



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 066**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01963330 .4**

86 Fecha de presentación : **23.07.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1303638**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

54 Título: **Método de haplotipado por espectrometría de masas.**

30 Prioridad: **24.07.2000 EP 00402112**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Consortium National de Recherche en
Genomique (CNRG)
2, rue Gaston Crémieux
91000 Evry, FR**

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

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Método de haplotipado por espectrometría de masas.

5 La invención se refiere a un método para realizar el haplotipado de polimorfismos múltiples de un solo nucleótido (SNP) que utiliza PCR específica para el alelo y análisis de espectrometría de masas.

10 La secuencia completa del genoma humano se conseguirá y será publicada completamente en los próximos meses. Este proyecto dará a conocer la secuencia completa de las 3 billones de bases y las posiciones relativas de todos los genes estimados (entre 30.000 y más de 100.000) en este genoma. Al disponer de esta secuencia se abren numerosas posibilidades para el esclarecimiento de la función génica e interacción de diferentes genes.

15 Esto permite además la aplicación de farmacogenéticos y farmacogenómicos. Los farmacogenéticos y los farmacogenómicos tienen como objetivo una utilización dirigida de la medicación dependiente del genotipo de un individuo y de esta manera la mejora drástica de la eficacia de los fármacos. Una etapa intermedia necesaria para esto es la determinación de la variabilidad de diferentes individuos sobre una base genómica. Esto se realiza determinando diferentes marcadores y a continuación utilizando éstos para el genotipado (caracterización de la presencia de un marcador en un individuo) y haplotipado (enlace entre diferentes marcadores en estrecha proximidad).

20 Actualmente se utilizan dos tipos de marcadores para el genotipado: microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

25 Los microsatélites son marcadores muy polimórficos en los que diferentes alelos están compuestos por diferentes números de elementos de secuencia repetitiva entre las zonas flanqueantes conservadas. Por término medio se encuentra un microsatélite cada 100.000 bases. Una cartografía completa de marcadores microsatélite que comprende el genoma humano fue presentada por la CEPH (Dib *et al.*, *Nature* 14 de marzo de 1996; 380(6570):152-4). Los microsatélites están normalmente genotipados por productos de PCR por tamaño generados sobre la zona repetida en los geles. Los sistemas más ampliamente utilizados se basan en la utilización de ADN marcado con fluorescencia y su detección en secuenciadores de fluorescencia.

30 Pocos SNP son actualmente de dominio público. Una cartografía de SNP con 300.000 SNP está siendo creada por el consorcio SNP (*Science*, 1999, 284, 406-407).

35 Para genotipar SNP, existen unos pocos métodos disponibles para el experto en la materia, todos los cuales presentan ventajas y desventajas.

Algunos de estos métodos se basan en la detección a base de gel, como el ensayo con oligonucleótido ligasa (OLA) y por esta razón solamente permite aplicaciones de rendimiento medio.

40 Otras se basan en la hibridación pura que no es discriminante y es difícil de ajustar para obtener la alta severidad requerida (conjunto de oligonucleótidos, chips de ADN). Aunque los chips de ADN son muy apropiados para el genotipado simultáneo de un gran número de genotipos en una zona muy limitada del genoma y en un número controlable de individuos, el problema principal observado en la utilización de estos objetos es la dificultad de optimizar las condiciones de hibridación (en particular para la severidad).

45 Se han presentado métodos que utilizan la extensión y detección del cebador por fluorescencia. Su ventaja es la fácil detección de la emisión en un lector de tipo ELISA. La limitación de estos métodos es el número limitado de colorantes fluorescentes disponibles, que en cambio limita el número de muestras que pueden analizarse simultáneamente.

50 Varios métodos de genotipado de SNP utilizan la detección por espectrometría de masas, ya que la espectrometría de masas permite rendimientos muy altos y al mismo tiempo proporciona información añadida basándose en que está presente en toda la masa del producto obtenido. En las aplicaciones en las que se mide un producto específico del alelo, esta es la información directa y por lo tanto muy sólida.

55 Se han propuesto varios métodos que utilizan espectrometría de masas para el genotipado de SNP (documentos WO 98/23774 y US n° 5.843.669).

60 La espectrometría de masas con tiempo de vuelo por desorción/ionización con láser asistido por la matriz (MALDI) permite el análisis espectrométrico de masas de las biomoléculas (Karas e Hillenkamp *Anal. Chem.* 60, 2299-2301 (1988)). De hecho, se ha aplicado MALDI al análisis del ADN en variaciones comprendidas entre el análisis de los productos por PCR y los métodos que utilizan la terminación específica para el alelo a las reacciones de extensión del cebador de un solo nucleótido, el secuenciado 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 y GB 2339279).

65 Los principales inconvenientes de estos métodos son que se basan en gran medida en los procedimientos de purificación severa antes del análisis MALDI que no se prestan a la fácil automatización y constituyen una parte principal del coste. La purificación en columna de rotación y/o la tecnología del lecho magnético y la purificación en base inversa se aplican frecuentemente.

De hecho, el análisis de los ácidos nucleicos por MALDI es muy dependiente del estado de carga y puede conseguirse un aumento de 100 veces en la sensibilidad del análisis cuando el ADN se acondiciona para llevar una carga positiva. Dichos productos de ADN modificados son asimismo significativamente menos sensibles a la formación del aducto y de este modo no requieren procedimientos de purificación (WO 96/27681, GB 2339279, Gut y Beck (1995) *Nucleic Acids Research*, 23, 1367-1373, Gut *et al.* (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11, 43-50).

Un análisis desarrollado a partir de esto para la generación de productos específicos para el alelo para las SNP se ha denominado "análisis GOOD" para el análisis de SNP (Sauer *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28, E 13).

No obstante, la información del genotipado no permite por sí misma la evaluación de la traducción de una secuencia de ADN en una proteína o la regulación de la transcripción. En particular, cuando los dos alelos de unos genes dados llevan diferentes SNP, es muy importante tener información acerca de la combinación de diferentes SNP en relación entre sí (haplotipado) y acerca de cuál de los alelos está en la misma cadena de ADN.

Existen pocos métodos de haplotipado. Se basan en la generación de productos específicos para el alelo por PCR específica para el alelo, utilizando un cebador cuya base del extremo 3' se empareja específicamente un alelo que debe ampliarse. No obstante, están limitados en su capacidad para examinar simultáneamente múltiples posiciones. Para la identificación de un haplotipo se utiliza la presencia o ausencia de un producto de PCR.

Ruano *et al.* (1989) *Nucleic Acids Research*, 20, 8392 da a conocer el haplotipado de los segmentos cromosómicos de heterocigotos múltiples por ampliación de PCR específica para el alelo y la detección del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción. Sauer *et al.* (2000) *Nucleic Acids Research*, 23, 2000 y WO n° 97/47766 describe la utilización de la espectrometría de masas para el genotipado.

Para aumentar la especificidad de la PCR específica para el alelo, se consideran dos métodos principales. Uno consiste en la adición de colas ricas en GC en el extremo 5' de los cebadores para la PCR y realizando la PCR con una elevada temperatura de hibridación (Liu *et al.* (1997), *Genome Res.* 7(4): 389-98). Durante los ciclos iniciales de la PCR, de esta manera se obtiene alta severidad. En los últimos ciclos, la cola GC proporciona una preferencia para las plantillas de ampliación. Sin embargo, esto no proporciona suficiente severidad en todos los casos.

Otra manera de aumentar la severidad de la PCR específica para el alelo es la introducción de más emparejamientos erróneos (Newton *et al.* (1989), *Nucleic Acids Res.* 17(7): 2503-16). Este método por sí mismo puede asimismo proporcionar severidad limitada.

Puede por lo tanto justificarse interesante combinar estos dos métodos para aumentar la especificidad y severidad en la reacción de PCR específica para el alelo.

No obstante, la PCR específica para el alelo (con o sin mejoras) adolece del inconveniente de que únicamente puede examinar dos polimorfismos en relación entre sí.

Clark *et al.* (1998, *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 595-612) describe un método para el análisis de la variación de la secuencia de nucleótidos en la lipoproteína lipasa humana que utiliza el secuenciado de los genes y de los productos de la PCR específica para el alelo como método de análisis para genotipado. Los autores muestran la debilidad de este método de haplotipado, en particular en la medida en que se requiere un gran esfuerzo.

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar un método sencillo y de gran rendimiento para el haplotipado, que permite la determinación del enlace de SNP múltiples de una manera rápida, económica y fiable. El método de la invención permite el análisis simultáneo de puntos polimorfos múltiples, después de realizar solamente una reacción PCR específica para el alelo.

De hecho, se requiere con frecuencia determinar los alelos de más de dos polimorfismos de nucleótidos individuales por genotipado. Si resulta que el genotipo individual es heterocigótico para más de uno de los SNP, es interesante determinar cuál de los alelos están en la misma cadena de ADN.

La invención utiliza la PCR específica para el alelo para la ampliación de únicamente un alelo del ADN genómico. Se designa el cebador específico del alelo para emparejarse con una alelo de un SNP heterocigótico. Se genotipa a continuación el producto de la ampliación cuyas manifestaciones permiten deducir que otros alelos están en este producto y permite la determinación del haplotipo, a medida que los SNP previamente heterocigóticos aparecen ahora homocigóticos.

La asociación del polimorfismo que sirve de base a la PCR específica del alelo con los alelos determinados de los alelos de los demás polimorfismos proporcionan el haplotipo.

La invención por consiguiente se refiere a un método de determinación del haplotipo de un individuo, que comprende las etapas siguientes:

- a) genotipar más de dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) por espectrometría de masas;

- b) PCR específica para el alelo con un cebador que es específico para un alelo de un polimorfismo heterocigótico, si más de un polimorfismo es heterocigótico;
- c) genotipar en el producto de la PCR específica para el alelo por espectrometría de masas;
- d) asociar el polimorfismo que sirve de base a la PCR específica del alelo con los alelos determinados de los demás polimorfismos analizados.

El método de la invención podría asimismo utilizarse para identificar secuencias casi idénticas a fin de descubrir si una secuencia está duplicada o es heterocigótica. Pueden utilizarse variaciones para generar productos “específicos para el alelo” si otros polimorfismos que eran heterocigóticos en el genotipado inicial permanecen heterocigóticos es evidente que una secuencia está duplicada. Si la segunda ronda de genotipado de este sistema produce todos los SNP homocigóticos es posible que la secuencia que está siendo estudiada no esté duplicada.

La utilización de espectrometría de masas permite realizar el análisis de un gran número de muestras y obtener los datos correspondientes en una reacción múltiple. Por consiguiente, puede utilizarse con gran rendimiento el método de la invención que se caracteriza por una combinación entre la PCR específica para el alelo y la utilización de espectrometría de masas para el genotipado y el análisis de datos. Puede asimismo automatizarse y ello permitirá una determinación fácil y rápida del perfil del SNP de los pacientes. Por consiguiente permitirá la aplicación completa de la farmacogenética y farmacogenómica y mejorará la utilización de los datos obtenidos a partir del proyecto de secuenciado del genoma.

El genotipado de los SNP en las etapas a) y c) se realiza por espectrometría de masas después de la generación de productos específicos para el alelo, que pueden obtenerse convencionalmente por ampliación del cebador, ligadura de oligonucleótidos y reacción de escisión.

Una de las ventajas del método según la invención consiste en la posibilidad de realizar el análisis de múltiples SNP en una muestra de ADN al mismo tiempo en una reacción multiplexada, conocida por los expertos en la materia, seleccionando las condiciones apropiadas.

A fin de realizar la reacción de PCR específica para el alelo de la etapa b), se utilizaría un cebador que empareja un alelo de un SNP heterocigótico, y preferentemente un cebador que se hibrida específicamente con el SNP heterocigótico que está situado en la mayoría de las posiciones 5' o en la mayoría de las posiciones 3' de todos los SNP analizados. El otro cebador hibridaría ambos alelos y estaría situado de modo que se obtenga la ampliación de la zona que contiene todos los SNP heterocigóticos.

En una puesta en práctica preferida de la invención, la especificidad del alelo para la ampliación por PCR se consigue mediante la base en el extremo 3' del cebador. Esta base se selecciona para emparejar un alelo y no el otro. Se puede conseguir más especificidad utilizando un cebador que tenga entre 10 y 25 bases complementarias con la secuencia del ADN genómico, más preferentemente entre 15 y 20 ó 22, obteniéndose la especificidad mediante la base en el extremo 3', como se describe.

Se podría asimismo incluir una cola no específica rica en CG en el extremo 5' del cebador y/o más emparejamientos erróneos antes de la base específica para el alelo en el extremo 3', como se ha descrito. Más preferentemente, el cebador presenta un emparejamiento erróneo más de 3 bases apartada del extremo 3'.

La temperatura de hibridación se selecciona crítica (mayor que la temperatura de fusión calculada). En las primeras rondas de la PCR solamente puede hibridarse la secuencia totalmente complementaria. Una vez se han alcanzado algunas rondas de PCR, la temperatura mayor de hibridación debida a la cola rica en CG asegura la mayoría de la ampliación de un único alelo.

Se utiliza espectrometría de masas para este procedimiento ya que es muy adecuada para el análisis de hasta varias decenas de polimorfismos y es muy fácil en la operación. La automatización completa de la preparación de la muestra es posible por lo tanto por este método. Dependiendo del procedimiento de preparación de la muestra utilizado para el genotipado por espectrometría de masas, esta tecnología es muy eficaz.

En una puesta en práctica preferida de la presente invención, el método realizado para una o ambas etapas (a) y (c) de genotipado utiliza cebadores que son híbridos naturales y el procedimiento seguido es un análisis desarrollado para MALDI denominado análisis GOOD, descrito por Sauer *et al.*

En una puesta en práctica preferida de la invención se utiliza espectrometría de masas con tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por la matriz (MALDI) para el análisis de los genotipos. En otra forma de realización, para la detección se utiliza espectrometría de masas de ionización por electroatomización.

En una puesta en práctica preferida de la invención los reactivos para el genotipado inicial son los mismos que los utilizados para el genotipado después de la PCR específica para el alelo.

La presente invención proporciona un procedimiento fácil para la determinación de haplotipos que es económico, muy fiable y puede automatizarse fácilmente y ofrece así un alto rendimiento.

El procedimiento perfilado utiliza el potencial de una preparación muy paralela de productos para el genotipado, su acondicionamiento de modo que no requieren ninguna purificación y el potencial de espectrómetros de masa para distinguir grandes cantidades de productos simultáneamente en un espectro y ser capaces de registrar un espectro único en unos pocos segundos. La presente invención esboza las posibilidades de resolver drásticamente los problemas de haplotipado de un gran número de SNP descubiertos actualmente en la técnica y hace posible el genotipado perfilado y eficaz del SNP.

La invención se refiere además a la utilización de cebadores para la PCR que generan productos específicos para el alelo para la aplicación de haplotipado por el método de la invención. La utilización mencionada anteriormente en un kit puede incluir además los reactivos para realizar las etapas a) y c) del procedimiento (generación de muestras que deben analizarse por espectrometría de masas para el genotipado) y las instrucciones de cómo realizar el método de la invención.

Descripción de las figuras

La Figura 1 describe el principio del método de la invención, aplicado a 4 SNP, siendo dos de ellos heterocigóticos. La primera etapa de genotipado (1.A) conduce a la generación de 6 productos determinados por espectrometría de masas. La PCR específica para el alelo (1.B) conduce a la ampliación de la cadena paterna. El genotipado de este producto (1.C) permite la identificación de los SNP que están presentes en este alelo.

La Figura 2 presenta los espectros típicos del espectrómetro de masas obtenidos después del genotipado y haplotipado para los SNP 298 y 390 (figura 2.A) y 325 y 423 (figura 2.B) del gen receptor beta-2 adrenérgico. El espectro superior presenta el resultado del genotipado, mientras que los espectros medio e inferior presentan los resultados obtenidos respectivamente para los haplotipados 1 y 2, después de la PCR específica para el alelo.

Ejemplo

El ejemplo ilustra el método de la invención y un experto en la materia puede generalizarlo fácilmente para otros genes.

El ejemplo presentado aquí es el haplotipado de 4 SNP publicados en el gen receptor β 2-adrenérgico. Los SNP son T/C en 298, C/T en 325, G/A en 390 y G/C en 423. Para cada SNP, se creó el genotipado mediante el análisis GOOD en un fragmento ampliado (con la SEC. ID n°: 1 y la SEC. ID n°: 2 de los cebadores) del ADN genómico. Se realizó el genotipado siguiendo el método de Sauer *et al.*, (*Nucleic Acids Research*, 2000, 28, E 13), con la SEC. ID n°: 5 a la SEC. ID n°: 8 de los cebadores, para la ampliación del cebador. El análisis se realiza en modo de ión positivo en un espectrómetro de masas MALDI.

En un primer experimento se determina el genotipo para los 4 SNP. El genotipo para SNP 298 y SNP 390 se presenta en el panel de la figura 2.A, mientras que el genotipo para SNP 325 y SNP 423 se presenta en el panel de la figura 2.B. La *m/z* observada para los productos están en el intervalo comprendido entre 1.400 y 1.500 Da (figura 2, espectro superior).

Los datos demuestran que el individuo, cuyos ADN se analizan, es heterocigótico para los cuatro SNP.

A fin de determinar el haplotipo, se realizan las reacciones de PCR específicas para el alelo, utilizando la SEC. ID n°: 3 o la SEC. ID n°: 4 de los cebadores específicos para el alelo, en combinación con la SEC. ID n°: 2 del cebador.

La SEC. ID n°: 3 y la SEC. ID n°: 4 de los cebadores son específicas de un alelo de SNP 298 (que es la mayoría de 5' de los SNP heterocigóticos) y lleva además una cola rica en GC y un emparejamiento erróneo situado 5 bases a partir del extremo 3' de los cebadores.

La PCR específica para el alelo podría realizarse además con la SEC. ID n°: 1 del cebador y los cebadores que son específicos para el alelo para SNP 423 (la mayoría de 3' de los SNP heterocigóticos).

El genotipado se realiza en los productos específicos para el alelo (figura 2, espectro medio para el haplotipo 1, espectro inferior para el haplotipo 2) utilizando el mismo método que anteriormente.

Es evidente que los dos haplotipos obtenidos se añaden al genotipo del individuo y los datos permiten la identificación del haplotipo completo del individuo analizado.

ES 2 271 066 T3

		SNP 298, -47 (C/T)	SNP 325, -20 (C/T)	SNP 390, 46 (A/G)	SNP 423, 79 (C/G)
5	Muestra de ADN	MALDI	MALDI	MALDI	MALDI
	Genotipos	TC	TC	GA	GC
	Haplotipo 1	C	C	G	G
10	Haplotipo 2	T	T	A	C

15 La reacción de PCR se realiza en condiciones clásicas, con 0,5 μ l de ADN genómico (50 ng/ μ l), 0,5 μ l de cada una de las SEC. ID n°: 1 y SEC. ID n°: 2 de los cebadores (7,5 pmoles/ μ l) y las condiciones de ciclación siguientes:

1. 95°C 2 min
2. 95°C 20 s
- 20 3. 68°C 30 s
4. 72°C 30 s

se repiten 35 veces las etapas 2 a 4.

25 Las reacciones de ampliación del cebador se realizan de forma clásica utilizando 1 μ l de la copia del cebador (SEC. ID n°: 5 a SEC. ID n°: 8) (25 pmoles/ μ l) en las condiciones de ciclación siguientes:

1. 95°C 3 min
2. 95°C 10 s
- 30 3. 58°C 30 s
4. 72°C 15 s

se repiten 35 veces las etapas 2 a 4.

35 La digesta de fosfodiesterasa se realiza añadiendo 1 μ l de ácido acético (0,5 M) y 3 μ l de PDE se añaden y se realiza la incubación a 37°C durante 80 min.

40 La alquilación se realiza mediante la adición de 45 μ l de acetonitrilo, 15 μ l de trietilamina/tampón de CO₂ (2 M, pH 8,0) y 14 μ l de MeI e incubación a 40°C durante 25 min. Se toma una muestra de 20 μ l y se mezcla con 45 μ l de acetonitrilo al 40%.

Se realiza el análisis MALDI con el éster metílico del ácido α -ciano cinnámico en acetona salpicada en la diana y 0,5 μ l de la muestra salpicada en la matriz.

45 El análisis se realiza en modo ión positivo en un espectrómetro de masas MALDI.

La PCR específica para el alelo se realiza utilizando la SEC. ID n°: 3 o la SEC. ID n°: 4 y la SEC. ID n°: 2 del cebador, siguiendo las mismas condiciones clásicas descritas anteriormente.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método de determinación del haplotipo de un individuo, que comprende las etapas siguientes:

- a) genotipar más de dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) por espectrometría de masas;
- b) PCR específica para el alelo con un cebador que es específico para un alelo de un polimorfismo heterocigótico, si más de un polimorfismo es heterocigótico;
- c) genotipar en el producto de la PCR específica para el alelo por espectrometría de masas;
- d) asociar el polimorfismo que sirve de base a la PCR específica para el alelo con los alelos determinados de los alelos de los otros polimorfismos analizados.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el genotipado de los SNP en las etapas a) y c) o en ambas etapas se realiza después de la generación de productos específicos para el alelo, siendo dicha generación de productos específicos para el alelo realizados por ampliación del cebador, ligadura de oligonucleótidos y reacción de escisión.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el genotipado para los SNP múltiples en la etapa a), etapa c) o en ambas etapas se realiza en una reacción en un procedimiento multiplexado.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reacción PCR específica para el alelo en la etapa b) se consigue seleccionando un cebador que se empareja a un alelo de un SNP heterocigótico.

5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho cebador se selecciona para hibridarse específicamente con el SNP heterocigótico situado en la mayoría de las posiciones 5' o la mayoría de las 3' de todos los SNP analizados.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que por lo menos un cebador utilizado para la PCR específica para el alelo es completamente complementario a la secuencia de un alelo.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la base del extremo 3' del cebador específico del alelo se empareja específicamente con un alelo del SNP heterocigótico.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que dicho cebador específico del alelo tiene 10 a 25 bases que son complementarias de la secuencia de dicho un alelo del ADN genómico.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 7 y 8, en el que dicho cebador específico del alelo presenta una cola 5' que es rica en G y C.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 7 a 9, en el que dicho cebador específico del alelo presenta un emparejamiento erróneo en la secuencia complementaria alejada más de 3 bases del extremo 3'.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se utiliza espectrometría de masas con tiempo de vuelo por desorción/ionización con láser asistido por la matriz para una o ambas etapas a) y c) definidas en la reivindicación 1.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el cebador utilizado para la generación de los productos detectados en el genotipado en las etapas a) y/o c) son híbridos en la naturaleza.

13. Método de la reivindicación 12, en el que un análisis con detección espectrométrica de masas MALDI se aplica a una o ambas etapas a) y c) de genotipado.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la espectrometría de masas de ionización por electropulverización se utiliza para una o ambas etapas a) y c) de la reivindicación 1.

15. Utilización de cebadores para PCR que generan productos específicos para el alelo destinados a la aplicación del haplotipado por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

a) Genotipia

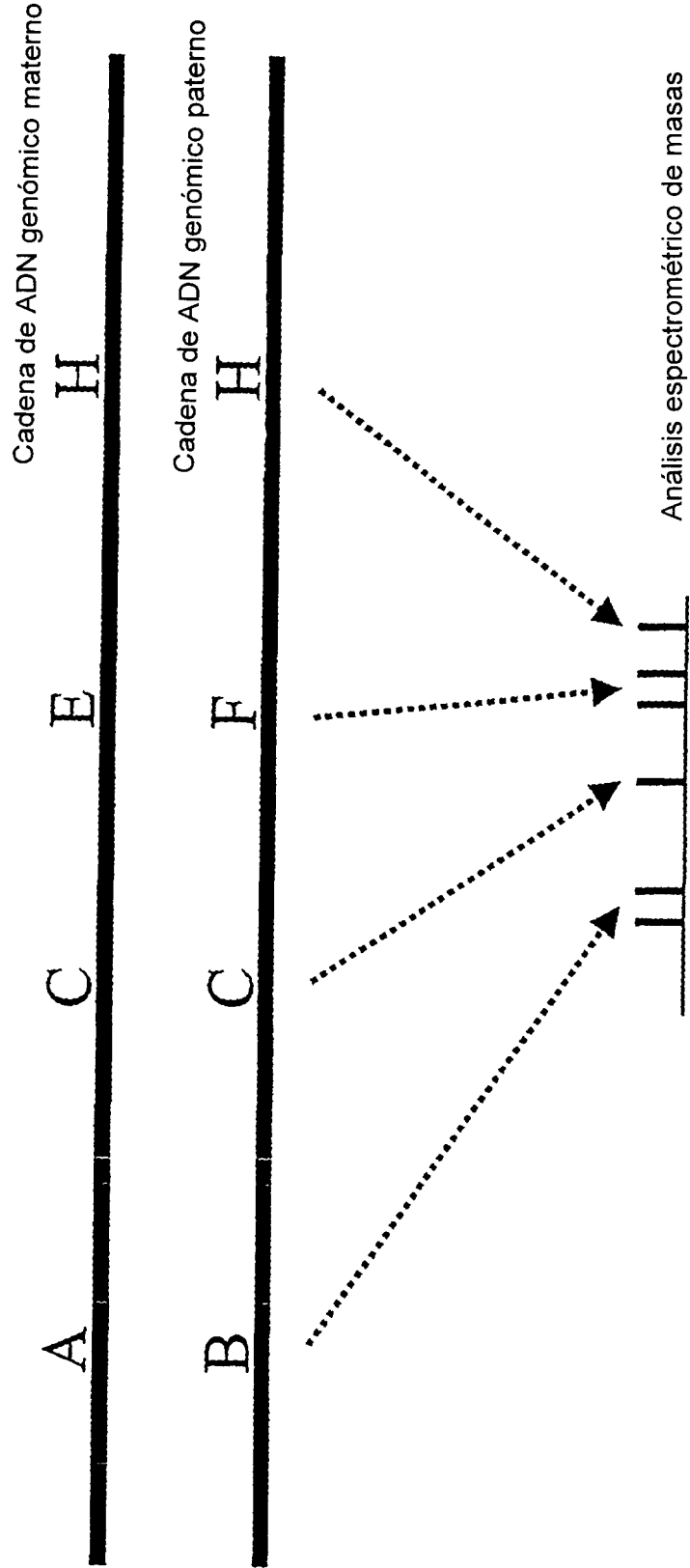


FIG. 1.A

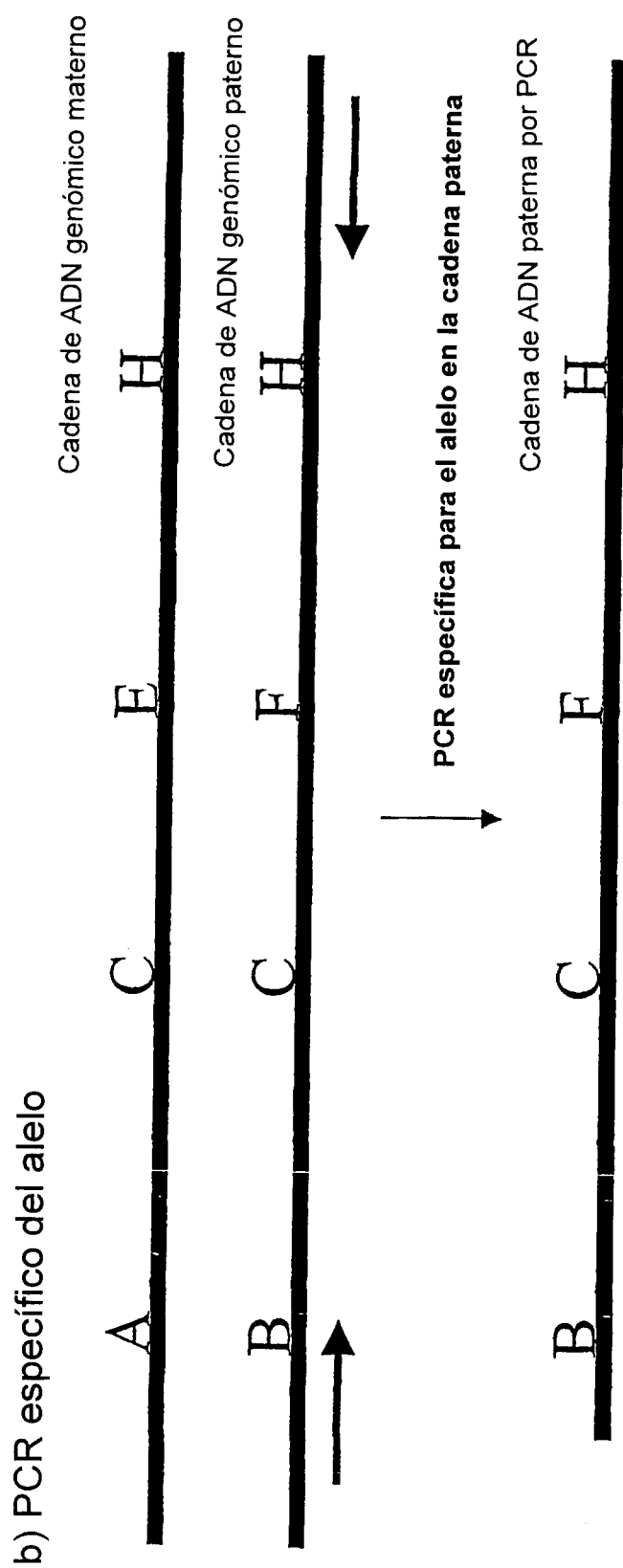


FIG. 1.B

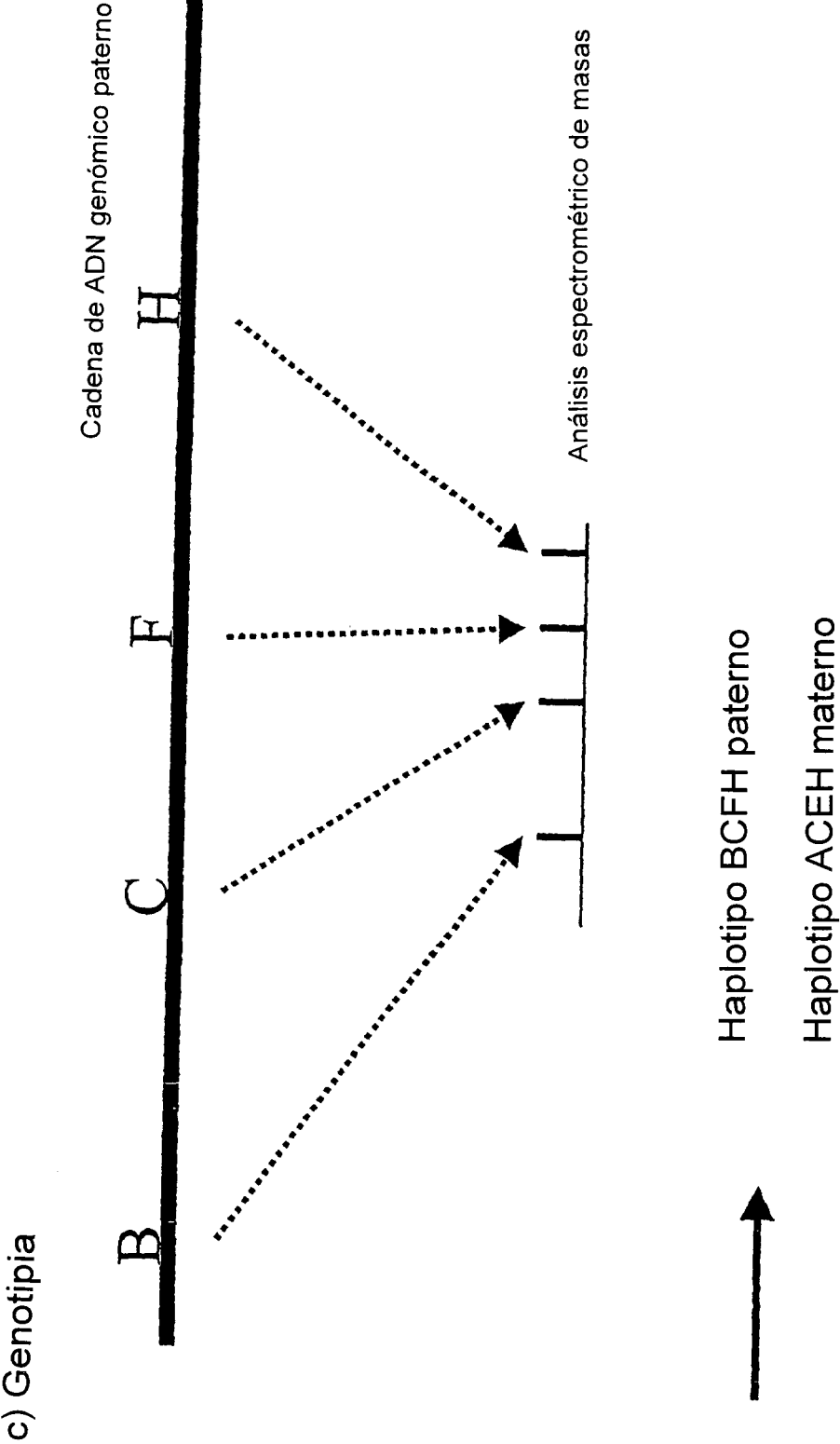


FIG. 1.C

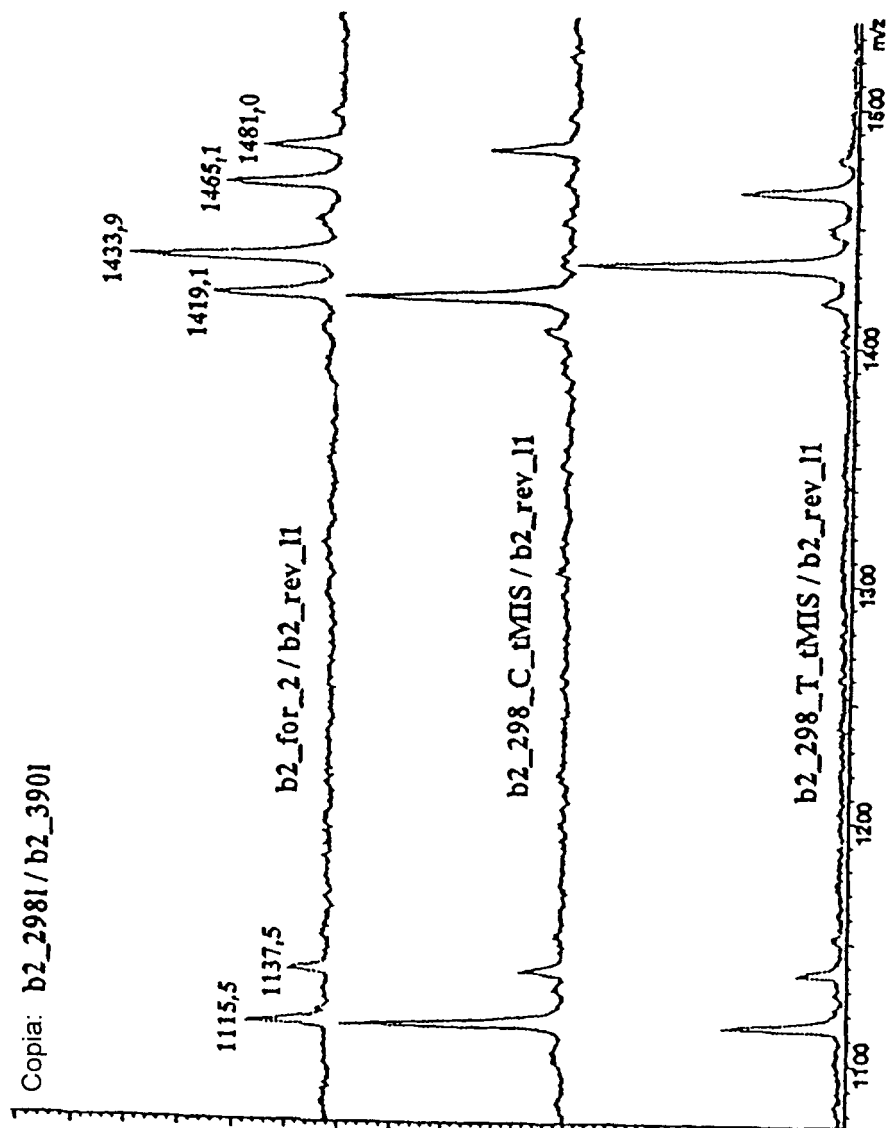


FIG. 2.A

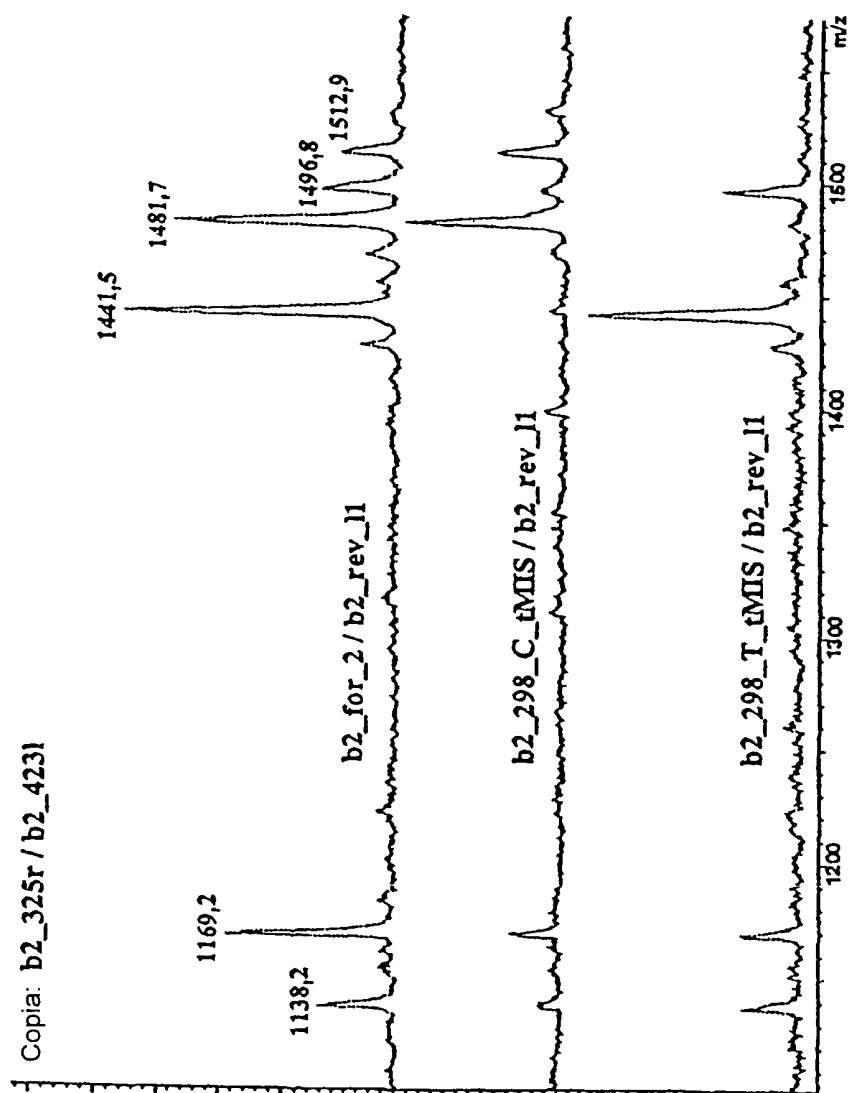


FIG. 2.B

ES 2 271 066 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> CENTRE NATIONAL DE GENOTYPAGE	
	<120> MÉTODO DE HAPLOTIPADO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	
10	<130> D19042	
	<150> EP 00 402 112	
	<151> 2000-07-24	
15	<160> 8	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
20	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador b2_para_2 para la ampliación de la zona del gen receptor beta-2 adrenérgico.	
30	<400> 1	
	ctcgcggggcc cgcagagcc	19
35	<210> 2	
	<211> 24	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> Cebador b2_rev_11 para la ampliación de la zona del gen receptor beta-2 adrenérgico.	
45	<400> 2	
	gttggtgacc gtctgcagac gctc	24
50	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico para el alelo b2_298_C_tMIS para SNP 298 del gen receptor adrenérgico beta-2.	
60	<400> 3	
65	gcggggcgggg cgccgtgggt cagccc	26

ES 2 271 066 T3

<210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico para el alelo b2_298_T_tMIS para SNP 298 del gen
 10 receptor adrenérgico beta-2.

 <400> 4

 15 gcggggcgggg cgccgtgggt cagcct 26

 <210> 5
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 25 <223> Cebador b2_2981 para la determinación del SNP 298 del gen receptor adrenérgico beta-2.

 <400> 5

 30 ccgccgtggg tccgcc 16

 <210> 6
 <211> 17
 35 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 40 <223> Cebador b2_3901 para la determinación del SNP 390 del gen receptor adrenérgico beta-2.

 <400> 6

 45 tcttgctggc acccaat 17

 <210> 7
 <211> 17
 50 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 55 <223> Cebador b2_325r para la determinación del SNP 325 del gen receptor adrenérgico beta-2.

 <400> 7

 60 cgcgcagtct ggcaggt 17

 <210> 8
 <211> 18
 65 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 271 066 T3

<220>

<223> Cebador b2_4231 para la determinación del SNP 4231 del gen receptor adrenérgico beta-2.

5 <400> 8

gaccacgacg tcacgcag

18

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65