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	181,8305	307,0291	477,2833
Y	-51,0987	15,33189	57,86783
(Constante)	-15,1285	-79,8083	-218,298

El mismo donante con genotipo 188G189C presentó igualmente unos ratios 1 y 2 de 0,77 y 0,82, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 6 réplicas de cada una de las 4 sondas.

Ejemplo 3

Detección de variaciones génicas humanas asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), utilizando un DNA-chip para el diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento de la IBD

3.1 Diseño del DNA-chip para el genotipado de variaciones génicas asociadas a IBD

Se diseñó y fabricó un DNA-chip para detectar variaciones génicas humanas asociadas a IBD que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a IBD. Dichas variaciones génicas se relacionan con un mayor o menor riesgo de padecer la IBD, una mejor o peor respuesta a los fármacos e incluso un mejor o peor pronóstico de la enfermedad. Ejemplos ilustrativos de variaciones génicas humanas asociadas a antígenos asociados a IBD que pueden ser determinados utilizando este DNA-chip se mencionan en la Tabla 1.

El DNA-chip diseñado y producido consta de un soporte (portaobjetos de cristal) que presenta en su superficie una pluralidad de sondas que permiten la detección de las variaciones génicas mencionadas anteriormente. Estas sondas son capaces de hibridar con las secuencias amplificadas de los genes relacionados con IBD. Las secuencias de DNA de cada una de las sondas utilizadas se mencionan a continuación [en general, se indica el nombre del gen y la mutación (cambio de nucleótido, “ins”: inserción, “del”: delección o cambio de aminoácido)]:

1.- Multidrug resistance protein (MDR-1) G2677T/A/C Ala893Ser/Thr/Pro (sondas

para detectar el polimorfismo G2677T/C Ala893Ser/Thr del gen *Multidrug resistance protein MDR-1*)

TCACCTTCCCAGCACCTTCTAGTTC
 GAACTAGAAGGTGCTGGGAAGGTGA
 TCACCTTCCCAGGACCTTCTAGTTC
 GAACTAGAAGGTCCTGGGAAGGTGA
 TCACCTTCCCAGAACCTTCTAGTTC
 GAACTAGAAGGTTCTGGGAAGGTGA
 TCACCTTCCCAGTACCTTCTAGTTC
 GAACTAGAAGGTACTGGGAAGGTGA

2.- Multidrug resistance protein (MDR-1) C3435T

5 TGCTGCCCTCACAATCTCTTCCTGT
ACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCA
TGCTGCCCTCACGATCTCTTCCTGT
10 ACAGGAAGAGATCGTGAGGGCAGCA

3.- CARD15 R702W

15 AAGGCCCTGCTCCGGCGCCAGGCCT
AGGCCTGGCGCCGGAGCAGGGCCTT
20 AAGGCCCTGCTCTGGCGCCAGGCCT
AGGCCTGGCGCCAGAGCAGGGCCTT

4.- CARD15 G908R

25 TTCAGATTCTGGGGCAACAGAGTGG
CCACTCTGTTGCCCCAGAATCTGAA
30 TTCAGATTCTGGCGCAACAGAGTGG
CCACTCTGTTGCGCCAGAATCTGAA

5.- CARD15 1007insC

35
40 TCCTGCAGGCCCTTGAAAGGAATG
CATTCTTTCAAGGGGCCTGCAGGA
TCCTGCAGGCCCTTGAAAGGAATGA
45 TCATTCTTTCAAGGGCCTGCAGGA

6.- Microsomal epoxide hydrolase (EPXH1) T612C (Y113H)

50 ATTCTCAACAGATACCCTCACTTCA
TGAAGTGAGGGTATCTGTTGAGAAT
55 ATTCTCAACAGACACCCTCACTTCA
TGAAGTGAGGGTGTCTGTTGAGAAT

7.- Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) (-2518)G/A

60 AGGCAGACAGCTGTCACTTTCCAGA
TCTGGAAAGTGACAGCTGTCTGCCT
65 AGGCAGACAGCTATCACTTTCCAGA

TCTGGAAAGTGATAGCTGTCTGCCT

5 **8.- Interleucina 10 (IL10) (-1082)G/A**

GCTTCTTTGGGAAGGGGAAGTAGGG

10 CCCTACTTCCCCTTCCCAAAGAAGC

GCTTCTTTGGGAGGGGGAAGTAGGG

CCCTACTTCCCCTTCCCAAAGAAGC

15 **9.- Interleucina 10 (IL10) G15R G43A**

GTCCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCA

20 GTCCTCCTGACTAGGGTGAGGGCCA

TGGCCCTCACCCAGTCAGGAGGAC

25 TGGCCCTCACCTAGTCAGGAGGAC

10.- Interleucina 16 (IL16) (-295)T/C

30 TTGTTCTATCATAAAGAGTCAGGG

CCCTGACTCTTTATGATAGGAACAA

35 TTGTTCTATCACAAAGAGTCAGGG

CCCTGACTCTTTGTGATAGGAACAA

40 **11.- Fas ligand (-843)C/T**

ATGAAAACATTGTGAAATACAAAGC

GCTTTGTATTTACAATGTTTTCAT

45 ATGAAAACATTGCGAAATACAAAGC

GCTTTGTATTTGCAATGTTTTCAT

50 **12.- Nuclear factor kappa-B (NFKB1) 94delATTG**

CCCCGACCATTGGGCCCCGGCAGGCG

55 CGCCTGCCGGGCCCCAATGGTCGGGG

CCCCGACCATTGATTGGGCCCCGGCA

TGCCGGGCCCAATCAATGGTCGGGG

60 **13.- Nuclear factor kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA)**

SNP en el 3'UTR

(G/A)

65 TGCACACTGCCTGGCCCAAAACGTC

TGCACACTGCCTAGCCCCAAACGTC
 GACGTTTTGGGCCAGGCAGTGTGCA
 GACGTTTTGGGCTAGGCAGTGTGCA

14.- Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) G2964A

GCTCTGAGACACGCCCCAACATGCC
 GGCATGTTGGGGCGTGTCTCAGAGC
 GCTCTGAGACACACCCCAACATGCC
 GGCATGTTGGGGTGTGTCTCAGAGC

15.- Interleucina 18 (IL18) TCA/TCC en el codon 35

GCCAAAGTAATCGGATTCCAGGTTT
 AAACCTGGAATCCGATTACTTTGGC
 GCCAAAGTAATCTGATTCCAGGTTT
 AAACCTGGAATCAGATTACTTTGGC

16.- Mediterranean fever gene (MEFV) E474E

CTACTTCCTGGAGCAGCAAGAGCAT
 ATGCTCTTGCTGCTCCAGGAAGTAG
 CTACTTCCTGGAACAGCAAGAGCAT
 ATGCTCTTGCTGTTCCAGGAAGTAG

17.- Mediterranean fever gene (MEFV) Q476Q

CCTGGAGCAGCAGGAGCATTTCCTT
 AAAGAAATGCTCCTGCTGCTCCAGG
 CCTGGAGCAGCAAGAGCATTTCCTT
 AAAGAAATGCTCTTGCTGCTCCAGG

18.- Mediterranean fever gene (MEFV) D510D

CGCCCTGCTCGACGCGCTGATTGGG
 CCCAATCAGCGCGTCGAGCAGGGCG
 CGCCCTGCTCGATGCGCTGATTGGG
 CCCAATCAGCGCATCGAGCAGGGCG

19.- Mediterranean fever gene (MEFV)

P588P

GCCAATCAGCTCCGGAACCTACGGAG
CTCCGTAGTTCCGGAGCTGATTGGC
GCCAATCAGCTCTGGAACCTACGGAG
CTCCGTAGTTCCAGAGCTGATTGGC

20.- Discs, large homolog 5 (DLG5)

113G/A (R30Q)

TCATTCACCTTGCCGGTCAGTGAGGA
TCCTCACTGACCGGCAAGTGAATGA
TCATTCACCTTGCTGGTCAGTGAGGA
TCCTCACTGACCAGCAAGTGAATGA

21.- Colony stimulating factor receptor 1 (CSFR1)

A2033T

AAACCCTTATTACCTAATCACAGC
GCTGTGATTAGGTGAATAAGGGTTT
AAACCCTTATTCTCCTAATCACAGC
GCTGTGATTAGGAGAATAAGGGTTT

22.- Organic cation transporter (OCTN1, SLC22A4)

1672C/T (L503F)

CTGATTGGAATCCTCACCTTTTTT
AAAAAAGGGTGAGGATTCCAATCAG
CTGATTGGAATCTTCACCTTTTTT
AAAAAAGGGTGAGGATTCCAATCAG

23.- Organic cation transporter (OCTN2, SLC22A5)

(-207)G/C

CCAGGGAAGGTTGCGGGCCTGGGCC
GGCCCAGGCCCCGCAACCTTCCCTGG
CCAGGGAAGGTTCCGGGCCTGGGCC
GGCCCAGGCCCCGGAACCTTCCCTGG

24.- Toll-like receptor 4 (TLR4)

(A/G)

Asp299Gly

ACTACCTCGATGATATTATTGACTT
AAGTCAATAATATCATCGAGGTAGT
ACTACCTCGATGGTATTATTGACTT
AAGTCAATAATACCATCGAGGTAGT

25.- Toll-like receptor 4 (TLR4)

(C/T)

Thr399Ile

5 ATTTTGGGACAACCAGCCTAAAGTA
TACTTTAGGCTGGTTGTCCCAAAT
ATTTTGGGACAATCAGCCTAAAGTA
10 TACTTTAGGCTGATTGTCCCAAAT

26.- Interleucina 1 beta (IL1 β) (-511)A/C

15 GAAGAGAATCCCAGAGCAGCCTGTT
AACAGGCTGCTCTGGGATTCTCTTC
20 GAAGAGAATCCCCGAGCAGCCTGTT
AACAGGCTGCTCGGGGATTCTCTTC

27.- Superoxide dismutase 2 (SOD2) (C/T) Ala16Val

25 AGCTGGCTCCGGCTTTGGGGTATCT
AGATACCCCAAAGCCGGAGCCAGCT
30 AGCTGGCTCCGGTTTGGGGTATCT
AGATACCCCAAACCGGAGCCAGCT
35

28.- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) (C/G)

Pro12Ala

40 TCTCCTATTGACCCAGAAAGCGATT
AATCGCTTTCTGGGTCAATAGGAGA
45 TCTCCTATTGACGCAGAAAGCGATT
AATCGCTTTCTGCGTCAATAGGAGA

29.- Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) (A/G) K469E

50 GAGGTCACCCGCAAGGTGACCGTGA
TCACGGTCACCTTGCGGGTGACCTC
55 GAGGTCACCCGCGAGGTGACCGTGA
TCACGGTCACCTCGCGGGTGACCTC
60

30.- Intercellular adhesion molecule 1 ICAM1 R241G

65 TGTTCCCTGGACAGGCTGTTCCAG
CTGGGAACAGCCTGTCCAGGGAACA

TGTTCCCTGGACGGGCTGTTCCCAG
CTGGGAACAGCCCGTCCAGGGAACA

5

31.- IBD5 locus IGR2060a_1

CCTTGCAACCCTGGCAAAGGTAATG
CATTACCTTTGCCAGGGTTGCAAGG
CCTTGCAACCCTCGCAAAGGTAATG
CATTACCTTTGCGAGGGTTGCAAGG

10

15

32.- IBD5 locus IGR2198a_1

CAGTAGACGAACGATGCAAAATACC
GGTATTTTGCATCGTTCGTCTACTG
CAGTAGACGAACCATGCAAAATACC
GGTATTTTGCATGGTTCGTCTACTG

20

25

33.- IBD5 locus IGR3096a_1

CATCCTGGAGAATAGCTGAGAACCT
AGGTTCTCAGCTATTCTCCAGGATG
CATCCTGGAGAACAGCTGAGAACCT
AGGTTCTCAGCTGTTCTCCAGGATG

30

35

40

34.- Heat shock protein 70 (HSP70-2) 1267A/G Gln351Gln

GAAGCTGCTGCAAGACTTCTTCAAC
GTTGAAGAAGTCTTGCAGCAGCTTC
GAAGCTGCTGCAGGACTTCTTCAAC
GTTGAAGAAGTCCTGCAGCAGCTTC

45

50

35.- Toll-like receptor (TLR9) 1237C/T

TCCCTCTGCCTGAAACTCCCCAA
TTGGGGGAGTTTTCCAGGCAGAGGGA
TCCCTCTGCCTGGAAACTCCCCAA
TTGGGGGAGTTTCCAGGCAGAGGGA

55

60

36.- Methylenetetrahydrofolate reductase (MTFHR) C677T Val222Ala

TGTCTGCGGGAGCCGATTTTCATCAT

65

ATGATGAAATCGGCTCCCGCAGACA
TGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCAT
ATGATGAAATCGACTCCCGCAGACA

37.- Interleucina 4 (IL4) (-590)C/T
GGAGAACATTGTCCCCCAGTGCTGG
CCAGCACTGGGGGACAATGTTCTCC
GGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGG
CCAGCACTGGGGAACAATGTTCTCC

38.- Interleucina 4 (IL4) (-34) C/T
ATAAACTAATTGCCTCACATTGTCA
TGACAATGTGAGGCAATTAGTTTAT
ATAAACTAATTGTCTCACATTGTCA
TGACAATGTGAGACAATTAGTTTAT

39.- Mannan-binding lectin (MBL) (A/G) Gly54Asp
ATGGGCGTGATGACACCAAGGGAGA
TCTCCCTTGGTGTCTACGCCCCAT
ATGGGCGTGATGGCACCAAGGGAGA
TCTCCCTTGGTGCCATCACGCCCCAT

40.- Mannan-binding lectin (MBL) (A/G)
Gly57Glu ATGGCACCAAGGAAGAAAAGGGGGA
TCCCCCTTTTCTTCCTTGGTGCCAT
ATGGCACCAAGGGAGAAAAGGGGGA
TCCCCCTTTTCTCCCTTGGTGCCAT

41.- Mannan-binding lectin (MBL) (C/T) Arg52Cys
GGCAAAGATGGGCGTGATGGCACCA
TGGTGCCATCACGCCCCATCTTTGCC
GGCAAAGATGGGTGTGATGGCACCA
TGGTGCCATCACACCCATCTTTGCC

42.- Angiotensinogen precursor (AGT) (-6)A/T

CGTGACCCGGCCAGGGGAAGAAGCT
 CGTGACCCGGCCGGGGGAAGAAGCT
 AGCTTCTTCCCCTGGCCGGGTCACG
 AGCTTCTTCCCCCGGCCGGGTCACG

43.- Plasminogen activator inhibitor (PAI1) 4G/5G

GGACACGTGGGGGAGTCAGCCGTGT
 ACACGGCTGACTCCCCACGTGTCC
 GGACACGTGGGGAGTCAGCCGTGTA
 TACACGGCTGACTCCCCACGTGTCC

44.- Tumor necrosis factor alpha (TNF α) (-857)C/T

CCCCCCCCTTAACGAAGACAGGGCC
 GGCCCTGTCTTCGTTAAGGGGGGGG
 CCCCCCCTTAATGAAGACAGGGCC
 GGCCCTGTCTTCATTAAGGGGGGGG

45.- Tumor necrosis factor alpha (TNF α) (-308)G/A

TTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCA
 TGAACCCCGTCCCCATGCCCTCAA
 TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTTCA
 TGAACCCCGTCCTCATGCCCTCAA

46.- Tumor necrosis factor alpha (TNF α) (-238)G/A

CCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGGA
 TCCTCCCTGCTCCGATTCCGAGGGG
 CCCCTCGGAATCAGAGCAGGGAGGA
 TCCTCCCTGCTCTGATTCCGAGGGG

47.- TPMT G238C

GTCCCCGGTCTGCAAACCTGCATAA
 TTATGCAGGTTTGCAGACCGGGGAC
 GTCCCCGGTCTGGAAACCTGCATAA
 TTATGCAGGTTTCCAGACCGGGGAC

48.- TPMT G460A

5 TGGGATAGAGGAGCATTAGTTGCCA
TGGGATAGAGGAACATTAGTTGCCA
TGGCAACTAATGCTCCTCTATCCCA
10 TGGCAACTAATGTTCTCTATCCCA

49.- TPMT A719G

15 TCTGTAAGTAGATATAACTTTTCAA
TTGAAAAGTTATATCTACTTACAGA
20 TCTGTAAGTAGACATAACTTTTCAA
TTGAAAAGTTATGTCTACTTACAGA

50.- MICA Trp14Gly

25 ACGGTGCTGTCCTGGGATGGATCTG
ACGGTGCTGTCCGGGGATGGATCTG
30 CAGATCCATCCCAGGACAGCACCGT
CAGATCCATCCCCGGACAGCACCGT

51.- MICA Thr24Ala

35 TCAGGGTTTCTCGCTGAGGTACATC
40 TCAGGGTTTCTCACTGAGGTACATC
GATGTACCTCAGCGAGAAACCCTGA
45 GATGTACCTCAGTGAGAAACCCTGA

52.- MICA Met129Val

50 GAGGAATGGACAATGCCCCAGTCCT
GAGGAATGGACAGTGCCCCAGTCCT
55 AGGACTGGGGCATTGTCCATTCCTC
AGGACTGGGGCACTGTCCATTCCTC

53.- MICA Lys173Glu

60 CGGCGATATCTAAAATCCGGCGTAG
CGGCGATATCTAGAATCCGGCGTAG
65 CTACGCCGGATTTTAGATATCGCCG

CTACGCCGGATTCTAGATATCGCCG

5

54.- MICA Gly175Ser

TATCTAAAATCCGGCGTAGTCCTGA

10

TATCTAAAATCCAGCGTAGTCCTGA

TCAGGACTACGCCGGATTTTAGATA

TCAGGACTACGCTGGATTTTAGATA

15

55.- SLC11A1=NRAMP1 in the promoter region (-377 a -222): alelo 7

CGTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTGT

20

CGTGTGTGTGTACGTGTGTGTGTGT

ACACACACACACATACACACACACG

25

ACACACACACACGTACACACACACG

56.- CD14 (-159)T/C

TTCCTGTTACGGTCCCCCTCCCTGA

30

TTCCTGTTACGGCCCCCTCCCTGA

TCAGGGAGGGGGACCGTAACAGGAA

35

TCAGGGAGGGGGGCCGTAACAGGAA

57.- CD16A=FCGR3A G4985T Val158Phe

TGCAGGGGGCTTGTTGGGAGTAAAA

40

TGCAGGGGGCTTTTTGGGAGTAAAA

45

TTTACTCCCAACAAGCCCCCTGCA

TTTACTCCCAAAAAGCCCCCTGCA

50

58.- NR1I2 (-25385)C/T

CAATCCCAGGTTCTCTTTTCTACCT

55

CAATCCCAGGTTTTCTTTTCTACCT

AGGTAGAAAAGAGAACCTGGGATTG

AGGTAGAAAAGAAAACCTGGGATTG

60

59.- TUCAN/CARD8/CARDINAL (T/A) Cys10Stop

GAGCCATTATTGTTCCGTGCTGTTC

65

GAGCCATTATTGATCCGTGCTGTTC

GAACAGCACGGAACAATAATGGCTC
GAACAGCACGGATCAATAATGGCTC

5

60.- IKBL +738T/C Cys224Arg

GCAGAGGGATCCTGTGACCCCCAC
GCAGAGGGATCCCGTCGACCCCCAC
GTGGGGGTGACAGGATCCCTCTGC
GTGGGGGTGACGGGATCCCTCTGC

10

15

61.- TNFRSF1B=TNFR2 G593A

GCAGAGGCAGCGGGTTGTGGAAAGC
GCAGAGGCAGCGAGTTGTGGAAAGC
GCTTTCCACAACCCGCTGCCTCTGC
GCTTTCCACAACCTCGCTGCCTCTGC

20

25

62.- TNFRSF1B=TNFR2 T620C

CTGCTGCCATGGCGTGTCCCTCTCG
CTGCTGCCATGGTGTGTCCCTCTCG
CGAGAGGGACACGCCATGGCAGCAG
CGAGAGGGACACACCATGGCAGCAG

30

35

40

63.- MEKK1 Asp643Asn

AGTGGGAATTATCAATGGACTGCAA
AGTGGGAATTATTAATGGACTGCAA
TTGCAGTCCATTGATAATTCCCACT
TTGCAGTCCATTAATAATTCCCACT

45

50

64.- HLA-DQ4 159G/A/C

CACCAACGGGACGGAGCGCGTGCGG
CACCAACGGGACAGAGCGCGTGCGG
CACCAACGGGACCGAGCGCGTGCGG
CCGCACGCGCTCCGTCCCGTTGGTG
CCGCACGCGCTCTGTCCCGTTGGTG
CCGCACGCGCTCGGTCCCGTTGGTG

55

60

65

65.- HLA-DQ4 282C/T

CGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAA
 CGAGTACTGGAATAGCCAGAAGGAA
 TTCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCG
 TTCCTTCTGGCTATTCCAGTACTCG

66.- HLA-DRB 109T/C

CGACCACGTTTCTTGTGGCAGCTTA
 TAAGCTGCCACAAGAAACGTGGTCG
 CGACCACGTTTCCTGTGGCAGCTTA
 TAAGCTGCCACAGGAAACGTGGTCG

67.- HLA-DRB 119T/C/G/A

TCTTGTGGCAGCTTAAGTTTGAATG
 CATTCAAACCTTAAGCTGCCACAAGA
 TCTTGTGGCAGCCTAAGTTTGAATG
 CATTCAAACCTTAGGCTGCCACAAGA
 TCTTGTGGCAGCGTAAGTTTGAATG
 CATTCAAACCTTACGCTGCCACAAGA
 TCTTGTGGCAGCATAAGTTTGAATG
 CATTCAAACCTTATGCTGCCACAAGA

68.- HLA-DRB 122A/C/G/T

TGTGGCAGCTTAAGTTTGAATGTCA
 TGACATTCAAACCTTAAGCTGCCACA
 TGTGGCAGCTTACGTTTGAATGTCA
 TGACATTCAAACGTAAGCTGCCACA
 TGTGGCAGCTTAGGTTTGAATGTCA
 TGACATTCAAACCTAAGCTGCCACA
 TGTGGCAGCTTATGTTTGAATGTCA
 TGACATTCAAACATAAGCTGCCACA

69.- HLA-DRB 129A/G

GCTTAAGTTTGAATGTCATTTCTTC
 GAAGAAATGACATTCAAACCTTAAGC

GCTTAAGTTTGAGTGTCAATTTCTTC
GAAGAAATGACACTCAAACCTTAAGC

5

70.- HLA-DRB 161G/A/T

CGGAGCGGGTGCGGTTGCTGGAAAG
CTTTCCAGCAACCGCACCCGCTCCG
CGGAGCGGGTGCAAGTTGCTGGAAAG
CTTTCCAGCAACTGCACCCGCTCCG
CGGAGCGGGTGCTGTTGCTGGAAAG
CTTTCCAGCAACAGCACCCGCTCCG

10

15

20

71.- HLA-DRB 175 T/C/G

TTGCTGGAAAGATGCATCTATAACC
GGTTATAGATGCATCTTTCCAGCAA
TTGCTGGAAAGACGCATCTATAACC
GGTTATAGATGCGTCTTTCCAGCAA
TTGCTGGAAAGAGGCATCTATAACC
GGTTATAGATGCCTCTTTCCAGCAA

25

30

35

72.- HLA-DRB 184A/C/delA

AGATGCATCTATAACCAAGAGGAGT
ACTCCTCTTGGTTATAGATGCATCT
AGATGCATCTATCACCAAGAGGAGT
ACTCCTCTTGGTGATAGATGCATCT
AGATGCATCTATACCAAGAGGAGTC
GACTCCTCTTGGTATAGATGCATCT

40

45

50

73.- HLA-DRB 286C/A/T

AGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGA
TCTGCTCCAGGAGGTCCTTCTGGCT
AGCCAGAAGGACATCCTGGAGCAGA
TCTGCTCCAGGATGTCCTTCTGGCT
AGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCAGA
TCTGCTCCAGGAAGTCCTTCTGGCT

55

60

65

74.- HLA-DRB 305C/G

AGCAGAGGCGGGCCGCGGTGGACAC
 GTGTCCACCGCGGCCCGCCTCTGCT
 AGCAGAGGCGGGGCGCGGTGGACAC
 GTGTCCACCGCGGCCCGCCTCTGCT

75.- IL1RN 2018 T/C EXON 2

CCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA
 CCAACTAGTTGCCGGATACTTGCAA
 TTGCAAGTATCCAGCAACTAGTTGG
 TTGCAAGTATCCGGCAACTAGTTGG

76.- IL1RN 2073 C/T INTRON 2

TTGCCAGGAAAGCCAATGTATGTGG
 TTGCCAGGAAAGTCAATGTATGTGG
 CCACATACATTGGCTTTCCTGGCAA
 CCACATACATTGACTTTCCTGGCAA

77.- IL1B 3954 C/T TAQI

ACCTATCTTCTTCGACACATGGGAT
 ACCTATCTTCTTTGACACATGGGAT
 ATCCCATGTGTGCGAAGAAGATAGGT
 ATCCCATGTGTCAAAGAAGATAGGT

3.2 Producción del DNA-chip para el genotipado de variaciones génicas asociadas a IBD

La unión de las sondas al portaobjetos de vidrio se lleva a cabo mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado tal y como se ha descrito previamente (Ejemplo 1.2) manteniendo la humedad relativa durante el proceso de deposición entre el 40-50% y la temperatura en torno a 20°C.

3.3 Validación de la utilidad clínica del DNA-chip para el diagnóstico de IBD: Detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas humanas asociadas a IBD utilizando un DNA-chip

3.3.1 Preparación de la muestra a hibridar

Se extrae DNA del individuo a partir de una muestra de sangre mediante un protocolo de filtración.

Se amplifican todos los exones e intrones de interés mediante PCR multiplex utilizando las parejas de oligonucleótidos cebadores apropiadas. Prácticamente puede utilizarse cualquier pareja de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de fragmentos génicos en los que pueda existir la variación génica a detectar, ventajosamente, aquellas parejas que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar, mediante PCR multiplex, los fragmentos de los genes en los que pueden existir las variaciones génicas correspondientes asociados a IBD a detectar, se mencionan a continuación. Dichos oligonucleótidos cebadores constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

1.- Multidrug resistance protein (MDR-1) G2677T/A/CAla893Ser/Thr/Pro

(oligonucleótidos para amplificar el fragmento del gen "Multidrug resistance protein MDR-1" en el que puede existir el polimorfismo G2677T/C Ala893Ser/Thr exon)

SEQ ID NO 1: GCATAGTAAGCAGTAGGGAGTAACA

SEQ ID NO 2: TGCAATAGCAGGAGTTGTTGA

2.- Multidrug resistance protein (MDR-1) C3435T

SEQ ID NO 3: TGCTCCCAGGCTGTTTATTT

SEQ ID NO 4: TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG

3.- CARD15 R702W

SEQ ID NO 5: AGATCACAGCAGCCTTCCTG

SEQ ID NO 6: GGATGGAGTGGAAGTGCTTG

4.- CARD15 G908R

SEQ ID NO 7: ACTGCAGAGGGAGGAGGACT

SEQ ID NO 8: CCACCTCAAGCTCTGGTGAT

5.- CARD15 1007insC

SEQ ID NO 9: ACTGGCTAACTCCTGCAGTC

SEQ ID NO 10: GAAAAACTGAGGTTTCGGAGA

6.- Microsomal epoxide hydrolase (EPXH1) T612C Y113H

SEQ ID NO 11: CTCTCAACTTGGGGTCCTGA

SEQ ID NO 12: GGCGTTTTGCAAACATACCT

7.- Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) (-2518)G/A

SEQ ID NO 13: CCAGCCAAATGCATTCTCTT

SEQ ID NO 14: CACAGGGAAGGTGAAGGGTA

8.- Interleucina 10 (IL10) (-1082)G/A

SEQ ID NO 15: CAACTGGCTCCCCTTACCTT

SEQ ID NO 16: ATGGAGGCTGGATAGGAGGT

9.- Interleucina 10 (IL10) G15R G43A

SEQ ID NO 17: AGAGGCCTCCCTGAGCTTAC

SEQ ID NO 18: TCTCGGAGATCTCGAAGCAT

10.- Interleucina 16 (IL16) (-295)T/C

SEQ ID NO 19: AACTGAAGCAATGCCAGTCC

SEQ ID NO 20: CAGAGCCAGCACCTCCTAGA

11.- Fas ligand (-843)C/T

SEQ ID NO 21: CTTGAGCCCAGGAGTTTGAG

SEQ ID NO 22: ATCAGAGGCTGCAAACCAGT

12.- Nuclear factor kappa-B (NFKB1) 94delATTG

SEQ ID NO 23: TGGACCGCATGACTCTATCA

SEQ ID NO 24: GGCTCTGGCTTCCTAGCAG

13.- Nuclear factor kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA) SNP en el 3'UTR (G/A)

SEQ ID NO 25: CCAGCCATCATTTCCACTCT

SEQ ID NO 26: CCTGCACCCTGTAATCCTGT

14.- Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) G2964A

SEQ ID NO 27: AGCCAATCCACTCCTTCCTT

SEQ ID NO 28: CATGCCCTAACCTGTGCTCT

15.- Interleucina 18 (IL18) TCA/TCC en el codon 35

SEQ ID NO 29: ATAGAGGCCGATTTCTTGG

SEQ ID NO 30: TTCTGGAACAGAAGATTGTCATT

16.- Mediterranean fever gene (MEFV) E474E

SEQ ID NO 31: GCTCCCCAGAAACAAACTGA

SEQ ID NO 32: CACCTGCAGAAGTTCCCAT

17.- Mediterranean fever gene (MEFV) Q476Q

SEQ ID NO 33: GCTCCCCAGAAACAAACTGA

SEQ ID NO 34: CACCTGCAGAAGTTCCCAT

18.- Mediterranean fever gene (MEFV) D510D

SEQ ID NO 35: AGGAAGCTGGAGCAGGTGTA

SEQ ID NO 36: CCATTCTGACTGGCACTCCT

19.- Mediterranean fever gene (MEFV) P588P

SEQ ID NO 37: TCTTCTGGAACGTGGTAGGG

SEQ ID NO 38: CTAAGCAGGGGGTTCCTTGT

20.- Discs, large homolog 5 (DLG5) 113G/A (R30Q)

SEQ ID NO 39: CGGCGCAATTACTACCTCTT

SEQ ID NO 40: CGTGAATGCCAGATGAACAC

21.- Colony stimulating factor receptor 1 (CSFR1) A2033T

SEQ ID NO 41: CTCCTTGCTTGCTTTCCTTG

SEQ ID NO 42: AGTAGGGATGGGATGGATGG

22.- Organic cation transporter (OCTN1, SLC22A4) 1672C/T (L503F)

SEQ ID NO 43: CAAGAGTGCCCAGAGAGTCC

SEQ ID NO 44: TTCTCCCTAAGGCATTTTGGT

23.- Organic cation transporter (OCTN2, SLC22A5) (-207G/C)

SEQ ID NO 45: CTTACATAGGGCGCACGAC

SEQ ID NO 46: AGTCCCGCTGCCTTCCTA

24.- Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly (A/G)

SEQ ID NO 47: CTCTAGAGGGCCTGTGCAAT

SEQ ID NO 48: TCAATGTGGGAACTGTCCA

25.- Toll-like receptor 4 (TLR4) Thr399Ile (C/T)

SEQ ID NO 49: CAACAAAGGTGGGAATGCTT

SEQ ID NO 50: TTTCAAATTGGAATGCTGGA

26.- Interleucina 1 beta (IL1 β) (-511)A/C

SEQ ID NO 51: AGGCAGAGAGGGAAGGAGAG

SEQ ID NO 52: AAACAGCGAGGGAGAACTG

27.- Superoxide dismutase 2 (SOD2) Ala16Val C/T

SEQ ID NO 53: GGCTGTGCTTTCTCGTCTTC

SEQ ID NO 54: GGTGACGTTCAAGTTGTTCA

28.- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) Pro12Ala C/G

SEQ ID NO 55: AGCAAACCCCTATTCCATGC

SEQ ID NO 56: TACATAAATGCCCCCACGTC

29.- Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) K469E (A/G)

SEQ ID NO 57: CTTGAGGGCACCTACCTCTG

SEQ ID NO 58: CATTATGACTGCGGCTGCTA

30.- Intercellular adhesion molecule 1 ICAM1 R241G

SEQ ID NO 59: GAATGAAATGCCCCAGAGAA

SEQ ID NO 60: ACTGTGGGGTTCAACCTCTG

31.- IBD5 locus IGR2060a_1

SEQ ID NO 61: CATACAGCACCTTCGGGTCT

SEQ ID NO 62: GGGCAGACTTTGGAACCTCAG

32.- IBD5 locus IGR2198a_1

SEQ ID NO 63: CATAATCAGGGGTTGCATGA

SEQ ID NO 64: CCAGAGACACTGGGACATCA

33.- IBD5 locus IGR3096a_1

SEQ ID NO 65: CCAAGGCCATGGTGTATAGC

SEQ ID NO 66: GTGCCACCTCCCCTCTCTAA

34.- Heat shock protein 70 (HSP70-2) 1267A/G Gln351Gln

SEQ ID NO 67: CTGTTTGAGGGCATCGACTT

SEQ ID NO 68: GGGGTTGATGCTCTTGTTC

35.- Toll-like receptor (TLR9) 1237C/T

SEQ ID NO 69: AGTCAAAGCCACAGTCCACA

SEQ ID NO 70: CCCTGTTGAGAGGGTGACAT

36.- Methylenetetrahydrofolate reductase (MTFHR) C677T Val222Ala

SEQ ID NO 71: GCCTCTCCTGACTGTCATCC

SEQ ID NO 72: TCACAAAGCGGAAGAATGTG

37.- Interleucina 4 (IL4) (-590)C/T

SEQ ID NO 73: ACCCAAAGTAGGCCTCACCT

SEQ ID NO 74: ACAGGTGGCATCTTGGAAC

38.- Interleucina 4 (IL4) (-34)C/T

SEQ ID NO 75: TCATTTTCCCTCGGTTTCAG

SEQ ID NO 76: AGAACAGAGGGGGAAGCAGT

39.- Mannan-binding lectin (MBL) (A/G) Gly54Asp

SEQ ID NO 77: TGGCAGCGTCTTACTCAGAA

SEQ ID NO 78: AGAACAGCCCAACACGTACC

40.- Mannan-binding lectin (MBL) (A/G) Gly57Glu

SEQ ID NO 79: GTTCCCCTTGACGTTCC

SEQ ID NO 80: TTGTTGGAAGAAAAGAATTGTCC

41.- Mannan-binding lectin (MBL) (C/T) Arg52Cys

SEQ ID NO 81: CAACCTCAGCCAGACAAGGT

SEQ ID NO 82: CAGCCACGTGATTGTCTAGG

42.- Angiotensinogen precursor (AGT) (-6)A/T

SEQ ID NO 83: GCTTCTGGCATCTGTCCTTC

SEQ ID NO 84: CCGGCTTACCTTCTGCTGTA

43.- Plasminogen activator inhibitor (PAI1) 4G/5G

SEQ ID NO 85: ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT

SEQ ID NO 86: AAAGTTGGGGACACACAAGC

44.- Tumor necrosis factor alpha (TNF α) (-857)C/T

SEQ ID NO 87: ACCACAGCAATGGGTAGGAG

SEQ ID NO 88: TGGTTTCAGTCTTGGCTTCC

45.- Tumor necrosis factor alpha (TNF α) (-308) G/A y (-238) G/A

SEQ ID NO 89: ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT

SEQ ID NO 90: AAAGTTGGGGACACACAAGC

46.- TPMT G238C

SEQ ID NO 91: AAAACTTTTGTGGGGATATGGA

SEQ ID NO 92: CCCTCTATTTAGTCATTTGAAAACA

47.- TPMT G460A

SEQ ID NO 93: CCAGGTCCACACATTCCTCT

SEQ ID NO 94: TTACCATTTGCGATCACCTG

48.- TPMT A719G

SEQ ID NO 95: CATCCATTACATTTTCAGGCTTT

SEQ ID NO 96: GGTTGATGCTTTTGAAGAACG

49.- MICA Trp14Gly y Thr24Ala

SEQ ID NO 97: GAGCCCCACAGTCTTCGTTA

SEQ ID NO 98: TTTCCGTTCCCTGTCAAGTC

50.- MICA Met129Val, Lys173Glu y Gly175Ser

SEQ ID NO 99: GCTCTTCCTCTCCCAAACC

SEQ ID NO 100: CACCATGGGGGGCACTGTTC

51.- SLC11A1=NRAMP1 in the promoter region (-377 a -222): alelo 7

SEQ ID NO 101: AACGAGGGGTCTTGGAAGTC

SEQ ID NO 102: GTGTTCTGTGCCTCCCAAGT

52.- CD14 (-159)T/C

SEQ ID NO 103: CACCCACCAGAGAAGGCTTA

SEQ ID NO 104: ATCACCTCCCCACCTCTCTT

53.- CD16A=FCGR3A G4985T Val158Phe

SEQ ID NO 105: CAAAAGCCCACTCAAAGAC

SEQ ID NO 106: CTTGAGTGATGGTGATGTTCA

54.- NR1I2 (-25385)C/T

SEQ ID NO 107: TCACCAGGGCTGGATTAAAG

SEQ ID NO 108: GCCTCTGGCAACAGTAAAGC

55.- TUCAN/CARD8/CARDINAL (T/A) Cys10Stop

SEQ ID NO 109: CTGCCGAGACGGGTATACAG

SEQ ID NO 110: GCAAATGTCTCCTGGGAATG

56.- IKBL +738T/C Cys224Arg

SEQ ID NO 111: TGAGTCCTTCTCAGCCTGGT

SEQ ID NO 112: CTCTCACGCAGCTCTTCCTC

57.- TNFRSF1B=TNFR2 G593A y T620C

SEQ ID NO 113: TTCTGGGCCAAGTTCCTCTA

SEQ ID NO 114: GGGGCAGGTCACAGAGAGT

58.- MEKK1 Asp643Asn

SEQ ID NO 115: CTGGAAAGTTTGCCAACCA

SEQ ID NO 116: ACCCAAAGTCTGGGCTCTTT

59.- HLA-DQ4 159G/A/C y 282C/T (DQB1*0401 y DQB1*0402)

SEQ ID NO 117: GTTTAAGGGCATGTGCTAC

SEQ ID NO 118: AGCTCCAACTGGTAGTTGTG

60.- HLA-DRB 109T/C, 119T/C/G/A, 122A/C/G/T, 129A/G, 161G/A/T, 175A/T/C/G, 184A/C/delA, 286C/A/T, 305C/G

SEQ ID NO 119: GCGCTTCGACAGCGACGTGGG

SEQ ID NO 120: CTCGCCGCTGCACTGTGAAG

61.- IL1RN 2018 T/C EXON 2 Y 2073 C/T INTRON 2

SEQ ID NO 121: ACAAGTTCTGGGGGACACAG

SEQ ID NO 122: ATTGCACCTAGGGTTTGTGC

62.- IL1B 3954 C/T TAQI

SEQ ID NO 123: TGTTCTTAGCCACCCCACTC

SEQ ID NO 124: GTGATCGTACAGGTGCATCG

Las PCR multiplex se llevan a cabo simultáneamente bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que permiten la amplificación específica de los fragmentos de los genes en los que pueda existir la variación génica a detectar. Finalizada la PCR multiplex se comprueba, en gel de agarosa, que ha tenido lugar reacción de amplificación.

A continuación, la muestra a hibridar (producto de la amplificación) se somete a fragmentación con una Dnasa y los productos resultantes del proceso de fragmentación se someten a una reacción de marcaje indirecto. Una transferasa terminal un nucleótido unido a un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, biotina, al final de estos pequeños fragmentos.

Antes de aplicar la muestra sobre el DNA-chip se procede a desnaturalizar la muestra mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos y, posteriormente, se añade el tampón de hibridación "ChipMap hybridisation Kit Buffers" (Ventana Medical System).

A continuación se procede a realizar las etapas de hibridación, escaneado del portaobjetos, cuantificación de la imagen e interpretación de los resultados, siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 1.3.2, 1.3.3, 1.3.4 y 1.3.5 del Ejemplo 1.

Ejemplo 4

Identificación del genotipo de 9 individuos para una variación génica humana asociada a IBD utilizando un DNA-chip

Extracción de DNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA por métodos convencionales de 9 individuos (pacientes) para caracterizar las variaciones génicas que presentaban estos individuos en relación a la variación génica A2033T del gen CSFR1 asociado con el desarrollo de la enfermedad de Crohn. El análisis genético mediante secuenciación de la región de interés determinó que 3 de los pacientes presentaban genotipo AA, otros 3 genotipo AT (heterocigotos) y los restantes 3, genotipo TT.

Diseño de las sondas

Se diseñaron 4 sondas para la detección de la variación génica A2033T CSFR1, cuyas secuencias nucleotídicas eran las siguientes:

AAACCCTTATTACCTAATCACAGC
GCTGTGATTAGGTGAATAAGGGTTT
AAACCCTTATTCTCCTAATCACAGC
GCTGTGATTAGGAGAATAAGGGTTT

Producción del DNA-chip para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a IBD

Los oligonucleótidos diseñados se imprimieron en el portaobjetos de cristal con un microarrayer tal y como se describe en el Ejemplo 3.2.

PCR y marcaje de la muestra

Se amplificó, mediante PCR multiplex utilizando cebadores específicos (SEQ ID NO 39 y SEQ ID NO 40), la región del gen CSFR1 que permitía el análisis de la variación génica de interés. El producto de la amplificación fue fragmentado y marcado tal y como se indica en el Ejemplo 1.3.1.

Hibridación de las muestras

La hibridación se llevó a cabo en una estación automática de hibridación, tal y como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1.3.2.

Análisis de los resultados

El portaobjetos se introdujo en el escáner y se procedió a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser (Ejemplo 1.3.3) y a cuantificar la imagen obtenida de la señal de los puntos donde se ha producido hibridación (Ejemplo 1.3.4).

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el algoritmo previamente descrito en el Ejemplo 1.3.5. El empleo de dicho algoritmo permitió caracterizar esta variación génica para los 9 pacientes con una coincidencia del 100% con respecto a la metodología de secuenciación.

La Figura 2 muestra la representación de los ratios 1 y 2 y permite caracterizar a los 9 pacientes.

Las funciones lineales para los tres grupos se exponen en la Tabla 8, en donde el número de réplicas de las 4 sondas usadas fue 10; "X" es el ratio 1; "Y" es el ratio 2; "0" se corresponde con el genotipo TT; "1" se corresponde con el genotipo AT; y "2" se corresponde con el genotipo AA.

TABLA 8

Coeficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	427,052	863,0399	1270,836
Y	8937,156	16216,35	21969,05
(Constante)	-1514,27	-5026,28	-9293,69

Un paciente con genotipo AA presentó unos ratios 1 y 2 de 0,26 y 0,32, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 10 réplicas de cada una de las 4 sondas.

ES 2 326 708 B1

Las funciones lineales obtenidas para 8 réplicas de cada una de las 4 sondas, se recogen en la Tabla 9.

TABLA 9

Coefficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	751,6869	1446,046	2065,363
Y	10369,47	18620,87	25204,48
(Constante)	-1813,36	-5892,27	-10868,5

El mismo paciente con genotipo AA presentó igualmente unos ratios 1 y 2 de 0,26 y 0,32, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 8 réplicas de cada una de las 4 sondas.

Las funciones lineales obtenidas para 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, se recogen en la Tabla 10.

TABLA 10

Coefficientes de la función de clasificación

CLASE	0	1	2
X	227,5676	531,6475	798,1821
Y	11864,89	21269,96	28789,95
(Constante)	-1992,22	-6460,62	-11889,5

El mismo paciente con genotipo AA presentó igualmente unos ratios 1 y 2 de 0,26 y 0,32, respectivamente. Al sustituir estos ratios en las funciones lineales, se observa que la función 2 presenta un valor absoluto mayor. De esta forma queda demostrado cómo el algoritmo proporcionado por esta invención clasifica perfectamente a los pacientes para 6 réplicas de cada una de las 4 sondas.

Ejemplo 5

Detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, utilizando un DNA-chip

5.1 Diseño del DNA-chip para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos

Se diseñó y fabricó un DNA-chip para detectar reacciones farmacológicas adversas que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos. Ejemplos ilustrativos de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos que pueden ser determinados utilizando este DNA-chip se mencionan en la Tabla 3.

En este caso concreto, el DNA-chip diseñado y fabricado consta de un soporte que contiene sobre su superficie una pluralidad de sondas que permiten la detección de las variaciones génicas mencionadas anteriormente. Estas sondas son capaces de hibridar con las secuencias diana amplificadas de genes asociados con reacciones adversas a fármacos cuya variación génica se desea estudiar. Las secuencias de DNA de cada una de las sondas utilizadas son las siguientes [en general, se indica el nombre del gen y la variación génica (cambio del aminoácido, cambio de nucleótido, “ins”: inserción, “del”: delección)]:

1.- Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) Arg389Gly (sondas para detectar el polimorfismo Arg389Gly en el gen del receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1))

AAGGCCTTCCAGCGACTGCTCTGCT

AAGGCCTTCCAGGGACTGCTCTGCT

AGCAGAGCAGTCGCTGGAAGGCCTT

AGCAGAGCAGTCCCTGGAAGGCCTT

5 **2.- Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) Arg16Gly**

CTGGCACCCAATGGAAGCCATGCGC

10 CTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGC

GCGCATGGCTTCCATTGGGTGCCAG

GCGCATGGCTTCTATTGGGTGCCAG

15

3.- Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) Gln27Glu

GACGTCACGCAGCAAAGGGACGAGG

20 GACGTCACGCAGGAAAGGGACGAGG

CCTCGTCCCTTTGCTGCGTGACGTC

25 CCTCGTCCCTTTCCTGCGTGACGTC

4.- Receptor dopaminérgico D3 (DRD3) Ser9Gly

30 AGTTCAGGTGGCCACTCAGCTGGCT

AGTTCAGGTGGCTACTCAGCTGGCT

AGCCAGCTGAGTGGCCACCTGAACT

35 AGCCAGCTGAGTAGCCACCTGAACT

5.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) His452Tyr

40 CTAGGAAAGCAGCATTCTGAAGAGG

CTAGGAAAGCAGTATTCTGAAGAGG

45 CCTCTTCAGAATGCTGCTTTCCTAG

CCTCTTCAGAATACTGCTTTCCTAG

50

6.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) T102C

GTTAGCTTCTCCGAGTTAAAGTCA

55 GTTAGCTTCTCCAGAGTTAAAGTCA

TGACTTTAACTCCGGAGAAGCTAAC

TGACTTTAACTCTGGAGAAGCTAAC

60

7.- Catecol-O-metiltransferasa (COMT) Val108Met

GATTTGCTGGCGTGAAGGACAAGG

65 GATTTGCTGGCATGAAGGACAAGG

CCTTGTCCTTCACGCCAGCGAAATC

CCTTGTCTTCATGCCAGCGAAATC

5

8.- Glutation S transferasa clase 1 (GSTP1) Ile105Val

CGCTGCAAATACATCTCCCTCATCT

10

CGCTGCAAATACGTCTCCCTCATCT

AGATGAGGGAGATGTATTTGCAGCG

AGATGAGGGAGACGTATTTGCAGCG

15

9.- Aducina 1 (ADD1) Gly460Trp

GCTTCCGAGGAAGGGCAGAATGGAA

20

GCTTCCGAGGAATGGCAGAATGGAA

TTCCATTCTGCCCTTCCTCGGAAGC

25

TTCCATTCTGCCATTCTCGGAAGC

10.- Proteína de reparación de DNA XRCC1 Arg399Gln

30

GGCTGCCCTCCCGGAGGTAAGGCCT

GGCTGCCCTCCCAGAGGTAAGGCCT

35

AGGCCTTACCTCCGGGAGGGCAGCC

AGGCCTTACCTCTGGGAGGGCAGCC

40

11.- Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) Ile462Val

ATCGGTGAGACCATGCCCCGCTGGG

ATCGGTGAGACCGTTGCCCGCTGGG

45

CCCAGCGGGCAATGGTCTCACCGAT

CCCAGCGGGCAACGGTCTCACCGAT

50

12.- Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) A1166C

TACCAAATGAGCATTAGCTACTTTT

55

TACCAAATGAGCCTTAGCTACTTTT

AAAAGTAGCTAATGCTCATTTGGTA

60

AAAAGTAGCTAAGGCTCATTTGGTA

13.- Receptor B2 de bradikina (BDKRB2) C-58T

65

TGCCATCTAACCATCTTTTCTTCTC

TGCCATCTAACCGTCTTTTCTTCTC

GAGAAGAAAAGATGGTTAGATGGCA
GAGAAGAAAAGACGGTTAGATGGCA

5

14.- Angiotensinógeno (AGT) Met235Thr

GCTGCTCCCTGACGGGAGCCAGTGT
GCTGCTCCCTGATGGGAGCCAGTGT
ACACTGGCTCCCGTCAGGGAGCAGC
ACACTGGCTCCCATCAGGGAGCAGC

10

15

15.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) C430T

AGCATTGAGGACCGTGTTCAAGAGG
AGCATTGAGGACTGTGTTCAAGAGG
CCTCTTGAACACGGTCCTCAATGCT
CCTCTTGAACACAGTCCTCAATGCT

20

25

16.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) A1075C

GTCCAGAGATACATTGACCTTCTCC
GTCCAGAGATACCTTGACCTTCTCC
GGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGAC
GGAGAAGGTCAAGGTATCTCTGGAC

30

35

40

17.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) 818delA

TGAAAATGGAGAAGGTAAAATGTAA
TGAAAATGGAGAGGTAAAATGTAAA
TTACATTTTACCTTCTCCATTTTCA
TTTACATTTTACCTCTCCATTTTCA

45

50

18.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) T1076C

TCCAGAGATACATTGACCTTCTCCC
TCCAGAGATACACTGACCTTCTCCC
GGGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGA
GGGAGAAGGTCAGTGTATCTCTGGA

55

60

19.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) C1080G

GAGATACATTGACCTTCTCCCCACC

65

GAGATACATTGAGCTTCTCCCCACC
 GGTGGGGAGAAGGTCAATGTATCTC
 GGTGGGGAGAAGCTCAATGTATCTC

20.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) H324P

TGCACATCCGGAGGTAGGATCATGA
 TGCACATCCGGATGTAGGATCATGA
 TCATGATCCTACCTCCGGATGTGCA
 TCATGATCCTACATCCGGATGTGCA

21.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) V136V

GCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGCGC
 GCGCTTCTCCGTCTCCACCTTGCGC
 GCGCAAGGTGGACACGGAGAAGCGC
 GCGCAAGGTGGAGACGGAGAAGCGC

22.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) V11M

GTGCCCCTGGCCGTGATAGTGGCCA
 GTGCCCCTGGCCATGATAGTGGCCA
 TGGCCACTATCACGGCCAGGGGCAC
 TGGCCACTATCATGGCCAGGGGCAC

23.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C882G

GCGGCGCCGCAACTGCAGAGGGAGG
 GCGGCGCCGCAAGTGCAGAGGGAGG
 CCTCCCTCTGCAGTTGCGGCGCCGC
 CCTCCCTCTGCACTTGCGGCGCCGC

24.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C1038T

GATCCTGGGTTTTCGGGCCGCGTTCC
 GATCCTGGGTTTTGGGCCGCGTTCC
 GGAACGCGGCCCGAAACCCAGGATC
 GGAACGCGGCCCAAAACCCAGGATC

25.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G4180C

CTTTCCTGGTGAGCCCATCCCCCTA
 CTTTCCTGGTGACCCCATCCCCCTA
 TAGGGGGATGGGCTCACCAGGAAAG
 TAGGGGGATGGGGTCACCAGGAAAG

26.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) A1847G

CTCCCACCCCCAGGACGCCCCTTTC
 CTCCCACCCCCAAGACGCCCCTTTC
 GAAAGGGGCGTCCTGGGGGTGGGAG
 GAAAGGGGCGTCTTGGGGGTGGGAG

27.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C-1584G

CTTGGAAGAACCCGGTCTCTACAAA
 CTTGGAAGAACCGGGTCTCTACAAA
 TTTGTAGAGACCGGGTTCTTCCAAG
 TTTGTAGAGACCCGGTTCTTCCAAG

28.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C100T

GCTGCACGCTACCCACCAGGCCCCC
 GCTGCACGCTACTCACCAGGCCCCC
 GGGGGCCTGGTGGGTAGCGTGCAGC
 GGGGGCCTGGTGAGTAGCGTGCAGC

29.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 138insT

GCTGGGCAACCTGCTGCATGTGGAC
 GCTGGGCAACCTTGCTGCATGTGGA
 GTCCACATGCAGCAGGTTGCCCAGC
 TCCACATGCAGCAAGGTTGCCCAGC

30.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C1023T

CTGTGCCCATCACCAGATCCTGGG
 CTGTGCCCATCATCCAGATCCTGGG
 CCCAGGATCTGGGTGATGGGCACAG
 CCCAGGATCTGGATGATGGGCACAG

31.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G1659A

AGGCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGC
 AGGCGCTTCTCCATGTCCACCTTGC
 GCAAGGTGGACACGGAGAAGCGCCT
 GCAAGGTGGACATGGAGAAGCGCCT

32.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 1707T/del

TCGCTGGAGCAGTGGGTGACCGAGG
 TCGCTGGAGCAGGGGTGACCGAGGA
 CCTCGGTCACCCACTGCTCCAGCGA
 TCCTCGGTCACCCCTGCTCCAGCGA

33.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G1758A

GCCAACCACTCCGGTGGGTGATGGG
 GCCAACCACTCCAGTGGGTGATGGG
 CCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGC
 CCCATCACCACTGGAGTGGTTGGC

34.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G1758T

GCCAACCACTCCGGTGGGTGATGGG
 GCCAACCACTCCTGTGGGTGATGGG
 CCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGC
 CCCATCACCCACAGGAGTGGTTGGC

35.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 1863ins9bp

CCCTTTCGCCCCAACGGTCTCTTGG
 CCCTTTCGCCCCTTTCGCCCCAACG
 CCAAGAGACCGTTGGGGCGAAAGGG
 CGTTGGGGCGAAAGGGGCGAAAGGG

36.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 1973insG

ACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGGA
 ACCTAGCTCAGGGAGGGACTGAAGG
 TCCTTCAGTCCCTCCTGAGCTAGGT
 CCTTCAGTCCCTCCCTGAGCTAGGT

37.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 2539delAACT

GGATGAGCTGCTAACTGAGCACAGG
GGATGAGCTGCTGAGCACAGGATGA
CCTGTGCTCAGTTAGCAGCTCATCC
TCATCCTGTGCTCAGCAGCTCATCC

38.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 2549A/del

CTAACTGAGCACAGGATGACCTGGG
CTAACTGAGCACGGATGACCTGGGA
CCCAGGTCATCCTGTGCTCAGTTAG
TCCCAGGTCATCCGTGCTCAGTTAG

39.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 2613delAGA

TGGCAGAGATGGAGAAGGTGAGAGT
TGGCAGAGATGGAGGTGAGAGTGGC
ACTCTCACCTTCTCCATCTCTGCCA
GCCACTCTCACCTCCATCTCTGCCA

40.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C2850T

GATGAGAACCTGCGCATAGTGGTGG
GATGAGAACCTGTGCATAGTGGTGG
CCACCACTATGCGCAGGTTCTCATC
CCACCACTATGCACAGGTTCTCATC

41.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G3183A

GAGATCGACGACGTGATAGGGCAGG
GAGATCGACGACATGATAGGGCAGG
CCTGCCCTATCACGTCGTCGATCTC
CCTGCCCTATCATGTCGTCGATCTC

42.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C3198G

ATAGGGCAGGTGCGGCGACCAGAGA
ATAGGGCAGGTGGGGCGACCAGAGA
TCTCTGGTCGCCGCACCTGCCCTAT

TCTCTGGTCGCCCCACCTGCCCTAT

5

43.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) T3277C

GCTTTGGGGACATCGTCCCCCTGGG

10

GCTTTGGGGACACCGTCCCCCTGGG

CCCAGGGGGACGATGTCCCCAAAGC

CCCAGGGGGACGGTGTCCCCAAAGC

15

44.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G4042A

TCCCCACAGGCCGCCGTGCATGCCT

20

TCCCCACAGGCCACCGTGCATGCCT

AGGCATGCACGGCGGCCTGTGGGGA

25

AGGCATGCACGGTGGCCTGTGGGGA

45.- Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 4125insGTGCCCACT

30

TCGGTGCCCACTGGACAGCCCCGGC

TCGGTGCCCACTGTGCCCACTGGAC

35

GCCGGGGCTGTCCAGTGGGCACCGA

GTCCAGTGGGCACAGTGGGCACCGA

40

46.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) A805T

GATTGCTTCCTGATCAAAATGGAGC

GATTGCTTCCTGTTCAAAATGGAGC

45

GCTCCATTTTGATCAGGAAGCAATC

GCTCCATTTTGAACAGGAAGCAATC

50

47.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) G416A

GGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGA

55

GGATGGGGAAGAAGAGCATTGAGGA

TCCTCAATGCTCCTCTTCCCCATCC

TCCTCAATGCTCTTCTTCCCCATCC

60

48.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) A1196G

TTAGGAAATTCTTTGTCATCATGTA

65

TTAGGAAATTCTCTGTCATCATGTA

TACATGATGACAAAGAATTTCTAA
TACATGATGACAGAGAATTTCTAA

5

49.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) C792G

TCGGGACTTTATCGATTGCTTCCTG
TCGGGACTTTATGGATTGCTTCCTG
CAGGAAGCAATCGATAAAGTCCCGA
CAGGAAGCAATCCATAAAGTCCCGA

10

15

50.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) T341C

TGCAGGTGACCATTGACGGCAGGAA
TGCAGGTGACCACTGACGGCAGGAA
TTCCTGCCGTCAATGGTCACCTGCA
TTCCTGCCGTCAAGTGGTCACCTGCA

20

25

51.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) C481T

GGAATCTGGTACCTGGACCAAATCA
GGAATCTGGTACTTGGACCAAATCA
TGATTTGGTCCAGGTACCAGATTCC
TGATTTGGTCCAAGTACCAGATTCC

30

35

40

52.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) A803G

AAGAAGTGCTGAAAAATATATTTAA
AAGAAGTGCTGAGAAATATATTTAA
TTAAATATATTTTTTCAGCACTTCTT
TTAAATATATTTCTCAGCACTTCTT

45

50

53.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) C282T

AGGGTATTTTTACATCCCTCCAGTT
AGGGTATTTTTATATCCCTCCAGTT
AACTGGAGGGATGTAAAAATACCCT
AACTGGAGGGATATAAAAAATACCCT

55

60

54.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G590A

CGCTTGAACCTCGAACAATTGAAGA

65

CGCTTGAACCTCAAACAATTGAAGA
TCTTCAATTGTTGAGGTTCAAGCG
TCTTCAATTGTTGAGGTTCAAGCG

55.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G857A

AACCTGGTGATGGATCCCTTACTAT
AACCTGGTGATGAATCCCTTACTAT
ATAGTAAGGGATCCATCACCAGGTT
ATAGTAAGGGATTTCATCACCAGGTT

56.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G191A

TAAGAAGAAACCGGGGTGGGTGGTG
TAAGAAGAAACCAGGGTGGGTGGTG
CACCACCCACCCCGGTTTCTTCTTA
CACCACCCACCCTGGTTTCTTCTTA

57.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G636A

AAGCACCCCCTGGATCCAGGTAAGG
AAGCACCCCCTGAATCCAGGTAAGG
CCTTACCTGGATCCAGGGGGTGCTT
CCTTACCTGGATTCAGGGGGTGCTT

58.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G681A

TGATTATTTCCCGGGAACCCATAAC
TGATTATTTCCAGGAACCCATAAC
GTTATGGGTTCCCGGGAATAATCA
GTTATGGGTTCTCGGGAATAATCA

59.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C680T

TTGATTATTTCCCGGGAACCCATAA
TTGATTATTTCTCGGGAACCCATAA
TTATGGGTTCCCGGGAATAATCAA
TTATGGGTTCCAGGAATAATCAA

60.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) A1G

GAGAAGGCTTCAATGGATCCTTTTG
GAGAAGGCTTCAGTGGATCCTTTTG
5 CAAAAGGATCCATTGAAGCCTTCTC
CAAAAGGATCCACTGAAGCCTTCTC

61.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) IVS5+2T>A

AAATGGAGAAGGTAAAATGTTAACA
15 AAATGGAGAAGGAAAAATGTTAACA
TGTTAACATTTTACCTTCTCCATTT
TGTTAACATTTTTCCTTCTCCATTT

62.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) T358C

25 AATGGAAAGAGATGGAAGGAGATCC
AATGGAAAGAGACGGAAGGAGATCC
GGATCTCCTTCCATCTCTTTCCATT
30 GGATCTCCTTCCGTCTCTTTCCATT

63.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G431A

35 GCATTGAGGACCGTGTTCAAGAGGA
GCATTGAGGACCATGTTCAAGAGGA
40 TCCTCTTGAACACGGTCCTCAATGC
TCCTCTTGAACATGGTCCTCAATGC

64.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C1297T

45 TTTTCAGGAAAACGGATTTGTGTGG
TTTTCAGGAAAATGGATTTGTGTGG
50 CCACACAAATCCGTTTTCTGAAAA
CCACACAAATCCATTTCTGAAAA

65.- Receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B) C2664T

60 GTTCATGGTTGCGGTGGGGGAGTTC
GTTCATGGTTGCAGTGGGGGAGTTC
65 GAACTCCCCCACC GCAACCATGAAC
GAACTCCCCCACTGCAACCATGAAC

66.- Glicoproteína P (ABCB1) C3435T

TGCTGCCCTCACAATCTCTTCCTGT
TGCTGCCCTCACGATCTCTTCCTGT
ACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCA
ACAGGAAGAGATCGTGAGGGCAGCA

67.- Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) A719G

TTGAAAAGTTATATCTACTTACAGA
TTGAAAAGTTATGTCTACTTACAGA
TCTGTAAGTAGATATAACTTTTCAA
TCTGTAAGTAGACATAACTTTTCAA

67.- Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) G238C

GTCCCCGGTCTGGAAACCTGCATAA
GTCCCCGGTCTGCAAACCTGCATAA
TTATGCAGGTTTCCAGACCGGGGAC
TTATGCAGGTTTGCAGACCGGGGAC

69.- 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T

TGTCTGCGGGAGCCGATTTTCATCAT
TGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCAT
ATGATGAAATCGGCTCCCGCAGACA
ATGATGAAATCGACTCCCGCAGACA

70.- Butirilcolinesterasa (BCHE) Asp70Gly

GTCAGAACATAGATCAAAGTTTTCC
GTCAGAACATAGGTCAAAGTTTTCC
GGAAAACCTTTGATCTATGTTCTGAC
GGAAAACCTTTGACCTATGTTCTGAC

71.- Butirilcolinesterasa (BCHE) Ala539Thr

AATATTGATGAAGCAGAATGGGAGT
AATATTGATGAAACAGAATGGGAGT
ACTCCCATTTCTGCTTCATCAATATT

ACTCCCATTTCTGTTTCATCAATATT

5 **72.- Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) A-392G**

GAGACAAGGGCAAGAGAGAGGCGAT

10 GAGACAAGGGCAGGAGAGAGGCGAT

ATCGCCTCTCTCTTGCCCTTGTCTC

ATCGCCTCTCTCCTGCCCTTGTCTC

15 **73.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-163C**

AGCTCTGTGGGCACAGGACGCATGG

20 AGCTCTGTGGGCCCAGGACGCATGG

CCATGCGTCCTGTGCCCACAGAGCT

25 CCATGCGTCCTGGGCCCACAGAGCT

74.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-3860G

30 CCTCCGCCTCTCGGATTCAAGCAAT

CCTCCGCCTCTCAGATTCAAGCAAT

35 ATTGCTTGAATCCGAGAGGCGGAGG

ATTGCTTGAATCTGAGAGGCGGAGG

75.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) G3534A

40 CAACCATGACCCGTGAGTACATACC

CAACCATGACCCATGAGTACATACC

GGTATGTACTCACGGGTCATGGTTG

45 GGTATGTACTCATGGGTCATGGTTG

76.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) C558A

50 GCCTGGGCACTTCGACCCTTACAAT

GCCTGGGCACTTAGACCCTTACAAT

55 ATTGTAAGGGTCGAAGTGCCCAGGC

ATTGTAAGGGTCTAAGTGCCCAGGC

60 **76.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G14690A**

GGAGAGCACTAAGAAGTTCCTAAAA

65 GGAGAGCACTAAAAAGTTCCTAAAA

TTTAGGAACTTCTTAGTGCTCTCC

TTTTAGGAACTTTTGTAGTGCTCTCC

5

78.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) C3699T

AGATATGGGACCCGTACACATGGAC

10

AGATATGGGACCTGTACACATGGAC

GTCCATGTGTACGGGTCCCATATCT

GTCCATGTGTACAGGTCCCATATCT

15

79.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G19386A

AAGGAGATTGATGCAGTTTTGCCCA

20

AAGGAGATTGATACAGTTTTGCCCA

TGGGCAAACTGCATCAATCTCCTT

25

TGGGCAAACTGTATCAATCTCCTT

80.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) T29753C

30

TTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAA

TTGGCATGAGGTCTGCTCTCATGAA

35

TTCATGAGAGCAAACCTCATGCCAA

TTCATGAGAGCAGACCTCATGCCAA

40

81.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G6986A

TTTTGTCTTTCAGTATCTCTTCCCT

TTTTGTCTTTCATATCTCTTCCCT

45

AGGGAAGAGATACTGAAAGACAAAA

AGGGAAGAGATATTGAAAGACAAAA

50

82.- Transportador de serotonina (SLC6A4) promoter 44bp deletion

ATCCCCCCTGCACCCCCCAGCATCC

55

ATCCCCCCTGCACCCCCCAGCATCCC

GGATGCTGGGGGGTGCAGGGGGGAT

GGGATGCTGGGGGTGCAGGGGGGAT

60

83.- Glutation S-transferasa M3 (GSTM3) delAGA (alelo*B)

65

AGGGAAAAGAAGAGGATACTTCTCT

AGGGAAAAGAAGATACTTCTCTATC

AGAGAAGTATCCTCTTCTTTTCCCT
GATAGAGAAGTATCTTCTTTTCCCT

5

84.- Glutation S-transferasa M1 (GSTM1) alelo nulo

CACACATTCTTGGCCTTCTGCAGAT
CACACATTCTTGACCTTCTGCAGAT
ATCTGCAGAAGGCCAAGAATGTGTG
ATCTGCAGAAGGTCAAGAATGTGTG

10

15

85.- Glutation S-transferasa n1 (GSTT1) alelo nulo

CTGCCTAGTGGGTTCACCTGCCCCAC
CTGCCTAGTGGGGTCACCTGCCCCAC
GTGGGCAGGTGAACCCACTAGGCAG
GTGGGCAGGTGACCCCACTAGGCAG

20

25

30

86.- Apolipoproteina E (APOE) Arg158Cys

GACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGT
ACACTGCCAGGCGCTTCTGCAGGTC
GACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGT
ACACTGCCAGGCACTTCTGCAGGTC

35

40

87.- Apolipoproteina E (APOE) Cys112Arg

ATGGAGGACGTGTGCGGCCGCGCTGG
CCAGGCGGCCGCGCACGTCCTCCAT
ATGGAGGACGTGCGCGGCCGCGCTGG
CCAGGCGGCCGCGCGCACGTCCTCCAT

45

50

88.- Tumor necrosis factor (TNF) G-308A

TTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCA
TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTTCA
TGAACCCCGTCCCCATGCCCCTCAA
TGAACCCCGTCCTCATGCCCCTCAA

55

60

65

89.- Interleucina 10 (IL10) G-1082A

GCTTCTTTGGGAAGGGGAAGTAGGG

GCTTCTTTGGGAGGGGGAAGTAGGG

CCCTACTTCCCCTTCCCAAAGAAGC

CCCTACTTCCCCTTCCCAAAGAAGC

*5.2 Producción del DNA-chip para el genotipado de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos**5.2.1 Impresión de los portaobjetos de vidrio*

Se imprimen o depositan las sondas capaces de detectar las variaciones génicas de interés en un portaobjetos de vidrio aminosilanizado empleando DMSO como tampón de impresión. La impresión se lleva a cabo con un *spotter* o impresor de oligonucleótidos en el que se lleva a cabo un control de la temperatura y la humedad.

5.2.2 Procesamiento de los portaobjetos de vidrio

La unión de las sondas al portaobjetos de vidrio se lleva a cabo mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado tal y como se ha descrito previamente (Ejemplo 1.2) manteniendo la humedad relativa durante el proceso de deposición entre el 40-50% y la temperatura en torno a 20°C.

*5.3 Validación de la utilidad clínica del DNA-chip para la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos utilizando un DNA-chip**5.3.1 Preparación de la muestra a hibridar*

Se extrae DNA del individuo a partir de una muestra de sangre de 300 µl aproximadamente mediante un protocolo de filtración.

Se amplifican todos los exones e intrones de interés mediante PCR multiplex utilizando las parejas de oligonucleótidos cebadores apropiadas. Prácticamente puede utilizarse cualquier pareja de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de fragmentos génicos en los que pueda existir la variación génica a detectar, ventajosamente, aquellas parejas que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar, mediante PCR multiplex, los fragmentos de los genes en los que pueden existir las variaciones génicas correspondientes asociadas a reacciones adversas a fármacos a detectar, se mencionan a continuación.

1.- Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) Arg389Gly (oligonucleótidos para amplificar el fragmento en el que puede existir el polimorfismo Arg389Gly en el gen del receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1)

SEQ ID NO 125: GCCTTCAACCCCATCATCTA

SEQ ID NO 126: CAGGCTCGAGTCGCTGTC

2.- Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) Arg16Gly y Gln27Glu (oligonucleótidos para amplificar el fragmento en el que puede existir el polimorfismo Arg16Gly en el gen *del receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2)*

SEQ ID NO 127: GCTCACCTGCCAGACTGC

SEQ ID NO 128: GCCAGGACGATGAGAGACAT

3.- Receptor dopaminérgico D3 (DRD3) Ser9Gly

SEQ ID NO 129: CGCAGTAGGAGAGGGCATAG

SEQ ID NO 130: CAAGCCCCAAAGAGTCTGAT

4.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) His452Tyr

SEQ ID NO 131: AGCAAGATGCCAAGACAACA

SEQ ID NO 132: CAGTGTGCCTTCCACAGTTG

5.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) T102C

SEQ ID NO 133: AGGAGAGACACGACGGTGAG

SEQ ID NO 134: CAAGTTCTGGCTTAGACATGGA

6.- Catecol-O-metiltransferasa (COMT) Val108Met

SEQ ID NO 135: GGGCCTACTGTGGCTACTCA

SEQ ID NO 136: CCCTTTTCCAGGTCTGACA

7.- Glutation S transferasa clase 1 (GSTP1) Ile105Val

SEQ ID NO 137: TGGTGGACATGGTGAATGAC

SEQ ID NO 138: GTGCAGGTTGTGTCTTGTCC

8.- Aducina 1 (ADD1) Gly460Trp

SEQ ID NO 139: TTGCTAGTGACGGTGATTGCG

SEQ ID NO 140: GAGACTGCAGCAAGGGTTTC

9.- Proteína de reparación de DNA XRCC1 Arg399Gln

SEQ ID NO 141: TGTCTCCCCTGTCTCATTCC

SEQ ID NO 142: ATTGCCCAGCACAGGATAAG

10.- Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) Ile462Val

SEQ ID NO 143: CTCACCCCTGATGGTGCTAT

SEQ ID NO 144: TTTGGAAGTGCTCACAGCAG

11.- Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) A1166C

SEQ ID NO 145: GAGAACATTCCTCTGCAGCAC

SEQ ID NO 146: TGTGGCTTTGCTTTGTCTTG

12.- Receptor B2 de bradikina (BDKRB2) C-58T

SEQ ID NO 147: GAGCAATGTCTGGCTTCTCC

SEQ ID NO 148: CCAGGGAGAGAACATTTGGA

13.- Angiotensinógeno (AGT) Met235Thr

SEQ ID NO 149: AGGCTGTGACAGGATGGAAG

SEQ ID NO 150: GGTGGTCACCAGGTATGTCC

14.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) C430T

SEQ ID NO 151: CCTGGGATCTCCCTCCTAGT

SEQ ID NO 152: CCACCCTTGGTTTTTCTCAA

15.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) A1075C, T1076C y C1080G

SEQ ID NO 153: CCACATGCCCTACACAGATG

SEQ ID NO 154: TCGAAAACATGGAGTTGCAG

16.- Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) 818delA

SEQ ID NO 155: CCGGGAACACACAACAAATTA

SEQ ID NO 156: CACAAATTCACAAGCAGTCACA

17.- Citocromo P450 2D6 31G>A, 100C>T y 138insT

SEQ ID NO 157: CAGGTATGGGGCTAGAAGCA

SEQ ID NO 158: ACCTGGTCGAAGCAGTATGG

18.- Citocromo P450 2D6 883G>C, 1023C>T, 1039C>T

SEQ ID NO 159: GATCCTGGCTTGACAAGAGG

SEQ ID NO 160: TCCCACGGAAATCTGTCTCT

19.- Citocromo P450 2D6 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>A y 1758G>T

SEQ ID NO 161: GTGGGGCTAATGCCTTCAT

SEQ ID NO 162: CTTCCCAGTTCCCGCTTT

20.- Citocromo P450 2D6 1846G>A y 1863ins9bp

SEQ ID NO 163: GTGGGTGATGGGCAGAAG

SEQ ID NO 164: GAGGGTCGTCGTA CT CGAAG

21.- Citocromo P450 2D6 1973insG

SEQ ID NO 165: AGCCGTGAGCAACGTGAT

SEQ ID NO 166: CTGCAGAGACTCCTCGGTCT

22.- Citocromo P450 2D6 2539delAACT, 2549A>del, 2613delAGA

SEQ ID NO 167: CAAGGTCCTACGCTTCCAAA

SEQ ID NO 168: GATGCACTGGTCCAACCTTT

23.- Citocromo P450 2D6 2850C>T y 2935A>C

SEQ ID NO 169: GGAACCCTGAGAGCAGCTT

SEQ ID NO 170: GGTGTCCCAGCAAAGTTCAT

24.- Citocromo P450 2D6 3183G>A, 3198C>G y 3277T>C

SEQ ID NO 171: GGAGGCAAGAAGGAGTGTCA

SEQ ID NO 172: CGATGTCACGGGATGTCATA

25.- Citocromo P450 2D6 4042G>A y 4125insGTGCCCACT

SEQ ID NO 173: GGAGTCTTGACAGGGGTATCA

SEQ ID NO 174: TCACCAGGAAAGCAAAGACA

26.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) C792G y A805T

SEQ ID NO 175: GAACACCAAGCATCACTGGA
SEQ ID NO 176: GATGTTTAGTGCAGGCCCATATA

27.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) G416A

SEQ ID NO 177: CTCACAACCTTGCGGAATTT
SEQ ID NO 178: CTTCAAATCTCCCTCCACCA

28.- Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) A1196G

SEQ ID NO 179: ACCTGCTGAGAAAGGCATGA
SEQ ID NO 180: TTCCAGGGCACAACCATAAT

29.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) 191G>A y 282C>T

SEQ ID NO 181: CCATGGAGTTGGGCTTAGAG
SEQ ID NO 182: CCATGCCAGTGCTGTATTTG

30.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) T341C

SEQ ID NO 183: TGGTGTCTCCAGGTCAATCA
SEQ ID NO 184: GGCTGATCCTTCCCAGAAAT

31.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) C481T

SEQ ID NO 185: TGACGGCAGGAATTACATTG
SEQ ID NO 186: TGTTTCTTCTTTGGCAGGAGA

32.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) A803G

SEQ ID NO 187: ACTGTTTGGTGGGCTTCATC
SEQ ID NO 188: AGGTTTGGGCACGAGATTT

33.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G590A

SEQ ID NO 189: CCTGCCAAAGAAGAAACACC
SEQ ID NO 190: GATGAAGCCCACCAAACAGT

34.- N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G857A

SEQ ID NO 191: ACTGTTTGGTGGGCTTCATC
SEQ ID NO 192: GGGTGATACATACACAAGGGTTT

35.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G636A

SEQ ID NO 193: ACCCTGTGATCCCACTTTCA

SEQ ID NO 194: TGTACTTCAGGGCTTGGTCA

36.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C680T y G681A

SEQ ID NO 195: CAACCAGAGCTTGGCATATTG

SEQ ID NO 196: TAAAGTCCCGAGGGTTGTTG

37.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) A1G

SEQ ID NO 197: TAGTGGGCCTAGGTGATTGG

SEQ ID NO 198: TTTCCAATCACTGGGAGAGG

38.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) IVS5+2T>A

SEQ ID NO 199: CAACCCTCGGGACTTTATTG

SEQ ID NO 200: CAAGCATTACTCCTTGACCTGTT

39.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) T358C

SEQ ID NO 201: CCCAGTGTGAGCTTCCTCTT

SEQ ID NO 202: GTCCTCAATGCTCCTCTTCC

40.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G431A

SEQ ID NO 203: GAATCGTTTTTCAGCAATGGAA

SEQ ID NO 204: GTATGTTCACCCACCCTTGG

41.- Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C1297T

SEQ ID NO 205: TCACCGAACAGTTCTTGCAAT

SEQ ID NO 206: GTCAAGGTCCTTTGGGTCAA

42.- Receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B) C2664T

SEQ ID NO 207: GCAGGATGTTGGAGTGTGTG

SEQ ID NO 208: GCAATTATTGGTGGGAGAGTG

43.- Glicoproteína P (ABCB1) C3435T

SEQ ID NO 209: TGCTCCCAGGCTGTTTATTT

SEQ ID NO 210: TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG

44.- Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) A719G

SEQ ID NO 211: GGTTGATGCTTTTGAAGAACG

SEQ ID NO 212: CATCCATTACATTTTCAGGCTTT

45.- Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) G238C

SEQ ID NO 213: AAAACTTTTGTGGGGATATGGA

SEQ ID NO 214: AACCTCTATTTAGTCATTTGAAAACA

46.- 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T

SEQ ID NO 215: TCCCTGTGGTCTCTTCATCC

SEQ ID NO 216: CAAAGCGGAAGAATGTGTCA

47.- Butirilcolinesterasa (BCHE) Asp70Gly

SEQ ID NO 217: AAAGCCACAGTCTCTGACCAA

SEQ ID NO 218: GGTGCTGGAATCCATACATTT

48.- Butirilcolinesterasa (BCHE) Ala539Thr

SEQ ID NO 219: GAGAAAATGGCTTTTGTATTGG

SEQ ID NO 220: TGATTTTCCAGTCCATCATGT

49.- Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) A-392G

SEQ ID NO 221: CAGGGGAGGAAATGGTTACA

SEQ ID NO 222: TGGAGCCATTGGCATAAAAT

50.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-163C

SEQ ID NO 223: AGAGAGCCAGCGTTCATGTT

SEQ ID NO 224: CTGATGCGTGTTCTGTGCTT

51.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-3860G

SEQ ID NO 225: GAGTGCAGTGGTGCGATCT

SEQ ID NO 226: TGAGGCCAGGAGTTCAAGAC

52.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) G3534A

SEQ ID NO 227: GGTGGAGGTAGGAGCAACAC

SEQ ID NO 228: CTGCTGAACCTGCACACATT

53.- Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) C558A

SEQ ID NO 229: CCTCATCCTCCTGCTACCTG

SEQ ID NO 230: GAGGCAGTCTCCACGAACTC

54.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G14690A

SEQ ID NO 231: GCCTACAGCATGGATGTGA

SEQ ID NO 232: TGGAATTGTACCTTTTAAGTGGA

55.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) C3699T

SEQ ID NO 233: TCACAATCCCTGTGACCTGA

SEQ ID NO 234: GGGGCATTTTTACTGATGGA

56.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G19386A

SEQ ID NO 235: TGAAACCACCAGCAGTGTTT

SEQ ID NO 236: AAAATTCTCCTGGGGAGTGG

57.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) T29753C

SEQ ID NO 237: ACCCCTAACATGTAACCTCTGTGG

SEQ ID NO 238: TTTGAAGGAGAAGTTCTGAAGGA

58.- Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G6986A

SEQ ID NO 239: CACCCAGCTTAACGAATGCT

SEQ ID NO 240: CCAGGAAGCCAGACTTTGAT

59.- Transportador de serotonina (SLC6A4) promoter 44bp deletion

SEQ ID NO 241: ACCCCTAATGTCCCTACTGC

SEQ ID NO 242: GGAGATCCTGGGAGAGGTG

60.- Glutation S-transferasa M3 (GSTM3) delAGA (alelo*B)

SEQ ID NO 243: TTCTGGGGAAATTCTCATGG

SEQ ID NO 244: TCAGGTTTGGGAACTCATCC

61.- Glutation S-transferasa M1 (GSTM1) alelo nulo

SEQ ID NO 245: ATGGTTTGCAGGAAACAAGG

SEQ ID NO 246: AAAGCGGGAGATGAAGTCCT

62.- Glutation S-transferasa n1 (GSTT1) alelo nulo

SEQ ID NO 247: GGCAGCATAAGCAGGACTTC

SEQ ID NO 248: GTTGCTCGAGGACAAGTTCC

63.- Apolipoproteina E (APOE) Arg158Cys y Cys112Arg

SEQ ID NO 249: GCACGGCTGTCCAAGGA

SEQ ID NO 250: GCGGGCCCCCGGCCTGGT

64.- Tumor necrosis factor (TNF) G-308A

SEQ ID NO 251: ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT

SEQ ID NO 252: AAAGTTGGGGACACACAAGC

65.- Interleucina 10 (IL10) G-1082A

SEQ ID NO 253: CACACACACACACAAATCCAAG

SEQ ID NO 254: GATGGGGTGGGAAGAAGTTGA

Las PCR multiplex se llevan a cabo simultáneamente bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que permiten la amplificación específica de los fragmentos de los genes en los que pueda existir la variación génica a detectar. Finalizada la PCR multiplex se comprueba, en gel de agarosa, que ha tenido lugar reacción de amplificación.

A continuación, la muestra a hibridar (producto de la amplificación) se somete a fragmentación con una DNAsa y los productos resultantes del proceso de fragmentación se someten a una reacción de marcaje indirecto. Una transferasa terminal incorpora un nucleótido unido a un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, biotina, al final de estos pequeños fragmentos.

Antes de aplicar la muestra sobre el DNA-chip se procede a desnaturalizar la muestra mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos y, posteriormente, se añade el tampón de hibridación "ChipMap hybridisation Kit Buffers" (Ventana Medical System).

A continuación se procede a realizar las etapas de hibridación, escaneado del portaobjetos, cuantificación de la imagen e interpretación de los resultados, siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 1.3.2, 1.3.3, 1.3.4 y 1.3.5 del Ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto, que comprende:

- extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
- amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
- someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
- poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;
- introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
- genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles.

2. Método según la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es DNA o RNA.

3. Método según la reivindicación 2, en donde dicho ácido nucleico es RNA o un fragmento del mismo que se utiliza como molde para obtener el correspondiente cDNA.

4. Método según la reivindicación 1, en donde tras la etapa de hibridación se procede a una reacción de amplificación mediante "primer extensión" o a una reacción de ligación mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos ("OLA").

5. Método según la reivindicación 1, en el que cada una de dichas 4 sondas para la detección de cada variación génica presentan la base a interrogar en la posición central y tiene una longitud comprendida entre 19 y 27 nucleótidos.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho algoritmo es un algoritmo basado en la obtención de tres Funciones Lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

AB Función 2

BB Función 3

en donde

AA representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación génica A;

AB representa el genotipo de un sujeto heterocigoto para las variación génica A y B; BB representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación génica B;

Función 1 es la Función Lineal que caracteriza a los pacientes con el genotipo AA y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

Función 2 es la Función Lineal para el genotipo AB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

ES 2 326 708 B1

Función 3 es la Función Lineal para el genotipo BB y consiste en una: combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

en donde dichas combinaciones lineales están formadas por constantes y cofactores que acompañan a las variables ratio 1 y ratio 2;

Ratio 1 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación génica A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación génica A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 2 que detecta la variación génica B y puede calcularse mediante la ecuación:

$$\text{Ratio 1} = \frac{\text{Intensidad media sonda 1}}{\text{Intensidad media sonda 1} + \text{Intensidad media sonda 2}}$$

Ratio 2 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación génica A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta variación génica A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 4 que detecta variación génica B y puede calcularse mediante la ecuación:

$$\text{Ratio 2} = \frac{\text{Intensidad media sonda 3}}{\text{Intensidad media sonda 3} + \text{Intensidad media sonda 4}}$$

7. Método según la reivindicación 6, en el que el genotipado de dichas variaciones génicas comprende:

- en primer lugar, restar a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas su propio ruido de fondo;
- a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada una de las 4 sondas que se han usado para caracterizar cada mutación;
- el valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes;
- conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas se calculan los ratios 1 y 2, según las ecuaciones definidas en la reivindicación anterior y dichos ratios se sustituyen en tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles AA, AB y BB definidos en dicha reivindicación anterior; y
- la función que presenta un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el sujeto en relación con la variación génica analizada.

8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que la obtención de dichas funciones lineales se lleva a cabo mediante el análisis de 5 pacientes por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica AA, AB, BB; con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 pacientes, los cuales sirven como variables de clasificación de los tres grupos en un análisis discriminante; y, en caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, los oligonucleótidos son rediseñados.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que los ratios 1 y 2 están dentro del rango de los ratios usados para construir los grupos, la intensidad de fluorescencia media de las 4n réplicas (donde "n" es 6, 8 ó 10) con respecto al ruido de fondo es mayor de 5, determinado mediante el empleo de un escáner de fluorescencia confocal, y el coeficiente de variación de las réplicas está por debajo de 0,25.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que, cuando se utiliza un escáner de fluorescencia confocal:

- a) la relación de la intensidad frente al ruido de fondo de todas las sondas depositadas en el soporte está por encima de 15;
- b) la media de todos los ratios es superior a 0,6;
- c) el coeficiente de variación de todas las réplicas es inferior a 0,25;
- d) el ratio del control externo es superior a 0,6; y
- e) el control negativo es igual o inferior a 3 veces el ruido de fondo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el genotipado simultáneo, sensible, específico y reproducible de múltiples variaciones génicas humanas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), o asociadas con antígenos eritrocitarios, o asociadas con reacciones adversas a fármacos.

5 12. Un DNA-chip de genotipado adecuado para la puesta en práctica de un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas útiles para detectar variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes, en donde, por cada variación
10 génica a detectar, hay 4 sondas, de las cuales 2 sondas detectan una primera variación génica y las otras 2 detectan una segunda variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas, depositadas siguiendo una patrón determinado y distribuidas homogéneamente entre las 2 áreas que constituyen el DNA-chip pero no agrupadas por variación génica a detectar, y, opcionalmente, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de hibridación.

15 13. Un kit adecuado para la puesta en práctica de un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:

- 20 - un DNA-chip según cualquiera de la reivindicación 12;
- un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende el empleo de un algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método; y, opcionalmente,
- 25 - un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación del método de la invención.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 708 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Progenika Biopharma, S.A.	
5	<120> Métodos y productos para el genotipado <i>in vitro</i>	
	<160> 254	
10	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
20	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen “multidrug resistance protein MDR-1” en el que puede existir el polimorfismo G2677T/C ala893Ser/Thr	
	<400> 1	
25	gcatagtaag cagtagggag taaca	25
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
35	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen “multidrug resistance protein MDR-1” en el que puede existir el polimorfismo G2677T/C ala893Ser/Thr	
	<400> 2	
40	tgcaatagca ggagttgttg a	21
	<210> 3	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
50	<223> oligo 1 oligo 1 para amplificar el fragmento del gen “multidrug resistance protein MDR-1” en el que puede existir el polimorfismo C3435T	
	<400> 3	
55	tgctcccagg ctgtttattt	20
	<210> 4	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen “multidrug resistance protein MDR-1” en el que puede existir el polimorfismo C3435T	

ES 2 326 708 B1

	<400> 4	
	tgtttcagc tgcttgatgg	20
5	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CARD15 en el que puede existir el polimorfismo R702W	
15	<400> 5	
	agatcacagc agccttcctg	20
20	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CARD15 en el que puede existir el polimorfismo R702W	
30	<400> 6	
	ggatggagtg gaagtgccttg	20
35	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CARD15 en el que puede existir el polimorfismo G908R	
45	<400> 7	
	actgcagagg gaggaggact	20
50	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen CARD15 en el que puede existir el polimorfismo G908R	
60	<400> 8	
	ccacctcaag ctctggtgat	20
65	<210> 9	
	<211> 20	

ES 2 326 708 B1

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CARD15 en el que puede existir el polimorfismo 1007insC	
	<400> 9	
10	actggctaac tctgcagtc	20
	<210> 10	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CARD15 en el que puede existir el polimorfismo 1007insC	
	<400> 10	
25	gaaaaactga ggttcggaga	20
	<210> 11	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen microsomal epoxide hydrolase (EPXH1) en el que puede existir el polimorfismo T612C Y113H	
40	<400> 11	
	ctctcaactt ggggtcctga	20
45	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen microsomal epoxide hydrolase (EPXH1) en el que puede existir el polimorfismo T612C Y113H	
55	<400> 12	
	ggcgttttgc aaacatacct	20
60	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	

ES 2 326 708 B1

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) en el que puede existir el polimorfismo (-2518)G/A

<400> 13

ccagccaaat gcattctctt

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) en el que puede existir el polimorfismo (-2518)G/A

<400> 14

cacaggggaag gtgaagggtta

20

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo (-1082)G/A

<400> 15

caactggctc cccttacctt

20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo (-1082)G/A

<400> 16

atggaggctg gataggaggt

20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo G15R G43A

ES 2 326 708 B1

	<400> 17	
	agaggcctcc ctgagcttac	20
5	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo G15R G43A	
	<400> 18	
20	tctcggagat ctcgaagcat	20
	<210> 19	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 16 (IL16) en el que puede existir el polimorfismo (-295)T/C	
	<400> 19	
35	aactgaagca atgccagtcc	20
	<210> 20	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 16 (IL16) en el que puede existir el polimorfismo (-295)T/C	
50	<400> 20	
	cagagccagc acctcctaga	20
55	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen fas ligand en el que puede existir el polimorfismo(-843)C/T	
65	<400> 21	
	cttgagccca ggagtttgag	20

ES 2 326 708 B1

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen fas ligand en el que puede existir el polimorfismo(-843)C/T
 10 <400> 22

 atcagaggct gcaaaccagt 20
 15
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen nuclear factor kappa-B (NFKB1) en el que puede existir el
 25 polimorfismo 94delATTG

 <400> 23

 30 tggaccgcat gactctatca 20

 <210> 24
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 40 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen nuclear factor kappa-B (NFKB1) en el que puede existir el
 polimorfismo 94delATTG

 <400> 24
 45
 ggctctggct tcctagcag 19

 <210> 25
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen nuclear factor kappa-B inhibidor alpha (NFKBIA) en el que puede
 existir el polimorfismo SNP en el 3'UTR (G/A)
 60 <400> 25

 ccagccatca ttccactct 20

 65 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 326 708 B1

	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
5	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen nuclear factor kappa-B inhibitor alpha (NFKBIA) en el que puede existir el polimorfismo SNP en el 3'UTR (G/A)	
	<400> 26	
10	cctgcaccct gtaatcctgt	20
	<210> 27	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen signal transducer and activator of transcription 6(STAT6) en el que puede existir el polimorfismo G2964A	
25	<400> 27	
	agccaatcca ctccttcctt	20
30	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen del signal transducer and activator of transcription 6(STAT6) en el que puede existir el polimorfismo G2964A	
40	<400> 28	
	catgccctaa cctgtgctct	20
45	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 18 (IL18) en el que puede existir el polimorfismo TCA/TCC en el codon 35	
55	<400> 29	
60	atagaggccg atttccttgg	20
	<210> 30	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 326 708 B1

<220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 18 (IL18) en el que puede existir el polimorfismo TCA/TCC en el codon 35
 5 <400> 30
 ttctggaaca gaagattgtc att 23
 10 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo E474E
 20 <400> 31
 gctccccaga aacaaactga 20
 25 <210> 32
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 35 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo E474E
 <400> 32
 40 cacctgcaga agttccatt 20
 <210> 33
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo Q476Q
 55 <400> 33
 gctccccaga aacaaactga 20
 60 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220> ADN sintético

ES 2 326 708 B1

	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo Q476Q	
5	<400> 34 cacctgcaga agttccatt	20
10	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> ADN sintético <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo D510D	
20	<400> 35 aggaagctgg agcaggtgta	20
25	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> ADN sintético <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo D510D	
35	<400> 36 ccattctgac tggcactcct	20
40	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo P588P	
50	<400> 37 tcttctggaa cgtggtaggg	20
55	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mediterranean fever gene (MEFV) en el que puede existir el polimorfismo P588P	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 38

ctaagcaggg ggttccttgt

20

5

<210> 39

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen discs, large homolog 5 (DLG5) en el que puede existir el polimorfismo 113G/A (R30Q)

<400> 39

20 cggcgcaatt actacctctt

20

<210> 40

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen discs, large homolog 5 (DLG5) en el que puede existir el polimorfismo 113G/A (R30Q)

<400> 40

35 cgtgaatgcc agatgaacac

20

<210> 41

40 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen colony stimulating factor receptor 1(CSFR1) en el que puede existir el polimorfismo A2033T

50 <400> 41

ctccttgctt gcttccttg

20

55 <210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen colony stimulating factor receptor 1(CSFR1) en el que puede existir el polimorfismo A2033T

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 42	
	agtagggatg ggatggatgg	20
5	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen organic cation transporter (OCTN1, SLC22A4) en el que puede existir el polimorfismo 1672C/T (L503F)	
	<400> 43	
20	caagagtgcc cagagagtc	20
	<211> 44	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen organic cation transporter (OCTN1, SLC22A4) en el que puede existir el polimorfismo 1672C/T (L503F)	
	<400> 44	
35	ttctccctaa ggcattttgg t	21
	<210> 45	
40	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen organic cation transporter (OCTN2, SLC22A5) en el que puede existir el polimorfismo (-207G/C)	
50	<400> 45	
	cttacatagg ggcacgac	19
55	<210> 46	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen organic cation transporter (OCTN2, SLC22A5) en el que puede existir el polimorfismo (-207G/C)	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 46	
	agtcctcgctg ccttccta	18
5	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen toll-like receptor 4 (TLR4) en el que puede existir el polimorfismo Asp299Gly (A/G)	
	<400> 47	
20	ctctagaggg cctgtgcaat	20
	<210> 48	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen toll-like receptor 4 (TLR4) en el que puede existir el polimorfismo Asp299Gly (A/G)	
	<400> 48	
35	tcaatgtggg aaactgtcca	20
	<210> 49	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen toll-like receptor 4 (TLR4) en el que puede existir el polimorfismo Thr399Ile (C/T)	
50	<400> 49	
	caacaaaggt gggaatgctt	20
55	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen toll-like receptor 4 (TLR4) en el que puede existir el polimorfismo Thr399Ile (C/T)	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 50	
	tttcaaattg gaatgctgga	20
5	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 1 beta (IL1 β) en el que puede existir el polimorfismo (-511)A/C	
	<400> 51	
20	aggcagagag ggaaggagag	20
	<210> 52	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 1 beta (IL1 β) en el que puede existir el polimorfismo (-511)A/C	
	<400> 52	
35	aaacagcgag ggagaaactg	20
	<210> 53	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen superoxide dismutase 2 (SOD2) en el que puede existir el polimorfismo Ala16Val C/T	
50	<400> 53	
	ggctgtgctt tctcgtcttc	20
55	<211> 54	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen superoxide dismutase 2 (SOD2) en el que puede existir el polimorfismo Ala16Val C/T	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 54

ggtgacgttc aggttggtca

20

5

<210> 55

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) en el que puede existir el polimorfismo Pro12Ala C/G

<400> 55

20 agcaaacccc tattccatgc

20

<210> 56

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) en el que puede existir el polimorfismo Pro12Ala C/G

<400> 56

35 tacataaatg cccccacgtc

20

<210> 57

40 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen intercellular adhesion molecule 1(ICAM1) en el que puede existir el polimorfismo K469E (A/G)

50 <400> 57

cttgagggca cctacctctg

20

55 <210> 58

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen intercellular adhesion molecule 1(ICAM1) en el que puede existir el polimorfismo K469E (A/G)

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 58	
	cattatgact gcggctgcta	20
5	<210> 59	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen intercellular adhesion molecule 1(ICAM1) en el que puede existir el polimorfismo R241G	
	<400> 59	
20	gaatgaaatg ccccagagaa	20
	<210> 60	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen intercellular adhesion molecule 1(ICAM1) en el que puede existir el polimorfismo R241G	
	<400> 60	
35	actgtggggt tcaacctctg	20
	<210> 61	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen IBD5 locus en el que puede existir el polimorfismo IGR2060a_1	
	<400> 61	
50	catacagcac cttegggtct	20
	<210> 62	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen IBD5 locus en el que puede existir el polimorfismo IGR2060a_1	
	<400> 62	
65	gggcagactt tggaactcag	20

ES 2 326 708 B1

<210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen IBD5 locus en el que puede existir el polimorfismo IGR2198a_1
 10 <400> 63

 cataatcagg ggttgcata 20
 15
 <211> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen IBD5 locus en el que puede existir el polimorfismo IGR2198a_1
 25 <400> 64

 ccagagacac tgggacatca 20
 30
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen IBD5 locus en el que puede existir el polimorfismo IGR3096a_1
 40 <400> 65

 ccaaggccat ggtgtatagc 20
 45
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen IBD5 locus en el que puede existir el polimorfismo IGR3096a_1
 55 <400> 66

 gtgccacctc ccattcttaa 20
 60
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 326 708 B1

<220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen heat shock protein 70 (HSP70-2) en el que puede existir el polimorfismo 1267A/G Gln351Gln
 5 <400> 67
 ctgtttgagg gcatcgactt 20
 10 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen heat shock protein 70 (HSP70-2) en el que puede existir el polimorfismo 1267A/G Gln351Gln
 20 <400> 68
 ggggttgatg ctctgttca 20
 25 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 35 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen toll-like receptor (TLR9) en el que puede existir el polimorfismo 1237C/T
 <400> 69
 40 agtcaaagcc acagtccaca 20
 <210> 70
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 50 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen toll-like receptor (TLR9) en el que puede existir el polimorfismo 1237C/T
 <400> 70
 55 ccctgttgag agggtgacat 20
 <210> 71
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220> ADN sintético

ES 2 326 708 B1

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen methylenetetrahydrofolate reductase (MTFHR) en el que puede existir el polimorfismo C677T Val222Ala

5 <400> 71

gcctctcctg actgtcatcc 20

<210> 72

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen methylenetetrahydrofolate reductase (MTFHR) en el que puede existir el polimorfismo C677T Val222Ala

20 <400> 72

tcacaaagcg gaagaatgtg 20

25 <210> 73

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 4 (IL4) en el que puede existir el polimorfismo (-590) C/T

35 <400> 73

acccaaacta ggcctcacct 20

40 <211> 74

<211> 20

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

50 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 4 (IL4) en el que puede existir el polimorfismo (-590) C/T

<400> 74

55 acaggtggca tcttgaaac 20

<210> 75

<211> 20

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

65 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 4 (IL4) en el que puede existir el polimorfismo (-34) C/T

ES 2 326 708 B1

<400> 75

tcattttccc tcggtttcag 20

5 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 4 (IL4) en el que puede existir el polimorfismo (-34) C/T

15 <400> 76

20 agaacagagg gggaagcagt 20

<210> 77
 <211> 20
 <212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mannan-binding lectin (MBL) (A/G) en el que puede existir el polimorfismo Gly54Asp

<400> 77

35 tggcagcgtc ttactcagaa 20

<210> 78
 <211> 20
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mannan-binding lectin (MBL) (A/G) en el que puede existir el polimorfismo Gly54Asp

45 <400> 78

50 agaacagccc aacacgtacc 20

<210> 79
 <211> 18
 <212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

60 <220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mannan-binding lectin (MBL) (A/G) en el que puede existir el polimorfismo (a/g) Gly57Glu

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 79	
	gttccccttg cacgttcc	18
5	<210> 80	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mannan-binding lectin (MBL) (A/G) en el que puede existir el polimorfismo (A/G) Gly57Glu	
	<400> 80	
20	ttgttgaag aaaagaattg tcc	23
	<210> 81	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen mannan-binding lectin (MBL) en el que puede existir el polimorfismo (C/T) Arg52Cys	
	<400> 81	
35	caacctcagc cagacaaggt	20
	<210> 82	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen mannan-binding lectin (MBL) en el que puede existir el polimorfismo (C/T) Arg52Cys	
50	<400> 82	
	cagccacgtg attgtctagg	20
55	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen angiotensinogen precursor (AGT) en el que puede existir el polimorfismo(-6)A/T	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 83	
	gcttctggca tctgtccttc	20
5	<211> 84	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen angiotensinogen precursor (AGT) en el que puede existir el polimorfismo(-6)A/T	
	<400> 84	
20	ccggetttacc ttctgctgta	20
	<210> 85	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen plasminogen activator inhibitor (PAI1) en el que puede existir el polimorfismo 4G/5G	
	<400> 85	
35	acctggtccc caaaagaaat	20
	<210> 86	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen plasminogen activator inhibitor (PAI1) en el que puede existir el polimorfismo 4G/5G	
50	<400> 86	
	aaagttgggg acacacaagc	20
55	<210> 87	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor alpha (tnfa) en el que puede existir el polimorfismo (-857)C/T	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 87

accacagcaa tgggtaggag

20

5

<210> 88

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor alpha (tnf α) en el que puede existir el polimorfismo (-857)C/T

<400> 88

20 tggtttcagt ctggcttcc

20

<210> 89

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor alpha (tnf α) en el que puede existir el polimorfismo (-308) G/A y (-238) G/A

<400> 89

35 acctggtccc caaaagaaat

20

<210> 90

40 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor alpha (tnf α) en el que puede existir el polimorfismo (-308) G/A y (-238) G/A

50 <400> 90

aaagtgggg acacacaagc

20

55 <210> 91

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen TPMT en el que puede existir el polimorfismo G238C

65 <400> 91

aaaacttttg tggggatatg ga

22

ES 2 326 708 B1

	<210> 92	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen TPMT en el que puede existir el polimorfismo G238C	
10	<400> 92	
	ccctctattt agtcatttga aaaca	25
15	<210> 93	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen TPMT en el que puede existir el polimorfismo G460A	
25	<400> 93	
	ccaggtccac acattcctct	20
30	<211> 94	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen TPMT en el que puede existir el polimorfismo G460A	
40	<400> 94	
	ttaccatttg cgtcacctg	20
45	<210> 95	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen TPMT en el que puede existir el polimorfismo A719G	
55	<400> 95	
	catccattac attttcaggc ttt	23
60	<210> 96	
	<211> 21	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 326 708 B1

<220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen TPMT en el que puede existir el polimorfismo A719G
 5 <400> 96
 ggttgatgct ttgaagaac g 21
 10 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen MICA en el que puede existir el polimorfismo Trp14Gly y Thr24Ala
 20 <400> 97
 gagccccaca gtcttcgta 20
 25 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen MICA en el que puede existir el polimorfismo Trp14Gly y Thr24Ala
 35 <400> 98
 ttccgttcc ctgtcaagtc 20
 40 <210> 99
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 50 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen MICA en el que puede existir el polimorfismo Met129Val, Lys173Glu y Gly175Ser
 <400> 99
 55 gctcttctc tcccaaaacc 20
 <210> 100
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen MICA en el que puede existir el polimorfismo Met129Val, Lys173Glu y Gly175Ser

ES 2 326 708 B1

	<400> 100	
	caccatgggg ggcactgttc	20
5	<210> 101	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen SLC11A1=NRAMP1 en el que puede existir el polimorfismo en la región del promotor (-377 a -222): alelo 7	
	<400> 101	
20	aacgaggggt cttggaactc	20
	<210> 102	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen SLC11A1=NRAMP1 en el que puede existir el polimorfismo en la región del promotor (-377 a -222): alelo 7	
	<400> 102	
35	gtgttctgtg cctcccaagt	20
	<210> 103	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CD14 en el que puede existir el polimorfismo (-159)T/C	
	<400> 103	
50	caccaccag agaaggctta	20
	<210> 104	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen CD14 en el que puede existir el polimorfismo (-159)T/C	
	<400> 104	
65	atcacctccc cacctctctt	20

ES 2 326 708 B1

<210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen CD16A=FCGR3A en el que puede existir el polimorfismo G4985T
 10 Val158Phe

 <400> 105

 15 ccaaaagcca cactcaaagac 20

 <210> 106
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 25 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen CD16A=FCGR3A en el que puede existir el polimorfismo G4985T
 Val158Phe

 <400> 106
 30 cttgagtgat ggtgatgttca 20

 <210> 107
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen NR1I2 en el que puede existir el polimorfismo (-25385)C/T

 <400> 107
 45 tcaccagggc tggattaaag 20

 <210> 108
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen NR1I2 en el que puede existir el polimorfismo (-25385)C/T

 <400> 108
 60 gcctctggca acagtaaagc 20

 <210> 109
 65 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 326 708 B1

	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen TUCAN/CARD8/CARDINAL en el que puede existir el polimorfismo (T/A) Cys10stop	
5	<400> 109	
	ctgccgagac gggatacag	20
10	<210> 110	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen TUCAN/CARD8/CARDINAL en el que puede existir el polimorfismo (T/A) Cys10stop	
20	<400> 110	
25	gcaaatgtct cctgggaatg	20
	<210> 111	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
35	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen IKBL en el que puede existir el polimorfismo +738T/C Cys224Arg	
	<400> 111	
40	tgagtccttc tcagcctggt	20
	<210> 112	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
50	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen IKBL en el que puede existir el polimorfismo +738T/C Cys224Arg	
	<400> 112	
55	ctctcacgca gctcttcctc	20
	<210> 113	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
65	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen TNFRSF1B=TNFR2 en el que puede existir el polimorfismo G593A y T620C	

ES 2 326 708 B1

	<400> 113	
	ttctgggccca agttcctcta	20
5	<210> 114	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen TNFRSF1B=TNFR2 en el que puede existir el polimorfismo G593A y T620C	
	<400> 114	
20	ggggcagggtc acagagagt	19
	<210> 115	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen MEKK1 en el que puede existir el polimorfismo Asp643Asn	
	<400> 115	
35	ctggaaagtt tgccaacca	19
	<210> 116	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
45	<223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen MEKK1 en el que puede existir el polimorfismo Asp643Asn	
	<400> 116	
50	acccaaagtc tgggctcttt	20
	<210> 117	
	<211> 19	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
60	<223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen HLA-DQ4 en el que puede existir el polimorfismo 159G/A/C Y 282C/T (DQB1*0401 Y DQB1*0402)	
	<400> 117	
65	gtttaagggc atgtgctac	19

ES 2 326 708 B1

<210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen HLA-DQ4 en el que puede existir el polimorfismo 159G/A/C Y
 10 282C/T (DQB1*0401 Y DQB1*0402)

 <400> 118

 15 agctccaact ggtagttgtg 20

 <210> 119
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 25 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen HLA-DRB en el que puede existir el polimorfismo 109T/C,
 119T/C/G/A, 122A/C/G/T, 129A/G, 161G/A/T, 175A/T/C/G, 184A/C/DELA, 286C/A/T, 305C/G

 <400> 119
 30 gcgcttcgac agcgacgtgg g 21

 <210> 120
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen HLA-DRB en el que puede existir el polimorfismo 109T/C,
 119T/C/G/A, 122A/C/G/T, 129A/G, 161G/A/T, 175A/T/C/G, 184A/C/DELA, 286C/A/T, 305C/G

 45 <400> 120

 ctcgccgctg cactgtgaag 20

 50 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen IL1RN en el que puede existir el polimorfismo 2018 T/C EXÓN
 60 2 Y 2073 C/T INTRÓN 2

 <400> 121

 acaagttctg ggggacacag 20
 65
 <210> 122
 <211> 20

ES 2 326 708 B1

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen IL1RN en el que puede existir el polimorfismo 2018 T/C EXÓN 2 Y 2073 C/T INTRÓN 2

10 <400> 122
 attgcaccta gggtttgtgc 20

15 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220> ADN sintético
 <223> oligo 1 para amplificar el fragmento del gen IL1B en el que puede existir el polimorfismo 3954 C/T TAQI

25 <400> 123
 tgttcttagc caccacctc 20

30 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220> ADN sintético
 <223> oligo 2 para amplificar el fragmento del gen IL1B en el que puede existir el polimorfismo 3954 C/T TAQI

40 <400> 124
 gtgacgtac aggtgcatcg 20

45 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) en el que puede existir el polimorfismo Arg389Gly

55 <400> 125
 gccttcaacc ccatcatcta 20

60 <210> 126
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

ES 2 326 708 B1

<220> ADN sintético
 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) en el que puede existir el polimorfismo Arg389Gly
 5 <400> 126
 caggctcgag tcgctgtc 18
 10 <210> 127
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) en el que puede existir el polimorfismo Arg16Gly y Gln27Glu
 20 <400> 127
 gctcacctgc cagactgc 18
 25 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 35 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) en el que puede existir el polimorfismo Arg16Gly y Gln27Glu
 <400> 128
 40 gccaggacga tgagagacat 20
 <210> 129
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 50 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor dopaminérgico D3 (DRD3) en el que puede existir el polimorfismo Ser9Gly
 <400> 129
 55 cgcagtagga gagggcatag 20
 <210> 130
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220> ADN sintético

ES 2 326 708 B1

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor dopaminérgico D3 (DRD3) en el que puede existir el polimorfismo Ser9Gly

<400> 130

caagcccca agagtctgat

20

<210> 131

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el polimorfismo His452Tyr

<400> 131

agcaagatgc caagacaaca

20

<210> 132

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el polimorfismo His452Tyr

<400> 132

cagtgtgcct tccacagttg

20

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el polimorfismo T102C

<400> 133

aggagagaca cgacggtgag

20

<210> 134

<211> 22

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el polimorfismo T102C

ES 2 326 708 B1

	<400> 134	
	caagttctgg cttagacatg ga	22
5	<210> 135	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen catecol-O-metiltransferasa (COMT) en el que puede existir el polimorfismo Val108Met	
	<400> 135	
20	gggcctactg tggctactca	20
	<210> 136	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen catecol-O-metiltransferasa (COMT) en el que puede existir el polimorfismo Val108Met	
	<400> 136	
35	cccttttcc aggtctgaca	20
	<210> 137	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutathione S transferasa clase 1 (GSTP1) en el que puede existir el polimorfismo Ile105Val	
50	<400> 137	
	tggtggacat ggtgaatgac	20
55	<210> 138	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutathione S transferasa clase 1 (GSTP1) en el que puede existir el polimorfismo Ile105Val	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 138

gtgcaggttg tgtctgtcc

20

5

<210> 139

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen aducina 1 (ADD1) en el que puede existir el polimorfismo Gly460Trp

<400> 139

20 ttgctagtga cgggtattcg

20

<210> 140

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen aducina 1 (ADD1) en el que puede existir el polimorfismo Gly460Trp

<400> 140

35 gagactgcag caagggttcc

20

<210> 141

40 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen de la proteína de reparación de DNA XRCC1 en el que puede existir el polimorfismo Arg399Gln

50 <400> 141

tgtctccct gtctcattcc

20

55 <210> 142

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen de la proteína de reparación de DNA XRCC1 en el que puede existir el polimorfismo Arg399Gln

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 142	
	attgcccagc acaggataag	20
5	<210> 143	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A1 (CYP1A1) en el que puede existir el polimorfismo Ile462Val	
	<400> 143	
20	ctcacccttg atggtgctat	20
	<210> 144	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A1 (CYP1A1) en el que puede existir el polimorfismo Ile462Val	
	<400> 144	
35	tttgaagtg ctcacagcag	20
	<210> 145	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) en el que puede existir el polimorfismo A1166C	
50	<400> 145	
	gagaacattc ctctgcagca c	21
55	<210> 146	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) en el que puede existir el polimorfismo A1166C	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 146	
	tgtggctttg cttgtcttg	20
5	<210> 147	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor B2 de bradikinina (BDKRB2) en el que puede existir el polimorfismo C-58T	
	<400> 147	
20	gagcaatgtc tggettctcc	20
	<210> 148	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor B2 de bradikinina (BDKRB2) en el que puede existir el polimorfismo C-58T	
	<400> 148	
35	ccaggagag aacatttga	20
	<210> 149	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen angiotensinógeno (AGT) en el que puede existir el polimorfismo Met235Thr	
50	<400> 149	
	aggctgtgac aggatggaag	20
55	<210> 150	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen angiotensinógeno (AGT) en el que puede existir el polimorfismo Met235Thr	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 150	
	ggtggtcacc aggtatgtcc	20
5	<210> 151	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9(CYP2C9) en el que puede existir el polimorfismo C430T	
	<400> 151	
20	cctgggatct cctcctagt	20
	<210> 152	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el polimorfismo C430T	
	<400> 152	
35	ccacccttgg tttttctcaa	20
	<210> 153	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que pueden existir los polimorfismos A1075C, T1076C y C1080G	
50	<400> 153	
	ccacatgccc tacacagatg	20
55	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que pueden existir los polimorfismos A1075C, T1076C y C1080G	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 154	
	tcgaaaacat ggagttgcag	20
5	<210> 155	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el polimorfismo 812delA	
15	<400> 155	
	ccgggaactc acaacaaatt a	21
20	<210> 156	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el polimorfismo 812delA	
30	<400> 156	
	cacaaattca caagcagtca ca	22
35	<210> 157	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
45	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 31G>A, 100C>T y 138insT	
	<400> 157	
50	caggtatggg gctagaagca	20
	<210> 158	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
60	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 31G>A, 100C>T y 138insT	
	<400> 158	
65	acctggtcga agcagtatgg	20

ES 2 326 708 B1

<210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
 10 883G>C, 1023C>T y 1039C>T

 <400> 159

 15 gatcctggct tgacaagagg 20

 <210> 160
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 25 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
 883G>C, 1023C>T y 1039C>T

 <400> 160
 30 tcccacggaa atctgtctct 20

 <210> 161
 35 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>A y 1758G>T

 45 <400> 161

 gtggggctaa tgcctcat 19

 50 <210> 162
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 55 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>A y 1758G>T

 60 <400> 162

 ctcccagtt cccgcttt 18

 65 <210> 163
 <211> 18

ES 2 326 708 B1

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

5 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir los polimorfismos 1846G>A y 1863ins9bp

10 <400> 163
 gtgggtgatg ggcagaag 18

15 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir los polimorfismos 1846G>A y 1863ins9bp

25 <400> 164
 gagggtcgtc gtactcgaag 20

30 <210> 165
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir el polimorfismo 1973insG

40 <400> 165
 agccgtgagc aacgtgat 18

45 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
 55 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir el polimorfismo 1973insG

<400> 166

60 ctgcagagac tcctcgtct 20

<210> 167
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

ES 2 326 708 B1

	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 para detectar los polimorfismos 2539de- IAACT, 2549A>del y 2613delAGA	
5	<400> 167	
	caaggtccta cgcttccaaa	20
10	<210> 168	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 para detectar los polimorfismos 2539de- IAACT, 2549A>del y 2613delAGA	
20	<400> 168	
25	gatgcactgg tccaaccttt	20
	<210> 169	
	<211> 19	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
35	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 2850C>T y 2935A>C	
	<400> 169	
40	ggaaccctga gagcagctt	19
	<210> 170	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
50	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 2850C>T y 2935A>C	
55	<400> 170	
	ggtgtcccag caaagttcat	20
60	<210> 171	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
65	<220> ADN sintético	

ES 2 326 708 B1

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 3183G>A, 3198C>G y 3277T>C

<400> 171

ggaggcaaga aggagtgtca

20

<210> 172

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 3183G>A, 3198C>G y 3277T>C

<400> 172

cgatgtcacg ggatgtcata

20

<210> 173

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 4042G>A y 4125insGTGCCCACT

<400> 173

ggagtcttgc aggggtatca

20

<210> 174

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 4042G>A y 4125insGTGCCCACT

<400> 174

tcaccaggaa agcaaagaca

20

<210> 175

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que pueden existir los polimorfismos C792G y A805T

ES 2 326 708 B1

	<400> 175	
	gaacaccaag catcactgga	20
5	<210> 176	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que pueden existir los polimorfismos C792G y A805T	
	<400> 176	
20	gatgtttagt gcaggcccat a	21
	<210> 177	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el polimorfismo G416A	
	<400> 177	
35	ctcacaacct tgcggaattt	20
	<210> 178	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el polimorfismo G416A	
50	<400> 178	
	cttcaaatct ccctccacca	20
55	<210> 179	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el polimorfismo A1196G	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 179	
	acctgctgag aaaggcata	20
5	<210> 180	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el polimorfismo A1196G	
	<400> 180	
20	ttccaggga caaccataat	20
	<210> 181	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que pueden existir los polimorfismos 191G>A y 282C>T	
	<400> 181	
35	ccatggagtt gggcttagag	20
	<210> 182	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que pueden existir los polimorfismos 191G>A y 282C>T	
50	<400> 182	
	ccatgccagt gctgtatttg	20
55	<210> 183	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo T341C	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 183	
	tggtgtctcc aggtcaatca	20
5	<210> 184	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo T341C	
	<400> 184	
20	ggctgacct tcccagaaat	20
	<210> 185	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo C481T	
	<400> 185	
35	tgacggcagg aattacattg	20
	<210> 186	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo C481T	
50	<400> 186	
	tgtttcttct ttggcaggag a	21
55	<210> 187	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo A803G	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 187	
	actgtttggt gggcttcac	20
5	<210> 188	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo A803G	
	<400> 188	
20	aggtttgggc acgagattt	19
	<210> 189	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G590A	
	<400> 189	
35	cctgccaaag aagaacacc	20
	<210> 190	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G590A	
50	<400> 190	
	gatgaagccc accaaacagt	20
55	<210> 191	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G857A	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 191	
	actgtttggt gggcttcac	20
5	<210> 192	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G857A	
	<400> 192	
20	gggtgataca tacacaagg ttt	23
	<210> 193	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo G636A	
	<400> 193	
35	accctgtgat cccacttca	20
	<210> 194	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo G636A	
50	<400> 194	
	tgtacttcag ggcttggtca	20
55	<210> 195	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que pueden existir los polimorfismos C680T Y G681A	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 195

caaccagagc ttggcatatt g

21

5

<210> 196

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que pueden existir los
polimorfismos C680T Y G681A

<400> 196

20 taaagtcccg aggggtgttg

20

<210> 197

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo A1G

<400> 197

35 tagtgggcct aggtgattgg

20

<210> 198

40 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo A1G

50 <400> 198

tttccaatca ctgggagagg

20

55 <210> 199

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo IVS5+2T>A

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 199	
	caaccctcgg gactttattg	20
5	<210> 200	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo IVS5+2T>A	
	<400> 200	
20	caagcattac tccttgacct gtt	23
	<210> 201	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo T358C	
	<400> 201	
35	cccagtgta gcttctctt	20
	<210> 202	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo T358C	
50	<400> 202	
	gtcctcaatg ctctcttcc	20
55	<210> 203	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo G431A	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 203	
	gaatcgtttt cagcaatgga a	21
5	<210> 204	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo G431A	
	<400> 204	
20	gtatgttcac ccacccttgg	20
	<210> 205	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo C1297T	
	<400> 205	
35	tcaccgaaca gttcttgc	20
	<210> 206	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo C1297T	
50	<400> 206	
	gtcaaggtcc ttgggtcaa	20
55	<210> 207	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B) en el que puede existir el polimorfismo C2664T	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 207	
	gcaggatgtt ggagtgtgtg	20
5	<210> 208	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B) en el que puede existir el polimorfismo C2664T	
	<400> 208	
20	gcaattattg gtgggagagt g	21
	<210> 209	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glicoproteína P (ABCB1) en el que puede existir el polimorfismo C3435T	
	<400> 209	
35	tgctcccagg ctgtttattt	20
	<210> 210	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glicoproteína P (ABCB1) en el que puede existir el polimorfismo C3435T	
50	<400> 210	
	tgttttcagc tgcttgatgg	20
55	<210> 211	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo A719G	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 211	
	ggttgatgct ttgaagaac g	21
5	<210> 212	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo A719G	
	<400> 212	
20	catccattac atttcaggc ttt	23
	<210> 213	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo G238C	
	<400> 213	
35	aaaacttttg tggggatatg ga	22
	<210> 214	
40	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo G238C	
50	<400> 214	
	aaccctctat ttagtcattt gaaaaca	27
55	<210> 215	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en el que puede existir el polimorfismo C677T	
65		

ES 2 326 708 B1

	<400> 215	
	tcctgtggt ctctcatcc	20
5	<210> 216	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en el que puede existir el polimorfismo C677T	
	<400> 216	
20	caaagcggaa gaatgtgtca	20
	<210> 217	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en que el puede existir el polimorfismo Asp70Gly	
	<400> 217	
35	aaagccacag tctctgacca a	21
	<210> 218	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en que el puede existir el polimorfismo Asp70Gly	
50	<400> 218	
	ggtgctggaa tccatacatt t	21
55	<210> 219	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en el que puede existir el polimorfismo Ala539Thr	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 219

gagaaaatgg ctttgtatt cg

22

5

<210> 220

<211> 22

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en el que puede existir el polimorfismo Ala539Thr

<400> 220

20 tgatttttcc agtccatcat gt

22

<210> 221

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en el que puede existir el polimorfismo A-392G

<400> 221

35 caggggagga aatggttaca

20

<210> 222

40 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en el que puede existir el polimorfismo A-392G

50 <400> 222

tgagaccatt ggcataaaat

20

55 <210> 223

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo A-163C

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 223	
	agagagccag cgttcattgt	20
5	<210> 224	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo A-163C	
	<400> 224	
20	ctgatgcgtg ttctgtgctt	20
	<210> 225	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo A-3860G	
	<400> 225	
35	gagtgccagtg gtgcgatct	19
	<210> 226	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo A-3860G	
50	<400> 226	
	tgaggccagg agttcaagac	20
55	<210> 227	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo G3534A	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 227

ggtggaggta ggagcaacac

20

5

<210> 228

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo G3534A

<400> 228

20 ctgctgaacc tgcacacatt

20

<210> 229

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo C558A

<400> 229

35

cctcatcctc ctgctacctg

20

<210> 230

40 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo C558A

50 <400> 230

gaggcagtct ccacgaactc

20

55 <210> 231

<211> 19

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo G14690A

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 231	
	gcctacagca tggatgtga	19
5	<210> 232	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo G14690A	
	<400> 232	
20	tggaattgta cctttaagt gga	23
	<210> 233	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo C3699T	
	<400> 233	
35	tcacaatccc tgtgacctga	20
	<210> 234	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo C3699T	
50	<400> 234	
	ggggcatttt tactgatgga	20
55	<210> 235	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo G19386A	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 235

tgaaaccacc agcagtgttc

20

5

<210> 236

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo G19386A

<400> 236

20 aaaattctcc tggggagtgg

20

<210> 237

<211> 23

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo T29753C

<400> 237

35

accctaaca tgtaactctg tgg

23

<210> 238

40 <211> 23

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo T29753C

50 <400> 238

tttgaaggag aagtctgaa gga

23

55 <210> 239

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo G6986A

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 239	
	cacccagctt aacgaatgct	20
5	<210> 240	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el polimorfismo G6986A	
	<400> 240	
20	ccaggaagcc agactttgat	20
	<210> 241	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen transportador de serotonina (SLC6A4) en el que puede existir el polimorfismo delección de 44 pb en el promotor	
	<400> 241	
35	accctaatag tccctactgc	20
	<210> 242	
40	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen transportador de serotonina (SLC6A4) en el que puede existir el polimorfismo delección de 44 pb en el promotor	
50	<400> 242	
	ggagatcctg ggagaggtg	19
55	<210> 243	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutathion S-transferasa M3 (GSTM3) en el que puede existir el polimorfismo delAGA (alelo*B)	
65		

ES 2 326 708 B1

<400> 243

ttctggggaa attctcatgg

20

5

<210> 244

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutathion S-transferasa M3 (GSTM3) en el que puede existir el polimorfismo delAGA (alelo*B)

<400> 244

20 tcaggtttgg gaactcatcc

20

<210> 245

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutathion S-transferasa M1 (GSTM1) en el que puede existir el polimorfismo alelo nulo

<400> 245

35 atggtttgca ggaacaagg

20

<210> 246

40 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutathion S-transferasa M1 (GSTM1) en el que puede existir el polimorfismo alelo nulo

50 <400> 246

aaagcgggag atgaagtcct

20

55 <210> 247

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutathion S-transferasa n1 (GSTT1) en el que puede existir el polimorfismo alelo nulo

65

ES 2 326 708 B1

	<400> 247	
	ggcagcataa gcaggacttc	20
5	<210> 248	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa n1 (GSTT1) en el que puede existir el polimorfismo alelo nulo	
	<400> 248	
20	gttgctcgag gacaagttcc	20
	<210> 249	
	<211> 17	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen apolipoproteina E (APOE) en la que pueden existir los polimorfismos Arg158Cys y Cys112Arg	
	<400> 249	
35	gcacggctgt ccaagga	17
	<210> 250	
40	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen apolipoproteina E (APOE) en la que pueden existir los polimorfismos Arg158Cys y Cys112Arg	
50	<400> 250	
	gcggggccccg gcctggt	17
55	<210> 251	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor (TNF) en el que puede existir el polimorfismo G-308A	
65	<400> 251	
	acctgtccc caaaagaaat	20

ES 2 326 708 B1

<210> 252
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor (TNF) en el que puede existir el polimorfismo G-308A
 10

 <400> 252

 15 aaagttgggg acacacaagc 20

 <210> 253
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220> ADN sintético
 25 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo G-1082A

 <400> 253
 30
 cacacacaca cacaatcca ag 22

 <210> 254
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220> ADN sintético
 40 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo G-1082A

 <400> 254
 45
 gatggggtgg aagaagttga 20

 50

 55

 60

 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 326 708

⑫ Nº de solicitud: 200502423

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 05.10.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KOZAL M J. et al. "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS". NATURE MEDICINE. 01.07.1996. Vol. 2. Nº. 7. Páginas 753-759. ISSN 1078-8956.	1-12
X	CHEE M. et al. "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS". SCIENCE. 25.10.1996. Vol. 274. Páginas 610-614. ISSN 0036-8075.	1-12
X	SAPOLSKY R. J. et al. "High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays". GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING. 01.02.1999. Vol. 14. Nº 5-6. Páginas 187-192. ISSN 1050-3862.	1-12
X	CUTLER D. J. "High-throughput variation detection and genotyping using microarrays". GENOME RESEARCH. 01.11.2001. Vol. 11. Nº 11. Páginas 1913-1925. ISSN 1088-9051.	1-12
X	WO 0129269 A2 (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 26.04.2001	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.09.2009

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G06F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	11	SÍ
	Reivindicaciones	1-10,12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KOZAL M J. et al. "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS". NATURE MEDICINE. 01-07-1996. Vol. 2. Nº.7. Páginas 753 - 759. ISSN 1078-8956.	01.07.1996
D02	CHEE M. et al. "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS". SCIENCE. 25.10.1996. Vol. 274. Páginas 610 - 614. ISSN 0036-8075	25.10.1996
D03	SAPOLSKY R. J.et al. "High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays". GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING. 01-02-1999. Vol. 14. Nº 5-6. Páginas 187 - 192. ISSN 1050-3862.	01.02.1999
D04	CUTLER D. J.et al. "High-throughput variation detection and genotyping using microarrays". GENOME RESEARCH. 01-11-2001.Vol. 11. Nº 11. Páginas 1913 - 1925. ISSN 1088-9051.	01.11.2001
D05	WO 0129269 A2	26.04.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un método de genotipado de múltiples variantes génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto.

En concreto, las reivindicaciones 1-11 caracterizan el método por las etapas del procedimiento, haciendo referencia, la reivindicación 6, al algoritmo matemático utilizado en la detección de las variaciones génicas y la reivindicación 11 al uso del método para el genotipado simultáneo de variaciones génicas humanas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). La reivindicación 12 caracteriza un DNA-chip de genotipado para llevar a cabo el método objeto de la solicitud.

A la luz del estado de la técnica anterior, las características técnicas del método de genotipado de variaciones génicas de la presente reivindicación 1 y el DNA-chip de la reivindicación 12, aparecen divulgadas en numerosos documentos: D1 (resumen y figura 3), D2 (resumen y figura 1), D3 (resumen y figura 2), D4 (resumen y figura 1) y D5 (todo el documento, especialmente reivindicaciones 14-15). Por lo tanto, el objeto de dichas reivindicaciones no es nuevo, según el art. 29.6 del Rgto de ejecución de la LP 11/1986.

Las reivindicaciones dependientes 2-10 tampoco son nuevas, porque las características adicionales de dichas reivindicaciones también aparecen en varios de los documentos citados D1-D5.

El método de genotipado de la reivindicación 11, caracterizado porque detecta variaciones génicas humanas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), no contiene características técnicas que, por sí solas o en combinación con otras características de otras reivindicaciones de las cuales dependa la presente reivindicación, cumplan con el requisito de actividad inventiva, porque, siendo conocidas en el estado de la técnica múltiples variaciones génicas que aparecen en la IBD, para el experto en la materia sería obvio usar métodos de genotipado ya conocidos para determinar dichas variaciones.