



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 416**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01954272 .9**

96 Fecha de presentación : **29.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1297181**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Generación de muestras para genotipar mediante espectrometría de masas.**

30 Prioridad: **30.06.2000 EP 00401886**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.10.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.10.2010**

73 Titular/es: **Commissariat à l'Énergie Atomique et  
aux Énergies Alternatives  
25, rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Gut, Ivo, Glynne;  
Lechner, Doris y  
Sauer, Sascha**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

**ES 2 347 416 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

Generación de muestras para genotipar mediante espectrometría de masas.

5 La invención se refiere a un método universal para preparar muestras de ADN para el genotipado de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP), deleciones e inserciones, mediante espectrometría de masas. El método de la invención permite generar muestras de una manera que permite someter a ensayo una amplia representación del genoma del individuo, y analizar estas muestras mediante espectrometría de masas sin necesidad de una etapa de purificación.

10 El más importante de los proyectos genoma, la secuencia completa del genoma humano, finalizará en los próximos años. Este proyecto revelará la secuencia completa de los 3.000 millones de bases y las posiciones relativas de la totalidad de los estimados 100.000 genes en este genoma. Disponer de esta secuencia abre posibilidades ilimitadas para dilucidar la función génica y la interacción de diferentes genes. También permitirá la implementación de farmacogenética y farmacogenómica. La farmacogenética y la farmacogenómica presentan como objetivo el uso dirigido  
15 de medicación en dependencia con el genotipo de un individuo, y por lo tanto, la drástica mejora de la eficiencia de los fármacos. Una etapa intermedia necesaria a lo anterior es determinar la variabilidad de los diferentes individuos a nivel genómico. Esto se consigue determinando diferentes marcadores y después utilizándolos para el genotipado.

20 En la actualidad se utilizan dos tipos de marcadores para el genotipado: microsatélites y polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP). Los microsatélites son marcadores altamente polimórficos en los que diferentes alelos están constituidos por un número diferente de elementos de secuencia repetitivos entre regiones flanqueantes conservadas. De promedio, se encuentra un microsatélite cada 100.000 bases. Un mapa completo de los marcadores microsatélites en el genoma humano ha sido presentado por Génethon (Dib *et al.*, Nature 380:152-4, 1996). Los microsatélites se genotipan a partir de la determinación de los tamaños de los productos de PCR generados a lo largo de la región repetitiva en geles. Los sistemas más ampliamente utilizados se basan en la utilización de ADN marcado fluorescentemente  
25 y su detección en secuenciadores fluorescentes. Se encuentran menos SNP en el dominio público. El consorcio SNP está estableciendo un mapa de los SNP de 300.000 SNP (*Science* 284:406-407, 1999).

30 Para el genotipado de los SNP, el experto en la materia dispone de unos cuantos métodos, todos con ventajas y desventajas.

Algunos de dichos métodos se basan en la detección en gel, por ejemplo el ensayo de la ligasa de oligonucleótidos (OLA), y por ello sólo permiten aplicaciones de rendimiento intermedio.

35 Otros métodos se basan en la hibridación únicamente, que no es tan discriminante y resulta difícil de ajustar para obtener la elevada astringencia necesaria (matrices de oligonucleótidos, chips de ADN). Aunque los chips de ADN resultan muy adecuados para el genotipado simultáneo de un gran número de genotipos en una región muy limitada del genoma y en un número supervisable de individuos, el problema principal observado al utilizar estos métodos es la dificultad para optimizar las condiciones de la hibridación (en particular para la astringencia).  
40

Se han utilizado enfoques de extensión de cebadores y de detección mediante fluorescencia. Su ventaja es la fácil detección de la emisión en un lector de tipo ELISA. La limitación de estos métodos es el limitado número de pigmentos fluorescentes disponible, que a su vez limita el número de muestras que puede analizarse simultáneamente.

45 Varios métodos utilizan la detección con un espectrómetro de masas, debido a que la espectrometría de masas permite potencialmente un rendimiento muy alto y simultáneamente proporciona información adicional a partir de la masa absoluta. En aplicaciones en las que se mide un producto específico de un alelo, ésta es información directa y por lo tanto muy sólida. Sin embargo, aunque la espectrometría de masas presenta un potencial muy alto para el genotipado de un gran número de muestras, la desventaja principal que presentan actualmente los usuarios es la  
50 necesidad de purificar las muestras generadas antes del análisis mismo.

De hecho, recientemente se ha presentado un método denominado "ensayo Invader" (T. Griffin y L.M. Smith, Proceedings of the ASMS, 1998, patentes WO n° 98/23774 y US n° 5.843.669). En este procedimiento se aplican dos oligonucleótidos que cubren un polimorfismo conocido. Un oligonucleótido cubre la secuencia de manera que su extremo 3' se encuentre sobre la posición del polimorfismo. Para el ensayo se utilizan dos oligonucleótidos con la secuencia que continúa en el lado 3' de la posición del polimorfismo. En el lado 5' del polimorfismo se cubren los diferentes alelos y después se continúa con cualquier secuencia de bases. Dichos dos oligonucleótidos se hibridan con ADN genómico. Mediante la utilización de una endonucleasa estructuralmente específica, se recorta el extremo 5'-  
55 protuberante del oligonucleótido 3' en el caso de que exista apareamiento con el alelo del polimorfismo. El fragmento escindido se utiliza para la caracterización. Ésta puede realizarse mediante análisis directo del fragmento escindido mediante, por ejemplo, espectrometría de masas, o uniendo pigmentos fluorescentes al oligonucleótido y observando el desarrollo de la extinción de la fluorescencia. La desventaja de esta detección mediante espectrometría de masas es que la sensibilidad de detección es reducida y que los fragmentos escindidos deben purificarse debido a que el análisis del ADN nativo es muy sensible a las impurezas.  
60

65 La espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) permite el análisis de espectrometría de masas de moléculas biológicas (Karas, M. e Hillenkamp, *F., Anal. Chem.* 60:2299-2301, 1988). MALDI ha sido aplicado al análisis del ADN en diferentes formas, desde el análisis de productos

## ES 2 347 416 T3

de PCR, a enfoques que utilizan la terminación específica de alelo, o reacciones de extensión de cebador de nucleótidos únicos, la secuenciación y la hibridación (patentes US n° 5.885.775, WO 96/29431, US n° 5.691.141, WO 97/37041, WO 94/16101, WO 96/27681, GB n° 2.339.279).

5 Tal como se ha indicado anteriormente, las desventajas principales de la mayoría de estos enfoques son que se basan en gran medida en procedimientos astringentes de purificación previos al análisis de MALDI que no permiten una fácil automatización y constituyen una parte importante de los costes. Frecuentemente se utiliza la purificación en columna giratoria y/o la tecnología de perlas magnéticas y la purificación en fase.

10 En el futuro se dispondrá de la secuencia completa del genoma y en la actualidad se están estableciendo mapas de los SNP, por lo que resultará deseable llevar a cabo la determinación de SNP en múltiples regiones del genoma de un individuo con el fin de determinar, por ejemplo, su susceptibilidad a una enfermedad basada en múltiples genes. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar un método que permita la generación de una representación del ADN genómico y el análisis de los SNP que podrían encontrarse presentes en estas regiones, determinando dichos SNP, por  
15 ejemplo, mediante análisis informático de las regiones que se generen, y no determinando el SNP de interés antes de generar las regiones que contienen dichos polimorfismos, tal como proponen los métodos actuales.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método universal y genético para resolver dicho problema. Un objetivo de la presente invención consiste asimismo en proporcionar un procedimiento para el análisis de SNP que  
20 resulte sencillo, económico, altamente multiplexable, fácilmente automatizable y que permita un alto rendimiento.

El procedimiento según la invención utiliza el potencial de una preparación altamente paralela de productos específicos de alelo, su acondicionamiento de manera que no requieran purificación y el potencial de los espectrómetros de masas para distinguir simultáneamente un gran número de productos en un espectro y de registrar un único espectro  
25 en unos cuantos segundos, alcanzando simultáneamente una relación de señal a ruido apropiada.

Resulta realmente difícil ajustar la sensibilidad (relación de señal a radio) y la complejidad (multiplexado) de los procedimientos de genotipado.

30 La invención proporciona un método para el genotipado que comprende tres etapas:

- a. reducir la complejidad del genoma,
- b. generar productos específicos de alelo,
- 35 c. analizar los productos mediante espectrometría de masas.

El método de la invención se caracteriza porque la generación de productos específicos de alelo en la etapa b. se realiza mediante por lo menos un método que utiliza uno o más oligonucleótidos específicos de uno o más alelos.  
40

La reducción de la complejidad del genoma en la etapa a. se lleva a cabo mediante una técnica que conduce al aislamiento no dirigido de regiones del ADN genómico. En efecto el objetivo de la invención consiste en obtener una representación grande del genoma y después llevar a cabo el análisis de genotipado para las modificaciones que pueden encontrarse presentes en dicha representación, y no realizar dicho análisis en una región específica del genoma  
45 que habría sido localizada tras seleccionar SNP, deleciones o inserciones de interés.

Alternativamente existen algunos métodos que pueden utilizarse para incrementar la población de regiones genómicas definidas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 51:263-273, 1986) amplifica un tramo de secuencia de ADN utilizando dos secuencias oligonucleótidas de reconocimiento (cebadores), una ADN polimerasa y bloques de construcción de ADN constitutivo. Habitualmente los cebadores se definen con el fin de amplificar una región de ADN seleccionada. La PCR debería utilizarse, según la presente invención, para amplificar las partes significativas de un genoma y no las partes cortas y específicas.  
50

Existen dos conceptos para la amplificación de partes definidas y significativas de un genoma. La DOP-PCR (PCR de cebador oligonucleótido degenerado) utiliza cebadores que presentan en su interior una o más bases degeneradas. A partir de lo expuesto anteriormente puede conseguirse una representación distribuida equitativamente en todo el genoma. En el caso de que dos de las secuencias degeneradas se encuentren enfrentadas en un intervalo suficientemente estrecho para las condiciones de PCR seleccionadas, se genera un producto de PCR (Telenius *et al.*, *Genomics* 13:718-  
60 25, 1992).

El segundo método es la ALU-PCR. Para este método se utilizan como cebadores secuencias repetitivas muy representadas en el genoma. En el presente caso se utilizan secuencias repetidas de ALU (Nelson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6686-90, 1989).  
65

Los dos métodos pueden combinarse con la PCR de grandes tamaños ("Long Range PCR"), que permite la amplificación de secuencias muy grandes de ADN.

## ES 2 347 416 T3

La reacción en cadena de la ligasa (LCR) utiliza cuatro secuencias oligonucleótidas de reconocimiento (oligonucleótidos) y una ADN ligasa (Landegren *et al.*, *Science* 241:1077-80, 1988).

5 Otra posibilidad para la generación de grandes regiones de ADN es la producción de sondas “candado”. Este método utiliza trozos lineales de ADN circularizado mediante ligación dirigida por molde, a la que puede seguir la amplificación por círculo rodante de estos moldes (patentes WO 99/49079, 97/09069).

10 Otro método para la reducción de la complejidad del genoma es el polimorfismo de tamaño de los fragmentos amplificados (AFLP). Para la AFLP, el ADN genómico se digiere con un enzima de restricción. Se ligan oligonucleótidos con secuencias conocidas a los extremos de los fragmentos de restricción. Estas secuencias unidas conjuntamente con las primeras pocas bases del producto ligado se utilizan como secuencias de cebador para una PCR. La elección de las pocas bases del cebador permite la selección y la extracción de únicamente una fracción de la secuencia genómica (Vos *et al.*, *Nucleic Acids Research* 23:4407-14, 1995).

15 Otro método que podría utilizarse para la reducción de la complejidad del genoma es la reacción de corte. En esta implementación, la reducción de la complejidad se consigue escindiendo secuencias conocidas de oligonucleótidos. Los productos escindidos conocidos que pueden generarse en gran número son una representación reducida de la complejidad del ADN genómico (Griffin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6301-6, 1999). Sauer *et al.*, *Nucleic Acids Research* 28(5):13, 2000, describen un método para genotipar SNP que implica una PCR, la extensión de cebador  
20 específica de alelo y espectrometría de masas MALDI.

Tal como se ha mencionado anteriormente, tras reducir la complejidad del genoma, siendo seleccionado el método utilizado por el experto en la materia en función del objetivo pretendido, el SNP que se detectará preferentemente puede seleccionarse mediante análisis asistido por ordenador, mediante la utilización de datos disponibles en las bases  
25 de datos públicas.

La generación de los productos específicos de alelo se lleva a cabo mediante la utilización de oligonucleótidos específicos de alelo. Estos oligonucleótidos habitualmente incluyen una base degenerada que es específica de uno de los alelos del SNP que debe someterse a ensayo, y que interacciona correctamente sólo con ese alelo del SNP.

30 Para detectar que se ha completado la hibridación, resulta necesario llevar a cabo unas cuantas etapas tras la hibridación de los oligonucleótidos específicos de alelo. Los métodos que pueden utilizarse son: extensión de cebador, ligación específica de alelo o reacción de corte.

35 La extensión de cebador se lleva a cabo con cebadores específicos de alelo y una ADN polimerasa.

Preferentemente, el oligonucleótido presenta una longitud de entre 17 y 25 bases y presenta una naturaleza quimérica. Una parte (el extremo 5') es ADN natural con enlaces fosfodiéster, mientras que se introducen modificaciones en la proximidad del extremo 3' del oligonucleótido. Éstas sirven para incrementar la sensibilidad de detección en el espectrómetro de masas. En la forma de realización más preferida, los oligonucleótidos portan modificaciones que permiten la separación de las dos diferentes partes del oligonucleótido quimérico mediante corte químico o enzimático.

40 Además, la ligación específica de alelo utiliza un oligonucleótido que es específico de alelo (el extremo 3' del cual es el SNP) y otro oligonucleótido que se encuentra en el lado inmediatamente 3' del primero. La ligación únicamente se llevará a cabo en el caso de que los dos oligonucleótidos se hibriden con el molde en el sitio de la ligación (Landegren *et al.*, *Science* 241:1077-80, 1988). Alternativamente, la especificidad de alelo puede conseguirse apareando la base del extremo 5' correspondiente del oligonucleótido 3'.

45 Preferentemente, los oligonucleótidos son de naturaleza quimérica. El oligonucleótido 5' porta su modificación en el extremo 3' del mismo, mientras que el oligonucleótido 3' porta su modificación en el extremo 5' del mismo. Estos últimos sirven para incrementar la sensibilidad de detección en el espectrómetro de masas. En la forma de realización más preferida, los oligonucleótidos portan modificaciones que permiten la separación de las dos partes diferentes del oligonucleótido quimérico mediante corte químico o enzimático.

50 En otra implementación, los productos específicos de alelo se generan mediante corte de un extremo protuberante por una cleavasa, una endonucleasa flap (FEN), una resolvasa o una endonucleasa. Un oligonucleótido cubre la secuencia comprendida entre la posición inmediatamente en el lado 5' y el polimorfismo. Se añade a la preparación un segundo oligonucleótido compuesto para que cubra completamente la secuencia hasta el primer oligonucleótido para un alelo del polimorfismo pero no para el otro. Este oligonucleótido es de naturaleza quimérica y presenta un extremo  
55 5' protuberante, que se modifica.

A continuación, la preparación se incuba con una endonucleasa estructuralmente específica. Esta endonucleasa escinde la parte protuberante del oligonucleótido 3' que sobresale del ADN de doble cadena en el caso de que se produzca una correspondencia completa: un alelo del polimorfismo. A continuación, esta parte se utiliza para el análisis mediante espectrometría de masas. Pueden utilizarse simultáneamente dos oligonucleótidos diferentes que cubran los dos alelos de un polimorfismo. El extremo 5' de los dos oligonucleótidos quiméricos puede seleccionarse de manera que cada producto escindido presente una masa diferente. Se asignan los alelos a partir de la presencia o ausencia de las diferentes masas. Se selecciona la naturaleza del fragmento escindido de manera que pueda detectarse  
65

## ES 2 347 416 T3

mediante espectrometría de masas con una sensibilidad elevada y sin purificación, directamente a partir de la mezcla de reacción.

Debe entenderse que la reducción de la complejidad del genoma puede llevarse a cabo mediante la utilización de más de uno de los métodos descritos anteriormente. Lo anterior conduciría a una representación mayor del genoma que la utilización de únicamente un método. Dependiendo del SNP que deba utilizarse, también podrían combinarse y utilizarse varios métodos, por lo menos uno de los cuales utilizaría uno o más oligonucleótidos específicos de alelo. El experto en la materia podrá combinar dos o más métodos dependiendo de los productos específicos de alelo que se utilicen (número, secuencias, etc.).

El método de la invención muestra la combinación de diferentes medios para reducir la complejidad del genoma utilizando técnicas específicas de alelo de preparación de muestras. De hecho, ninguno de los procedimientos anteriormente indicados para generar productos específicos de alelo puede aplicarse directamente al ADN genómico.

Por otra parte, la sensibilidad de detección del espectrómetro de masas en combinación con la tecnología de aplicación de etiquetas de carga resulta suficiente para detectar los productos generados mediante los métodos descritos para la preparación específica de alelo de muestras directamente a partir del ADN genómico. Debido a la representación de la mayoría de secuencias 20-meras de reconocimiento de bases en el ADN genómico, por ejemplo, del ser humano, no se consigue una relación de señal a ruido suficiente y por lo tanto no resulta posible el genotipado.

La presente invención permite resolver dichos problemas mediante la provisión de una estrategia general que puede utilizarse para genotipar múltiples SNP en una serie de experimentos. Uno de los puntos fuertes de la presente invención es que proporciona posibilidades para combinar cualquier método de reducción de la complejidad con cualquier generación de producto específica de alelo y que los productos se encuentran inmediata y fácilmente disponibles para el análisis de espectrometría de masas.

Debido a que el análisis de ácidos nucleicos mediante MALDI es fuertemente dependiente del estado de carga de la molécula que debe someterse a ensayo, un incremento de 100 veces en la sensibilidad del análisis puede conseguirse en el caso de que se acondicione el ADN para que porte una carga positiva. Dichos productos de ADN modificado también son significativamente menos susceptibles a la formación de compuesto y por lo tanto no requieren procedimientos de purificación (Gut y Beck, *Nucleic Acids Res.* 23:1367-1373, 1995; Gut *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11:43-50, 1997).

Resulta ventajoso utilizar uno o más oligonucleótidos modificados en la etapa b. del método de la invención de manera que resulte posible un análisis de espectrometría de masas con una sensibilidad significativamente más alta que para uno o más oligonucleótidos no modificados y no purificados.

También resulta importante acondicionar los productos generados en la etapa b. del método de la invención para que porten una única carga en exceso, positiva o negativa. Habitualmente resulta posible modificar dichos productos generados en la etapa b. para que porten una única carga.

Para conseguir dicho objetivo, los oligonucleótidos pueden seleccionarse de manera que puedan escindirse tras la generación de los productos específicos de alelo, satisfaciendo el producto escindido los requisitos de portar una única carga o de ser capaz de modificación química para alcanzar dicho estado cargado.

En una puesta en práctica preferida de la presente invención, la parte escindida es un péptido ácido nucleico, un péptido, un metilfosfonato, un etilfosfonato, un metoxifosfonato o un etoxifosfonato. En otra puesta en práctica preferida, la parte escindida es un oligonucleótido que contiene enlaces fosforotioato. Puede introducirse una única carga positiva en el producto de escisión mediante acoplamiento de una funcionalidad que contenga carga al mismo. Lo expuesto anteriormente puede conseguirse mediante condensación de una función etiqueta de carga positiva en el extremo 5' del extremo protuberante en una función amino, mediante la unión de la misma a una de las bases del extremo protuberante o mediante la salida de un grupo fosfato natural con la parte escindida del oligonucleótido y seleccionando el esqueleto del extremo protuberante de manera que pueda neutralizarse su carga mediante alquilación de, por ejemplo, enlaces fosforotioato o mediante la selección de una modificación de una modificación oligonucleótido que ya se encuentre no cargada.

Por lo tanto, resulta importante utilizar oligonucleótidos quiméricos, constituidos por el esqueleto natural de azúcar-fosfato (enlaces fosfodiéster), siendo un extremo (más preferentemente el extremo 5') un fosforotioato, etilfosfonato, metoxifosfonato, etoxifosfonato, fosforoselenoato, péptido ácido nucleico o un péptido. Preferentemente, los oligonucleótidos presentan una longitud de entre 13 y 40 bases.

También resulta preferente que la parte no modificada del oligonucleótido u oligonucleótidos se separe de la parte modificada, tras la generación de los productos específicos de alelo. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la utilización de corte químico o enzimático. La reacción de corte enzimático preferentemente es una digestión inhibida de nucleasa. La reacción de corte con la endonucleasa o exonucleasa se inhibe de manera que no se digieran los productos que deben analizarse.

5 Resulta importante la modificación de los oligonucleótidos debido a que permite realizar un análisis de espectrometría de masas con una sensibilidad más alta que para un oligonucleótido no modificado. En efecto, debido al gran número de cargas negativas en el ADN negativo, con frecuencia resulta difícil analizar el ADN mediante espectrometría de masas. El método de la invención utiliza oligonucleótidos quiméricos para resolver este problema y permitir la fácil detección de numerosos SNP simultáneamente.

10 Por ejemplo, en el caso de que los oligonucleótidos sean parcialmente fosfodiéster y parcialmente fosforotioato, la parte que se escinde contiene los enlaces fosforotioato. La neutralización de las cargas de los enlaces fosforotioato puede conseguirse fácilmente mediante alquilación.

15 El etiquetado con cargas de los productos de escisión se lleva a cabo aplicando dos estrategias ligeramente diferentes, dependiendo de los modos iónicos utilizados (positivo o negativo):

- 15 - para el etiquetado con cargas positivas, una base que contiene una funcionalidad de carga positiva o por lo menos una función química que después permita la introducción de una etiqueta de carga en la parte del oligonucleótido que posteriormente se escinde de manera específica de alelo.
- 20 - para el etiquetado de carga para el modo iónico negativo, la parte escindida puede sintetizarse de manera que quede un único grupo fosfato en el fragmento escindido, mientras que el resto sean fosforotioatos. Debido a que la reacción de alquilación es selectiva para los grupos fosforotioato, el grupo fosfato permanece sin cambios y de esta manera actúa como la etiqueta de carga negativa. En una forma de realización preferida de la invención, el grupo fosfato se encuentra más próximo al sitio de corte de la endonucleasa estructuralmente activa. Lo expuesto anteriormente garantiza el funcionamiento óptimo de la endonucleasa.

25 En otra forma de realización, los oligonucleótidos son modificados para que sean parcialmente ADN fosfodiéster y parcialmente APN. La posición de corte es un enlace azúcar-fosfato natural que resulta cortado por la endonucleasa estructuralmente sensible. El oligonucleótido quimérico puede sintetizarse de manera que quede un enlace fosfato residual en el producto escindido. La carga negativa del grupo fosfato puede servir como la carga necesaria para la extracción del producto en el espectrómetro de masas. Dichos oligonucleótidos pueden utilizarse en el procedimiento de corte para la generación de productos específicos de alelo, en el aspecto de que el APN consiga una sensibilidad más alta en el análisis de espectrometría de masas y no requiera la purificación previa al análisis.

30 Lo expuesto anteriormente es otra ventaja del procedimiento de la invención, debido a que las modificaciones químicas previstas en los oligonucleótidos específicos de alelo utilizados para la generación de los productos específicos de alelo permiten el análisis de dichos productos mediante espectrometría de masas sin purificación o separación respecto de la mezcla de reacción.

35 Debido a que el método de la invención está destinado a la utilización en el análisis de un gran número de SNP simultáneamente, resulta importante que cada producto específico de alelo generado en la etapa b. presente una masa única, que permita la asignación inequívoca de alelo a dicho producto. Lo expuesto anteriormente puede conseguirse seleccionando cuidadosamente los oligonucleótidos específicos de alelo y el método para la generación de productos específicos de alelo. Un análisis asistido por ordenador ayudará al experto en la materia a determinar los oligonucleótidos efectivos que deben utilizarse. Habitualmente resulta óptimo utilizar oligonucleótidos concebidos de manera que los productos generados en la etapa b. presenten una longitud comprendida entre 2 y 15 bases, más preferentemente de entre 2 y 10 bases.

40 El análisis de los productos generados mediante el método o métodos específicos de alelo seleccionados se lleva a cabo mediante espectrometría de masas. Aunque MALDI resulta un método preferido, otra forma de realización del procedimiento utiliza la espectrometría de masas de ionización por electropulverización, tal como se describe en la solicitud de patente WO n° 99/29897.

45 En el caso de que se utilice MALDI, la elección de la matriz puede resultar importante para la ionización de los productos específicos de alelo. Podría utilizarse una matriz con buenas propiedades ionizantes, o una con propiedades débilmente ionizantes. También podría utilizarse una matriz que muestre una fuerte absorción en la longitud de onda del láser.

50 Preferentemente se utiliza una matriz de entre matrices tales como ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, metiléster de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, ácido  $\alpha$ -ciano-4-metoxicinámico, derivados de los mismos, y una mezcla de dichas matrices.

55 El experto en la materia también determinará las condiciones del análisis de espectrometría de masas que permitan el análisis de los fragmentos modificados obtenidos a partir de los productos específicos de alelo, mientras que todos los productos secundarios de la reacción (incluyendo los esqueletos fosfodiéster naturales que han sido escindidos) no resultan detectables. La elección de matriz resulta muy importante para dicha detección específica de los productos deseados.

60 Por lo tanto, el método descrito en la presente invención es un método universal que permite el genotipado de múltiples SNP a partir de ADN genómico de un individuo. Tras la reducción de la complejidad del genoma, el ADN

se genotipa mediante la utilización de oligonucleótidos específicos de alelo que preferentemente se modifican con el fin de permitir su análisis mediante espectrometría de masas sin purificación. El método muestra una gran mejora en comparación con la técnica anterior, en el aspecto de que es el primer procedimiento descrito que realmente permite la utilización del potencial completo de la detección mediante espectrometría de masas en el genotipado, principalmente el multiplexado y la automatización, que anteriormente resultaban dificultados por la necesidad de purificar los productos.

Los ejemplos siguientes ilustran diferentes formas de realización de la invención, y las condiciones operativas indicadas en dichos ejemplos no deben considerarse como limitativas de la invención, y podrán ser optimizadas para cada aplicación por el experto en la materia.

### Descripción de las figuras

Figura 1: *principio de la invención.*

Figura 2: *vista general detallada de la invención.* Se ha reducido la complejidad del ADN genómico, y se han generado productos específicos de alelo, que pueden acondicionarse opcionalmente mediante simple química de modificación, y que se analizan mediante espectrometría de masas y sin necesidad de purificación.

Figura 3: *reducción de complejidad mediante PCR y extensión de cebadores.* La reducción de la complejidad se lleva a cabo mediante la utilización de uno de los métodos de PCR descritos. A continuación, los productos de amplificación resultantes se utilizan como moldes para una reacción de extensión de cebador específica de alelo. Las partes no modificadas de los productos de extensión de cebador deben ser eliminadas y el producto resultante se analiza mediante MALDI.

Figura 4: *reducción de la complejidad mediante PCR y endonucleasa Flap.* La reducción de la complejidad del ADN genómico se consigue mediante la utilización de una reacción de endonucleasa Flap. La generación de productos específicos de alelo también se lleva a cabo mediante una reacción de endonucleasa Flap. El acondicionamiento de los productos para el análisis MALDI se lleva a cabo tal como se describe en la especificación.

Figura 5: *reducción de la complejidad con sondas candado y extensión de cebadores.* La reducción de la complejidad del ADN genómico se consigue mediante la utilización de varias sondas candado. Los productos circularizados pueden utilizarse para una amplificación por círculo rodante. Los productos resultantes sirven como moldes para una reacción de extensión de cebador específica de alelo, tal como se ha indicado anteriormente.

Figura 6: *reducción de la complejidad con sondas candado y endonucleasa Flap.* La reducción de la complejidad se lleva a cabo mediante la generación de sondas candado. En este caso, la generación de productos específicos de alelo se consigue mediante una reacción de endonucleasa Flap. El resto debe llevarse a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

Figura 7: *reducción de la complejidad con sondas candado y ligación de oligonucleótidos.* La reducción de la complejidad del ADN genómico se consigue mediante la generación de sondas candado. La generación de productos específicos de alelo se lleva a cabo mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos. El resto se lleva a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### PCR y ligación de oligonucleótidos

PCR: Tris-HCl 40 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  32 mM, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM a pH 8,8, 5 pmoles de cebadores directos e inversos, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 5 ng de ADN genómico y 0,2 U de ADN polimerasa Taq se enrasan con agua hasta un volumen de reacción de 10  $\mu\text{l}$ . La reacción se desnaturaliza durante 2 minutos a 95°C, después se termocicla durante 20 segundos a 95°C, a continuación durante 30 segundos a la temperatura de hibridación apropiada (por ejemplo 65°C) y durante 30 segundos a 72°C 30 veces.

Ligación: se separan 5  $\mu\text{l}$  de la PCR para la etapa de ligación. Se utilizan tres oligonucleótidos (25 pmoles de cada uno) para la ligación. Dos de ellos contienen una secuencia específica de alelo y uno se utiliza como la pareja de ligación. El oligonucleótido 3' porta un grupo fosfato en su extremo 5' y una modificación en el esqueleto en el puente entre los nucleósidos uno y dos (y entre dos y tres, y de esta manera sucesivamente) desde el extremo 5', que puede ser un fosforotioato, un metilfosfonato, un péptido ácido nucleico o similar. El oligonucleótido 5' contiene una modificación del esqueleto, tal como los ejemplos mencionados, en su extremo 3'. Se enrasan con agua hasta un volumen de reacción de 20  $\mu\text{l}$ , 5 U de una ADN ligasa Th (termoestable) y Tris-HCl 20 mM, KCl 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Triton X-100 al 0,1%, NAD 0,1 mM, DTT 10 mM a pH 7,5. La reacción se desnaturaliza durante 2 minutos a 95°C, después se termocicla durante 15 segundos a 95°C y durante 90 segundos a la temperatura de ligación apropiada (por ejemplo 45°C) 25 veces.

## ES 2 347 416 T3

Digestión con exonucleasa: se utilizó una 5'-exonucleasa y una 3'-exonucleasa para la digestión de la mayor parte de los oligonucleótidos (no modificados). El pH de la reacción debe ajustarse aproximadamente, utilizando ácido acético, a pH 7. Se incubaron durante 1 hora a 37°C 2 U de 5'-fosfodiesterasa de bazo bovino como la 5'-exonucleasa y 10 U de 3'-exonucleasa Exo III. Este procedimiento también puede llevarse a cabo en un procedimiento de dos etapas mediante la utilización en primer lugar de 5 U de 3'-fosfodiesterasa de veneno de serpiente y la incubación durante una hora a 37°C. En una segunda etapa se ajusta el pH a 7 y se incuban 2 U de 5'-fosfodiesterasa de bazo bovino durante 1 hora a 37°C.

Los productos que contenían fosforotioato se alquilaron en 45 µl de acetonitrilo, 15 µl de tampón de bicarbonato de trietilamonio (pH 8,5) y 14 µl de yoduro de metilo durante 25 minutos a 40°C. A continuación, se añadieron 20 µl de agua y se mezclaron 20 µl de la fase superior con 45 µl de acetonitrilo al 40%.

Los productos que contenían metilfosfonato se diluyeron en 50 a 250 µl de acetonitrilo al 40%.

A continuación, se cargaron 0,4 µl de los productos en una diana recubierta de una capa fina de matriz, tal como metiléster de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sauer *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 28:13, 2000; Landegren *et al.*, *Science* 241:1077-1080, 1988).

### Ejemplo 2

#### PCR de una etapa y ligación

La PCR y la ligación se llevaron a cabo en una etapa. Se enrasaron con agua hasta un volumen de reacción de 20 µl, Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, NAD 1 mM, 200 µM de dNTPs, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, 2,5 µM de cada cebador de PCR (25 a 30-meros) y 0,2 µM de cada oligonucleótido de ligación (12 a 17-meros), 5 ng de ADN genómico, 0,2 U de ADN polimerasa Taq y 5 U de una ADN ligasa (termoestable). La reacción se desnaturizó durante 2 minutos a 95°C, después se termocicló durante 15 segundos a 95°C, incrementando la temperatura lentamente hasta 65°C durante 90 segundos, 30 segundos a 65°C 10 veces, 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 65°C 30 veces, 15 segundos a 95°C y 90 segundos a 45°C 25 veces.

Se llevaron a cabo las etapas siguientes tal como en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 3

#### Reacción en cadena de la ligasa y ligación de oligonucleótidos

Se generaron moldes de complejidad reducida mediante la utilización de un conjunto de seis oligonucleótidos de ligación. Tres de ellos funcionan de manera similar a los del primer y segundo ejemplos, aunque con ADN genómico y no con productos de PCR. Los productos generados sirven como moldes para el otro conjunto de tres oligonucleótidos. El resultado de este enfoque es una amplificación de producto eficiente.

Se enrasó con agua hasta un volumen de reacción de 50 µl, ácido N-(2-hidroxietil)-piperazín-N-(3-propanosulfónico) 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 10 mM, KCl 80 mM, DTT 1 mM, BSA 1 µg por ml, NAD 100 µM y 1 pmol de cada uno de los seis oligonucleótidos (por ejemplo 20-meros) en un conjunto y 5 U de una ADN ligasa termoestable. La reacción se desnaturizó durante 2 minutos a 95°C, después se termocicló durante 20 segundos a 95°C, 90 segundos a la temperatura de hibridación y ligación apropiada (por ejemplo 55°C) 30 veces (Nickerson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-8927, 1991; Baron *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:1279-1282, 1996).

Las etapas siguientes se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1.

El principio de la variante generado mediante ligación se muestra para el polimorfismo 61 de un único nucleótido del gen humano para el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

Molde:

5'-TTACTGGACTGAGGTTGC[G/A]CCTGCTCCAGGGAGCCCATGTGAC-3' (SEC ID nº 1 y 2)

3'-AATGACCTGACTCCAACG[G/T]\* GGACGAGGTCCCTCGGGTA-5' (SEC ID nº 3 y 4).

\* el polimorfismo de un único nucleótido en el presente ejemplo se detectó mediante una ligación de dos oligonucleótidos específicos de alelo selectivamente conectados. El oligonucleótido 3' contenía un grupo fosfato libre en su extremo 5', y el oligonucleótido 5' contenía un grupo hidroxilo libre en su extremo 3'.

## ES 2 347 416 T3

Las secuencias en **negrita subrayadas** muestran los productos específicos de alelo que se generan tras la digestión con 5'-exonucleasa y 3'-exonucleasa. La digestión resultó inhibida por la modificación apropiada del esqueleto de fosfatos de los oligonucleótidos. En el caso de los fosforotioatos, resulta necesario neutralizar la carga del esqueleto mediante alquilación. Esta etapa puede resultar innecesaria en el caso de que se utilicen, por ejemplo, metilfosfonatos. Los productos deben prepararse para el procedimiento MALDI tal como se ha descrito anteriormente.

Con el fin de incrementar la cantidad de los productos y para evitar una etapa de amplificación por PCR, el producto de la primera ligación puede utilizarse como nuevo molde para otro conjunto de productos específicos de alelo, que se muestra a continuación:

2. producto:

5'-TACTGGACTGAGGTTG**C[C/A]\*CCTGCTCCAGGGAGCCCATG**-3' (SEC ID nº 5 y 6).

1. producto:

3'-AATGACCTGACTCCAACG[G/T]GGACGAGGTCCCTCGGGTA-5' (SEC ID nº 3 y 4).

### Ejemplo 4

#### *Reacción en cadena de la ligasa y extensión de cebadores*

Con el fin de mejorar la selectividad del enfoque que se describe en el tercer ejemplo, se utilizó una etapa de extensión de cebador siguiendo la LCR llevada a cabo bajo las condiciones indicadas en el Ejemplo 2.

*Reacción de extensión de cebador:* se añadieron 25 pmoles del cebador con etiqueta de carga, conjuntamente con 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -S-dNTPs (conjunto reducido, se omitió por lo menos una de las cuatro bases y en algunos casos se substituyó con el  $\alpha$ -S-ddNTP correspondiente) y 0,5 U de termosequenasa. Se incrementó el volumen de reacción a 20  $\mu$ l mediante la adición de agua. Se utilizó una etapa inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 62°C. Extracción del cebador: se añadió 1  $\mu$ l de una solución 0,5 M de ácido acético a la reacción procesada de extensión, resultando en un pH de reacción <7,0. A continuación, se añadieron 2  $\mu$ l de 5'-fosfodiesterasa, que había sido previamente dializada frente a citrato amónico (0,1 M, pH 6,0) y la reacción se incubó durante 45 minutos a 37°C.

*Reacción de alquilación:* se añadieron 45  $\mu$ l de acetonitrilo, 15  $\mu$ l de solución de bicarbonato de trietilamonio (pH 8,5) y 14  $\mu$ l de CH<sub>3</sub>I. Se incubó la reacción a 40°C durante 25 minutos. Tras enfriar, se obtuvo un sistema bifásico. Se extrajo una muestra de 20  $\mu$ l de la capa superior y se diluyó en 45  $\mu$ l de acetonitrilo al 40%. Esta solución se utilizó directamente para transferir las muestras sobre la matriz.

*Preparación de muestras para el análisis MALDI:* se preparó el metiléster de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico (CNME) transfiriendo un punto de 0,5  $\mu$ l de una solución al 1% en acetona a la diana y transfiriendo un punto de 0,3  $\mu$ l de una solución de la muestra en acetonitrilo al 40% sobre la matriz seca. El acetonitrilo al 40% disuelve la capa superficial de la matriz, permitiendo una incorporación concentrada de los analitos en la superficie de la matriz. Mediante esta preparación, se consiguió una capa de matriz cristalina muy delgada y fina. Se sintetizó el CNME siguiendo el método de Gut *et al.* (*Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11:43-50, 1997).

### Ejemplo 5

#### *Reducción de la complejidad del genoma con una endonucleasa Flap*

Reacción de endonucleasa Flap: se mezclaron conjuntamente 1  $\mu$ l de tampón de reacción (polietilenglicol al 16%, ácido (3-[N-morfolino]propanosulfónico 50 mM, pH 7,5), 1  $\mu$ l de oligonucleótido primario 12  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de ADN o ARN genómico humano 500 ng/ $\mu$ l o una cantidad comparable de un producto de (RT)-PCR y 3  $\mu$ l de agua. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 63°C y se añadieron 3  $\mu$ l de una solución que contenía MgCl<sub>2</sub> 75 mM y 5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos sonda primarios y 100 ng de una endonucleasa Flap (por ejemplo Afu-FEN1 de *Archaeoglobus fulgidus* o Pfu-FEN1 de *Pyrococcus furiosus*). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 63°C. Los fragmentos escindidos de oligonucleótidos secundarios sirvieron como representación de complejidad reducida del ADN que debía

## ES 2 347 416 T3

analizarse. Los fragmentos escindidos pueden utilizarse como nuevos oligonucleótidos primarios para una reacción de endonucleasa Flap posterior en un molde sintético proporcionado a una concentración significativamente más alta que el ADN genómico. Gracias al ciclo de actividad de la reacción primaria, se proporciona una representación sustancial para la posterior reacción específica de alelo, tal como se muestra en el Ejemplo 6, por ejemplo mediante una reacción altamente multiplexada con varios oligonucleótidos sonda y oligonucleótidos intruso para varios loci (Kaiser *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry* 30:21387-21394, 1999; Lyamichev *et al.*, *Nature Biotechnology* 17:292-296, 1999; Griffin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6301-6306, 1999).

### 10 Ejemplo 6

#### *Reacciones de endonucleasa Flap para la generación de productos específicos de alelo*

15 *Reacción de endonucleasa Flap:* se mezclaron conjuntamente 1  $\mu$ l de tampón de reacción (polietilenglicol al 16%, ácido (3-[N-morfolino)-propanosulfónico 50 mM, pH 7,5), 1  $\mu$ l de oligonucleótido primario, 1  $\mu$ l de ADN o ARN genómico humano 500 ng/ $\mu$ l o una cantidad comparable de un producto de (RT)-PCR y 3  $\mu$ l de agua. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 63°C y se añadieron 3  $\mu$ l de una solución que contenía MgCl<sub>2</sub> 75 mM y 5 pmoles de cada uno de los dos oligonucleótidos sonda primarios y 100 ng de una endonucleasa Flap (por ejemplo FEN 1 Afu de *Archaeoglobus fulgidus* o FEN 1 Pfu de *Pyrococcus furiosus*). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 63°C.

25 El producto escindido de la sonda puede contener previamente esqueletos de carga neutra, tales como metilfosfonatos o modificaciones que pueden convertirse en neutras de carga, tales como fosforotioatos, mediante un procedimiento de alquilación. La etiqueta de carga puede ser positiva (por ejemplo mediante una modificación del grupo amino) o negativa (por ejemplo mediante un puente fosfato).

30 Oligonucleótidos utilizados para SNP 22708 (A/T) en el gen del enzima conversor de la angiotensina (ACE). Los metilfosfonatos ("mp") pueden sustituirse por fosforotioatos u otros nucleótidos modificados. El lado de corte de las sondas se encuentra situado entre las posiciones 4 y 5 desde el extremo 5':

Intruso ACE 22708 1: SEC ID nº 7

35

Sonda 1 ACE/MP Pos. (SEC ID nº 8):

40 5'-**T(NH<sub>2</sub>)<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>A<sub>mp</sub>**AGGGCAATACAGCAAGACCCCGTCT

40

Sonda 2 ACE/MPPos (SEC ID nº 9)

45 5'-**T(NH<sub>2</sub>)<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>A<sub>mp</sub>**TGGGCAATACAGCAAGACCCCGTCT

45

Sonda 1 ACE/MPNeg (SEC ID nº 10):

50 5'-**T<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>**AAGGGCAATACAGCAAGACCCCGTCT

50

Sonda 2 ACE/MPNeg (SEC ID nº 11):

55 5'-**T<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>**ATGGGCAATACAGCAAGACCCCGTCT

55

60 Las bases subrayadas corresponden a bases metilfosfonato. La primera T en el extremo 5' de estas sondas porta un grupo NH<sub>2</sub> que permite proporcionar carga positiva a los fragmentos obtenidos (en negrita).

Los productos (en negrita) deben prepararse para el procedimiento MALDI tal como se describe en la sección sobre la ligación, mediante digestión con exonucleasa y neutralización de la carga.

65 En contraste con el ejemplo anterior, los oligonucleótidos sonda utilizados pueden encontrarse no modificados, aunque resulta absolutamente necesario que el producto escindido sea más largo que en el primer ejemplo, debido a que debe actuar como nuevo oligonucleótido intruso para la segunda diana.

## ES 2 347 416 T3

Sonda 1 ACE/IN (SEC ID nº 12): 5'- GGCCCTGTA<sup>o</sup>ACTCGGAA  
GGGCAATACAGCAAGACCCCGTCT

5 Sonda 2 ACE/IN (SEC ID nº 13): 5'- GGA<sup>o</sup>ACTGTGGCTCTTAT  
GGGCAATACAGCAAGACCCCGTCT

10 Oligonucleótido intruso derivado de la Sonda 1 ACE/IN (SEC ID nº 14): 5'-  
GGCCCTGTA<sup>o</sup>ACTCGGAG

15 Oligonucleótido intruso derivado de la Sonda 2 ACE/IN (SEC ID nº 15): 5'-  
GGA<sup>o</sup>ACTGTGGCTCTTAA

Segundos moldes sintéticos:

1. SEC ID nº 16
2. SEC ID nº 17

25 Sonda sec. 1 positiva (SEC ID nº 18):  
5'-**C(NH<sub>2</sub>)<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>G<sub>mp</sub>I**GGACCGTCGTACACCG

30 Sonda sec. 2 positiva (SEC ID nº 19):  
5'-**G(NH<sub>2</sub>)<sub>mp</sub>C<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>G<sub>mp</sub>**AGCAGTGTCTGTACATTG

Las bases subrayadas corresponden a las bases metilfosfonato. La primera C y la primera G en el extremo 5' de estas dos sondas portan un grupo NH<sub>2</sub> que permiten proporcionar carga positiva a los fragmentos obtenidos (en negrita).

35 Sonda sec. 1 negativa (SEC ID nº 20):  
5'-**C<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>G**TGGACCGTCGTACACCG

40 Sonda sec. 2 negativa (SEC ID nº 21):  
5'-**G<sub>mp</sub>C<sub>mp</sub>T<sub>mp</sub>G**AGCAGTGTCTGTACATTG

Las bases subrayadas corresponden a bases metilfosfonato. La primera T en el extremo 5' de estas sondas porta un grupo NH<sub>2</sub> que permite proporcionar carga positiva a los fragmentos obtenidos (en negrita).

45 Los productos (en negrita) deben prepararse para el procedimiento MALDI tal como se ha descrito.

### Ejemplo 7

#### Ligación de la sonda candado

55 La sonda (SEC ID nº 22) que se encuentra químicamente 5'-fosforilada y purificada mediante fase inversa presenta una concentración de aproximadamente 0,01 µM. En la parte de la sonda indicada como N<sub>40</sub> se encuentra una secuencia de cebador para la reacción RCA siguiente y también un sitio de restricción para *Hpa*II. Se utilizaron 50 ng de ADN genómico como molde. Se calentaron a 65°C KAc 50 mM, MgAc<sub>2</sub> 10 mM, Tris-Ac 10 mM (pH 7,5), ATP 1 mM y albúmina sérica bovina (BSA) 0,1 µg/µl en un volumen de 20 µl y se enfriaron hasta la temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 µl de una ADN ligasa de T4 (0,5 U/µl) y se incubó a 37°C durante una hora. La ligación se terminó mediante incubación a 65°C durante 10 minutos.

60 *Reacción RCR*: se utilizaron 5 µl de la reacción de ligación y se completaron con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, ditiotreitól 1 mM y BSA 0,2 µg/µl, dNTPs 0,25 mM, 0,1 pmoles de cebador y 2 ng/µl de ADN polimerasa phi hasta un volumen de 20 µl. La reacción se calentó a 65°C y se enfrió hasta la temperatura ambiente antes de añadir la polimerasa.

65 Los productos de la RCR se digirieron con enzimas de restricción mediante la adición a la reacción de un oligonucleótido complementario al sitio de restricción *Hpa*II integrado en las sondas que se habían amplificado mediante

## ES 2 347 416 T3

círculo rodante y el ajuste del tampón a las condiciones recomendadas por el fabricante. Las reacciones se calentaron a 65°C y se enfriaron hasta la temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 U de *HpaII*. La digestión se incubó a 37°C durante 12 horas y se detuvo mediante incubación a 65°C durante 10 minutos.

5 Las secuencias en N<sub>40</sub> deben contener una secuencia para el cebador para la amplificación mediante círculo rodante, por ejemplo la secuencia SEC ID n° 23. Este oligonucleótido contiene un sitio de restricción *HpaII* (CCGG).

10 El oligonucleótido que resulta necesario para la restricción con *HpaII* es complementario al cebador para la amplificación mediante círculo rodante y contiene el sitio de restricción *HpaII* respectivo (CCGG) (Lizardi *et al.*, *Nature Genetics* 19:225-232, 1998; Banér *et al.*, *Nucleic Acids Research* 26:5073-5078, 1998).

### Ejemplo 8

15 *Oligonucleótido degenerado (DOP) y PCR Alu*

Los cebadores utilizados fueron la secuencia SEC ID n° 24 en el caso de la PCR degenerada, o la secuencia SEC ID n° 25, que representa una determinada secuencia Alu para la PCR Alu. Se añadió a un volumen de 50 µl, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, 2 µM de cebador, dNTPs 0,2 mM, gelatina al 0,01%, 1,5 U de ADN polimerasa Taq y 500 ng de ADN. Procedimiento de ciclado: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 50 segundos, 70°C durante 7 minutos (Tagle y Collins, *Nucleic Acids Research* 1:1211-122, 1992; Telenius *et al.*, *Genomics* 13:718-725, 1992).

25 Ejemplo 9

### *PCR arbitraria*

*Secuencia del cebador: SEC ID n° 26*

30 Se introdujeron en agua hasta un volumen de reacción de 10 µl, Tris-HCl 40 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 32 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, a pH 8,8, 0,5 µM de cebador, dNTPs 600 µM, gelatina al 0,01%, 10 a 25 ng de ADN genómico y 2 U de ADN polimerasa Taq. Se llevó a cabo el termociclado durante 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C y 2 minutos a 72°C (Welsh *et al.*, *Nucleic Acids Research* 19:303-306, 1991).

35

Ejemplo 10

### *Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)*

40 *Modificación del ADN y preparación de molde:* los oligonucleótidos AFLP están constituidos por una secuencia nuclear, una secuencia específica de enzima de restricción y un sitio de extensión selectiva. Se incubaron 0,5 µg de ADN genómico durante 1 hora a 37°C con 6 U de *EcoRI* y 6 U de *MseI* en 40 µl de Tris-HAc 10 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KAc 50 mM, DTT 5 mM, BSA 50 ng/µl. A continuación, se añadieron 10 µl de una solución que contenía 5 pmoles de adaptadores de *EcoRI* (SEC ID n° 27 y SEC ID n° 28), 5 pmoles de adaptadores *MseI* (SEC ID n° 29 y SEC ID n° 30), 1 U de ADN ligasa de T4, ATP 1 mM en Tris-HAc 10 mM, pH 7,5, MgAc 10 mM, KAc 50 mM, DTT 5 mM, BSA 50 ng/µl y se incubó durante 3 horas a 37°C. Tras la ligación, la mezcla de reacción se diluyó hasta 500 µl con Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0 y se congeló.

50 Procedimiento general para las reacciones de AFLP: se utilizaron cebadores de sitios de restricción que contenían *EcoRI* y *MseI*, en el presente ejemplo, la secuencia SEC ID n° 31 para *EcoRI* y la secuencia SEC ID n° 32 para *MseI*.

55 Los 20 µl contenían 5 ng de cebador *EcoRI* y 30 ng de cebador *MseI*, 5 µl de molde de ADN, 0,5 U de ADN polimerasa Taq, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM y dNTPs 200 µM. El esquema de ciclado depende de las diferentes extensiones de los cebadores AFLP. Las reacciones que no presentan ningún nucleótido o un único nucleótido se llevan a cabo durante 20 ciclos siguiendo el perfil siguiente: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C y 1 minuto a 72°C. Las reacciones con cebadores que presentan dos o tres nucleótidos selectivos se llevan a cabo durante 35 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos de hibridación (ver comentario, posteriormente) y 1 minuto a 72°C. La temperatura de hibridación se selecciona que sea 65°C para el primer ciclo y se reduce en cada ciclo en 60 0,7°C durante los siguientes 12 ciclos y se continúa durante los ciclos restantes a 56°C.

Se recomienda preamplificar con dos cebadores AFLP que presenten únicamente un nucleótido selectivo. En este caso, se utilizan 30 ng de ambos cebadores. Tras la preamplificación, la reacción se diluye 10 veces con Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0. Resulta necesario llevar a cabo una segunda ronda de amplificación tal como la descrita anteriormente, con cebadores AFLP que contengan extensiones selectivas más largas (Vos *et al.*, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414, 1995).

65

## ES 2 347 416 T3

### Ejemplo 11

#### *Extensión de cebador específica de alelo*

5 Extensión de cebador con cebadores específicos de alelo para el polimorfismo 61 de un único nucleótido del gen humano para el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (ver también el punto 3) - ensayo MOLA): se añaden 25 pmoles de fosfortioato y cebadores de extensión de cebador modificado con etiqueta de carga (que presentan las secuencias: 5'-(N) $\gamma$ TTACTGGACTGAGGTTGCC (secuencias SEC ID n° 33 a 54) y 5'-(N) $\gamma$ TTACTGGACTGAGGTTGCA (secuencias SEC ID n° 55 a 76)) conjuntamente con MgCl<sub>2</sub> 2 mM, MnCl<sub>2</sub> 0,2 mM, 10  $\alpha$ -S-ddNTPs 100  $\mu$ M (en este caso únicamente  $\alpha$ -S-ddCTP) y 2 U de termosecuencia al producto de PCR que ya contiene tampón y se enrasa con agua hasta un volumen de 20  $\mu$ l. Además, resulta posible utilizar cebadores que ya contienen un esqueleto de carga neutra, tales como metilfosfonatos, en combinación con dNTPs y/o ddNTPs. Se aplica una etapa de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 15 58°C y 1 minuto a 62°C.

15 En las secuencias de los cebadores, N se refiere a la amplia variedad de bases, por ejemplo una cola de Gs, y se refiere a un número variable de bases, y puede presentar cualquier valor entre 0 y 21.

20

25

30

35

40

45

50

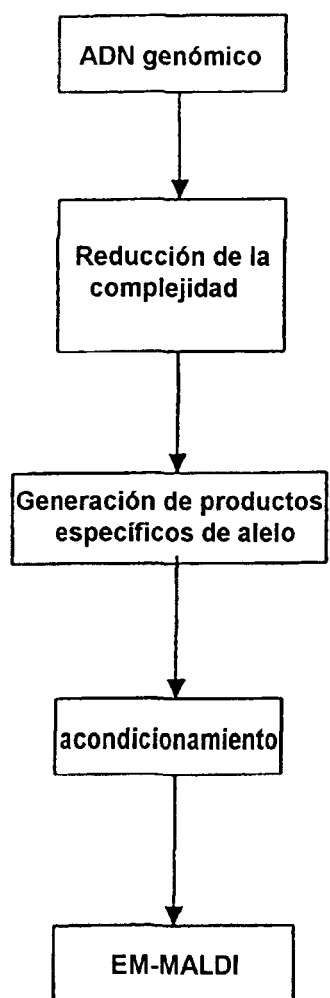
55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el genotipado de polimorfismos de un nucleótido único (SNP) mediante espectrometría de masas, que comprende las etapas siguientes:
- a. reducir la complejidad de la muestra de ADN genómico para obtener una representación amplia del genoma mediante PCR Alu o PCR de cebadores oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR),
  - 10 b. generar un(os) producto(s) específico(s) de alelo sobre los productos generados en la etapa a., en el que la generación del (de los) producto(s) específico(s) de alelo en la etapa b. se lleva a cabo mediante por lo menos un método que utiliza un(os) oligonucleótido(s) específico(s) de alelo,
  - 15 c. analizar por espectrometría de masas los productos generados en la etapa b, en el que el análisis de espectrometría de masas en la etapa c. se lleva a cabo sobre los productos generados en la etapa b. sin purificación ni separación de la mezcla de reacción.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa b. se lleva a cabo mediante por lo menos un método seleccionado de entre el grupo constituido por extensión de cebador, ligación específica de alelo y corte de un extremo protuberante mediante una cleavasa, una endonucleasa Flap (FEN), una resolvasa o una endonucleasa.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el (los) oligonucleótido(s) específico(s) de alelo se modifica(n) para que permita(n) el análisis de espectrometría de masas con una sensibilidad significativamente superior para un(os) oligonucleótido(s) no modificado(s).
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los productos generados en la etapa b. se acondicionan, o pueden acondicionarse, para que porten una carga única en exceso, positiva o negativa.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los productos generados en la etapa b. y tras el acondicionamiento presentan una longitud comprendida entre 2 y 10 bases.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que por lo menos un oligonucleótido utilizado en la etapa b. es quimérico.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, en el que el (los) oligonucleótido(s) quimérico(s) está(n) constituido(s) por un esqueleto de azúcar-fosfato regular, con un extremo que es un fosforotioato, un fosforoselenoato, un metilfosfonato, un etilfosfonato, un metoxifosfonato, un etoxifosfonato, un ácido nucleico peptídico o un péptido.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, en el que la parte regular de (de los) oligonucleótido(s) presenta una longitud de entre 13 y 40 bases.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que los productos generados en la etapa b. se obtienen mediante corte de la parte modificada procedente de la parte no modificada de (de los) oligonucleótido(s) quimérico(s).
- 45 10. Método según la reivindicación 9, en el que el corte se lleva a cabo mediante por lo menos un método de entre el grupo constituido por una digestión de endonucleasa inhibida, una digestión de exonucleasa inhibida o el corte químico.
- 50 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa c. se lleva a cabo mediante análisis de masas de los productos de la etapa b., siendo la masa de cada producto generada única y permitiendo la asignación alélica inequívoca.
- 55 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa c. se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la matriz se selecciona de entre el grupo constituido por matrices de ácido a-ciano-4-hidroxicinámico, de metiléster de ácido a-ciano-4-hidroxicinámico, de ácido a-ciano-4-metoxicinámico, los derivados de las mismas, y una mezcla de estas matrices.
- 60 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa c. se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización.
- 65



**FIG. 1**

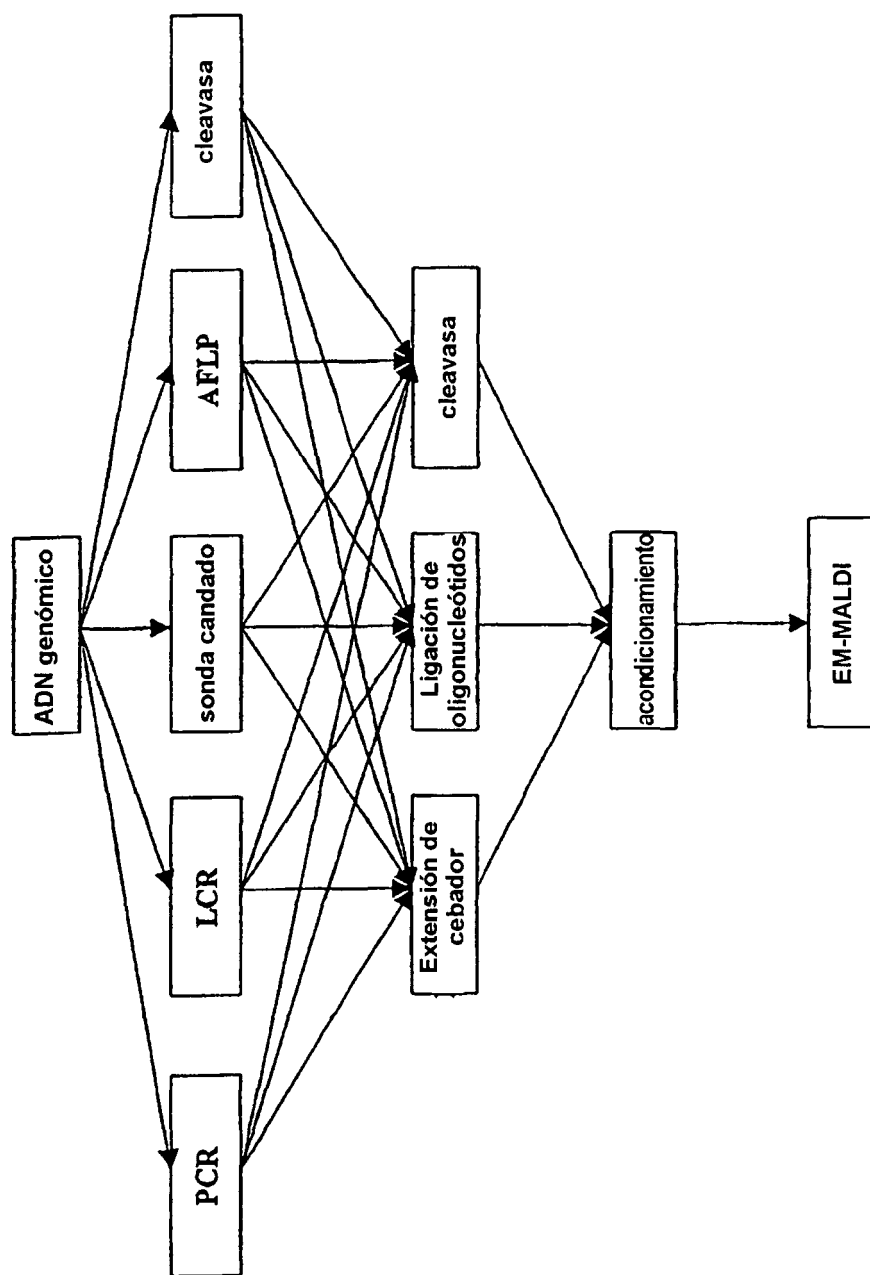


FIG. 2

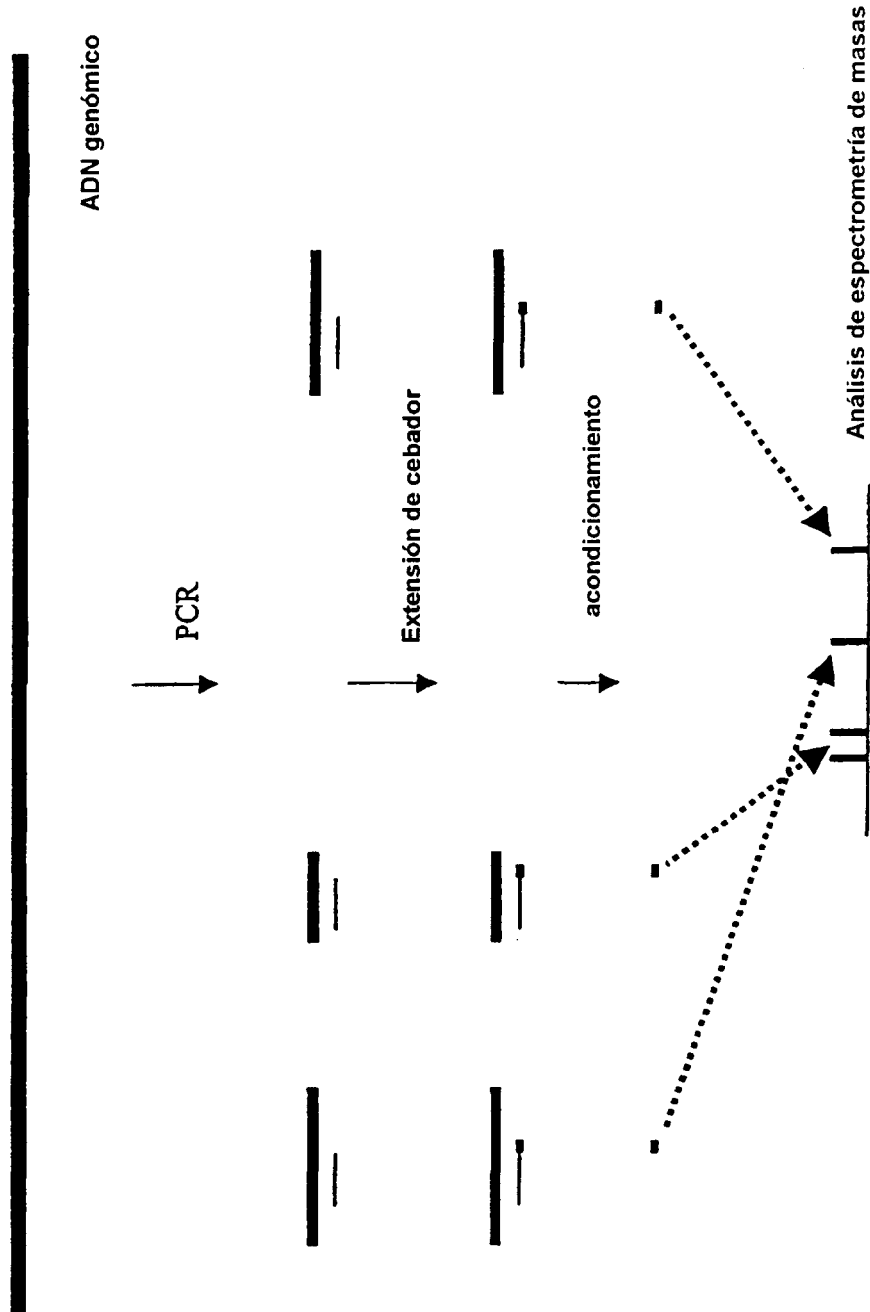


FIG. 3

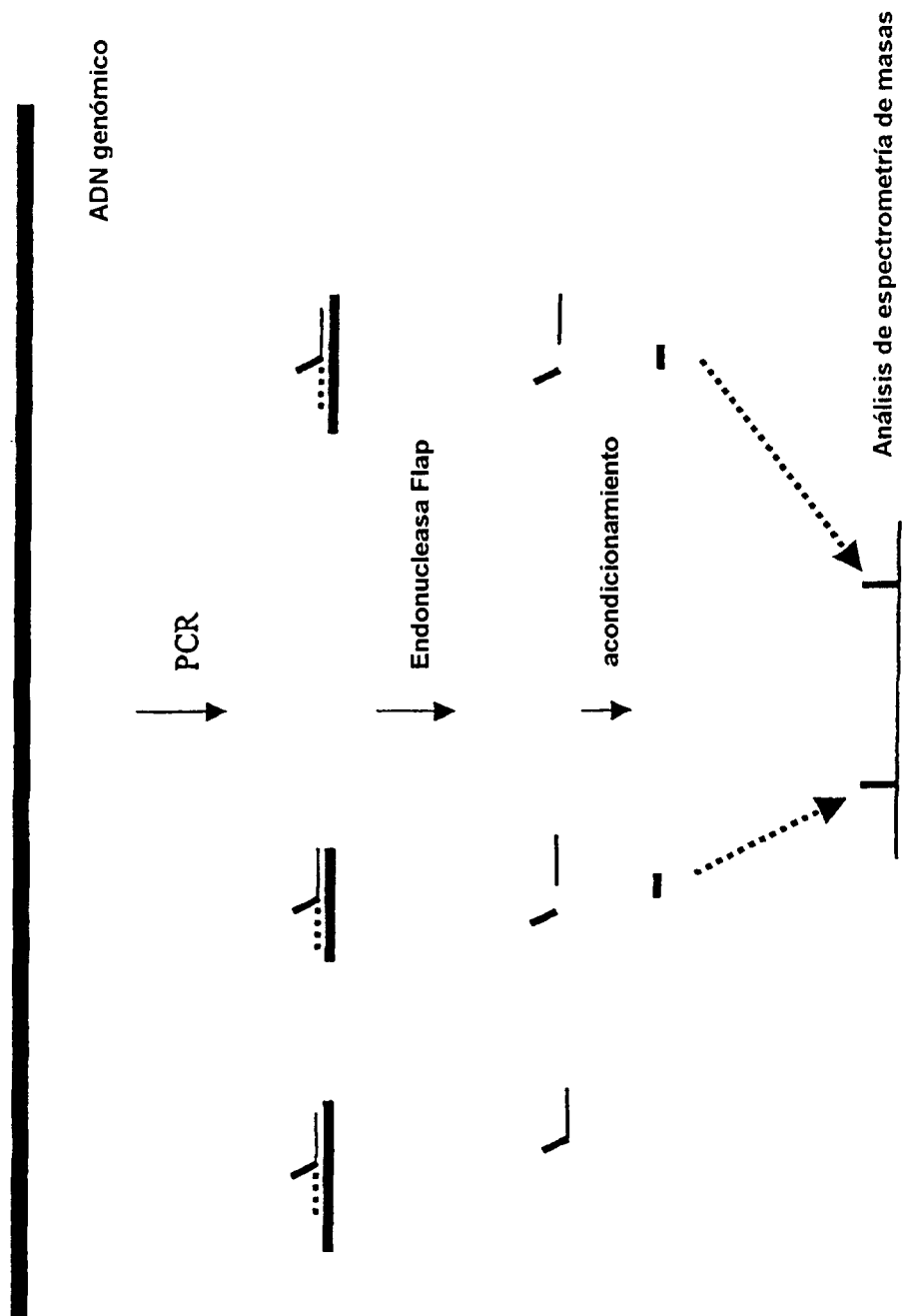


FIG. 4

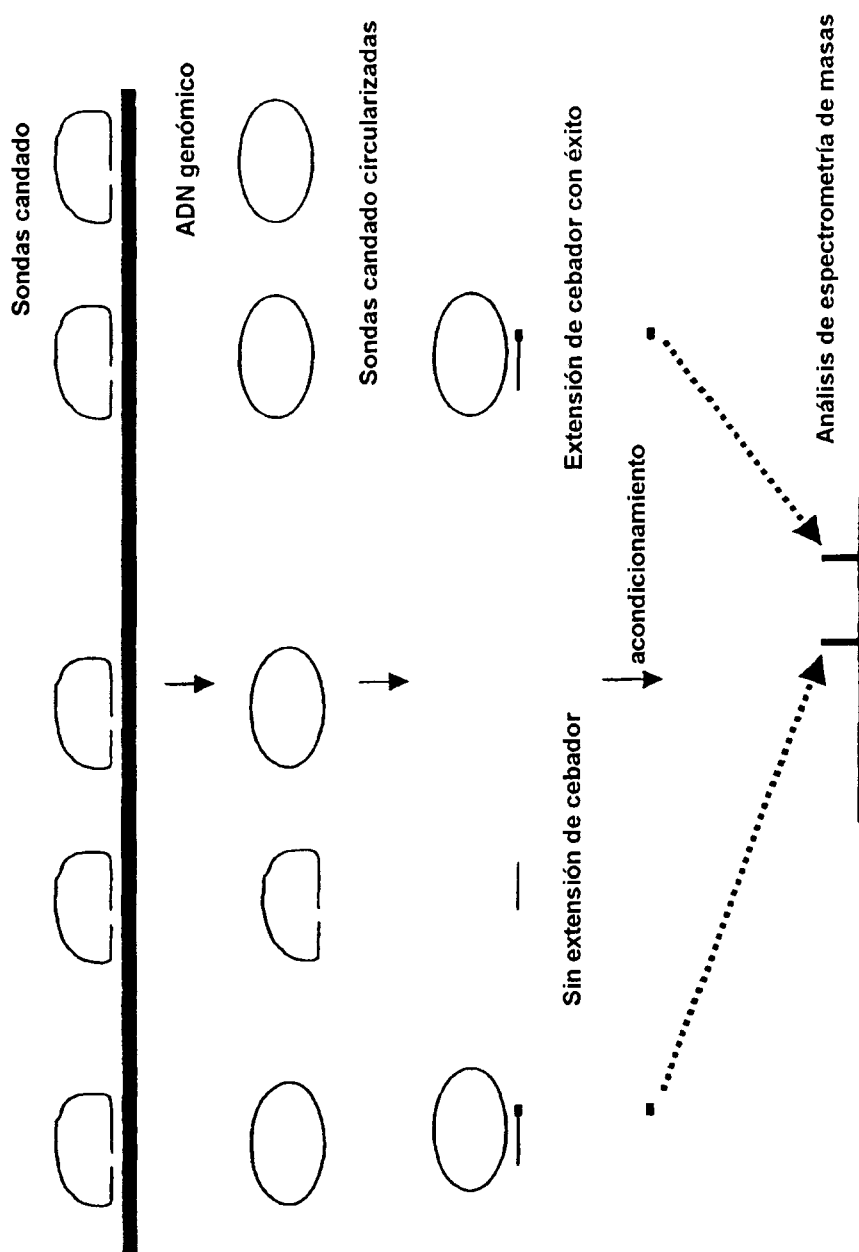


FIG. 5

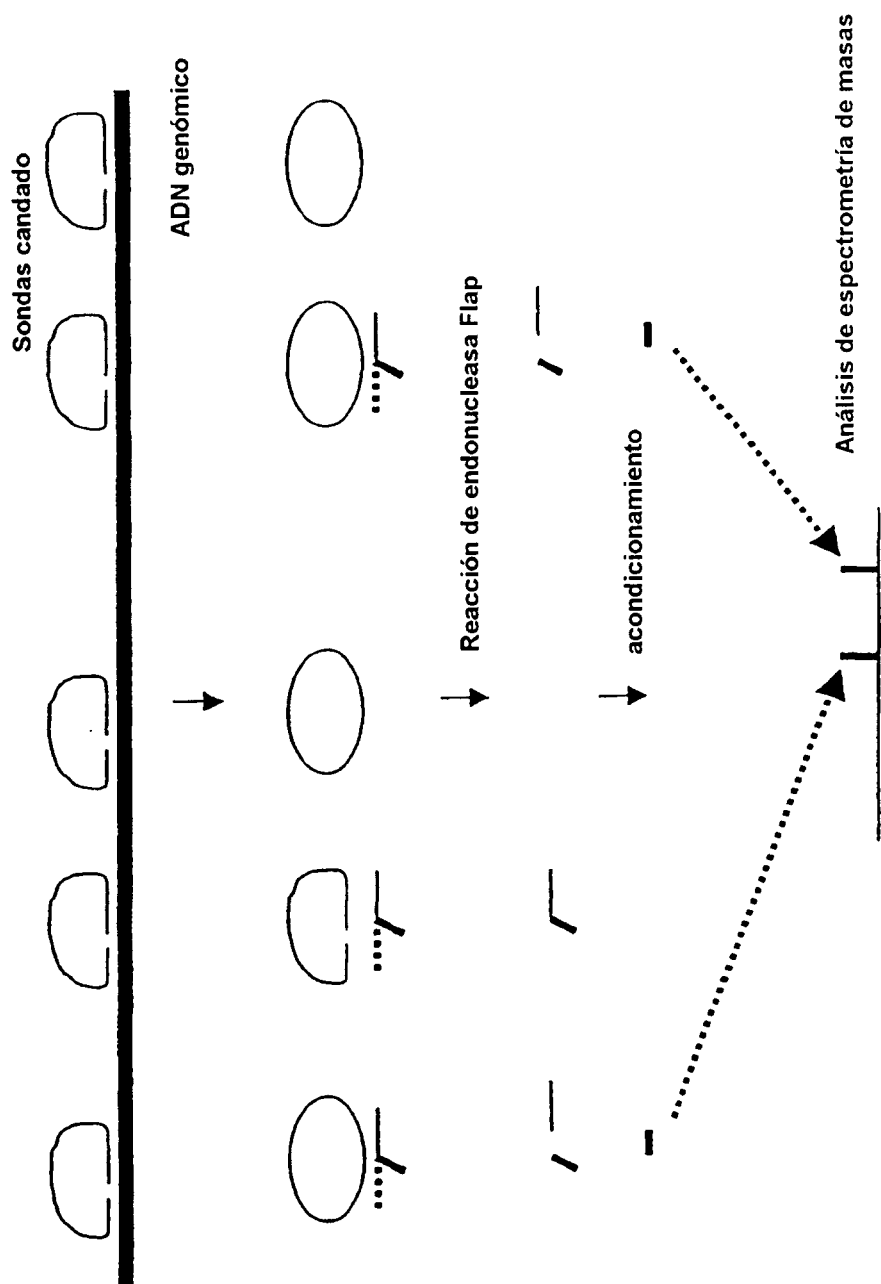


FIG. 6

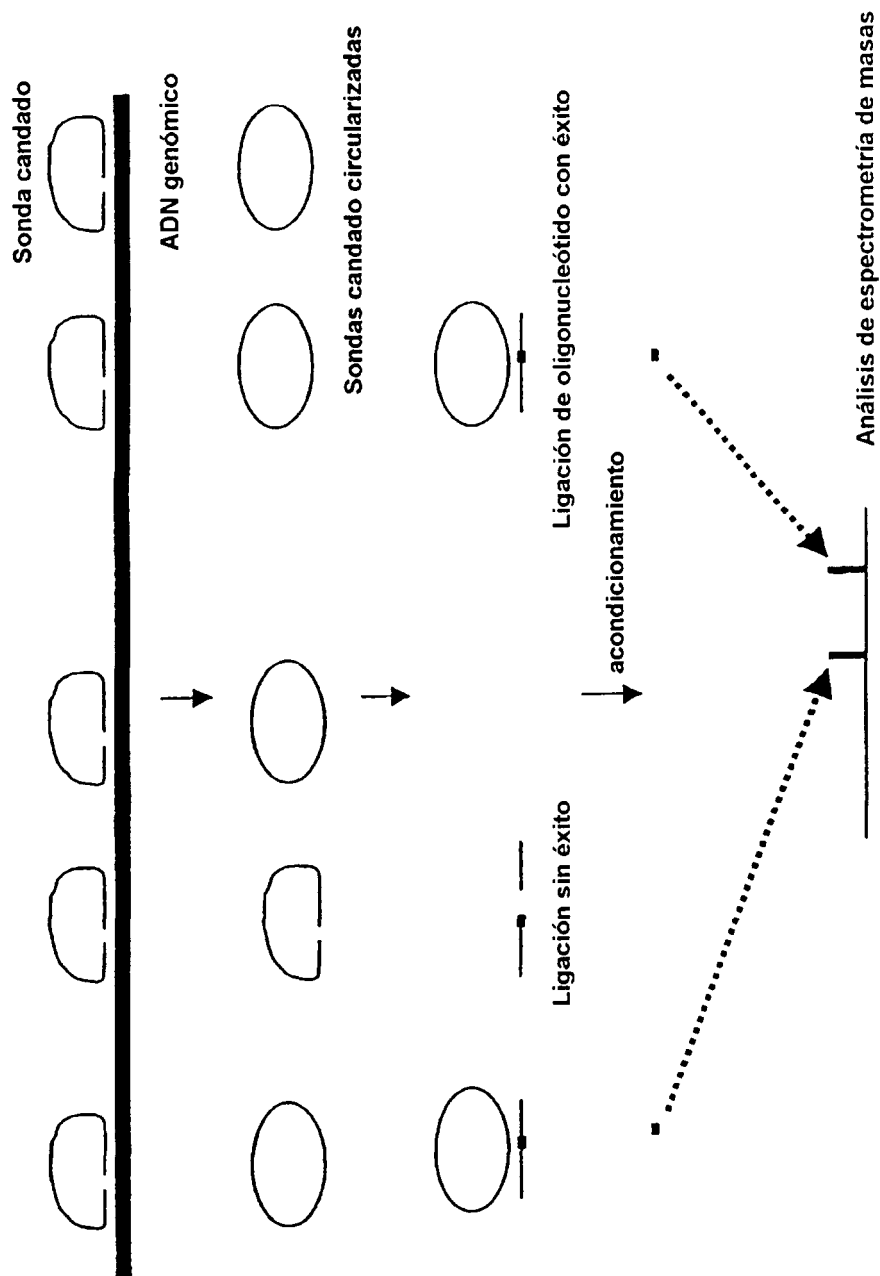


FIG. 7

# ES 2 347 416 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centre National de Génotypage
- 5 <120> Generación de muestras para genotipar mediante espectrometría de masas
- <130> D18716
- 10 <150> EP 00 401 886  
<151> 2000-06-30
- <160> 76
- 15 <170> PatentIn versión 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 44  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1
- cttactggac tgaggtgca cctgctccag ggagcccatg tgac 44
- 30 <210> 2  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 2
- cttactggac tgaggtgccc cctgctccag ggagcccatg tgac 44
- 40 <210> 3  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 45 <400> 3
- 50               aatgacctga ctccaacggg gacgaggtcc ctcgggta 38
- <210> 4  
<211> 38
- 55 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 60 <400> 4
- aatgacctga ctccaacgtg gacgaggtcc ctcgggta 38
- <210> 5
- 65 <211> 38  
<212> ADN

## ES 2 347 416 T3

<213> <i>Homo sapiens</i>		
<400> 5		
5	tactggactg aggtgcccc tgctccaggg agcccatg	38
<210> 6		
10	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 6	
	tactggactg aggtgcacc tgctccaggg agcccatg	38
<210> 7		
20	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 7	
	gcatgagaat cgcttgagcc cagccg	26
30	<210> 8	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
40	ttaaggcaa tacagcaaga ccccgctct	28
<210> 9		
	<211> 28	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
50	ttatggcaa tacagcaaga ccccgctct	28
<210> 10		
55	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 10	
	ttaaggcaa tacagcaaga ccccgctct	28
<210> 11		
65	<211> 28	
	<212> ADN	

## ES 2 347 416 T3

	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;400&gt; 11</i>	
5	ttatgggcaa tacagcaaga ccccgctc	28
	<i>&lt;210&gt; 12</i>	
10	<i>&lt;211&gt; 41</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
15	<i>&lt;400&gt; 12</i>	
	ggccctgtaa ctcggaaggg caatacagca agaccccgtc t	41
20	<i>&lt;210&gt; 13</i>	
	<i>&lt;211&gt; 41</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
25	<i>&lt;400&gt; 13</i>	
	ggaactgtgg ctcttatggg caatacagca agaccccgtc t	41
30	<i>&lt;210&gt; 14</i>	
	<i>&lt;211&gt; 17</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
35	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;400&gt; 14</i>	
40	ggccctgtaa ctcgag	17
	<i>&lt;210&gt; 15</i>	
	<i>&lt;211&gt; 17</i>	
45	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;400&gt; 15</i>	
50	ggaactgtgg ctcttaa	17
	<i>&lt;210&gt; 16</i>	
55	<i>&lt;211&gt; 46</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
60	<i>&lt;400&gt; 16</i>	
	ggactgaact gcctgtacg acggtccatc cgagaaacag ccctt	46
65	<i>&lt;210&gt; 17</i>	
	<i>&lt;211&gt; 46</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	



## ES 2 347 416 T3

	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
10	acgagccggt ctgaatagta	20
	<210> 24	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
20	<223> n hace referencia a, g, c o t/u	
	<400> 24	
25	ttctcgccgg ccgcnnnnnn atg	23
	<210> 25	
	<211> 31	
30	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	
35	aagtcgctggg ccgcttgcag tgagccgaga t	31
	<210> 26	
40	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 26	
	gatccagtcc g	11
50	<210> 27	
	<211> 17	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27	
60	ctcgtagact gcgtacc	17
	<210> 28	
	<211> 18	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

## ES 2 347 416 T3

	<400> 28	
	aattggtacg cagtctac	18
5	<210> 29	
	<211> 16	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	
15	gacgatgagt cctgag	16
	<210> 30	
	<211> 14	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 30	
25	tactcaggac tcat	14
	<210> 31	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<220>	
	<223> n hace referencia a, g, c o t/u	
	<400> 31	
40	gacctgcgta ccaattcnnn	20
	<210> 32	
45	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 32	
55	gatgagtcct gagtaannn	19
	<210> 33	
60	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	

## ES 2 347 416 T3

	<400> 33	
	ttactggact gaggtgcc	19
5	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	
15	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
20	<400> 34	
	nttactggac tgaggtgcc	20
25	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	
35	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 35	
40	nnntactgga ctgaggtgc c	21
	<210> 36	
45	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	
	<220>	
55	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 36	
60	nnntactgg actgaggtg cc	22
	<210> 37	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 347 416 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

5 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 37

10 nnnnttactg gactgagggt gcc 23

<210> 38  
15 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
25 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 38

30 nnnnttact ggactgaggt tgcc 24

<210> 39  
<211> 25  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
45 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 39

50 nnnnnttac tggactgagg ttgcc 25

<210> 40  
<211> 26  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

65 <400> 40

nnnnnntta ctggactgag gttgcc 26

## ES 2 347 416 T3

<210> 41  
<211> 27  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.  
10

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

15 <400> 41  
nnnnnnnntt actggactga ggttgcc 27

20 <210> 42  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

30 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

35 <400> 42  
nnnnnnnntt tactggactg aggttgcc 28

40 <210> 43  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

50 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

55 <400> 43  
nnnnnnnnnn ttactggact gaggttgcc 29

60 <210> 44  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

## ES 2 347 416 T3

	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
5	<400> 44	
	nnnnnnnnnn nttactggac tgaggtgcc	30
10	<210> 45	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	
20	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 45	
25	nnnnnnnnnn nnttactgga ctgaggtgc c	31
	<210> 46	
30	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	
	<220>	
40	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 46	
45	nnnnnnnnnn nnnttactgg actgaggtg cc	32
	<210> 47	
	<211> 33	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.	
	<220>	
60	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 47	
65	nnnnnnnnnn nnnttactg gactgaggtt gcc	33
	<210> 48	
	<211> 34	

## ES 2 347 416 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
10 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 48

15 nnnnnnnnnn nnnnnttact ggactgaggt tgcc 34

<210> 49  
<211> 35

20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

30 <400> 49

nnnnnnnnnn nnnnnnttac tggactgagg ttgcc 35

35 <210> 50  
<211> 36  
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

50 <400> 50

nnnnnnnnnn nnnnnntta ctggactgag gttgcc 36

55 <210> 51  
<211> 37  
<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

65 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

## ES 2 347 416 T3

<400> 51  
nnnnnnnnnn nnnnnnnntt actggactga gggtgcc 37

5 <210> 52  
<211> 38  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

15 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

20 <400> 52  
nnnnnnnnnn nnnnnnnntt tactggactg aggttgcc 38

25 <210> 53  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

35 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

40 <400> 53  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ttactggact gaggttgcc 39

<210> 54  
45 <211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>  
55 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 54

60 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nttactggac tgaggttgcc 40

<210> 55  
65 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 347 416 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

5 <400> 55  
ttactggact gaggttgca 19

10 <210> 56  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

20 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 56

25 nttactggac tgaggttgca 20

<210> 57

30 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>

40 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 57

45 nnttactgga ctgaggttgca 21

<210> 58  
<211> 22

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano.

<220>

60 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 58

65 nnnttactgg actgaggttgca 22

<210> 59  
<211> 23

## ES 2 347 416 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

<220>  
10 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 59

15 nnnnttactg gactgaggtt gca 23

<210> 60  
<211> 24

20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

30 <400> 60

nnnnnttact ggactgaggt tgca 24

35 <210> 61  
<211> 25  
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

50 <400> 61

nnnnnttac tggactgagg ttgca 25

55 <210> 62  
<211> 26  
<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

65 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

## ES 2 347 416 T3

	<400> 62	
	nnnnnnntta ctggactgag gttgca	26
5	<210> 63	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano	
15	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
20	<400> 63	
	nnnnnnnntt actggactga ggttgca	27
25	<210> 64	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano	
35	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 64	
40	nnnnnnnntt tactggactg aggttgca	28
	<210> 65	
45	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano	
	<220>	
55	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 65	
60	nnnnnnnnnn ttactggact gaggttgca	29
	<210> 66	
	<211> 30	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 347 416 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

5 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 66

10 nnnnnnnnnn nttactggac tgaggttga 30

<210> 67  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

<220>  
25 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 67

30 nnnnnnnnnn nnttactgga ctgaggtgc a 31

<210> 68  
<211> 32  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

<220>  
45 <223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 68

50 nnnnnnnnnn nnnnttactgg actgaggtg ca 32

<210> 69  
<211> 33  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

<220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

65 <400> 69

nnnnnnnnnn nnnnttactg gactgaggtt gca 33

## ES 2 347 416 T3

<210> 70  
<211> 34  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano  
10 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

15 <400> 70  
nnnnnnnnnn nnnnnttact ggactgaggt tgca 34

20 <210> 71  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano  
30 <220>

<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

35 <400> 71  
nnnnnnnnnn nnnnnttac tggactgagg ttgca 35

40 <210> 72  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

50 <220>  
<223> n hace referencia a a, g, c o t/u

<400> 72  
55 nnnnnnnnnn nnnnnntta ctggactgag gttgca 36

<210> 73  
60 <211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano

## ES 2 347 416 T3

	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
5	<400> 73	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnntt actggactga ggttgca	37
10	<210> 74	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano	
20	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 74	
25	nnnnnnnnnn nnnnnnnntt tactggactg aggttgca	38
	<210> 75	
30	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano	
	<220>	
40	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
	<400> 75	
45	nnnnnnnnnn nnnnnnnntt tactggact gaggttgca	39
	<210> 76	
	<211> 40	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador por SNP de GM-CSF humano	
	<220>	
	<223> n hace referencia a a, g, c o t/u	
60	<400> 76	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnntt tactggac tgaggttgca	40
65		