

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 827 227**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6874 (2008.01)

C12Q 1/6881 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2014 PCT/AU2014/001114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15085350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2014 E 14869706 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 3080302**

54 Título: **Métodos y sondas para identificar alelos génicos**

30 Prioridad:

10.12.2013 AU 2013904801

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

20.05.2021

73 Titular/es:

CONEXIO GENOMICS PTY LTD (100.0%)

36 Windsor Road

East Fremantle, Western Australia 6158, AU

72 Inventor/es:

SAYER, DAVID, CHARLES y

DESANTIS, DIANNE

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 827 227 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y sondas para identificar alelos génicos

5 Campo

La presente invención se refiere a un método para determinar el genotipo de ácido nucleico altamente polimórfico. En particular, la presente divulgación se refiere a métodos para determinar el genotipo de alelos del gen HLA altamente polimórficos mediante el uso de tecnología de secuenciación de alto rendimiento.

10

Antecedentes

La denominada tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) ha acelerado la investigación genética y ha permitido caracterizar rápidamente defectos genéticos no diagnosticados previamente, lo que da como resultado un diagnóstico temprano de la enfermedad y mejores resultados de salud. Una característica clave de la tecnología de secuenciación de próxima generación es la capacidad de secuenciar millones de moléculas de ADN individuales al mismo tiempo. El paralelismo y la velocidad de la secuenciación son tales que ahora es posible secuenciar un genoma humano completo en tan solo unos pocos días. Además de poder secuenciar genomas complejos completos mediante NGS, muchas aplicaciones se centran en el potencial clínico de NGS y la detección de variantes genéticas en regiones diana específicas.

Un método de secuenciación genética dirigida implica el uso de sondas marcadas que se unen a regiones diana que luego pueden extraerse del ADN genómico.

25 Las sondas que se usan pueden ser de naturaleza ARN o ADN y normalmente tienen una longitud del orden de 100 nucleótidos.

El uso de sondas de captura es útil para regiones genéticas que en individuos sanos tienden a no ser muy polimórficas. A saber, las diferencias de secuencia genética entre individuos sanos son del orden de < 1 %. Se usa una alta redundancia de sondas superpuestas para garantizar que, si hay diferencias de secuencia entre las sondas y el ADN diana que impiden que la sonda se hibride con la secuencia diana, habrá otras sondas adyacentes a las diferencias genéticas que permitirán la extracción y secuenciación de los fragmentos variantes de ADN.

35 Si bien el uso de sondas de captura tiene amplias aplicaciones, su uso no es universal y se considera inapropiado para la determinación del genotipo de genes altamente polimórficos, como los genes del sistema HLA. El HLA es fundamental para nuestra respuesta inmunitaria a los patógenos. Las moléculas de HLA residen en la superficie de las células y presentan péptidos patógenos fragmentados al sistema inmunitario. La mayoría de los individuos tienen tipos de HLA exclusivos que permiten que la especie pueda defenderse de prácticamente cualquier ataque patogénico.

40 Si bien las ventajas del polimorfismo HLA para nuestra especie son obvias, la otra cara es que el sistema inmunitario del receptor ve como "extraños" a los antígenos HLA de los órganos trasplantados, incluidas las células madre hematopoyéticas (HSC), lo que resulta en el rechazo del órgano. En el caso de los trasplantes de HSC, las células madre trasplantadas se dirigen al nuevo huésped, lo que da como resultado la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), una consecuencia potencialmente mortal de los trasplantes de HSC.

45 Por lo tanto, se requiere la determinación del genotipo HLA para asegurar la compatibilidad entre donantes de HSC y pacientes. Hay varios genes HLA, todos los cuales residen en aproximadamente 4 millones de bases en una región conocida como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos. Los genes pueden dividirse en 2 conjuntos. Los genes de Clase I que incluyen HLA-A, HLA-B y HLA-C, y los genes de Clase 2 que incluyen HLA-DRB1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1. Son estos genes los que normalmente se tipifican con fines de trasplante, pero el MHC contiene, además, genes HLA de clase I adicionales que no son muy polimórficos y tienen funciones distintas de la presentación de péptidos derivados de patógenos. Estos genes incluyen HLA-E, -F y -G. Además, existen numerosos pseudogenes y fragmentos de genes de clase I y clase 2.

50 Los genes clásicos de clase I son similares en secuencia. Todos son genes relativamente pequeños de aproximadamente 3200 pares de bases caracterizados por 7-8 exones e intrones pequeños. Los genes de la clase 2 tienen intrones más grandes y algunos están en el orden de 20 000 pares de bases.

55 El alto nivel de polimorfismo HLA se genera al "compartir" motivos de secuencia de alelos del mismo y de diferentes loci. Hay relativamente pocos polimorfismos exclusivos y SNP. En otras palabras, los alelos recién identificados contendrán una combinación exclusiva de motivos que se ven en otros alelos del mismo locus o de alelos de otros loci relacionados. El intercambio de motivos es un mecanismo eficaz para la rápida evolución del polimorfismo y es útil para las especies cuando se encuentran con patógenos. El tamaño del motivo compartido entre alelos y loci varía. En algunos casos, el motivo puede tener menos de 20 pb, pero otros alelos pueden contener la mitad del gen completo. 60 La consecuencia del alto nivel de polimorfismo es que en algunos casos es imposible identificar donantes de HSC compatibles con HLA. 65

NGS para HLA ofrece beneficios significativos sobre las técnicas de secuenciación convencionales basadas en Sanger. Las técnicas de secuenciación de HLA convencionales requieren la secuenciación del ADN amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El ADN amplificado se secuencia como una pluralidad de moléculas de secuencia donde no puede determinarse si los nucleótidos adyacentes son del mismo cromosoma o de diferentes cromosomas (maternos o paternos). Esta incapacidad para secuenciar en fase, con frecuencia da como resultado una tipificación inexacta y se requiere un experimento posterior para resolver el tipo ambiguo.

NGS produce datos de secuencia de una sola molécula, completos con información de fase que puede compilarse con software de análisis de secuencias, tal como Assign MPS, para producir potencialmente un tipo de HLA inequívoco. Sin embargo, al secuenciar los productos de PCR, los errores y moléculas quiméricas que incorpora la PCR también se secuenciaron, lo que creó dificultades en el análisis de la secuencia.

Sin embargo, es probable que las técnicas convencionales de captura de sondas basadas en exones no sean fiables, ya que los tipos de HLA se generan en gran medida mediante la mezcla de motivos y el grado de diferencia de secuencia puede ser sustancial de un alelo al siguiente.

Así, permanece la necesidad de un método que permita la secuenciación de alto rendimiento de genes altamente polimórficos, tales como los genes HLA.

El documento núm. WO 2010/151416 describe secuencias consenso de intrones de los alotipos HLA-A, HLA-B y HLA-C que se usan para desarrollar cebadores para usar como cebadores de secuenciación para determinar los alelos HLA en la tipificación de HLA basada en secuencia.

El documento núm. US 2004/0197775 describe un método para la detección de al menos un alelo de un locus génico que puede usarse para proporcionar la determinación directa del haplotipo. El método comprende amplificar el ADN genómico con un par de cebadores que abarca una secuencia de intrón y define una secuencia de ADN en enlace génico con un alelo a detectar.

Gabriel C. y otros, Rapid high-throughput human leukocyte antigen typing by massively parallel pyrosequencing for high-resolution allele identification. *Human Immunology* 70(11) 960-964. DOI: 10.1016/J.HUMIMM.2009.08.009, describe un método de tipificación basado en secuencias de HLA mediante el uso del sistema Roche/454 Life Sciences Genome Sequencer FLX.

Resumen

Los presentes inventores describen un método de sonda de captura que es adecuado para identificar alelos en genes de HLA altamente polimórficos al dirigir sondas de captura a secuencias no codificantes. Las regiones no codificantes de las moléculas de HLA de clase I y clase II comúnmente tipificadas son menos polimórficas que los exones polimórficos y el número de posibles secuencias alternativas en diferentes tipos de HLA parecería ser relativamente finito, excepto para los SNP aleatorios que ocurrirían mediante el proceso normal de generación de variantes. Así, puede diseñarse una pequeña cantidad de sondas en una sola región que permitirán la captura de todos los alelos, incluidos los que probablemente se describirán en el futuro. Las sondas de captura capturarán fragmentos de ADN que incluyen los exones polimórficos y la secuenciación del fragmento de ADN de captura producirá las secuencias de los fragmentos polimórficos que permitirán la deducción de un tipo de HLA.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para identificar uno o más alelos del gen HLA en un sujeto, el método comprende:

- a) poner en contacto una muestra de ácido nucleico del sujeto con sondas de oligonucleótidos, en donde las sondas de oligonucleótidos se hibridan con secuencias diana del gen HLA en la muestra de ácido nucleico;
 - b) enriquecer un ácido nucleico que está hibridado con una sonda oligonucleotídica al separarlo del ácido nucleico no unido a una sonda oligonucleotídica; y
 - c) secuenciar el ácido nucleico enriquecido mediante cribado de alto rendimiento para identificar uno o más alelos del gen HLA;
- en donde las secuencias de genes diana están en una región no codificante de uno o más genes HLA, y en donde las sondas de oligonucleotídicas son adecuadas para preparar el ácido nucleico para cribado de alto rendimiento mediante el uso de captura de diana.

La persona experta entenderá que, al preparar el ácido nucleico capturado para la secuenciación, puede ser conveniente amplificar el ácido nucleico capturado. Por consiguiente, en una modalidad, el método comprende amplificar el nucleico unido a la sonda oligonucleotídica.

En una modalidad, el método comprende secuenciar un exón del gen HLA.

En otra modalidad, el método comprende secuenciar un gen HLA completo.

Para facilitar el enriquecimiento de un ácido nucleico de interés, en una modalidad las sondas oligonucleotídicas comprenden una etiqueta de captura.

5 En una modalidad, la etiqueta de captura es una etiqueta de hibridación.

En otra modalidad, la etiqueta de captura es biotina o estreptavidina.

10 En otra modalidad más, el método comprende poner en contacto la etiqueta de captura con un agente de unión.

En una modalidad, el agente de unión es biotina o estreptavidina.

15 En otra modalidad más, el agente de unión se acopla a un sustrato. En una modalidad particular, el agente de unión se acopla a un sustrato magnético, como por ejemplo una perla magnética.

En una modalidad, la muestra de ácido nucleico en contacto con las sondas oligonucleotídicas comprende ácido nucleico monocatenario.

20 En otra modalidad más, la muestra de ácido nucleico se fragmenta antes de ponerse en contacto con las sondas oligonucleotídicas.

En una modalidad, el método comprende poner en contacto fragmentos de ácido nucleico que tienen una longitud promedio superior a aproximadamente 100 pb con las sondas oligonucleotídicas.

25 En otra modalidad, el método comprende poner en contacto fragmentos de ácido nucleico que tienen una longitud promedio superior a aproximadamente 2 kb con las sondas oligonucleotídicas.

Alternativamente, la muestra de ácido nucleico se fragmenta después de que se ha puesto en contacto con las sondas oligonucleotídicas.

30 Las sondas oligonucleotídicas se dirigen a regiones no codificantes de genes HLA, tales como, por ejemplo, intrones y regiones intergénicas. En una modalidad, la región no codificante del gen HLA es un intrón.

35 En otra modalidad, el método comprende, además, detectar uno o más alelos de un gen que no es HLA.

En el método de la presente invención, la secuenciación es secuenciación de alto rendimiento.

En una modalidad, la secuenciación de alto rendimiento es una técnica de secuenciación de próxima generación.

40 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un método para identificar alelos del gen HLA en un sujeto, el método comprende:

45 a) fragmentar la muestra de ácido nucleico que se obtiene de un sujeto para obtener fragmentos de ácido nucleico de al menos aproximadamente 2 kb de longitud;

b) poner en contacto el ácido nucleico monocatenario con sondas oligonucleotídicas que comprenden una etiqueta de captura, en donde las sondas oligonucleotídicas se hibridan con secuencias diana de HLA en la muestra de ácido nucleico;

c) enriquecer un ácido nucleico que está hibridado con una sonda oligonucleotídica al poner en contacto la etiqueta de captura con un agente de unión; y

50 d) secuenciar el ácido nucleico mediante secuenciación de alto rendimiento para identificar uno o más alelos del gen HLA;

55 en donde las secuencias diana de HLA están en una región no codificante de uno o más genes HLA, y en donde las sondas oligonucleotídicas son adecuadas para preparar el ácido nucleico para cribado de alto rendimiento mediante el uso de captura de diana.

60 Si bien el ácido nucleico que se usa en el método de la invención puede ser de una muestra obtenida previamente, en una modalidad, el método comprende aislar el ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se obtiene del sujeto.

En una modalidad, la muestra de ácido nucleico se fragmenta antes de ponerse en contacto con las sondas oligonucleotídicas.

65 En otra modalidad, la muestra de ácido nucleico se fragmenta después de ponerse en contacto con las sondas oligonucleotídicas.

En una modalidad del primer o segundo aspecto, una o más de las sondas oligonucleotídicas comprenden una secuencia de ácido nucleico idéntica al menos en 95 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8 o 10-71.

5 En otra modalidad, una o más de las sondas oligonucleotídicas comprenden una secuencia de ácido nucleico idéntica al menos en 98 % a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8 o 10-71.

En una modalidad particular, una o más de las sondas oligonucleotídicas comprenden una secuencia de ácido nucleico idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8 o 10-71.

10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un donante de trasplante para un receptor que necesita un trasplante, el método comprende:

a) realizar el método de la invención para identificar uno o más alelos del gen HLA en el receptor que necesita un trasplante; e

15 b) identificar un donante de trasplante basado en la presencia de uno o más alelos en un gen HLA tanto del donante de trasplante como del receptor de trasplante.

La presente invención proporciona, además, un método para reducir la probabilidad de que un receptor de trasplante desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped, el método comprende:

20 a) realizar el método de la invención para identificar uno o más alelos del gen HLA en el receptor que necesita un trasplante; e

b) identificar un donante de trasplante basado en la presencia de uno o más alelos del gen HLA tanto en el donante de trasplante como en el receptor de trasplante;

25 en donde la presencia de uno o más alelos del gen HLA tanto en el receptor de trasplante como en el donante de trasplante es indicativa de una probabilidad reducida de que el receptor de trasplante desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped después del trasplante de un injerto del donante de trasplante.

30 Como será evidente, las características preferidas de un aspecto de la invención son aplicables a muchos otros aspectos de la invención.

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

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

40 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Alineación de secuencia del intrón 1 de HLA-A que demuestra que diferentes alelos HLA tienen una secuencia HLA idéntica y predecible. La nomenclatura de los alelos HLA usa hasta 4 campos separados por dos puntos (por ejemplo, A*01:01:01:01). El primer campo representa, en general, las diferencias de secuencia de aminoácidos que pueden detectarse mediante anticuerpos. El segundo campo representa las diferencias de nucleótidos que dan como resultado cambios de aminoácidos pero que no pueden detectarse mediante anticuerpos. El tercer campo representa cambios sinónimos y el cuarto campo representa cambios en regiones no codificantes. El uso de sufijos de códigos de letras, como la N en A*01:01:01:02N, indica que el alelo es una variante de expresión. Por ejemplo, N = Nulo o no expresado. Como puede verse, todos los alelos A*01 tienen una secuencia idéntica, excepto 2 (A*01:02 y A*01:20) que comparten un nucleótido con los alelos A*30, y los alelos A*03 y A*11 también son idénticos a la mayoría de los alelos A*01. Dado que una sonda capturará igualmente el ADN que tenga un único error de apareamiento de bases, una sola sonda debe capturar todos los alelos A*01, A03, A*11 y A*30.

Figura 2. El uso de sondas de captura para regiones no codificantes poco polimórficas para capturar y secuenciar regiones codificantes polimórficas.

Figura 3. Estructura del gen HLA-A, que muestra los exones y la ubicación de las sondas de captura en los experimentos de prueba de principio

Figura 4. Análisis de los datos de secuencia generados mediante el uso de un protocolo de secuenciación de captura dirigida (no se muestran los colores).

65 1: Muestra la estructura del gen para HLA sobre una región sombreada de blanco a rojo que resume la profundidad de la secuencia a través del gen. Las regiones blancas indican profundidades de lectura de

secuencia <50 y cuanto más se acerca el sombreado al rojo, menor profundidad de lectura de secuencia. Los bloques negros indican que no hay archivos de secuencia que abarquen esta región.

2: Esto muestra el nombre de la muestra (Muestra 01) y el locus que se analiza (HLA-A = gA)

3: Esta región resume los datos. Cada barra vertical gris representa la cantidad de secuencia en esa posición. La cobertura máxima que muestra esta escala es 100. La línea horizontal de cuadros de colores es la secuencia de consenso donde rojo = T, negro = G, azul = C y verde = A. Los cuadros de colores debajo representan otras secuencias vistas en esa posición y donde se encuentran en la barra gris vertical indica el porcentaje de lecturas con esa base en esa posición. Estas secuencias suelen representar errores de asignación de bases, pero pueden indicar una secuencia heterocigótica. Las líneas horizontales negras indican el porcentaje de asignaciones de base, de manera que un cuadro azul en la primera línea horizontal indica que el 1 % de las asignaciones de base en esa posición son C. La escala es logarítmica, de manera que la segunda línea horizontal indica el 10 % de las lecturas,

4: Esta región dentro de la interfaz del software indica el genotipo mejor apareado entre la secuencia consenso y la biblioteca HLA-A. Las primeras 2 columnas indican los genotipos. La tercera columna indica el número de secuencias con errores de apareamiento con las secuencias codificantes de HLA-A. La columna siguiente indica el número de errores de apareamiento con las secuencias no codificantes de HLA-A y las columnas 5ta y 6ta indican los errores de apareamientos de secuencia cuando los datos de la secuencia están en fase. El genotipo correcto tendrá 0 errores de apareamientos en las columnas 3 a 6. En este caso, el genotipo que mejor se aparea es con HLA- A*02:01:01:01+A*02:01:01:01.

Figura 5. Resultados de la Secuenciación de Próxima Generación después del enriquecimiento con Sonda de Captura de 3 muestras secuenciadas, además, por Sanger.

Clave para el listado de secuencias

SEQ ID NO:1 a 8 - Sondas oligonucleotídicas de captura
 SEQ ID NO:9 -HLA A Intrón 1
 SEQ ID NO:10 a 71 secuencias de sonda de captura de HLA

Descripción detallada

Técnicas generales y definiciones

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

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

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

Por "molécula de ácido nucleico aislada" se entiende una molécula de ácido nucleico que generalmente se ha separado de las secuencias de nucleótidos con las que está asociada o enlazada en su estado nativo (si es que existe en la naturaleza). Preferentemente, el ácido nucleico aislado está al menos 60 % libre, con mayor preferencia al menos 75 % libre y con la máxima preferencia al menos 90 % libre de otros componentes con los que normalmente está asociado. El ácido nucleico puede aislarse de una muestra biológica mediante el uso de cualquier técnica conocida adecuada. Por ejemplo, el ADN genómico total puede extraerse de las células mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y/o kits disponibles comercialmente, por ejemplo, mediante el uso del Mini Kit de sangre QIAamp DNA o el Kit DNeasy Blood & Tissue suministrados por QIAGEN, o mediante el uso de métodos tales como extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.

Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente", a menos que se indique de otra manera, se

refiere a +/- 20 %, con mayor preferencia +/- 10 %, o con la máxima preferencia aproximadamente +/- 5 % del valor designado.

Método para Identificar Alelos del Gen HLA

5 Los presentes inventores han desarrollado ahora un método para identificar alelos del gen HLA que es particularmente adecuado para técnicas de captura dirigida y de secuenciación de alto rendimiento. El método de la invención comprende poner en contacto una muestra de ácido nucleico de un sujeto con sondas oligonucleotídicas con el fin de separar las regiones genómicas de interés de la muestra de ADN. Comoquiera que los métodos de las técnicas anteriores de captura dirigida se basan en oligonucleótidos que capturan regiones codificantes de genes de interés, esos métodos no son adecuados para determinar el genotipo de genes altamente polimórficos debido a la dificultad para diseñar sondas de captura basadas en exones que sean capaces de identificar todos los alelos descritos actualmente; así como identificar nuevos alelos. Por el contrario, la presente invención usa sondas oligonucleotídicas de captura que hibridan con secuencias diana del gen HLA que están ubicadas en regiones no codificantes, lo que permite la secuenciación de alto rendimiento de alelos del gen HLA altamente polimórficos.

La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencia del intrón 1 de HLA-A que demuestra que diferentes alelos de HLA tienen una secuencia de intrón de HLA idéntica y predecible. Como puede verse, todos los alelos A*01 tienen una secuencia idéntica, excepto 2 (A*01:02 y A*01:20) que comparten un nucleótido con los alelos A*30, y los alelos A*03 y A*11 son, además, idénticos a la mayoría de los alelos A*01. Dado que una sonda capturarán igualmente el ADN que tenga un único error de apareamiento de bases, una sola sonda debe capturar todos los alelos A*01, A*03, A*11 y A*30.

En la Figura 2 se representa un diagrama que muestra la ubicación en los fragmentos de ADN capturados de la secuencia que es complementaria a la sonda de captura, así como su posición relativa al exón polimórfico. La Figura 3 demuestra cómo se diseñan y ubican las sondas de captura con el fin de capturar los exones polimórficos para la secuenciación.

Como se usa en la presente descripción, los términos "secuencia no codificante" o "región no codificante" se refieren a secuencias de ácido nucleico que no forman parte de la secuencia codificante de proteína del gen en el que se identifican los alelos. Así, los términos incluyen referencia a intrones, regiones no traducidas 5' y 3', promotores, elementos reguladores de la transcripción y/o ADN intergénico. Así, la región no codificante puede ser interna al gen de interés o externa al gen de interés, por ejemplo, estar en una región intergénica. En una modalidad, las sondas oligonucleotídicas se hibridan con secuencias de genes diana en intrones en el gen de interés.

Preparación de ácido nucleico

El método de la invención puede realizarse en una muestra de ácido nucleico que ya se ha obtenido de un sujeto mediante el uso de cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Alternativamente, en una modalidad, el método comprende obtener una muestra de ácido nucleico a partir de una muestra biológica obtenida del sujeto. Como se usa en la presente descripción, una "muestra biológica" puede ser, por ejemplo, linfocitos, sangre completa, frotis bucal, muestra de biopsia o tejido congelado o cualquier otra muestra que comprenda ADN genómico. Aunque puede usarse casi cualquier fuente de tejido para la determinación del genotipo molecular, los linfocitos de sangre periférica, por ejemplo, se usan con la mayor frecuencia. Además, es posible usar muestras que se obtienen por medios no invasivos, por ejemplo, mediante hisopados de mejillas o recolección de ADN a base de saliva. En la técnica se conocen varios métodos adecuados para extraer ADN de tales fuentes. Estos van desde la extracción con solventes orgánicos hasta la absorción en perlas recubiertas de sílice y columnas de intercambio aniónico. Además, los sistemas automatizados para extracción de ADN están disponibles comercialmente y pueden proporcionar ADN de buena calidad y alta pureza.

El ácido nucleico que se usa en el método de la invención puede ser ADN genómico monocatenario y/o bicatenario. En algunas modalidades, el ácido nucleico puede incluir ácidos nucleicos largos que comprenden una longitud de al menos aproximadamente 1 kb, al menos aproximadamente 2 kb, al menos aproximadamente 5 kb, al menos aproximadamente 10 kb, o al menos aproximadamente 20 kb o más largos. Los ácidos nucleicos largos pueden prepararse a partir de fuentes mediante una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Se prefieren los métodos para obtener muestras biológicas y el posterior aislamiento de ácido nucleico a partir de tales muestras que mantienen la integridad (es decir, minimizan la rotura o cizallamiento) de las moléculas de ácido nucleico. Los métodos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, métodos de lisis sin purificación adicional (por ejemplo, método de lisis química o enzimática mediante el uso de detergentes, solventes orgánicos, alcalinos y/o proteasas), aislamiento de núcleos con o sin purificación adicional de ácidos nucleicos, métodos de aislamiento mediante el uso de etapas de precipitación, métodos de aislamiento de ácidos nucleicos que usan matrices sólidas (por ejemplo, membranas a base de sílice, perlas o superficies modificadas que se unen a moléculas de ácido nucleico), matrices similares a gel (por ejemplo, agarosa) o soluciones viscosas, y métodos que enriquecen las moléculas de ácido nucleico con un gradiente de densidad.

En una modalidad, los ácidos nucleicos que se usan en el método de la invención se fragmentan con el fin de obtener un tamaño de fragmento promedio conveniente. El experto en la técnica apreciará que la longitud requerida del

fragmento de ácido nucleico dependerá de la tecnología de secuenciación que se use. Por ejemplo, las plataformas Ion Torrent y MisSeq usan fragmentos de alrededor de 100 pb a 200 pb de longitud, mientras que la plataforma Pacific Biosciences NGS puede usar fragmentos de ácido nucleico de hasta 20 kb de longitud. El ácido nucleico puede fragmentarse mediante cizallamiento físico, sonicación, digestión por restricción u otra técnica adecuada conocida en la técnica. La fragmentación del ácido nucleico puede realizarse para generar fragmentos de ácido nucleico que tengan una longitud promedio conveniente. Por ejemplo, la longitud, o la longitud promedio, de los fragmentos de ácido nucleico puede ser al menos aproximadamente 100 pb, al menos aproximadamente 200 pb, al menos aproximadamente 300 pb, al menos aproximadamente 400 pb, al menos aproximadamente 500 pb, al menos aproximadamente 600 pb, al menos aproximadamente 700 pb, al menos aproximadamente 800 pb, al menos aproximadamente 900 pb, al menos aproximadamente 1 kb, al menos aproximadamente 2 kb, al menos aproximadamente 3 kb, al menos aproximadamente 4 kb, al menos aproximadamente 5 kb, al menos aproximadamente 6 kb, al menos aproximadamente 7 kb, al menos aproximadamente 8 kb, al menos aproximadamente 9 kb, al menos aproximadamente 10 kb, al menos aproximadamente 11 kb, al menos aproximadamente 12 kb, al menos aproximadamente 15 kb, o al menos aproximadamente 20 kb.

En una modalidad, la muestra de ácido nucleico se trata con el fin de generar ácido nucleico monocatenario, o para generar ácido nucleico que comprende una región monocatenaria, antes de poner en contacto la muestra con sondas oligonucleotídicas. El ácido nucleico puede hacerse monocatenario mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, que incluyen técnicas de hibridación conocidas y kits comerciales disponibles tales como el sistema de purificación de ADN genómico ReadyAmp™ (Promega). Alternativamente, las regiones monocatenarias pueden introducirse en un ácido nucleico mediante el uso de una nickasa adecuada junto con una exonucleasa.

Sondas oligonucleotídicas

El término "sonda" o "sonda oligonucleotídica" de acuerdo con la presente invención se refiere a un oligonucleótido que está diseñado para hibridar específicamente con un ácido nucleico de interés. Preferentemente, las sondas son adecuadas para su uso en la preparación de ácido nucleico para secuenciación de alto rendimiento (próxima generación) mediante el uso de una técnica de captura de diana. Así, en una modalidad, la sonda puede ser adecuada para la captura de diana y tener una longitud de alrededor de 60 a 120 nucleótidos. Alternativamente, la sonda puede tener aproximadamente de 10 a 25 nucleótidos. En ciertas modalidades, la longitud de la sonda es de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Las sondas de oligonucleótidos que se usan en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

Alternativamente, las sondas oligonucleotídicas pueden comprender análogos de nucleótidos. El término "análogos de nucleótidos" se refiere a análogos sintéticos que tienen porciones de bases de nucleótidos modificadas, porciones de pentosa modificadas y/o porciones de fosfato modificadas y, en el caso de polinucleótidos, enlaces internucleotídicos modificados, como se describe generalmente en cualquier otra parte (por ejemplo, Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York, (1980); Agarwal, Protocolos para polinucleótidos y análogos, Humana Press, (1994)). Generalmente, las porciones de fosfato modificadas comprenden análogos de fosfato en donde el átomo de fósforo está en el estado de oxidación +5 y uno o más de los átomos de oxígeno se reemplazan con un resto que no es oxígeno, por ejemplo, azufre. Ejemplos de análogos de fosfato incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, boronofosfatos, que incluyen contraiones asociados, por ejemplo, H⁺, NH₄⁺, Na⁺, si tales contraiones están presentes. Las porciones de base de nucleótidos modificadas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, 5-metilcitosina (5mC); análogos de C-5-propinilo, que incluyen pero no se limitan a, C-5-propinil- C y C-5-propinil-U; 2,6-diaminopurina, también conocida como 2-amino-adenina o 2-amino-dA); hipoxantina, pseudouridina, 2-tiopirimidina, isocitosina (isoC), 5-metil isoC e isoguanina (isoG; ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos núm. 5,432,272). Las porciones de pentosa modificadas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, análogos de ácido nucleico bloqueado (LNA) que incluyen, sin limitación, Bz-A-LNA, 5-Me-Bz-C-LNA, dmf-G-LNA y T-LNA, y modificaciones 2'- o 3'- donde la posición 2'- o 3'- es hidrógeno, hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi, aliloxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi y fenoxi), azido, amino, alquilamino, flúor, cloro o bromo. Los enlaces internucleotídicos modificados incluyen análogos de fosfato, análogos que tienen enlaces aquirales enlaces intersubunitarios y no cargados, y polímeros basados en morfolino no cargados que tienen enlaces intersubunitarios aquirales (ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos núm. 5,034,506). Algunos análogos de enlaces internucleotídicos incluyen morfolidato, acetal, y heterociclos unidos por poliamida. En una clase de análogos de nucleótidos, conocidos como ácidos nucleicos peptídicos, que incluyen ácidos nucleicos peptídicos pseudocomplementarios ("PNA"), se reemplaza un enlace convencional de azúcar e internucleótido por un polímero de cadena principal de amida de 2-aminoetilglicina.

Hibridación

Como se usa en la presente descripción, el término "hibridación" se refiere al proceso en el que una sonda oligonucleotídica se une de forma no covalente con un ácido nucleico diana para formar un polinucleótido estable de doble cadena. Las condiciones de hibridación incluirán típicamente concentraciones de sal de aproximadamente menos de 1 M, más habitualmente menos de aproximadamente 500 mM y pueden ser menos de aproximadamente 200 mM. Un tampón de hibridación incluye una solución salina tamponada tal como SSPE al 5 %, u otros tampones

conocidos en la técnica. Las temperaturas de hibridación pueden ser tan bajas como 5 °C, pero típicamente son mayores de 22 °C, y más típicamente mayores de aproximadamente 30 °C, y típicamente por encima de 37 °C. Las hibridaciones comúnmente se realizan en condiciones rigurosas, es decir, condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará con su secuencia diana a la que es complementaria, pero no se hibridará con las otras secuencias no complementarias.

Como se usa en la presente descripción, el término "complementario" y equivalentes gramaticales se refiere a la interacción de apareamiento de bases de nucleótidos de un ácido nucleico con otro ácido nucleico, incluidos ácidos nucleicos modificados y análogos de ácidos nucleicos, que da como resultado la formación de un dúplex, tríplex u otra estructura de orden superior. La interacción primaria es típicamente específica de bases de nucleótidos, por ejemplo, A:T, A:U y G:C, mediante enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick y Hoogsteen. Condiciones en las que las sondas oligonucleotídicas se hibridan con regiones complementarias o sustancialmente complementarias de ácidos nucleicos diana bien conocidas en la técnica

Como se entiende en la técnica, las condiciones rigurosas de hibridación dependen de la secuencia y son diferentes en circunstancias diferentes. Por ejemplo, los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación más altas para la hibridación específica que los fragmentos cortos. Como otros factores pueden afectar el rigor de la hibridación, incluida la composición de bases y la longitud de las cadenas complementarias, la presencia de disolventes orgánicos y el grado de errores de apareamiento de bases, la combinación de parámetros es más importante que la medida absoluta de cualquier parámetro solo. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que la T_m para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. Las condiciones rigurosas de ejemplo incluyen una concentración de sal de al menos 0,01 M hasta no más de 1 M de concentración de iones de sodio (u otra sal) a un pH de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,3 y una temperatura de al menos 25 °C. Por ejemplo, condiciones de 5 x SSPE (NaCl 750 mM, fosfato de sodio 50 mM, EDTA 5 mM a pH 7,4) y una temperatura de 30 °C son adecuadas para hibridaciones de sondas específicas de alelo.

Etiquetas de captura y agentes de unión

En una modalidad, las sondas oligonucleotídicas que se usan en el método de la presente invención comprenden una etiqueta de captura para facilitar el enriquecimiento de un ácido nucleico de interés unido a una sonda oligonucleotídica a partir de otras secuencias de ácidos nucleicos en una muestra. Con el fin de enriquecer el ácido nucleico de interés a partir de otras secuencias de ácido nucleico, la etiqueta de captura se une a un agente de unión adecuado. Como se entendería en la técnica, la frase "enriquecimiento de un ácido nucleico" se refiere al aumento de la cantidad de una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra con respecto al ácido nucleico que no está unido a una sonda oligonucleotídica. Por consiguiente, aumenta la relación de la secuencia diana con respecto al ácido nucleico no diana correspondiente en una muestra.

En una modalidad, la etiqueta de captura es una "etiqueta de hibridación". Como se usa en la presente descripción, el término "etiqueta de hibridación" y equivalentes gramaticales pueden referirse a un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria de al menos una porción de otra secuencia de ácido nucleico que actúa como agente de unión (es decir, una "etiqueta de unión"). El grado de complementariedad entre una etiqueta de hibridación y una secuencia de unión correspondiente puede variar con la aplicación. En algunas modalidades, la etiqueta de hibridación puede ser complementaria o sustancialmente complementaria a una etiqueta de unión o a porciones de la misma. Por ejemplo, una etiqueta de hibridación puede comprender una secuencia que tiene una complementariedad con una etiqueta de unión correspondiente de al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % y al menos aproximadamente 99 %. En algunas modalidades, una etiqueta de hibridación puede comprender una secuencia que tiene un 100 % de complementariedad con una etiqueta de unión correspondiente.

En algunas modalidades, una sonda de captura puede incluir una pluralidad de etiquetas de hibridación para las cuales las etiquetas de unión correspondientes están ubicadas en el mismo ácido nucleico o en diferentes ácidos nucleicos. En ciertas modalidades, las etiquetas de hibridación que comprenden ARN pueden ser ventajosas para eliminar eficazmente los niveles en exceso de dichas etiquetas.

En ciertas modalidades, una etiqueta de hibridación puede comprender al menos aproximadamente 5 nucleótidos, al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 15 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 25 nucleótidos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, al menos aproximadamente 35 nucleótidos, al menos aproximadamente 40 nucleótidos, al menos aproximadamente 45 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 55 nucleótidos, al menos aproximadamente 60 nucleótidos, al menos aproximadamente 65 nucleótidos, al menos aproximadamente 70 nucleótidos, al menos aproximadamente 75 nucleótidos, al menos aproximadamente 80 nucleótidos, al menos aproximadamente 85 nucleótidos, al menos aproximadamente 90 nucleótidos, al menos aproximadamente 95 nucleótidos y al menos aproximadamente 100 nucleótidos.

En otra modalidad, la etiqueta de captura puede comprender una "etiqueta de afinidad". Como se usa en la presente

descripción, el término "etiqueta de afinidad" y equivalentes gramaticales pueden referirse a un componente de un complejo multicomponente, en donde los componentes del complejo multicomponente específicamente interactúan o se unen entre sí. Por ejemplo, una etiqueta de afinidad puede incluir biotina que puede unirse a estreptavidina. Otros ejemplos de complejos de etiquetas de afinidad de componentes múltiples incluyen ligandos y sus receptores, por ejemplo, avidina-biotina, estreptavidina-biotina y derivados de biotina, estreptavidina o avidina, que incluyen, pero no se limitan a, 2-iminobiotina, destiobiotina, NeutrAvidin (Molecular Probes, Eugene, OR), CaptAvidin (Molecular Probes) y similares; proteínas/péptidos de unión, que incluyen proteína de unión maltosa-maltosa (MBP), proteína/péptido de unión a calcio-calcio (CBP); antígeno-anticuerpo, que incluye etiquetas de epítipo, que incluyen e-MYC, HA y FLAG Tag™, y sus correspondientes anticuerpos antiepítipo; haptenos, por ejemplo, dinitrofenilo y digoxigenina, y sus correspondientes anticuerpos; aptámeros y sus dianas correspondientes; fluoróforos y anticuerpos anti-fluoróforos; y similares. En una modalidad, las etiquetas de afinidad se usan para la separación masiva de ácidos nucleicos diana que comprenden etiquetas de hibridación.

Así, el agente de unión que se usa en el método de la invención es capaz de unirse a una etiqueta de afinidad como se describe en la presente descripción para facilitar la separación de un ácido nucleico de interés de otras secuencias de ácido nucleico en una muestra. Por ejemplo, en una modalidad, la etiqueta de afinidad comprende biotina y el agente de unión comprende estreptavidina. El agente de unión está típicamente sobre un sustrato. Los ejemplos de sustratos incluyen perlas, microesferas, superficies planas, columnas, pocillos y similares. Los términos "microesfera" o "perla" o "partícula" o equivalentes gramaticales se entienden en la técnica y se refieren a una partícula pequeña discreta. La composición del sustrato variará según la aplicación. Las composiciones adecuadas incluyen las que se usan en la síntesis de péptidos, ácidos nucleicos y restos orgánicos, que incluyen, entre otros, plásticos, cerámica, vidrio, poliestireno, metilmetacrilato, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, toria sol, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados tales como Sepharose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y Teflón todos pueden usarse. Una guía útil es la "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers Ind. No es necesario que las perlas sean esféricas; pueden usarse partículas irregulares. En algunas modalidades, un sustrato puede comprender una composición metálica, por ejemplo, ferrosa, y puede comprender, además, propiedades magnéticas. Una modalidad de ejemplo que usa perlas magnéticas incluye sondas de captura que comprenden perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Además, las perlas pueden ser porosas, lo que aumenta el área superficial de la perla disponible para la asociación con sondas de captura. Los tamaños de las perlas varían desde nanómetros, es decir, 100 nm, hasta milímetros, es decir, 1 mm, con perlas de aproximadamente 0,2 µm hasta aproximadamente 200 µm, o de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 µm, aunque en algunas modalidades pueden usarse perlas más pequeñas.

Secuenciación de alto rendimiento

Los métodos de la invención son particularmente adecuados para preparar ácido nucleico para secuenciar mediante el uso de una tecnología de secuenciación de alto rendimiento tal como la tecnología de secuenciación de próxima generación. Las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) incluyen instrumentos que son capaces de secuenciar más de 10^{14} kilo pares de bases (kpb) de ADN por ejecución del instrumento. La secuenciación típicamente produce una gran cantidad de lecturas independientes, cada una de las cuales representa entre 10 y 1000 bases del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos generalmente se secuencian de forma redundante para confianza, y las réplicas por unidad de área se denominan cobertura (es decir, "cobertura 10 x" o "cobertura 100 x"). Los métodos de secuenciación de próxima generación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Metzker (2010).

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

Las plataformas para la secuenciación de próxima generación incluyen, entre otras, el sistema FLX del Secuenciador del Genoma (GS) de Roche/454, el Analizador del Genoma (GA) de Illumina/Solexa, el sistema de Detección de Ligadura de Oligonucleótidos de Soporte (SOLiD) de Life/APG, el sistema G.007 de Polonator, el sistema de Secuenciación de Genes HeliScope de Helicos BioSciences y el sistema PacBio RS de Pacific Biosciences.

Genes altamente polimórficos y tipificación de HLA

Como se usa en la presente descripción, el término "gen altamente polimórfico" incluye una referencia a genes que tienen mayores niveles de polimorfismo en la región codificante del gen en comparación con las regiones no codificantes. Por ejemplo, un gen altamente polimórfico puede tener un mayor número de polimorfismos por kb de secuencia codificante en comparación con el número de polimorfismos por kb de secuencia no codificante del gen. Ejemplos bien conocidos de genes altamente polimórficos son los genes del antígeno leucocitario humano (HLA).

Las regiones codificantes de las moléculas de HLA son altamente polimórficas, ya que se cree que están bajo presión de selección positiva para evolucionar en respuesta a una amenaza patógena. Las regiones no codificantes de HLA no están bajo tal presión selectiva y no comparten el mismo grado de polimorfismo. Si bien las regiones no codificantes

de HLA de clase I son polimórficas, los polimorfismos no se distribuyen aleatoriamente entre estas regiones y las que están estrechamente relacionadas, por similitud de secuencia codificante, tienen secuencias no codificantes idénticas.

5 El análisis de alineamientos de secuencia a partir de regiones no codificantes de HLA de clase I revela un conjunto limitado de secuencias únicas. Los presentes inventores han determinado que es posible diseñar sondas para cada uno del conjunto de secuencias únicas para capturar fragmentos de ADN que luego pueden usarse en ensayos de secuenciación de nueva generación.

10 Por lo tanto, en lugar de un enfoque que usa sondas superpuestas a partir de un exoma (es decir, sondas diseñadas en regiones de exón), los presentes inventores describen el uso de sondas diseñadas explícitamente para las regiones no codificantes de HLA. La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencia del intrón 1 de HLA-A que demuestra que diferentes alelos de HLA tienen una secuencia de HLA idéntica y predecible. La nomenclatura del alelo HLA usa hasta cuatro campos separados por dos puntos (por ejemplo, A*01:01:01:01). El primer campo representa, en general, diferencias en la secuencia de aminoácidos que pueden detectarse por anticuerpos. El segundo campo representa las diferencias de nucleótidos que dan como resultado cambios de aminoácidos pero que pueden no ser detectables con el uso de anticuerpos. El tercer campo representa cambios sinónimos y el cuarto campo representa cambios en regiones no codificantes. El uso de sufijos de códigos de letras, como la N en A*01:01:01:02N, indica que el alelo es una variante de expresión. Por ejemplo, N = Nulo o no expresado. Como puede verse, todos los alelos A*01 tienen una secuencia idéntica, excepto 2 (A*01:02 y A*01:20) que comparten un nucleótido con los alelos A*30, y los alelos A*03 y A*11 también son idénticos a la mayoría de los alelos A*01. Dado que una sonda capturarán igualmente el ADN que tenga un único error de apareamiento de bases, una sola sonda debe capturar todos los alelos A*01, A03, A*11 y A*30.

25 En una modalidad, los métodos de la presente invención comprenden identificar alelos en uno o más genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, y/o HLA-DRB1.

30 En algunas modalidades, los métodos de la invención son útiles para determinar los donantes adecuados para los receptores de trasplantes y/o para determinar la probabilidad de desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) o la GVHD aguda (aGVHD) en un paciente al aparear alelos de genes, por ejemplo, alelos del gen HLA, tanto en el donante como en el receptor de trasplante.

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

40 Como se usa en la presente descripción, los términos "trasplante" o "trasplantar" se refieren al injerto o introducción de tejido o células que se obtienen de un individuo (el donante) en o sobre el cuerpo de otro individuo (el receptor). Las células o el tejido que se extraen del donante y se trasplantan al receptor se denominan "injerto". Ejemplos de tejidos comúnmente trasplantados son médula ósea, células madre hematopoyéticas, órganos tales como hígado, corazón, piel, vejiga, pulmón, riñón, córnea, páncreas, islotes pancreáticos, tejido cerebral, hueso e intestino. La persona experta en la técnica entendería que el término "haplotipo" se refiere a una combinación de alelos que están ubicados cerca, o en loci adyacentes, en un cromosoma y que se heredan juntos, o un conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido en un solo cromosoma de un par de cromosomas que están estadísticamente asociados.

50 Kits

Además, en la presente descripción se describe un kit para identificar alelos del gen HLA de acuerdo con el método de la invención. El kit contiene sondas de oligonucleótidos que pueden hibridar con secuencias diana del gen HLA en una región no codificante del gen. Las sondas de oligonucleótidos pueden comprender una etiqueta de captura tales como, por ejemplo, biotina o estreptavidina. Los kits pueden comprender, además, un agente de unión capaz de unirse a la etiqueta de captura. El agente de unión puede recubrirse o unirse a un sustrato adecuado tal como, por ejemplo, una microesfera o una perla. El sustrato puede ser magnético para facilitar el enriquecimiento de un ácido nucleico diana de interés.

60 Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de la biblioteca de ADN

65 Las bibliotecas de Illumina se prepararon a partir de 200 ng de ADN genómico mediante el uso del protocolo Illumina TruSeq DNA Nano, mediante selección de insertos diana de 550 pb de tamaño.

Ejemplo 2. Captura de HLA mediante sondas específicas de intrón

5 Como prueba de concepto, se diluyó un conjunto de sondas de oligonucleótidos personalizadas (SEQ ID NO:1 a 8) dirigidas a las secuencias de intrones y diluidas a una concentración de 1,5 pmol/μl. Para un primer procedimiento de hibridación, se añadieron ADN de Human Cot, biblioteca amplificada (preparada como antes), oligo de bloqueo universal TS-p7 (6nt) y oligo de bloqueo universal TS-p7 (8nt) a un tubo y se secaron en un concentrador de vacío configurado a 60 °C durante aproximadamente 1 hora. Luego la muestra seca se resuspendió en tampón de hibridación Nimblegen 2X, componente A de hibridación Nimblegen y agua libre de nucleasas. Luego la muestra resuspendida se agitó con vórtex y se desnaturalizó a 95 °C durante 10 minutos. Después de la desnaturalización, se añadieron a la muestra 2μl de sonda (3 pmol) y se incubó a 72 °C durante 4 horas.

15 Para lavar y recuperar el ADN hibridado con sonda, se diluyeron las soluciones de lavado de los kits de lavado Nimblegen de acuerdo con el protocolo del fabricante. La muestra hibridada se combinó con perlas de estreptavidina, se agitó en vórtex y se incubó a 72 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, el ADN unido se lavó con un lavado I y un lavado riguroso a 72 °C, seguido de los lavados II y III a temperatura ambiente. La muestra hibridada unida a las perlas de estreptavidina se colocó luego en un imán y el ADN unido se eluyó mediante el uso de NaOH 0,125 N. La muestra hibridada se purificó luego mediante el uso de perlas Ampure XP y luego se amplificó durante 12 ciclos con KAPA HiFi HotStart ReadyMix. Los cebadores que se usaron en la PCR eran complementarios al adaptador de Illumina y a las secuencias de códigos de barras en el ADN ligado (Illumina P5 y P7). La muestra se purificó con perlas Ampure XP.

Ejemplo 3. Secuenciación de ADN hibridado

25 La muestra hibridada amplificada se secuenció en un MiSeq o HiSeq mediante el uso del protocolo de secuenciación Illumina 2x300 pb.

Ejemplo 4. Resultados

30 Los datos de secuencia generados se analizaron con el software de análisis de secuencias Assign MPS v 1.0 (Conexio Genomics, Fremantle, Australia). El análisis de los datos de secuencia generados mediante un protocolo de secuenciación de captura dirigida se muestra en la Figura 4. Con el software Assign MPS v 1.0, se determinó que el genotipo que mejor apareaba para la muestra era HLA-A *02:01:01:01+A*02:01:01:01.

35 Ejemplo 5. Secuenciación de próxima generación después del enriquecimiento de la sonda de captura de 3 muestras secuenciadas, además, por Sanger

40 El ensayo de Sanger amplifica la secuencia HLA-A, -B y -C en amplicones que abarcan la región no traducida 5' hasta el final del intrón 4 para HLA-A y -B y la región no traducida 5' hasta la región no traducida 3' de HLA- C. Todas las ambigüedades heterocigotas se resolvieron mediante el uso de cebadores de secuenciación específicos de alelos.

45 El ensayo de Sonda de Capture se realizó mediante el uso de las sondas descritas en la Figura 3 y proporcionadas como SEQ ID NO:10-71, y con el protocolo descrito en el texto anterior. Para las 3 muestras hubo concordancia completa para los genotipos reportados. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 5.

50 La muestra 1 HLA-B contiene un alelo para el que no se ha informado una secuencia de referencia. Este alelo tiene un único error de apareamiento en la base 444 en comparación con la secuencia de B*15:01:01:01, ubicada en el intrón 1. Por amplificación específica de locus mediante el uso de Sanger, esta muestra requiere un experimento adicional mediante el uso de cebadores de secuenciación específicos del alelo B*08:01:01 y B*15:01:01 para determinar si el nuevo alelo es un alelo B*08:01:01 no descrito del alelo B*15:01:01:01. NGS permite poner en fase los polimorfismos a lo largo de todo el gen y puede identificar fácilmente que el nuevo alelo es un subtipo B*15:01:01. Esta muestra contiene, además, un alelo novedoso C*04:01:01. El polimorfismo se encuentra en el intrón 5. El uso de cebadores de *secuenciación* específicos de alelos no es común en esta región y la caracterización mediante secuenciación de Sanger requeriría que los alelos se separen mediante PCR, seguido de secuenciación de Sanger. Sin embargo, NGS identificó correctamente el nuevo alelo como un subtipo C*04:01:01.

60 Estos datos demuestran que el uso de Sondas de Captura permite la identificación de nuevos alelos y además, la capacidad de NGS para determinar la relación de fase de los polimorfismos de secuencia, lo que permite la caracterización precisa del nuevo alelo.

Referencias

Metzker (2010) Nat Rev Genet, 11(1):31-46

65

ES 2 827 227 T3

Listado de secuencias

<110> Conexio Genomics Pty Ltd

<120> Métodos y sondas para identificar alelos génicos

5 <130> P95258.PCT

<150> AU 2013904801
<151> 2013-12-10

10 <160> 71

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
15 <211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I1.1 (01 = grupo de alelo; I1 = intrón número 1; .1 = sonda uno para intrón)

<400> 1

25 **cgctctgcg gggagaagca aggggccctc ctggcggggg cgcaggaccg ggggagccgc 60**
gccgggagga gggc 74

<210> 2
30 <211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I2.1 (01 = grupo de alelo; I2 = intrón número 2; .1 = sonda uno para intrón)

<400> 2

40 **cacagtctcc gggctccgaga tccaccccgga agccgcggga ctccgagacc cttgtcccgg 60**
gagaggccca ggcg 74

<210> 3
50 <211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I3.1 (01 = grupo de alelo; I3 = intrón número 3; .1 = sonda uno para intrón)

<400> 3

60 **gtaccagggg ccaacggggcg cctccctgat cgcctataga tctcccgggc tggcctccca 60**
caaggagggg agacaattgg gaccaac 87

ES 2 827 227 T3

5 <210> 4
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I3.2 (01 = grupo de alelo; I3 = intrón número 3; .2 = sonda dos para intrón)

15 <400> 4

tatcacccctc cctctgggtcc tgagggagag gaatcctcct gggtttcag atcctgtacc 60

agagagtgac tctgagggttc cg 82

20 <210> 5
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I3.3 (01 = grupo de alelo; I3 = intrón número 3; .3 = sonda tres para intrón)

30 <400> 5

acacaattaa gggataaaat ctctgaagga gtgacgggaa gacgatccct cgaatactga 60

tgagtgggttc cctttgacac 80

35 <210> 6
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I3.4 (01 = grupo de alelo; I3 = intrón número 3; .4 = sonda cuatro para intrón)

45 <400> 6

ttgggcccgt gacttttctc ctcaggcctt gttctctgct tcacactcaa tgtgtgtggg 60

ggctctgagtc cagcacttct gagtct 86

55 <210> 7
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I4.1 (01 = grupo de alelo; I4 = intrón número 4; .1 = sonda uno para intrón)

65 <400> 7

ES 2 827 227 T3

	atgggggtgt catgtctctt agggaaagca ggagcctctc tggagacctt tagcagggtc	60
5	agggccctc accttcccct cttttcccag	90
	<210> 8 <211> 79 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Sonda de captura de oligonucleótido 01-I5.1 (01 = grupo de alelo; I5 = intrón número 5; .1 = sonda uno para intrón)	
15	<400> 8	
	ctccacaat catgggccga cccagcctgg gccctgtgtg ccagcactta ctcttttcta	60
20	aagcacctgt taaaatgaa	79
	<210> 9 <211> 130 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 9	
30	gtgagtgcgg ggtcgggagg gaaaccgcct ctgcggggag aagcaagggg ccctcctggc	60
	gggggcgcag gaccggggga gccgcgccgg gaggagggtc gggcaggtct cagccactgc	120
35	tcgccccag	130
	<210> 10 <211> 127 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> A-3-1.1 secuencia de la sonda de captura de la región 3' no traducida de HLA-A	
45	<400> 10	
	gacagctgcc ttgtgtggga ctgagaggca agagttgttc ctgcccttcc ctttgtgact	60
50	tgaagaacct tgactttggt tctgcaaagg cacctgcatg tgtctgtgtt cgtgtaggca	120
	taatgtg	127
55		
	<210> 11 <211> 120 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> A-5-1.1 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-A	
65	<400> 11	

ES 2 827 227 T3

	cagggcgaag tcccagggcc ccaggcgtgg ctctcagggt ctcaggcccc gaaggcgtg	60
	tatggattgg ggagtcccag ccttggggat tcccactc cgcagtttct tttctccctc	120
5		
	<210> 12	
	<211> 120	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> A-5-2.1 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-A	
15	<400> 12	
	cctggatact cagcagcgg acccagttct cactcccatt ggtgtcggg tttccagaga	60
20	agccaatcag tgcgtcggg gtcgctgttc taaagcccgc acgcacccac cgggactcag	120
25	<210> 13	
	<211> 112	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> A-I1-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-A	
	<400> 13	
35	gggaaacggc ctctgcgggg agaagcaagg ggcccgccg gcgggggcgc aggaccggg	60
	aagccgcgcc gggaggaggg tcgggcgggt ctcagccact cctcgcccc ag	112
40		
	<210> 14	
	<211> 112	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> A-I1-1-2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-A	
	<400> 14	
50	gggaaaccgc ctctgcgggg agaagcaagg ggccctcctg gcgggggcgc aggaccggg	60
	gagccgcgcc gggaggaggg tcgggcaggt ctcagccact gtcgcccc ag	112
55		
	<210> 15	
	<211> 115	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> A-I2-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-A	
65	<400> 15	

ES 2 827 227 T3

gcaggtcacg acccctcatc cccacaggac gggccaggtc gccacagtc tccgggtccg 60
agatccaccc cgaagccgcg gggctccgag acccttgctc cgggagaggc ccagg 115
 5
 <210> 16
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> A-I2-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-A
 15
 <400> 16

gaggcccagg cgcctttaac cggtttcat tttcagttta ggccaaaaat cccccgggt 60
tggtcggggc gggcggggc tcgggggacc gggctgacct cggggtccgg g 111
 20
 <210> 17
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> A-I2-2.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-A
 30
 <400> 17

gaggcccagg cgcctttacc cggtttcatt ttcagtttag gccaaaaatc cccccgggtt 60
ggtcggggcc gggcggggct cgggggactg ggctgaccgc ggggtcgggg 110
 35
 <210> 18
 <211> 113
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> A-I3-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-A
 45
 <400> 18

gatcgctgt agatctccgg ggctggcctc ccacaagaaa gggagacaaa tgggaccaac 60
actataatat cgcctccct ctggtcttga gggagaagaa tcctcctggg ttt 113
 50
 <210> 19
 <211> 113
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> A-I3-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-A
 60
 <400> 19
 65

ES 2 827 227 T3

gatcgctgt agatctcccg ggctggcctc ccacaaggag gggagacaat tgggaccaac 60
 actagaatat ogcctccct ctggctctga gggagaggaa tcctcctggg ttt 113

5

<210> 20
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> A-I3-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-A

15

<400> 20

ctgggttctg tgctctcttc cccatcccgg gtgtcctgtc cattctcaag atggccacat 60
 gcgtgctggt ggagtgtccc atgacagatg caaatgcct gaa 103

20

<210> 21
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> A-I3-2.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-A

30

<400> 21

ctgggttctg tgctctcttc cccatcccag gtgtcctgtc cattctcaag atagccacat 60
 gtgtgctgga ggagtgtccc atgacagatg caaatgcct gaa 103

35

<210> 22
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> A-I3-2.3 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-A

45

<400> 22

50

ctgggttctg tgctctcttc cccatcccgg gtgtcctgtc cattctcaag atggccacat 60
 gcatgctgga gtgtcccatg acagatgcaa aatgcctgaa 100

55

<210> 23
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> A-I3-2.4 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-A

65

<400> 23

ES 2 827 227 T3

	ctgggttctg tgctctcttc cccatcccag gtgtcctgtc catcctcaaa atggccacat	60
5	gcgtgctggt ggagtgtccc atgacagatg caaatggct gaa	103
	<210> 24 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> A-I4-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-A	
15	<400> 24	
	taaggaggga gatgggggtg tcatgtctct tagggaaagc aggagcctct ctggagacct	60
20	ttagcagggt cagggcccct caccttcccc tcttttccca g	101
	<210> 25 <211> 98 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> A-I4-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-A	
30	<400> 25	
	taaggaggga gacgggggtg tcatgtcttt tagggaaagc aggagcctct ctgacctta	60
35	gcagggtcag ggcccctcac cttcccctct tttcccag	98
	<210> 26 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> A-I4-1.3 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-A	
45	<400> 26	
	taaggaggga gatgggggtg tcatgtcttt tacggaaagc aggagcctct ctgacctta	60
50	gcagggtcag ggcccctcac cttccccttt tcccag	96
	<210> 27 <211> 113 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> A-I5-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-A	
60	<400> 27	
65		

ES 2 827 227 T3

tctgagattt cttgtctcac tgagggttcc aagaccagg tagaagtgtg ccctgcctcg 60
ttactgggaa gcaccatcca caattatggg cctaccagc ctgggcctg tgt 113
 5
 <210> 28
 <211> 113
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> A-I5-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-A
 15
 <400> 28

tctgagattt cttgtctcac tgagggttcc aagccccagc tagaaatgtg ccctgtctca 60
ttactgggaa gcaccatcca caatcatggg cctaccagc ctgggcctg tgt 113
 20

 <210> 29
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> A-I5-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-A
 30
 <400> 29

ccctgggtct gcagtcacac atttctggaa acttctctga ggtccaagac ttggaggttc 60
ctctaggacc ttaaggccct gactcctttc tggtagctca caggacattt tctt 114
 35

 <210> 30
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> A-I5-2.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-A
 45
 <400> 30

ccctgggtct gcattcacac atttctggaa acttctctgg ggtccaaggc taogaggttc 60
ctctaggacc ttaaggccct ggctcctttc tggtagctca caggacattt tctt 114
 50

 <210> 31
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> B-3-1.1 secuencia de la sonda de captura de la región 3' no traducida de HLA-B
 60
 <400> 31
 65

ES 2 827 227 T3

cagaatttgt tcatgactgt tgttttctgt agcctgagac agctgtcttg tgaggactg 60
agatgcagga tttotttcaact cctccccctt gtgacttcaa ggcctctgg catctctttc 120
 5
 <210> 32
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> B-5-1.1 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-B
 15
 <400> 32
gatcaggacg aagtcccagg tcccggacgg ggctctcagg gtctcaggct ccgagggccg 60
cgtctgcaat ggggaggcgc agcgttgggg attccccact cccatgagtt tcac 114
 20
 <210> 33
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> B-5-1.2 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-B
 30
 <400> 33
gatcaggacg aagtcccagg ccccgggccc ggctctcagg gtctcaggct ccgagagccc 60
cgtctgcatt ggggaggcgc agcgttgggg attccccact cccacgagtt tcac 114
 35
 <210> 34
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> B-5-2.1 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-B
 45
 <400> 34
ttcccactcc cattgggtgt cgggtgtcta gagaagccaa tcagtgtcgc cggggtccca 60
gttotaaagt ccccacgcac ccaccggac tcaaaatctc ctcagacgcc 110
 50
 <210> 35
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> B-5-2.2 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-B
 60
 <400> 35
 65

ES 2 827 227 T3

ttcccactcc cattgggtat tggatatcta gagaagccaa tcagcgtcgc cgcggtccca 60
gttctaaagt cccacgcac ccaccggac tcagagtctc ctcagacgcc 110
 5
 <210> 36
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> B-5-2.3 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-B
 15
 <400> 36

ttcccactcc cattgggtgt cggatatcta gagaagccaa tcagcgtcgc cggggtccca 60
gttctaaagt cccacgcac ccaccggac tcagagtctc ctcagacgcc 110
 20

 <210> 37
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> B-I1-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-B
 30
 <400> 37

gggaaatggc ctctgtgggg aggagcgagg ggaccgcagg cgggggcgca ggaccgggg 60
agccgcgccg ggaggagggt cgggccctc ctcgccccca g 101
 35

 <210> 38
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> B-I1-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-B
 45
 <400> 38

gggaaatggc ctctgccggg aggagcgagg ggaccgcagg cgggggcgca ggacctgagg 60
agccgcgccg ggaggagggt cgggcgggtc tcagcccctc ctcacccc 108
 50

 <210> 39
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> B-I2-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-B
 60
 <400> 39
 65

ES 2 827 227 T3

	gtgagtgacc cgggccggg ggcaggtca cgactcccca tccccacgg acggcccggg	60
5	tgcggcgag tctccgggtc cgagatccgc ctccctgagg ccgcgggacc cgccc	115
10	<210> 40 <211> 113 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> B-I2-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-B	
	<400> 40	
20	gtgagtgacc cgggccggg ggcaggtca cgactcccca tccccacgt acggcccggg	60
	tgcggcgag tctccgggtc cgagatccgc ccccgaggcc gggggaccg ccc	113
25	<210> 41 <211> 115 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> B-I2-1.3 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-B	
	<400> 41	
35	gtgagtgacc cgggcctggg ggcaggtca cgaccctcc ccaacccga cgtacggccc	60
	gggtctctc gagtctctag gtcgagatc cgccccgagg ccgcgggacc cgccc	115
40	<210> 42 <211> 110 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> B-I2-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-B	
	<400> 42	
50	gccgcgggac ccgcccagac cctcgaccgg cgagagcccc aggcgcgttt acccggtttc	60
	atthtcagtt gaggcctaaa tccccgagg ttggtcgggg gggggcggg	110
55	<210> 43 <211> 110 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> B-I2-2.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-B	
65	<400> 43	

ES 2 827 227 T3

	gccgcgggac cgcgccagaa cctcgaccgc agagagcccc aggcgacttt acccggttcc	60
5	attttcagtt gaggtcaaaa gccccgcggg ttggtcaggg gggggcgggg	110
	<210> 44 <211> 98 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> B-I3-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-B	
15	<400> 44	
	gtaccagggg cagtggggag ccttcccat ctcctatagg tcgccgggga tggcctccca	60
20	cgagaagaag aggaaaatgg gatcagcgct agaatgtc	98
	<210> 45 <211> 98 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> B-I3-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-B	
30	<400> 45	
	gtaccagggg cagtggggag ccttcccat ctcctataga tcgccgggga tggcctccca	60
35	cgaggagggg aggaaaatga gagaagcgct agaatgtc	98
	<210> 46 <211> 126 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> B-I3-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-B	
45	<400> 46	
50	tgtctggggt ctgtgccct tccccacccc aggtgtcctg tccattotca ggctggtcac	60
	atgggtggtc ctagggtgtc ccatgaaaga tgcaaagcgc ctgaattttc tgactcttcc	120
55	catcag	126
	<210> 47 <211> 93 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> B-I4-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-B	
65	<400> 47	

ES 2 827 227 T3

	gtaaggaggg ggatgagggg tcatatctct tctcagggaa agcaggagcc cttcagcagg	60
5	gtcagggccc ctcatcttcc cctcctttcc cag	93
10	<210> 48 <211> 104 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> B-I4-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-B	
	<400> 48	
20	gtaaggaggg ggatgagggg tcatatctct tctcagggaa agcaggagcc cttctggagc	60
	ccttcagcag ggtcagggcc cctcatcttc cctcctttc ccag	104
25	<210> 49 <211> 115 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> B-I5-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-B	
	<400> 49	
35	gtagggaaagg ggtgaggggt ggggtctggg ttttcttgtc cactggggg tttcaagccc	60
	caggtagaag tgttccctgc ctcatctctg ggaagcagca tgcacacagg ggcta	115
40	<210> 50 <211> 120 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> B-I5-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-B	
	<400> 50	
50	ctttcctcgt gtttctgat cctgccctgg gtctgtagtc atacttctgg aaattctttt	60
	tgggtccaag actaggaggt tcctctaaga tctcatggcc ctgcttcctc ccagtcacct	120
55	<210> 51 <211> 115 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> C-3-2.1 secuencia de la sonda de captura de la región 3' no traducida de HLA-C	
65	<400> 51	

ES 2 827 227 T3

gacagctgcc tgtgtgggac tgagatgcag gatttcttca cacctctcct ttgtgacttc 60
aagagcctct ggcactctct tctgcaaagg catctgaatg tgtctgcggt cctgt 115
 5
 <210> 52
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> C-5-1.1 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-C
 15
 <400> 52

caggacgaag tcccaggtcc cgggcggggc tctcagggtc tcagggtcca agggccgtgt 60
ctgcactggg gaggcgccgc gttggggatt ctccactccc ctgagtttca 110
 20

 <210> 53
 <211> 116
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> C-5-1.2 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-C
 30
 <400> 53

caggacgaag tcccaggtcc cgggcggggc tctctgggtc tcaagctccc agggccgtgt 60
ctgcattggg gaggcgcagc gttggggatt cccactccc actcccctga gtttca 116
 35

 <210> 54
 <211> 109
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> C-5-2.1 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-C
 45
 <400> 54

ctcatgacgc gtccccaatt cccactccca ttgggtgtcg gattctagag aagccaatca 60
gcgtctccgc agtcccgtt ctgaagtccc cagtcacca cccggactc 109
 50

 <210> 55
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> C-5-2.2 secuencia de la sonda de captura de la región 5' no traducida de HLA-C
 60
 <400> 55
 65

ES 2 827 227 T3

	ctcatgacgc gtccccaatt cccactocca ttgggtgctg ggttctagag aagccaatca	60
5	gcgtctaogc agtcccgggt ctgaagtcac ccaccggac tc	102
	<210> 56 <211> 112 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> C-I1-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-C	
15	<400> 56	
	ggttgggagg gaagcggcct ctgcggagag gagcggggg cccgcccggc gagggcgag	60
20	gacccgggga gccgcgcagg gaggtgggtc gggcgggtct cagcccctcc tc	112
	<210> 57 <211> 97 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> C-I2-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-C	
30	<400> 57	
	gtgagtgacc ccggcccggg ggcaggtca cgaccctcc ccatcccca cggacggccc	60
35	gggtcgccc gagtctccc gtctgagatc caccocg	97
	<210> 58 <211> 97 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> C-I2-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 1 de HLA-C	
45	<400> 58	
	gtgagtgacc ccggcccggg ggcaggtca cgaccctcc ccatcccca cggacggccc	60
50	gggtcgcccta gagtctccc gtctgagatc caccoca	97
	<210> 59 <211> 114 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> C-I2-2.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-C	
60	<400> 59	
65		

ES 2 827 227 T3

gcggaacccg cccagaccct cgaccggaga gagccccagt cacctttacc cggtttcatt 60
ttcagtttag gccaaaatcc ccgcgggttg gtcggggcgg ggcggggctc gggg 114
 5
 <210> 60
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> C-I2-2.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-C
 15
 <400> 60

gcggaacccg cccagaccct cgaccggaga gagccctagt cgcctttacc cggtttcatt 60
ttcagtttag gccaaaatcc ccgcgggttg gtcggggctg ggcgggggtt cgggg 115
 20

 <210> 61
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> C-I2-2.3 secuencia de la sonda de captura del Intrón 2 de HLA-C
 30
 <400> 61

gcggaacccg cccagaccct cgaccggaga gagccccagt cacctttacc cggtttcatt 60
ttcagtttag gccaaaatcc ccgcgggttg gtcggggctg ggcgggggct cgggg 115
 35

 <210> 62
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> C-I3-1.1a secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-C
 45
 <400> 62

gggcagtggg gaggcctccc catctcctgt agatctcccg ggatggcctc ccacgaggag 60
gggaggaaaa tgggatcagc gctagaatat cggcctccct tgaatgga 108
 50

 <210> 63
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> C-I3-1.1b secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-C
 60
 <400> 63
 65

ES 2 827 227 T3

ccccttccc caccaggt gtcctgtcca ttctcaggat agtcacatgg gcgctgttg 60
 agtgtgcaa gagagataca aagtgtctga atttctgac tcttccgtc 110
 5
 <210> 64
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> C-I3-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 3 de HLA-C
 15
 <400> 64
 cgccttccc caccaggt gtcctgtcca ttctcaggat ggtcacatgg gcgctgttg 60
 agtgtccaa gagagatgca aagtgtctga atttctgac tcttccgtc 110
 20
 <210> 65
 <211> 117
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> C-I4-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-C
 30
 <400> 65
 ggaggggat gaggggtcat gtgtcttctc agggaaagca gaagtcctgg agccctcag 60
 ccgggtcagg gctgaggctt gggggtcagg gccctcacc tccccctct tcccag 117
 35
 <210> 66
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> C-I4-1.2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-C
 45
 <400> 66
 ggaggggat gaggggtgat atctgttctc agggaaagca ggagccctc tggagccctt 60
 cagcagggtc agggccctc acctccccct ccttcccag 100
 50
 <210> 67
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> C-I4-1.3 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-C
 60
 <400> 67
 65

ES 2 827 227 T3

ggaggggaat ggggggtcac atctcttatc agagaaagca gaagtccttc tggagccctt 60
 cagccgggtc agggctgagg ctgggggtc agggcccctc accttctcct cctttcccag 120
 5
 <210> 68
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> C-I4-1.4 secuencia de la sonda de captura del Intrón 4 de HLA-C
 15
 <400> 68
 ggaggggat gagggtcat gtgtcttctc agggaaagca gaagtccttc tggagccctt 60
 cagccgggtc agggctgagg ctgggtgta agggcccctc accttcccct cctttcccag 120
 20
 <210> 69
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> C-I5-1.1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-C
 30
 <400> 69
 gggctctgggt tttcttgtcc cactgggagt ttcaagcccc aggtagaagt gtgccccacc 60
 tcgttactgg aagcaccatc cacacctggg ccatcccagc ctgggaccct 110
 35
 <210> 70
 <211> 118
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> C-I5-2-1 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-C
 45
 <400> 70
 cctgggtctg cagtcatagt tctggaaact tctcttgggt ccaagactag gaggttcccc 60
 taagatcgca tggccctgcc tcctccctgt cccctcacag ggcattttct tcccacag 118
 50
 <210> 71
 <211> 118
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> C-I5-2-2 secuencia de la sonda de captura del Intrón 5 de HLA-C
 60
 <400> 71
 65

ES 2 827 227 T3

cctgggtctg cagtcgtagt tctggaaact tctcttgggt ccaagactag gaggttcccc 60

taaaatcaca tggccctgcc tcttcccagt cccctcatag ggcattttct tcccacag 118

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar uno o más alelos del gen HLA en un sujeto, el método comprende:
- 5 a) poner en contacto una muestra de ácido nucleico del sujeto con sondas oligonucleotídicas en donde una o más de las sondas oligonucleotídicas se hibridan con las secuencias diana del gen HLA en la muestra de ácido nucleico;
- b) enriquecer un ácido nucleico que está hibridado con una sonda oligonucleotídica al separarla del ácido nucleico no unido a una sonda oligonucleotídica; y
- 10 c) secuenciar el ácido nucleico enriquecido mediante cribado de alto rendimiento para identificar uno o más alelos del gen HLA;
- en donde las secuencias de genes diana están en una región no codificante de uno o más genes HLA, y en donde las sondas oligonucleotídicas son adecuadas para preparar el ácido nucleico para cribado de alto rendimiento mediante el uso de captura de diana.
- 15 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde las sondas oligonucleotídicas comprenden una etiqueta de captura.
3. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra de ácido nucleico que se pone en contacto con las sondas oligonucleotídicas comprende ácido nucleico monocatenario.
- 20 4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra de ácido nucleico se fragmenta antes de ponerse en contacto con las sondas oligonucleotídicas.
5. El método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende, además, fragmentar la muestra de ácido nucleico para obtener fragmentos de ácido nucleico de al menos aproximadamente 2 kb de longitud antes de la etapa (a).
- 25 6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una o más de las sondas oligonucleotídicas comprenden una secuencia de ácido nucleico idéntica al menos en un 95 % a cualquiera de las SEQ ID NO:1-8 o 10-71.
- 30 7. Un método para identificar un donante de trasplante para un receptor que necesita un trasplante, el método comprende:
- 35 a) realizar el método de conformidad con cualquiera las reivindicaciones anteriores para identificar uno o más alelos del gen HLA en el receptor que necesita un trasplante; e
- b) identificar un donante de trasplante basado en la presencia de uno o más alelos en un gen HLA tanto del donante de trasplante como del receptor de trasplante.
- 40 8. Un método para reducir la probabilidad de que un receptor de trasplante desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped, el método comprende:
- 45 a) realizar el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para identificar uno o más alelos del gen HLA en el receptor que necesita un trasplante; e
- b) identificar un donante de trasplante basado en la presencia de uno o más alelos del gen HLA tanto en el donante de trasplante como en el receptor de trasplante;
- en donde la presencia del uno o más alelos del gen HLA tanto en el receptor de trasplante como en el donante de trasplante es indicativa de una probabilidad reducida de que el receptor de trasplante desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped después del trasplante de un injerto del donante de trasplante.
- 50

Alelos HLA	Secuencia del intrón 1 de HLA A									
	80	90	100	110	120	130	140			
GADN										
A*01:01:01:01 (SEQ ID: 9)	GTGAGTG	CGGGGTCGGG	AGGSAACCG	CCTCTGCGGG	GAGAAGCAAG	GGGCCCTCCT	GGCGGGGGCG			
A*01:01:01:02N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:01:38L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:03	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:04N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:11N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:16N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:01:01	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:01:18	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:02:01	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:05	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:50Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:60	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:69N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:74	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:77	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*11:110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*36:01	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
A*01:02	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			

Figura 1

A*33:01:01	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*33:03:01	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*33:07	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*24:03:01	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G--	-----
A*24:07:01	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G--	-----
A*24:08	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G--	-----
A*32:01:01	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*32:06	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*74:01	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*74:02:01:01	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*74:02:01:02	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----G--C	-----
A*34:01:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*34:02:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*43:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*66:01:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*66:17	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:01:01:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:01:01:02	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:01:02:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:01:02:02	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:02:01:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:02:01:02	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:02:01:03	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:02:02	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:03:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----
A*68:08:01	-----	-----	-----G-	-----T-	-----	-----G--C	-----

Figura 1 continuación

A*02:03:03	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:05:01	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:06:01	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:07:01	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:10	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:32N	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:43N	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:48	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:51	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:53N	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:57	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:60:01	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:65	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:68	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:77	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:81	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:89	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:95	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:251	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:259	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:264	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:265	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:266	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:269	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:279	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---
A*02:376	-A-----	-C--	-A-----	-----	-----G--	-----	-C---T---	---

Figura 1 continuación

A*29:01:01:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-TG--	-----	-C-----	---
A*29:01:01:02N	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-TG--	-----	-C-----	---
A*29:02:01:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-TG--	-----	-C-----	---
A*29:02:01:02	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-TG--	-----	-C-----	---
A*29:46	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-TG--	-----	-C-----	---
A*31:01:02	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*31:01:23	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*31:04	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*31:14N	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*31:46	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*33:01:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*33:03:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*33:07	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G-A	-----	-C-----	---
A*32:01:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*32:06	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*74:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*74:02:01:01	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*74:02:01:02	-T-----	-C--	-T-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*34:01:01	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*34:02:01	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*43:01	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*66:01:01	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*66:17	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*68:01:01:01	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*68:01:01:02	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---
A*68:01:02:01	-A-----	-C--	-A-----	-T-----	-C-----	-G--	-----	-C-----	---

Figura 1 continuación

A*68:01:02:02	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:02:01:01	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:02:01:02	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:02:01:03	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:02:02	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:03:01	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:08:01	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:17	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:18N	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:22	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:71	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*68:113	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*69:01	-A-----	-T-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*80:01:01:01	-A-----	-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----
A*80:01:01:02	-A-----	-----	-----G--	-C-----	-----	-C-----	-----

Figura 1 continuación

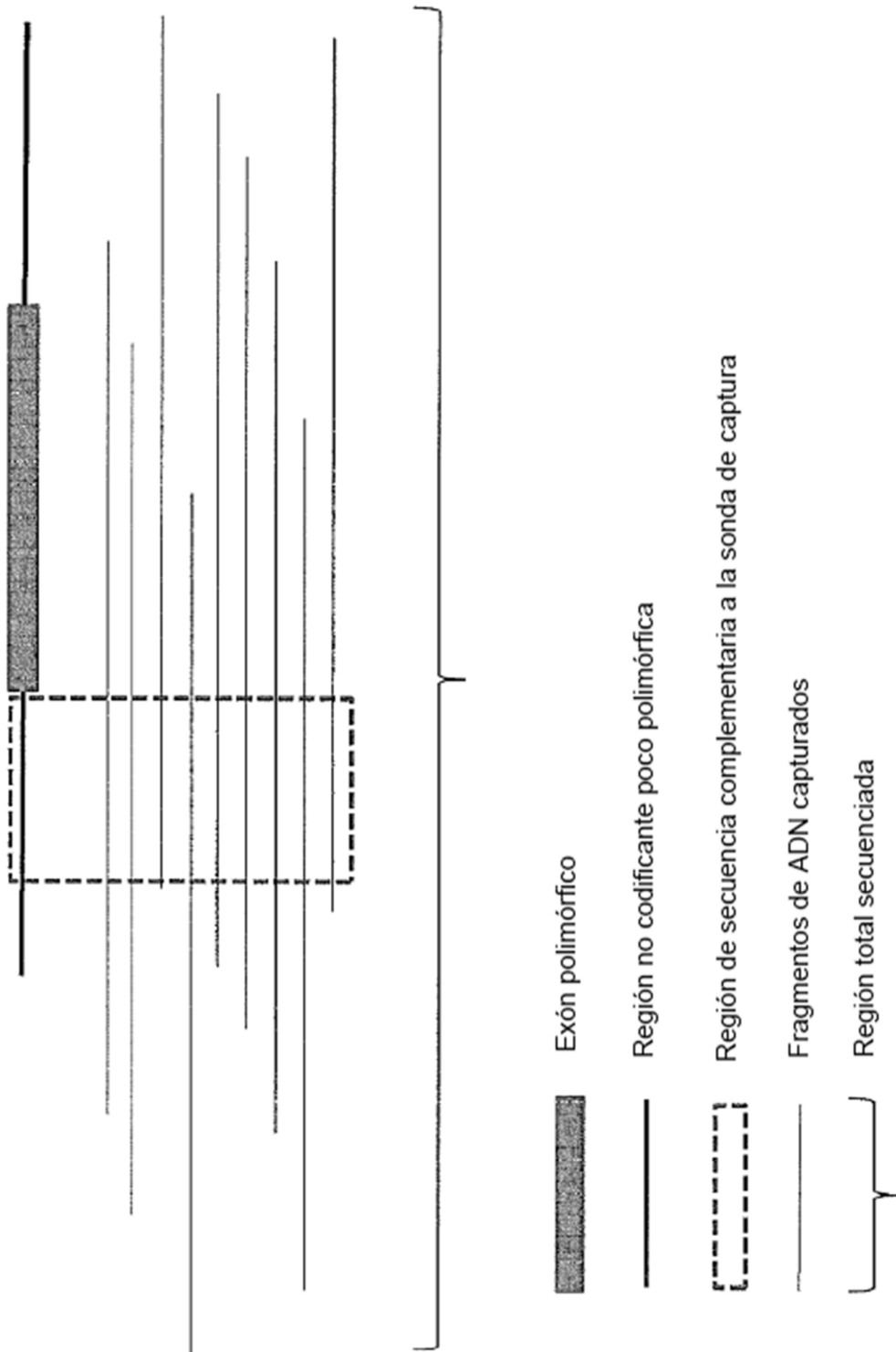


Figura 2

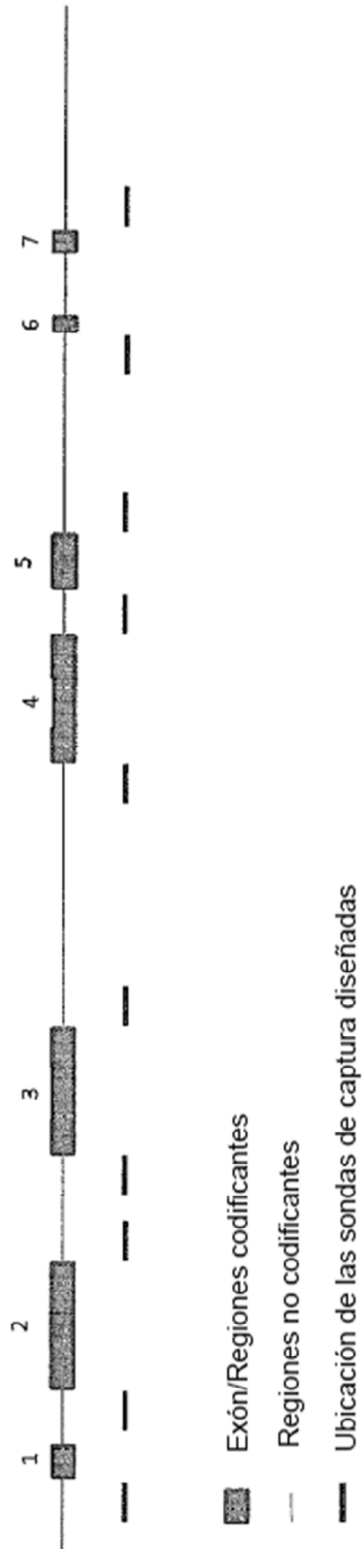


Figura 3

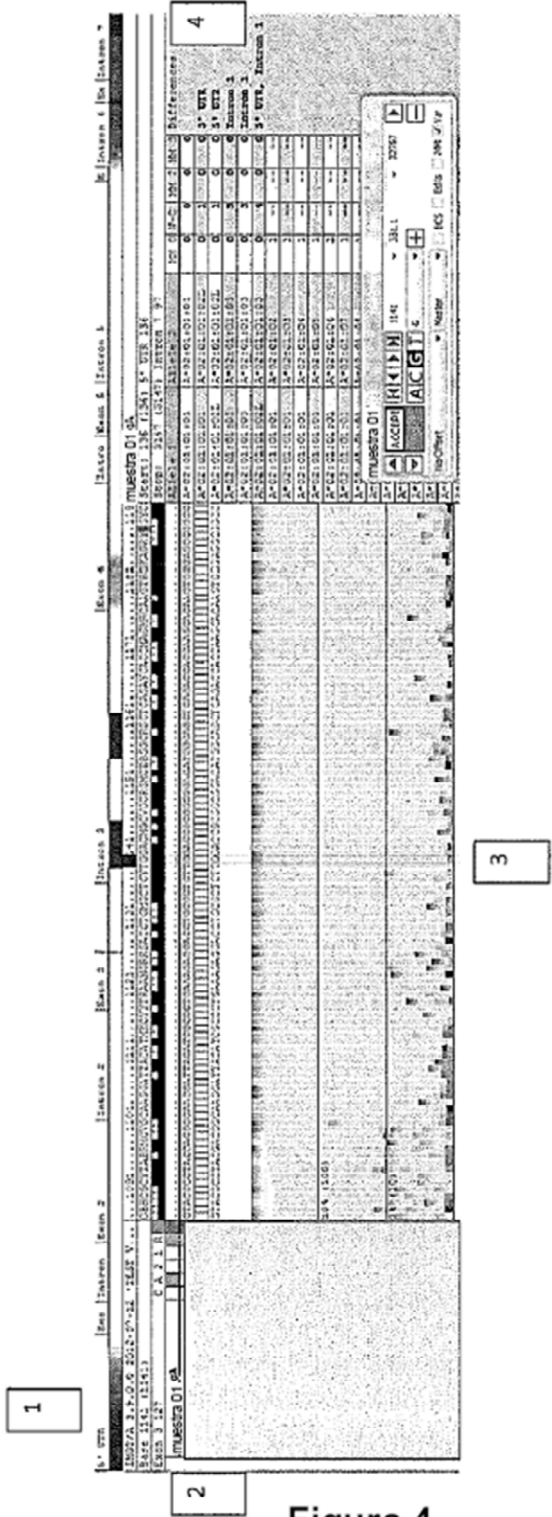


Figura 4

Muestra	Locus	Genotipos reportados	
		Sanger	Sonda de captura
Muestra 1	HLA A	01:01:01:01	01:01:01:01
	HLA A	24:02:01:01	24:02:01:01
	HLA B	08:01:01	08:01:01
	HLA B	15:01:01*	15:01:01*
	HLA C	04:01:01*	04:01:01*
	HLA C	07:01:01:01	07:01:01:01
Muestra 2	HLA A	02:01:01:01	02:01:01:01
	HLA A	31:01:02	31:01:02
	HLA B	27:05:02	27:05:02
	HLA B	40:01:02	40:01:02
	HLA C	02:02:02:01	02:02:02:01
	HLA C	03:04:01:01	03:04:01:01
Muestra 3	HLA A	03:01:01:01	03:01:01:01
	HLA A	24:03:01	24:03:01
	HLA B	39:06:02	39:06:02
	HLA B	50:01:01	50:01:01
	HLA C	12:03:01:01	12:03:01:01
	HLA C	15:04	15:04

Figura 5