TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2025

91

Félix Pardos Bernad

Estudio y optimización de métodos de detección de SNPs y su aplicación para la determinación de polimorfismos de patógenos y humanos mediante qPCR

Director/es

Villuendas Piqueras, Pedro Ramón

Jiménez Sanz, Ana Isabel

EXTRACTO

http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis

ISSN 2254-7606

Prensas de la Universidad Universidad Zaragoza

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza.
Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.

Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral [Extracto]

ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE SNPS Y SU APLICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE PATÓGENOS Y HUMANOS MEDIANTE QPCR

Autor

Félix Pardos Bernad

Director/es

Villuendas Piqueras, Pedro Ramón
Jiménez Sanz, Ana Isabel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Química Orgánica

2024

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

Estudio y optimización de métodos de detección de SNPs y su aplicación para la determinación de polimorfismos de patógenos y humanos mediante qPCR

Autor

Félix Pardos Bernad

Directores

Pedro Ramón Villuendas Piqueras
Ana Isabel Jiménez Sanz

Departamento de Química Orgánica

2024

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

VERSIÓN REDUCIDA DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con una **ayuda para la formación de doctores en empresas** "**Doctorados Industriales"** otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación a **Félix Pardos Bernad** y a la **empresa CerTest Biotec S.L**. (DIN2018-009707).

Al tratarse de una **Tesis con Mención de Doctorado Industrial** que incluye información sensible perteneciente a la empresa Certest Biotec S.L., el presente documento corresponde a una **Versión Reducida de la Tesis Doctoral** completa, versión que ha sido aprobada por la Comisión del Programa de Doctorado en Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza y en la que se ha eliminado contenido confidencial con el fin de proteger la propiedad industrial derivada del trabajo realizado.

PEDRO RAMÓN VILLUENDAS PIQUERAS, Investigador Doctor contratado en la empresa CerTest Biotec. S. L. (San Mateo de Gállego, Zaragoza)

y

ANA ISABEL JIMÉNEZ SANZ, Científico Titular del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) en el Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH, Instituto de Investigación Mixto Universidad de Zaragoza-CSIC) y miembro del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "*Estudio y optimización de métodos de detección de SNPs y su aplicación para la determinación de polimorfismos de patógenos y humanos mediante qPCR*" ha sido realizada por **FÉLIX PARDOS BERNAD** bajo nuestra dirección, en las instalaciones de la empresa **CerTest Biotec**, y reúne las condiciones necesarias para su presentación, tanto por la calidad de la investigación desarrollada como por la formación adquirida por el Doctorando.

En Zaragoza, a 24 de agosto de 2024,

Fdo. Pedro R. Villuendas Piqueras

Fdo. Ana Isabel Jiménez Sanz

Resumen

La síntesis química de oligonucleótidos es una técnica establecida y muy bien estudiada que permite obtener, de una forma rápida y eficiente, productos es de alta utilidad en campos como la biología molecular. Los avances en dicha técnica han permitido, entre otros, el desarrollo de técnicas de análisis y de diagnóstico molecular, como la qPCR, que serían inalcanzables a través de los medios disponibles en la naturaleza. El ingenio humano ha diseñado diferentes arquitecturas de sondas y experimentos para qPCR que han permitido llegar a diferenciar entre mutaciones de un solo nucleótido (SNPs) de diferentes cepas de un microorganismo patógeno o de distintos alelos del genoma humano asociados a enfermedades. El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio de las dichas arquitecturas y el desarrollo de un protocolo de diseño y elaboración para la identificación específica de determinadas cepas de patógenos y polimorfismos humanos.

Este trabajo se divide en dos secciones principales. En la primera de ellas, se desarrolla un protocolo de elaboración de sondas en los canales principales de detección más habituales en los equipos de análisis de qPCR (FAM, HEX, ROX y Cy5). Así mismo, se realiza el estudio de las arquitecturas y modificadores de sondas *molecular beacons*, *cooperative primers*, *scorpions*, MGBs y LNAs con potencial de discriminación de SNPs y una optimización de su fabricación a nivel industrial con los fluoróforos antes mencionados.

En la segunda sección, se realizó el diseño y preparación de sondas LNA, unos nucleótidos modificados que proporcionan propiedades ventajosas a las sondas que los incluyen, para la detección específica de polimorfismos en diferentes cepas de *C. Difficile*, *M.Tuberculosis* y COVID-19, además de los alelos HLA-B27 y HLA-B57/58 asociados a espondilitis anquilosante y varios tipos de reacciones adversas a medicamentos respectivamente. Simultáneamente, se determinaron las directrices de diseño de este tipo de sondas.

Notas

Las unidades de medida utilizadas en esta memoria, han sido, por lo general, aquellas recomendadas por la Unión Internacional de Química Pura y Analítica (IUPAC). Sin embargo, en ocasiones, y para facilitar la interpretación de los resultados, se han utilizado unidades ajenas al Sistema Internacional, como el grado Celsius (°C), la hora (h) y el minuto (min).

En las referencias bibliográficas se han incluido los identificadores digitales de objeto (DOI) de los documentos citados que poseyeran uno, con el objetivo de facilitar su búsqueda. La consulta de los mismos se puede realizar en cualquiera de las dos páginas web siguientes:

http://www.doi.org/

http://dx.doi.org/

En la redacción de esta memoria se han utilizado, en ocasiones, los símbolos de algunos elementos químicos para hacer referencia a los mismos, así como las fórmulas de algunas sustancias químicas. También se han utilizado anglicismos para referirse a algunos términos. En otros casos, se han utilizado abreviaturas de uso general en el campo de la química y la biología molecular, muchas de las cuales se recogen a continuación.

Abreviaturas

Ac	Acetil
AcN	Acetonitrilo
AMA	Metilamina Acuosa
AU	Del inglés *absorbance unit*, traducido al español como unidad de absorbancia.
BHQ1	Black Hole Quencher 1
BHQ2	Black Hole Quencher 2
BSA	Del inglés *Bovine serum albumin*, traducido al español como albúmina sérica bovina
Bz	Benzoíl
CBQX	Certest Black Quencher X
CBQX2	Certest Black Quencher X2
CBQX3	Certest Black Quencher X3
CFU	Unidades formadoras de colonia
CPG	Del inglés *Controlled pore glass*, traducido al español como vidrio de poro controlado
Cy5	Cianina 5
dA	Desoxiadenosina
dC	Desoxicitidina
DCI	Dicianoimidazol
DCM	Diclorometano
dG	Desoxiguanosina
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilaminoformamidina
DMT	Dimetoxitritil
DNA	Del inglés *Desoxyrribonucleic acid*, traducido al español como ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dsDNA	Del inglés *double strand DNA*, traducido al español como ADN de cadena doble (bicatenario o doble hebra).
dT	Deoxitimidina
DTT	Ditiotreitol
EC (number)	Del inglés *Enzyme Comission (number)*, es el número identificativo propio de una enzima
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAM	5(6)-Carboxifluoresceína
HEG	Hexaetilenglicol
HEX	Hexaclorofluoresceína
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	Del inglés *High Performance Liquid Chromatography*, traducido al español como cromatografía líquida de alta eficacia
iBu	Isobutiril
LNA	Del inglés *Locked nucleic acid*, traducido al español como ácido nucleico bloqueado
MDx	Del inglés *Molecular Diagnostics*, traducido al español como Diagnóstico Molecular

MGB	Del inglés *Minor Groove Binder*, traducido al español como Afín al Surco Menor (del DNA)
miRNA	Micro-RNA.
NHS	N-Hidroxisuccinimida
Nt	Nucleótido
Pb	Pares de bases
PCR	Del inglés *Polymerase Chain* Reaction, traducido al español como reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Del inglés *Quantitative real time PCR*, traducido al español como PCR cuantitativa a tiempo real
RFU	Del inglés *Random Fluorescence Units*, traducido al español como unidades de fluorescencia aleatorias.
RNA	Del inglés Ribonucleica cid, traducido al español como ácido ribonucleico.
ROX	Carboxi-x-rodamina
RT	Retrotranscriptasa
Rt	Temperatura ambiente
RT-qPCR	Del inglés *Reverse Transcription qPCR*, traducido al español como qPCR con transcripción inversa
SHEX	SIMA-HEX
siRNA	Del inglés *small interference* RNA, traducido al español ARN pequeño de interferencia
SNP	Del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*, traducido al español como polimorfismo de un solo nucleótido
ssDNA	Del inglés *single strand DNA*, traducido al español como ADN de cadena simple (monocatenario o monohebra).
T	Temperatura
t	Tiempo
TAC	tert-Butilfenoxiacetil
Taq	*Thermus aquaticus* (referido a la DNA polimerasa de este microorganismo)
TCA	Ácido Tricloroacético
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
Tm	Del inglés *Melting temperature*, traducido al español como temperatura de fusión
UPLC	Del inglés *Ultra Performance Liquid Chromatography*, traducido al español como Cromatografía líquida de ultra alta eficacia

ÍNDICE

I. Introducción 1
Objetivos 15
Bibliografía 16
II. Capítulo 1: Elección del sistema Primer - Sonda 19
II.1. Optimización del protocolo de síntesis, digestión, purificación y análisis de sondas de hidrólisis 23
II.1.1. FAM 24
II.1.2. HEX 47
II.1.3. ROX 53
II.1.4. Cy5 60
II.2. Optimización del protocolo de síntesis, digestión, purificación y análisis de Sistemas Primer-Sonda 68
II.2.1. Molecular Beacon 68
II.2.2. Cooperative Primers 71
II.2.3. Scorpions 72
II.2.4. MGB 73
II.2.5. LNAs 75
Conclusiones 76
Bibliografía 77
III. Capítulo 2: Diseño de sondas LNA y Proyectos qPCR 83
III.1. Patógenos 85
III.1.1. *Clostridium Difficile*. Cepas Hipervirulentas. 85
III.1.2. Tuberculosis. Hiperplex de resistencias. 87
III.1.3. COVID-19. 98
III.2. Polimorfismos humanos ligados a enfermedades 118
III.2.1. HLA-B27 118
III.2.2. HLA-B57/58 131
Conclusiones 134
Bibliografía 136
IV. Sección Experimental 139
IV.1. Productos sintetizados 141

I. INTRODUCCIÓN

El año 2020 marcó un cambio del paradigma mundial. El estallido y dispersión de la COVID-19 supuso una crisis sanitaria internacional y representó una amenaza para la humanidad. Numerosos fueron los frentes que se abrieron para frenar y controlar esta pandemia, desde enfoques profilácticos, de diagnóstico o de tratamiento. De entre las técnicas de diagnóstico que más destacaron por su efectividad se encuentra la qPCR.

Para entender el funcionamiento de la qPCR es necesario revisar previamente el mecanismo en el que se basa la PCR. La PCR o reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polimerase Chain Reaction*) es un método para aumentar el número de copias de un DNA específico que está contenido en una muestra. Esta técnica fue inventada en 1983 por Kary Mullis y le valió ganar el Premio Nobel en Química en 1993.

La PCR imita el proceso natural de replicación del DNA en los seres vivos. Para ello, necesita un DNA molde (la molécula que se amplificará), una enzima DNA polimerasa (una enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de DNA molde), dos primers o cebadores de DNA (que actúan como cebadores para la DNA polimerasa), desoxinucleótidos trifosfato o dNTP (que se usarán para la síntesis del DNA copia) y un medio de reacción adecuado (que contiene cationes necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima, regula el pH, etc.).

La PCR consiste en una serie de ciclos térmicos que se repiten unas 20-40 veces, en los que la temperatura oscila entre los 50°C y los 98°C (Figura 1):

- Desnaturalización: en la primera etapa del ciclo, la temperatura aumenta hasta los 94-98°C. Este aumento de la temperatura provoca que el dsDNA se desnaturalice, es decir, que se rompan las interacciones por enlaces de hidrógeno entre las cadenas complementarias. De esta forma, el dsDNA se separa en dos hebras de ssDNA.
- Hibridación: a continuación, la temperatura desciende hasta los 50-60°C, lo que permite que los primers o cebadores se hibriden con sus secuencias complementarias en las cadenas de DNA.
- Elongación: de nuevo se produce un aumento de la temperatura, esta vez hasta los 75-80°C. En esta etapa, la DNA polimerasa reconoce los primers hibridados a la cadena de DNA y los utiliza como base para la síntesis de la hebra complementaria a la cadena de DNA molde. Para ello, consume los dNTPs presentes en el medio de reacción. La síntesis de la nueva cadena de DNA se produce en el sentido 5’ a 3’. Idealmente, en cada etapa de elongación se produce una duplicación de la cantidad de material genético presente en el medio.

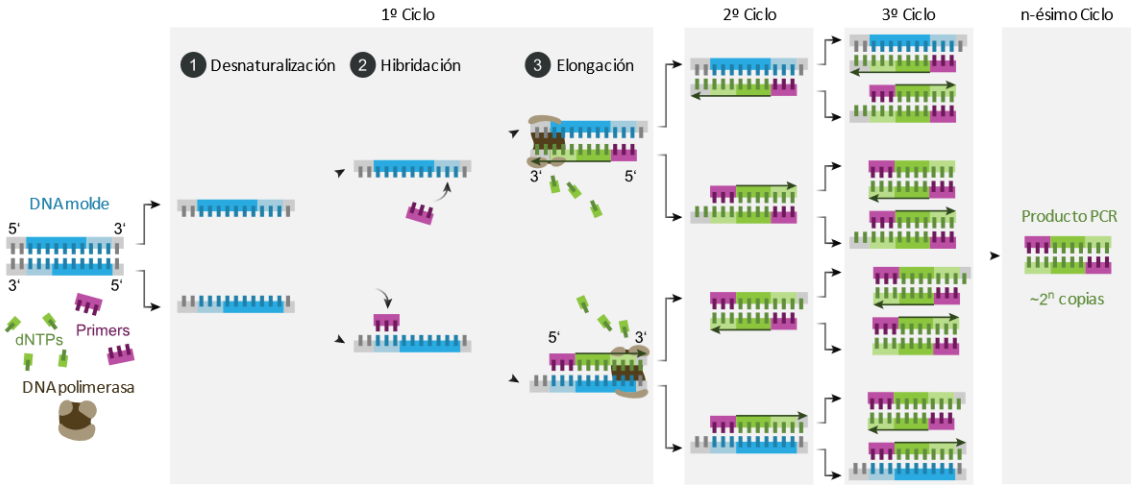


Figura 1: Esquema del funcionamiento de la PCR[1].

La invención del método de la PCR supuso una revolución en el campo de la biología molecular y permitió el desarrollo de técnicas y aplicaciones como el aislamiento selectivo de DNA, la amplificación y cuantificación de DNA, aplicaciones de diagnóstico médico o aplicaciones forenses entre otras, que no se habían podido desarrollar previamente por no existir una forma de obtener suficiente cantidad de material genético.

La versatilidad de la PCR ha permitido la introducción de modificaciones en el protocolo base dando lugar a una gran cantidad de técnicas derivadas. De entre todas ellas destaca la "*quantitative PCR*" (qPCR) como técnica para diagnóstico clínico. La qPCR permite monitorizar en "tiempo real" la cantidad amplificada de una secuencia determinada de DNA, permite introducir un análisis cuantitativo o semicuantitativo de la cantidad de DNA diana presente en la muestra inicial o también permite detectar polimorfismos de un solo nucleótido.

Los SNPs o polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism)* son una de las principales causas de variabilidad genética en los seres vivos[2,3]. A nivel de microorganismo, estas pequeñas variaciones en su DNA suponen la aparición de nuevas cepas (subespecies) que en el caso de los patógenos pueden suponer un cambio de sus características de interés clínico, como el aumento de la capacidad infectiva, virulencia, morbilidad, mortalidad o resistencia a antibióticos. Además, es una herramienta de control epidemiológico para la monitorización de la evolución de las diferentes cepas de un patógeno como ocurrió en el caso del COVID-19. Por otro lado, existen un gran número de enfermedades genéticas asociados a determinados polimorfismos en el genoma humano. Diferentes estudios de farmacogenética también relacionan las reacciones adversas o desproporcionadas a determinados medicamentos a estas mutaciones. En los últimos años, el desarrollo de diferentes arquitecturas de sondas que logren desarrollar kits de qPCR que sean lo suficientemente específicos como para discriminar entre SNPs se han hecho fundamentales para ofrecer una respuesta a esta necesidad.

La novedad que introduce la qPCR respecto a la PCR es la detección a tiempo real de una señal de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de DNA diana amplificado. Esto se consigue con dos estrategias:

1. Uso de agentes intercalantes, como el bromuro de etidio o el SYBR Green®. Un agente intercalante es una molécula que al introducirse o intercalarse en el *minor groove* de una molécula de dsDNA es capaz de emitir una señal fluorescente, mientras que en presencia de ssDNA no posee estas propiedades luminiscentes o están muy limitadas

(Figura 2). Por lo tanto, la medida de la intensidad de una señal de fluorescencia es indicativa del avance de la qPCR. Este tipo de detección, que actualmente aún se sigue usando, sólo necesita de dos primers específicos de la secuencia, del DNA diana y del agente intercalante y presenta la ventaja de no necesitar manipulaciones post-PCR. Sin embargo, el uso de agentes intercalantes genera una señal fluorescente que es inespecífica de la secuencia amplificada, porque sólo detecta la presencia de dsDNA, y esto puede llevar obtención de falsos positivos. Además, esta estrategia limita notablemente la capacidad de múltiples ensayos en un único experimento.

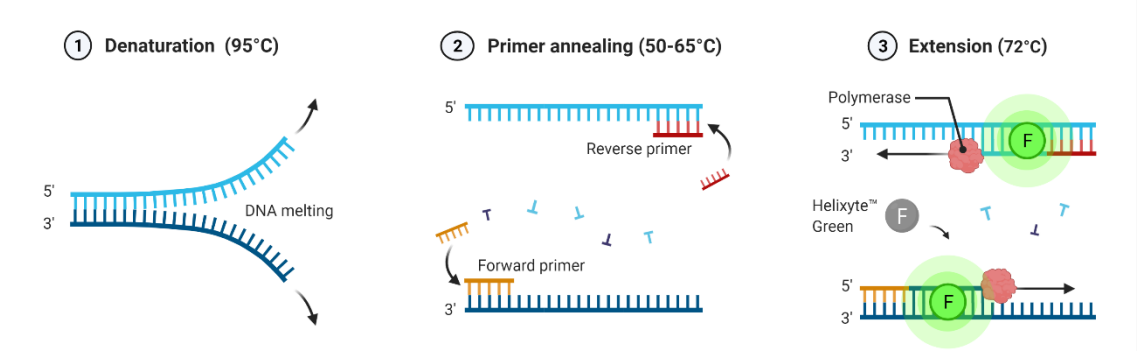


Figura 2. Esquema del mecanismo de funcionamiento de los agentes intercalantes[4].

2. Uso de sondas fluorescentes. El uso de secuencias de ssDNA específicas del DNA diana que se encuentran marcadas con moléculas con propiedades fluorescentes permite obtener señales fluorescentes que indican tanto la presencia de una secuencia concreta a la vez que la intensidad de esta señal es directamente proporcional a la cantidad de dicha secuencia. Esta estrategia permite la obtención de información más concreta de la muestra analizada, pero requiere de un diseño más cuidadoso de las secuencias de ssDNA específicas o sondas y la incorporación de apantalladores de fluorescencia o *quenchers*.

El uso de sondas fluorescentes ha superado las prestaciones que ofrece el uso de agentes intercalantes. Sin embargo, para conseguir un buen funcionamiento de las sondas fluorescentes es necesario conseguir un buen apantallamiento de la fluorescencia. En la mayoría de los casos, el apantallamiento de la fluorescencia emitida por una molécula fluorescente por parte de un *quencher* de fluorescencia tiene lugar mediante un proceso físico denominado FRET. Se trata de un mecanismo de transferencia de energía dinámico entre cromóforos y se basa en que la energía que porta un cromóforo excitado (fluoróforo) puede ser transferida a otro cercano (*quencher*) mediante un mecanismo acoplado dipolo-dipolo. Esta transferencia de energía entre el fluoróforo y el *quencher* resulta en la desaparición de la fluorescencia del primero. Dependiendo del tipo de *quencher*, esta energía transferida será emitida en una longitud de onda menor que el fluoróforo primero (*quenchers* radiantes) o se disipará mediante mecanismos no radiantes como por ejemplo en forma de calor (*quenchers* no radiantes o *dark quenchers*).Es importante destacar que la energía transferida se produce de una forma no radiante, por lo que no se genera una radiación de fondo que pueda ser detectada. Para que se produzca una transferencia de energía por efecto FRET deben cumplirse una serie de requisitos[5] (Figura 3):

1. Se debe producir un solapamiento espectral, al menos parcial, entre la banda de emisión del fluoróforo y la banda de absorción del *quencher*.

2. Las especies activas deben encontrarse a distancias próximas.
3. Los dipolos de las especies activas deben tener una orientación adecuada (ángulo diferente a 90°).

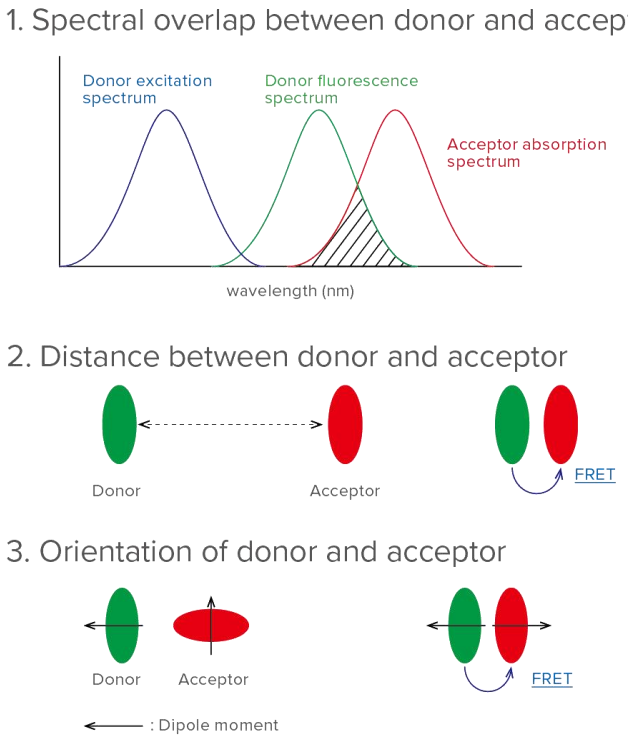


Figura 3. Condiciones necesarias para el efecto FRET.[6]

Los requisitos necesarios para que tenga lugar una transferencia de energía según un mecanismo FRET condiciona el diseño de las sondas de fluorescencia usadas en la detección de DNA por qPCR. De esta forma:

1. Es necesario usar una pareja de fluoróforo – *quencher* que sea compatible. No es posible usar especies cuyas bandas estén muy alejadas en el espectro electromagnético porque se reduciría el solapamiento entre ellas.
2. La distancia entre un fluoróforo y un *quencher* tiene que ser la adecuada. Si las especies activas se sitúan en los extremos de una sonda fluorescente para no repercutir negativamente sobre el reconocimiento entre las secuencias de DNA, la longitud de la sonda queda limitada y, por lo tanto, la cantidad de bases nitrogenadas que puede haber entre ellas. Esto hace que haya que afinar el diseño de las secuencias para hacerlas específicas del DNA diana.
3. La orientación de los dipolos del fluoróforo y del *quencher* es más difícil de fijar, ya que la flexibilidad de las sondas puede hacer que cambie en función de factores difíciles de controlar. No obstante, la distancia de los linkers que unen las especies fotoactivas con los oligonucleótidos puede influir directamente sobre su orientación y, por lo tanto, en la capacidad de establecer una transferencia de energía por efecto FRET.

Aunque estas condiciones parezcan muy restrictivas, se conoce una gran variedad de fluoróforos que se pueden utilizar para aplicaciones de qPCR. De hecho, existen casas comerciales que

suministran fluoróforos que cubren desde el ultravioleta A hasta el infrarrojo cercano, pasando por todo el rango del visible (Figura 4).

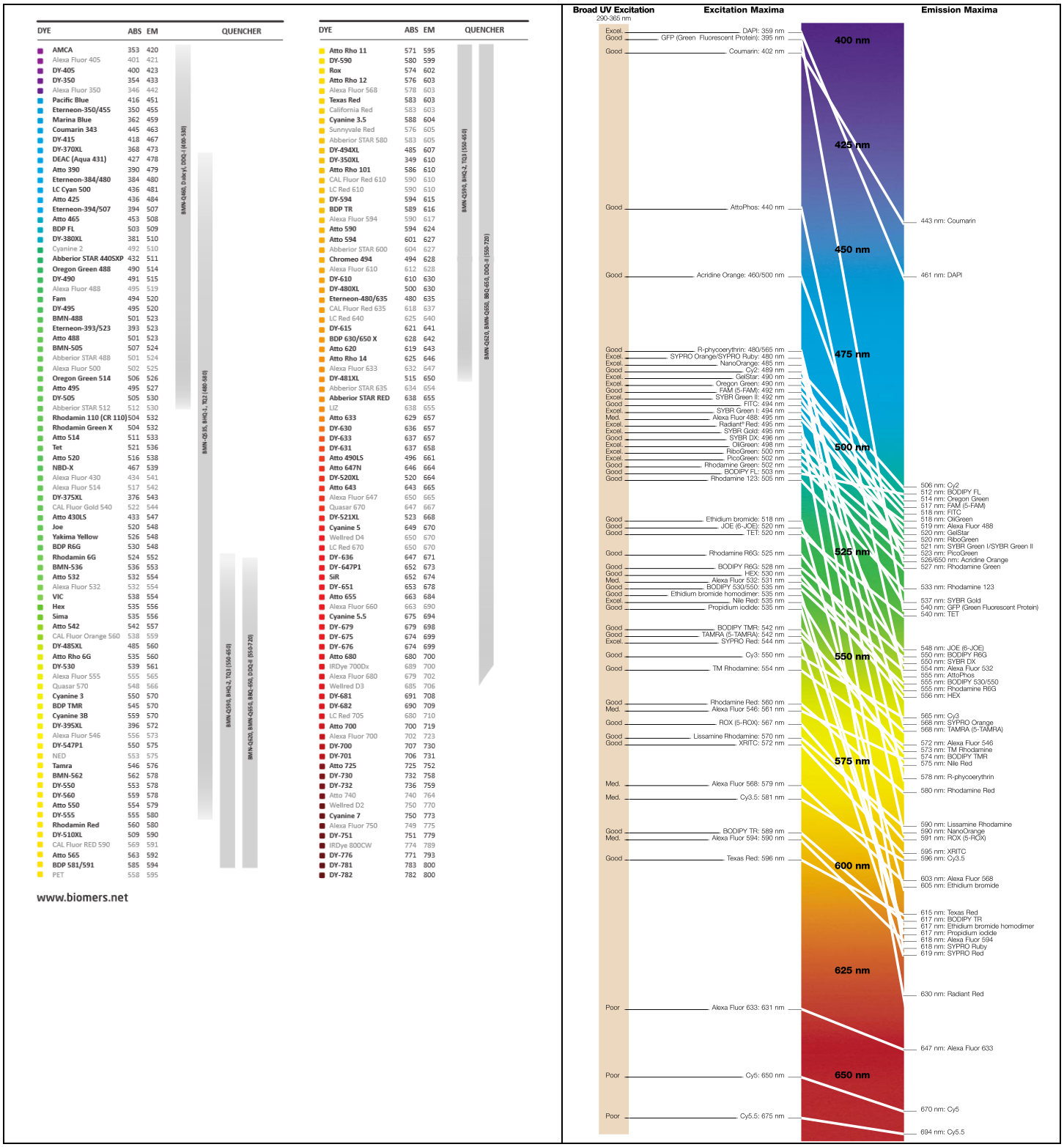


Figura 4. Listado de fluoróforos y quencher disponibles comercialmente y su longitud de onda de emisión y absorción[7].

Esta variedad abre un importante abanico de posibilidades, lo cual puede ser abrumador a la hora de elegir la opción que más convenga. Sin embargo, la elección de fluoróforo suele simplificarse notablemente debido a las limitaciones técnicas de los equipos de medida. Los

termocicladores que se usan en los experimentos de qPCR incorporan detectores de varias longitudes de onda. Estos detectores tienen una ventana de detección en la medida más o menos amplia, lo que puede provocar que se detecten señales debidas a fluoróforos que emitan a longitudes de onda demasiado cercanas. Por ello, es habitual una configuración de los equipos para la detección de cuatro canales que coincide con los cuatro fluoróforos más habituales (Tabla 1):

Tabla 1. Máximos de absorción y de emisión de los fluoróforos más comunes en qPCR.

Fluoróforo	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
FAM	493	517
HEX	533	559
ROX	578	604
Cy5	651	670

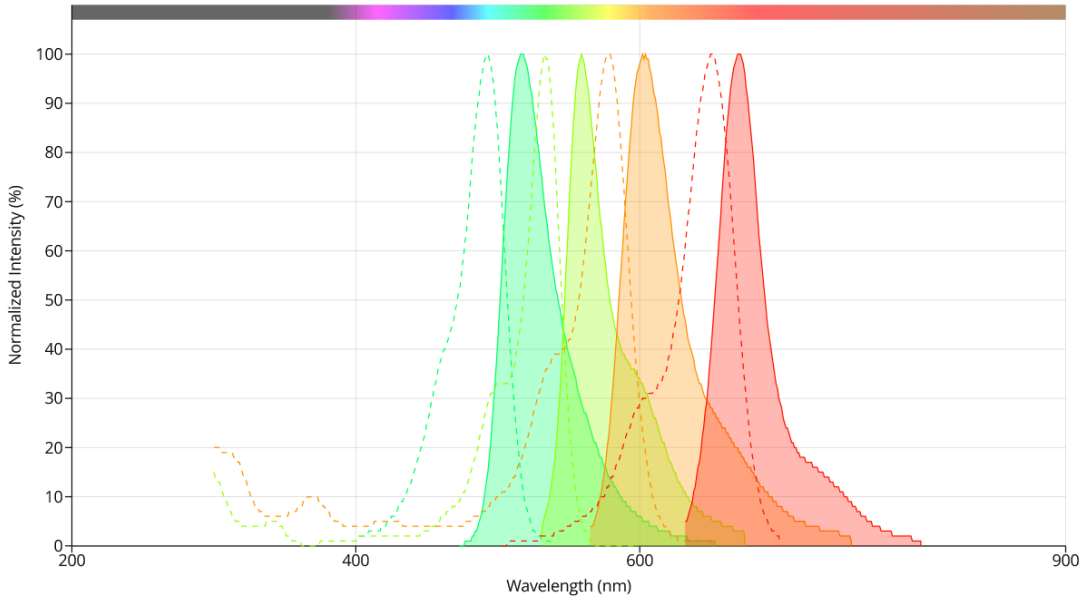


Figura 5. Espectros de absorción (línea discontinua) y emisión (línea continua rellena) de FAM (verde oscuro), HEX (verde claro), ROX (naranja) y Cy5 (rojo)[8].

El uso de estos cuatro fluoróforos cubre el rango del visible (380 a 750 nm), que es la zona de trabajo para qPCR (Figura 5). Longitudes de onda más corta serían tan energéticas que degradarían el DNA mientras que longitudes de onda más larga portarían tan poca energía que dificultarían la detección de la señal generada.

La elección de estos fluoróforos no es trivial. El uso de fluoróforos en los que las bandas de absorción y de emisión estuvieran más próximas podría llevar a la generación de fenómenos de *crosstalk*. En esta situación, la fluorescencia de un fluoróforo se detecta en el canal de otro menos energético, bien por medida directa o bien porque tiene la suficiente intensidad como para excitar a ese fluoróforo. Esta situación es indeseada porque se podrían generar falsos positivos (Figura 6).

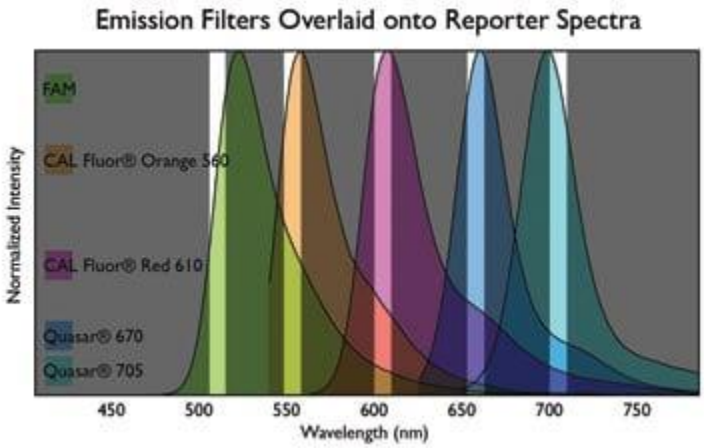


Figura 6. Principio del fenómeno de crosstalk en los rangos de longitud de onda más comunes registrados por termocicladores[9].

Por otro lado, la elección del *quencher* suele ser más sencilla. Si bien la banda de emisión de un fluoróforo debe ser, idealmente, estrecha para reducir al máximo las posibles interferencias en canales cercanos por fenómenos de crosstalk, la banda de absorción de un *quencher* debe ser, idealmente, ancha (Figura 7). Una banda de absorción ancha favorece el solapamiento espectral requerido como condición de la transferencia de energía por mecanismo FRET. Por este motivo, unos pocos *quenchers* pueden cubrir todo el rango de longitudes de onda.

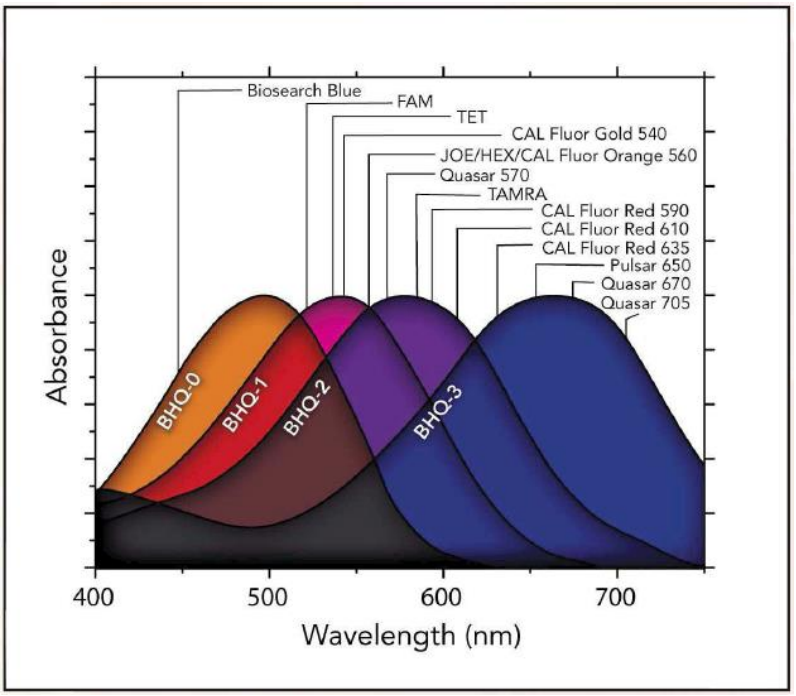


Figura 7. Espectros de absorción de los quenchers BHQ y máximos de emisión de los fluoróforos con los que se suelen emparejar[10].

Si la medida de la señal de fluorescencia es imprescindible para el correcto funcionamiento de la qPCR, la disponibilidad de sondas y primers específicos es uno de los pilares de esta técnica. El uso de oligonucleótidos específicos para una secuencia de material genético permite que esta técnica sea tan fidedigna y los errores de reconocimiento de otras secuencias sean mínimos. Hoy en día la qPCR es una técnica muy potente y bien establecida, sin embargo, uno de los requisitos que ha ido cobrando importancia es el mayor grado de especificidad de los ensayos de qPCR.

El uso de primers y sondas específicos crea la necesidad de su obtención. Estas secuencias no se pueden obtener de fuentes naturales, por lo que es necesario sintetizarlos. El origen de la síntesis artificial de cadenas de ssDNA se remonta a los trabajos de Khorana *et al.*[11,12], a mitad de la década de los años 1960, intentando descifrar el código genético. Estos primeros trabajos, que buscaban la relación entre una secuencia de DNA y la secuencia de aminoácidos que codificaba, supusieron un gran esfuerzo de 5 años de trabajo para llevar a cabo la síntesis de un oligonucleótido en fase homogénea. En los años 1980, inspirados en la síntesis en fase sólida de oligopéptidos, Caruthers *et al*.[13,14] desarrollaron un método de síntesis de en fase sólida de oligonucleótidos basada en la química de las fosforamiditas. En la actualidad, este es el método más utilizado para obtener de forma automática secuencias de ácidos nucleicos. El desarrollo de la técnica ha llevado a la disponibilidad de fosforamiditas de diferentes modificadores, lo que hace mucho más amplio el abanico de posibilidades para la síntesis de oligonucleótidos artificiales.

La síntesis de la fosforamidita[15] consiste en una serie de cuatro reacciones que se repiten de forma cíclica. En cada uno de estos ciclos se añade uno de los cuatro ácidos nucleicos que componen una secuencia natural de DNA siempre en dirección 3'→5'. La elongación de la cadena de DNA parte de un soporte sólido unido covalentemente a una fosforamidita del nucleósido correspondiente al extremo 3' de la molécula que se vaya a sintetizar. El ciclo de las cuatro reacciones siempre lleva el siguiente ciclo concreto:

1. Desbloqueo/*Deblocking*: tanto el nucleósido del soporte sólido como lo que se incorporarán se encuentran protegidos con un grupo DMT que debe ser eliminado. Para ello, se hace reaccionar con un ácido, normalmente ácido tricloroacético (TCA). Como resultado, se obtiene el nucleósido activado y el grupo DMT se elimina, generando una disolución rosácea. La medida de la absorbancia de esta disolución es un indicativo del rendimiento paso a paso de la reacción.

2. Acoplamiento/*Coupling*: en la segunda etapa, se produce la elongación de la cadena de nucleótidos del soporte sólido mediante la adición de la base al hidroxilo libre del extremo 5' de la reacción anterior. Previamente, se ha produce la activación de la fosforamidita que se va a incorporar mediante un activador. La reacción entre la fosforamidita y la base unida al soporte da lugar a la formación de una especie fosfito.

3. Capado/*Capping*: en la tercera etapa de la síntesis, se acetilan todos los grupos hidroxilo en 5' que no hubieran reaccionado en la etapa anterior para que estas secuencias no reaccionantes no sigan incorporando nucleótidos en sucesivas reacciones y no se produzca una mezcla de oligonucleótidos de cadena incompleta que dificultaría en gran medida su purificación posterior. Se realiza mediante la mezcla de dos reactivos de capado Cap A y Cap B.

4. Oxidación/*Oxidation*: en la cuarta y última etapa, el enlace fosfito entre las dos bases se oxida a un enlace fosfato, para emular el esqueleto de fosfato del DNA y evitar que se pueda romper el enlace en sucesivas etapas de la elaboración del oligo

Esta secuencia de etapas se repite hasta sintetizar la secuencia deseada del oligonucleótido. En ese momento, una etapa de digestión hace que el oligonucleótido se libere del soporte sólido y que se eliminen todos los grupos protectores aún presentes.

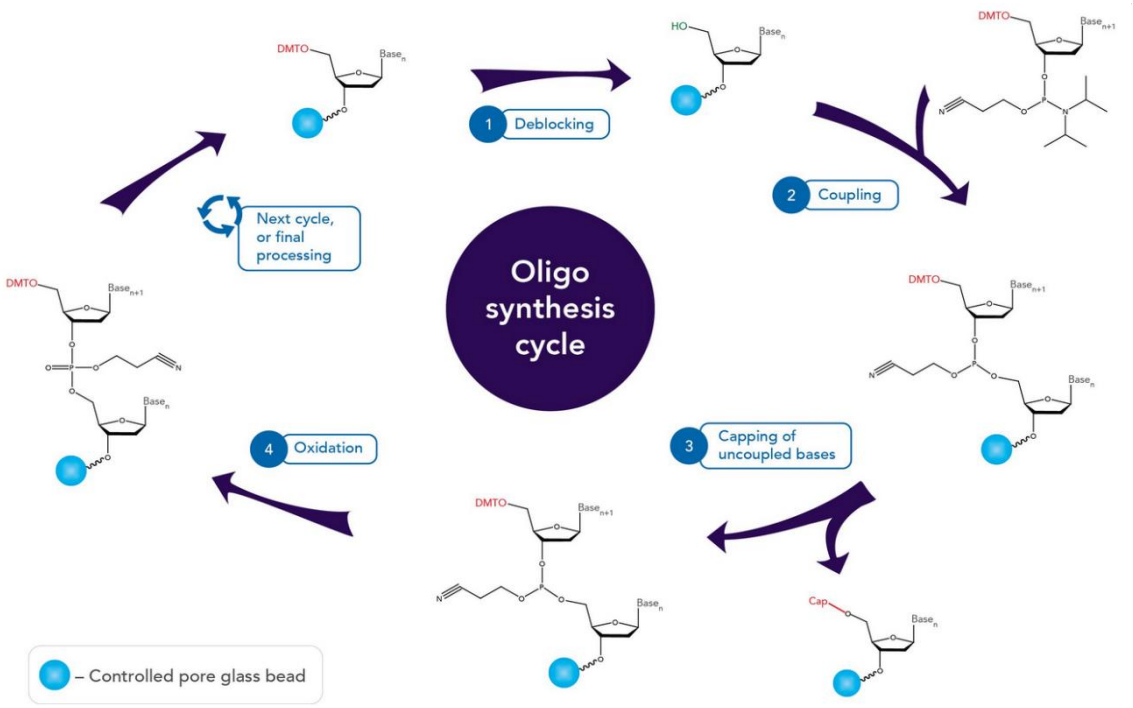


Figura 8. Ciclo de síntesis de oligonucleótidos mediante el método de la amidita[16]

El método de síntesis de la amidita sigue siendo el método más utilizado para la obtención de oligonucleótidos artificiales. Su rapidez, disponibilidad de reactivos y automatización permite obtener simultáneamente entre 8 y 1536 oligonucleótidos distintos en escalas entre 10 y 1000 nmol en tan solo un par de horas. Sin embargo, es un método que presenta carencias cuando se trata de sintetizar oligonucleótidos de cadena demasiado larga. Si bien cada etapa del ciclo puede tener un rendimiento muy elevado, incluso con un 99,5% de rendimiento en cada etapa, tras 50 ciclos el rendimiento global se reduce hasta el 77,8% y tras 200 ciclos, se reduce hasta el 36,7%. La síntesis artificial de oligonucleótidos ha permitido desarrollar constructos con propiedades que proporcionan mayor sensibilidad en el reconocimiento del DNA objetivo en el ensayo de qPCR. De esta forma, es posible encontrar una gran variedad alternativas diferentes[17]:

- Sondas de hidrólisis: secuencia de nucleótidos que contiene un grupo fluoróforo (habitualmente en el extremo 5') y un *quencher* terminal (habitualmente en el extremo 3'). En ocasiones puede contar con un *quencher* interno. Estas sondas no presentan fluorescencia en su estado fundamental, pero cuando intervienen en la qPCR la DNA polimerasa las degrada y libera el fluoróforo y el *quencher*. La mayor distancia entre estas moléculas imposibilita una transferencia de energía por efecto FRET y, por lo tanto, se observa un aumento de la fluorescencia. La sonda de hidrólisis por excelencia es la sonda Taqman (Figura 9), pero existen sondas de hidrólisis con arquitecturas más complejas como los *cooperative primers*.

Figura 9. Sonda Taqman y su mecanismo de generación de señal[17].

- Sondas de hibridación: Su uso en qPCR no implica la degradación de la sonda por la DNA polimerasa. La generación de la señal de fluorescencia está relacionada con el reconocimiento de la secuencia diana. Existen varios tipos:
    - *Molecular beacon* (Figura 10): el oligonucleótido contiene un fluoróforo y un *quencher* en los extremos de la secuencia. La propia sonda contiene una secuencia que provoca su plegamiento y la aproximación de fluoróforo y *quencher* en estado nativo de la sonda, por lo que se produce un apantallamiento de la fluorescencia. Cuando la sonda reconoce la secuencia diana, se hibrida a ella y se despliega, haciendo que el fluoróforo y el *quencher* se alejen y deje de actuar la transferencia de energía por efecto FRET y, por lo tanto, se observa un aumento de la fluorescencia.

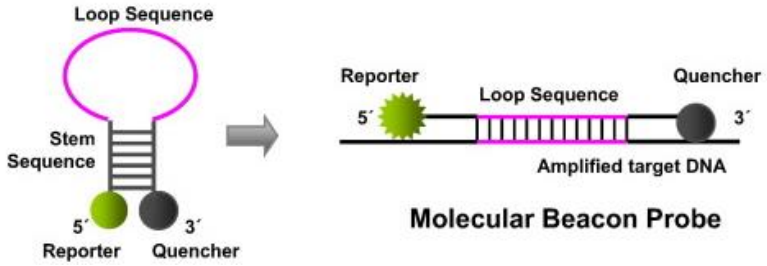


Figura 10. Sonda Molecular Beacon y su mecanismo de generación de señal[17]

    - Hibridación dual (*Hybprobes* Figura 11): se usan dos sondas de forma que hibridan de forma contigua dentro de la secuencia diana. Estas sondas contienen, una de ellas, un *quencher* y la otra un fluoróforo, de forma que al hibridarse quedan próximos en el espacio y se produce una transferencia de energía por efecto FRET. En este tipo sondas se produce una disminución de la fluorescencia inicial cuando tiene lugar el reconocimiento de la secuencia diana.

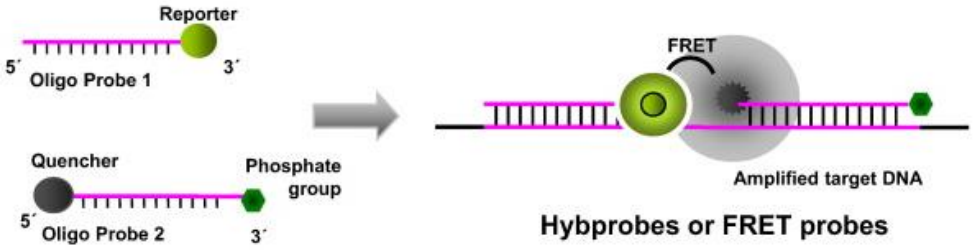


Figura 11. Sonda Hybprobe y su mecanismo de generación de señal[17]

    - Sondas *scorpion* (Figura 12): sondas similares a las *molecular beacon*. Contienen un fluoróforo y un *quencher* en los extremos de la secuencia. La propia sonda contiene una secuencia que provoca su plegamiento y la aproximación de fluoróforo y *quencher* en estado nativo de la sonda, por lo que se produce un apantallamiento de la fluorescencia. Este tipo de sonda incorpora una secuencia que actúa como primer y se incorpora a la cadena en crecimiento. Cuando la sonda reconoce la secuencia diana, se hibrida a ella y se despliega, haciendo que el fluoróforo y el *quencher* se alejen y deje de actuar la transferencia de energía por efecto FRET y, por lo tanto, se observa un aumento de la fluorescencia.

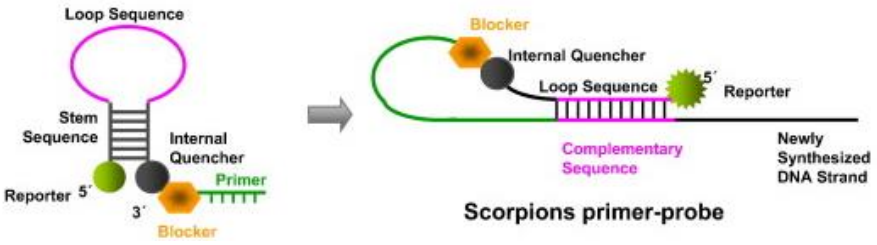


Figura 12. Sonda Scorpion y su mecanismo de generación de señal[17]

De forma complementaria al diseño de la secuencia, la síntesis artificial de oligonucleótidos también ha permitido introducir dentro de la secuencia bases no naturales o modificadas, hacer ácidos nucleicos quimera (mezcla de DNA y RNA) o introducir otro tipo de elementos que permiten incrementar su rendimiento en las reacciones de qPCR. Algunas de las modificaciones más habituales son:

- *Locked nucleic acid* (LNA Figura 13)[18]: este tipo de nucleótido contiene un puente metileno entre el oxígeno en 2' y el carbono en 4' del anillo de ribosa. Esta modificación estructural provoca que la estructura quede bloqueada en una conformación C3'-endo. Esta modificación provoca una rigidificación de la estructura que, a su vez, genera un aumento de la afinidad por la cadena complementaria.

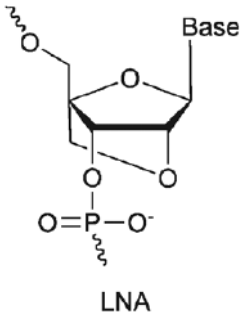


Figura 13. Estructura molecular de una base LNA[18].

- Unlocked nucleic acid (UNA Figura 14)[18]: por el contrario, en los UNA el anillo de ribosa se ha abierto entre las posiciones de los carbonos en 2' y 3', por lo que es una estructura lineal y muy flexible.

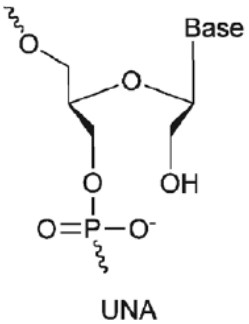


Figura 14. Estructura molecular de una base UNA[18].

- *Minor Groove Binders* (MGB Figura 15)[19]: molécula que tiene afinidad por las secuencias ricas en AT y G/C del surco menor del DNA aumentando también la afinidad del oligonucleótido por su cadena complementaria.

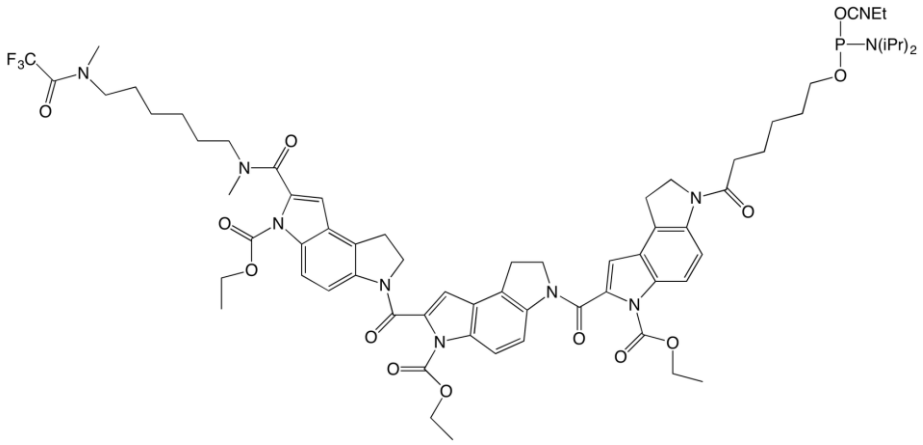


Figura 15. Estructura molecular de la fosforamidita del MGB CDPI$_3$.

- Inosina[20] (Figura 16): se trata de una base púrica con la capacidad de emparejarse con cualquier base natural. Su incorporación a sondas de PCR se ha usado en posiciones con polimorfismos de un único nucleótido, para evitar un *mismatch*.

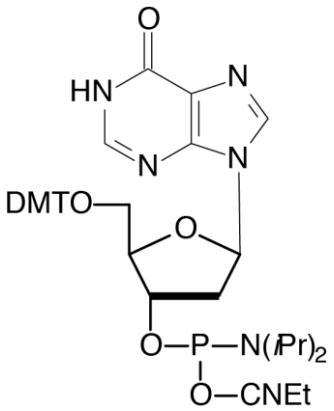


Figura 16. Estructura molecular de la fosforamidita Inosina[21].

- 2'-F[22] (Figura 17): la introducción de un átomo de fluor como sustituyente en la posición 2' de la ribosa favorece la conformación de la misma como C3'-endo, que ayuda al reconocimiento de la cadena complementaria y aumenta la estabilidad del dímero (aumento de la Tm)[22]. Este tipo de sustitución también presenta una mayor estabilidad frente a la actividad nucleasa de ciertas enzimas.

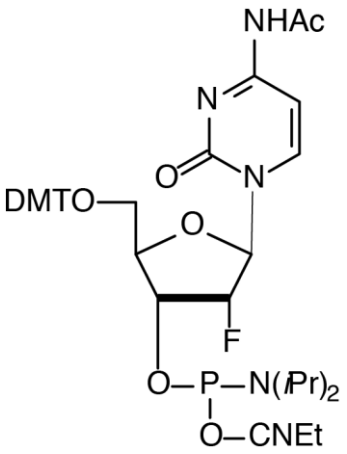


Figura 17. Estructura molecular de la fosforamidita citosina 2'-F[23].

El presente trabajo de investigación se ha desarrollado dentro de un programa de doctorado industrial, en la empresa Certest Biotec. La actividad económica principal de la empresa es la investigación y el desarrollo de técnicas de diagnóstico y su comercialización mundial, entre las que se encuentran kit para qPCR. En un afán de tener un mayor control del proceso productivo, en 2019 se lanzó un proyecto de I+D+i para la creación de un desarrollo de síntesis de oligonucleótidos y así poder suministrar a la línea de producción de ensayos de qPCR. Además, Considerando los precedentes expuestos y las dificultades que plantea la síntesis artificial de oligonucleótidos, ese proyecto de I+D+i inicial acabó desarrollándose en forma de una investigación de doctorado que es la que se recoge en esta memoria.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó este trabajo para llevar a cabo la síntesis de sondas de DNA para la detección y discriminación de SNPs de patógenos y humanos mediante qPCR.

OBJETIVOS

El primer objetivo que se plantea en este trabajo es el desarrollo de un método para la síntesis de oligonucleótidos. En el **Capítulo 1**: Elección del sistema Primer - Sonda se recoge el estudio realizado para la optimización de las condiciones de reacción de estos procesos. Dentro de los parámetros a estudiar se encuentran los sustratos a utilizar, los reactivos empleados durante la síntesis, la incorporación de modificaciones en la estructura para mejorar las propiedades de la molécula o la adecuación del par fluoróforo-*quencher*. De forma adicional, también forma parte del trabajo realizado el desarrollo de métodos de síntesis de sondas con distintas arquitecturas capaces de discriminar entre SNPs.

Una vez desarrollado un método que permitiera la disponibilidad de la materia prima, el siguiente objetivo en el que se trabajó fue el uso de la arquitectura seleccionada para la obtención de sondas para ensayos qPCR y que permitieran la discriminación de SNPs de diferentes cepas de patógenos (*C. Difficile*, *M. Tuberculosis* y COVID-19) y alelos humanos (HLA-B27 y HLA-B57). Este trabajo se recoge en el **Capítulo 2**: Diseño de sondas LNA y Proyectos QPCR.

En la última sección de esta memoria la **Sección Experimental** incluye la descripción detallada de los métodos utilizados durante la síntesis y purificación de los oligonucleótidos, así como los datos correspondientes a su caracterización por las técnicas analíticas y espectroscópicas pertinentes. Tanto este capítulo como los anteriores contienen su propia bibliografía y son, por lo tanto, autoconsistentes en lo que a citación de referencias se refiere.

Las **Conclusiones** más relevantes de cada parte se presentan al final de cada **Capítulo.**

Como se ha mencionado anteriormente, la presente tesis doctoral se ha desarrollado dentro de un programa de doctorado industrial, en la empresa Certest Biotec, S.L., por lo que cierta información puede estar omitida por encontrarse bajo secreto industrial y protección de la propiedad industrial.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Enzoklop. *English: Schematic Mechanism of PCR.*; 2020. https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=96042657 (accessed 2024-08-28).
(2) Rahman, M.-M.; Lim, S.-J.; Park, Y.-C. Development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Based Triplex PCR Marker for Serotype-Specific Escherichia Coli Detection. *Pathogens* **2022**, *11* (2), 115. https://doi.org/10.3390/pathogens11020115.
(3) Nelson, M. R.; Marnellos, G.; Kammerer, S.; Hoyal, C. R.; Shi, M. M.; Cantor, C. R.; Braun, A. Large-Scale Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Gene Regions. *Genome Res.* **2004**, *14* (8), 1664–1668. https://doi.org/10.1101/gr.2421604.
(4) *Real-Time PCR (qPCR) | AAT Bioquest*. https://www.aatbio.com/catalog/real-time-pcr-qpcr (accessed 2024-08-28).
(5) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999.
(6) Group, S. *Monitoring of protein behavior by using FRET | JASCO Global*. JASCO Inc. https://www.jasco-global.com/solutions/monitoring-of-protein-behavior-by-using-fret/ (accessed 2024-08-28).
(7) *biomers.net | Modifications*. https://www.biomers.net/en/Catalog/Modifications (accessed 2024-08-28).
(8) *Fluorescence Spectrum Viewer | AAT Bioquest*. https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer (accessed 2024-02-09).
(9) Technologies, B. *Factors affecting fluorophore performance in qPCR - LGC*. https://blog.biosearchtech.com/thebiosearchtechblog/bid/81047/factors-affecting-fluorophore-performance-in-qpcr (accessed 2024-08-28).
(10) *DNA Synthesis*. LGC Biosearch Technologies. https://www.biosearchtech.com/support/education/dna-synthesis (accessed 2024-08-28).
(11) Paredes, E.; Aduda, V.; Ackley, K. L.; Cramer, H. 6.11 - Manufacturing of Oligonucleotides. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Chackalamannil, S., Rotella, D., Ward, S. E., Eds.; Elsevier: Oxford, 2017; pp 233–279. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12423-0.
(12) Hughes, R. A.; Ellington, A. D. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9* (1), a023812. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023812.
(13) Caruthers, M. H. A Brief Review of DNA and RNA Chemical Synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39* (2), 575–580. https://doi.org/10.1042/BST0390575.
(14) Caruthers, M. H. Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and Its Uses. *Science* **1985**, *230* (4723), 281–285. https://doi.org/10.1126/science.3863253.
(15) ATDBio. *Chapter 5: Solid-phase oligonucleotide synthesis*. ATDBio Nucleic Acids Book. https://atdbio.com/nucleic-acids-book/05_solid-phase-oligo-synthesis (accessed 2024-08-28).
(16) *What are oligos? More information at LubioScience*. https://www.lubio.ch/blog/oligos (accessed 2024-08-28).
(17) Nolan, T.; Bustin, S. A. *PCR Technology Current Innovations*; CRC Press: Boca Raton, Fla., 2013.

(18) Campbell, M. A.; Wengel, J. Locked vs. Unlocked Nucleic Acids (LNA vs. UNA): Contrasting Structures Work towards Common Therapeutic Goals. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (12), 5680–5689. https://doi.org/10.1039/c1cs15048k.

(19) Kutyavin, I. V.; Afonina, I. A.; Mills, A.; Gorn, V. V.; Lukhtanov, E. A.; Belousov, E. S.; Singer, M. J.; Walburger, D. K.; Lokhov, S. G.; Gall, A. A.; Dempcy, R.; Reed, M. W.; Meyer, R. B.; Hedgpeth, J. 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes Increase Sequence Specificity at PCR Extension Temperatures. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (2), 655–661. https://doi.org/10.1093/nar/28.2.655.

(20) Zheng, L.; Gibbs, M. J.; Rodoni, B. C. Quantitative PCR Measurements of the Effects of Introducing Inosines into Primers Provides Guidelines for Improved Degenerate Primer Design. *J. Virol. Methods* **2008**, *153* (2), 97–103. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.07.029.

(21) *dI-CE Phosphoramidite*. https://www.glenresearch.com/degenerate-bases/10-1040.html (accessed 2024-08-28).

(22) Patra, A.; Paolillo, M.; Charisse, K.; Manoharan, M.; Rozners, E.; Egli, M. 2'-Fluoro RNA Shows Increased Watson-Crick H-Bonding Strength and Stacking Relative to RNA: Evidence from NMR and Thermodynamic Data. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2012**, *51* (47), 11863–11866. https://doi.org/10.1002/anie.201204946.

(23) *2'-F-Ac-C-CE Phosphoramidite*. https://www.glenresearch.com/2-f-rna-phosphoramidites/10-3415.html (accessed 2024-08-28).

II. CAPÍTULO 1: ELECCIÓN DEL SISTEMA PRIMER - SONDA

La generación de una señal fluorescente medible y proporcional a la cantidad de DNA amplificado es el fundamento sobre el que se basa el ensayo de qPCR. Sin embargo, la obtención de esta señal no es un proceso baladí y ha ido evolucionando en las sucesivas mejoras que ha ido sufriendo la técnica. En el origen de la qPCR, la señal se obtenía mediante el uso de agentes intercalantes como el bromuro de etidio o el SYBR Green® (Figura 18). Un agente intercalante es una molécula que al introducirse o intercalarse en el *minor groove* de una molécula de dsDNA es capaz de emitir una señal fluorescente mientras que, en presencia de ssDNA no posee estas propiedades luminiscentes o están muy limitadas. Por lo tanto, la medida de la intensidad de una señal de fluorescencia es indicativa del avance de la qPCR. Este tipo de detección, que actualmente aún se sigue usando, sólo necesita de dos primers específicos de la secuencia, del DNA diana y del agente intercalante y presenta la ventaja de no necesitar manipulaciones post-PCR (Figura 19).

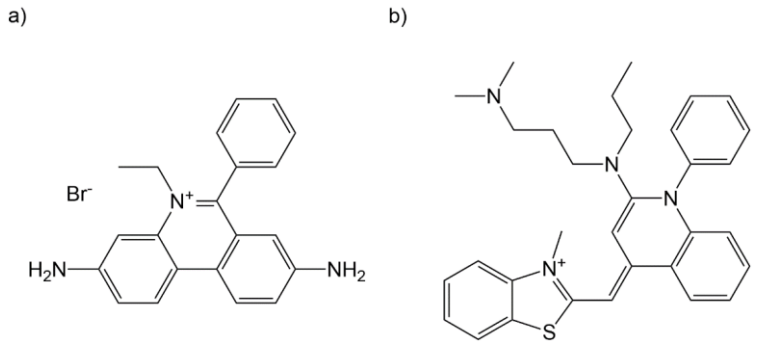


Figura 18. Estructura molecular del bromuro de etidio [(a)] y de SYBR GREEN® (b).

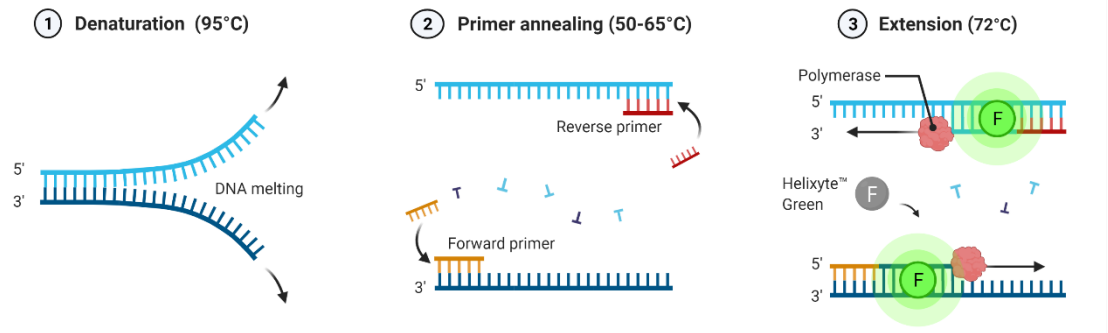


Figura 19. Amplificación de la señal fluorescente mediante el uso de agentes intercalantes durante un ensayo de qPCR. Imagen obtenida de: https://www.aatbio.com/catalog/real-time-pcr-qpcr .

El uso de agentes intercalantes genera una señal fluorescente que es inespecífica de la secuencia amplificada, porque sólo detecta la presencia de dsDNA, y limita notablemente la capacidad de múltiples ensayos en un único experimento. La evolución de la técnica de la qPCR llevó al desarrollo de las técnicas basadas en sondas, en las que se usan secuencias de ssDNA específicas del DNA diana que se encuentran marcadas con moléculas con propiedades fluorescentes. De esta forma, la obtención de la señal fluorescente en este tipo de ensayos es indicativa de la presencia de una secuecia concreta a la vez que la intensidad de esta señal es directamente propocional al número de copias presente en la muestra de dicha secuencia. Esta forma de trabajo ha permitido desarrollar un gran número de sistemas primer-sonda para la detección y semicuantificación de ácidos nucleicos, cuyas diferencias se encuentran en su mecanismo de

acción, la forma de interactuar con el DNA diana y la generación de la señal fluorescente, proporcionándoles unas características y capacidades diferentes. La casuística en los experimentos de qPCR es muy amplia. En cualquier caso, la elección del sistema experimental se realiza en base a:

- Alto de grado de especificidad: la detección y discriminación de secuencias mutadas para la identificación de diferentes cepas de un mismo microorganismo potencialmente patogénico o de polimorfismos genéticos humanos asociados a enfermedades es un punto crítico. La elaboración de sondas lo suficientemente específicas y sensibles para detectar estas mutaciones de un solo nucleótido (SNPs), una de las formas más comunes de variación genética[1,2], es fundamental.
- Posibilidad del desarrollo de ensayos *multiplex*: debido a la cada vez más acuciante inmediatez en el diagnóstico clínico, es necesaria la posibilidad de poder realizar ensayos en los que se identifique más de una secuencia objetivo a la vez, lo que se denomina ensayos *multiplex* (en contraposición a los ensayos *monoplex* en los que únicamente se detecta una diana). Este tipo de ensayos supone un coste menor de tiempo y de recursos, tanto económicos como de muestras biológicas, y disminuye el error experimental al disminuir las operaciones necesarias para la preparación de la muestra.[3]
- Mínima cantidad de componentes del sistema: la presencia de múltiples secuencias de DNA de distintas longitudes en un mismo ensayo de PCR puede provocar interacciones no deseadas entre ellos, como la formación de dímeros de primer, dando lugar a errores en el diagnóstico. La realización de experimentos minimizando el número de componentes beneficia la calidad del análisis.
- Síntesis asequible: como se ha visto en la **Introducción** la longitud del oligonucleótido sintetizado es un factor bastante influyente en el rendimiento final de su obtención. Además, la incorporación de una elevada cantidad de modificadores también merma este rendimiento. Debe existir un compromiso entre el éxito de los resultados y la síntesis de la sonda.
- Optimización del diseño de la sonda: la disponibilidad de herramientas informáticas y de bases de datos que sirvan de punto de apoyo para el diseño de las secuencias de cada sonda es fundamental para la eficacia de los experimentos de PCR.

Además, dado que la investigación desarrollada se ha realizado en un entorno industrial, otro de los factores que se ha tenido en cuenta para la elección del sistema experimental ha sido la compatibilidad con el formato de producto final de qPCR ofertado por la empresa. Los kits de diagnóstico de qPCR desarrollados y comercializados por la empresa tienen determinadas características en cuanto a ventanas de observación de la fluorescencia, composición de la máster mix, protocolo térmico y formato de venta como producto liofilizado, que se deben mantener y no afectar negativamente al constructo (secuencia de DNA sintético, primer o sonda) elegido para mantener los estándares de calidad establecidos.

Toda esta casuística es conocida y es por ello por lo que la comunidad científica ha desarrollado diferentes soluciones para afrontarla. Especialmente notable es la cantidad de moléculas con propiedades fluorescentes (fluoróforos) que se pueden incorporar a las sondas[4], dado que se pueden encontrar ejemplos que abarcan desde el ultravioleta cercano hasta el infrarrojo cercano, cubriendo todas las longitudes de onda intermedias. Sin embargo, la resolución de las señales condiciona que haya una separación mínima entre ellas para evitar fenómenos de interferencias cruzadas o *crosstalk*. Es por ello que tradicionalmente en qPCR se haya trabajado

con cuatro ventanas de observación y que el uso de fluoróforos se haya limitado a los que se ajustan a dichas ventanas (Tabla 2):

Tabla 2. Ventanas de longitudes de onda de los registros de fluorescencia en el sistema de análisis de qPCR Applied Biosystems™ QuantStudio™ a los fluoróforos más utilizados.

Color	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Fluoróforo
Azul	470 ± 15	520 ± 15	FAM
Verde	520 ± 15	558 ± 15	HEX (VIC)
Naranja	580 ± 15	623 ± 15	ROX (Texas Red)
Rojo	640 ± 15	682 ± 15	Cy5

La construcción de las sondas de fluorescencia puede ser muy variada y en ello radica también sus diferentes usos. Pero en la mayoría de los casos se produce un apantallamiento de la fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (efecto FRET) mediante el uso de una molécula con propiedades de apantallador de fluorescencia o *quencher*. Al igual que en el caso de los fluoróforos, se han desarrollado *quenchers* que cubren todo el espectro de la radiación visible. Sin embargo, mientras la emisión de fluorescencia tiene lugar en una banda estrecha y definida, la banda de absorción de los *quenchers* es más amplia y cubre un rango de longitudes de onda mayor. Por lo tanto, un mismo *quencher* puede apantallar de forma efectiva la fluorescencia de varios fluoróforos. Además, para las aplicaciones más habituales, resulta interesante que los *quenchers* sean no radiantes, es decir, que disipen la energía absorbida en forma de calor para no generar señales que puedan causar interferencias entre diferentes canales de qPCR.

Por lo tanto, para el trabajo desarrollado en este capítulo se propusieron los siguientes objetivos:

- Estudio de la interacción del par fluoróforo-quencher y su adecuación para la síntesis de sondas de ssDNA para su uso en qPCR.
- Optimización de la síntesis, digestión, purificación y análisis de las sondas con los pares fluoróforo-quencher seleccionados.
- Optimización de la síntesis, digestión, purificación y análisis de sondas de fluorescencia con diferentes arquitecturas.
- Valoración de la viabilidad y adecuación de los sistemas primer-sonda desarrollados y elección para su uso en el diagnóstico por qPCR.

II.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE SÍNTESIS, DIGESTIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SONDAS DE HIDRÓLISIS

El trabajo desarrollado en la presente investigación industrial se enmarca dentro del desarrollo de productos con fines comerciales. Es por ello por lo que se ha perseguido el obtener resultados con aplicaciones directas dentro del marco de la qPCR. Teniendo en cuenta esta premisa, se decidió trabajar con los cuatro fluoróforos más habituales y establecidos, a nivel comercial, para esta técnica: FAM, HEX, ROX y Cy5. Esta elección permite que los productos desarrollados se adecuen a los equipos existentes en el mercado, ya que es habitual que presenten detectores de fluorescencia adaptados a estos cuatro fluoróforos. Durante la realización del trabajo también se ha comprobado que son los fluoróforos los que marcan, en mayor medida, la estabilidad de la sonda en la que se encuentran integrados y, por lo tanto, los que condicionan los tratamientos aplicados. Por este motivo, a continuación, se realiza una descripción de la optimización de los

protocolos de síntesis, digestión, purificación y análisis de sondas de hidrólisis, agrupados en función de los correspondientes fluoróforos.

II.1.1. FAM

La 6-carboxifluoresceína, más conocida como FAM, es un xantenoide (Figura 20a) derivado de la estructura de fluoresceína (Figura 20b). FAM posee una estructura rígida y plana formada por tres ciclos fusionados. Las características de su estructura le confieren una fluorescencia con unos valores muy altos de coeficiente de extinción molar (88000 $cm^{-1}M^{-1}$ a pH 8) y de rendimiento cuántico (0,92 a pH>8)[5,6]. Sin embargo, la molécula presenta deficiencias en cuanto a estabilidad química o a estabilidad fotofísica (fotobleaching) y sus propiedades luminiscentes presentan dependencia del pH. Con el objetivo de modular sus propiedades ópticas o para conferirle nuevas propiedades químicas, es habitual que la estructura de la fluoresceína se encuentre funcionalizada en alguno de los diversos puntos susceptibles de serlo.

En el caso de la 6-carboxifluoresceína, la fluoresceína incorpora un grupo carboxilato en el C6 del anillo bencílico externo al esqueleto de xanteno (Figura 20c). La presencia de diversos grupos funcionales en este anillo no supone una modificación de las propiedades ópticas de la molécula[7]. Sin embargo, este grupo carboxilato introduce una reactividad adicional a la molécula, ya que permite incorporar un linker para su unión al oligonucleótido que se vaya a sintetizar. En el derivado usado durante la síntesis de oligonucleótidos por el método de la amidita es necesario proteger los grupos hidroxilo para evitar reacciones cruzadas (Figura 20d).

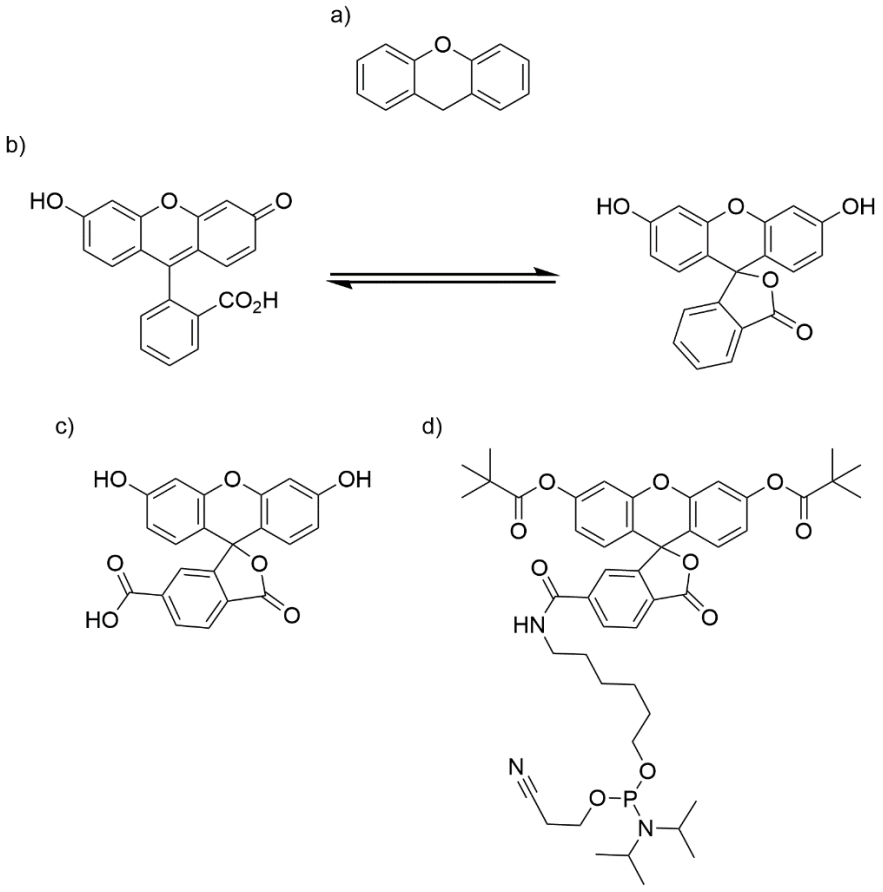


Figura 20. a) Molécula de xanteno. b) Equilibrio entre la forma abierta y la forma lactona de la fluoresceína. c) Molécula de 6-FAM. d) Molécula de la fosforamidita 6-FAM.

De entre los cuatro fluoróforos utilizados tradicionalmente en qPCR, FAM es el que presenta una mayor estabilidad fotoquímica[8].

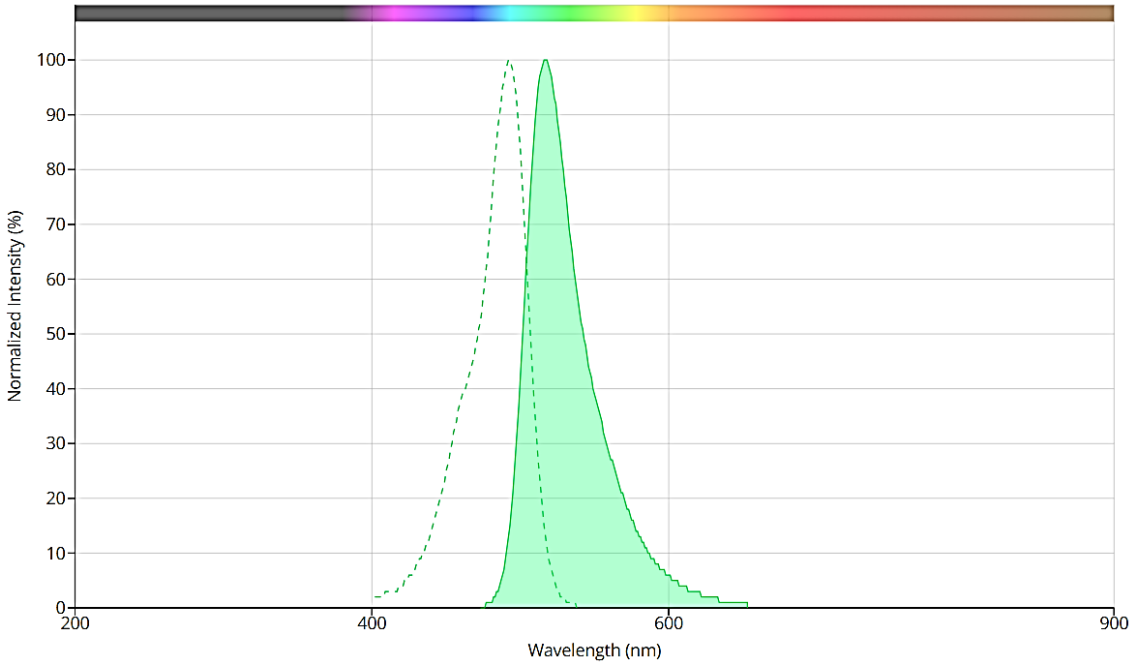


Figura 21. Espectro de absorción (línea de puntos verde sin relleno) y espectro de emisión (línea continua verde con relleno) de FAM. Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9].

FAM presenta un máximo de absorción a 493 nm y un máximo de emisión a 517 nm (Figura 21). Teniendo en cuenta el principio de solapamiento necesario para que se produzca el apantallamiento de la fluorescencia por efecto FRET, uno de los *quenchers* comerciales más usados en sondas de hidrólisis acompañando a este fluoróforo es el denominado *Black Hole Quencher 1* o BHQ1 (Figura 23).

BHQ1 pertenece a la familia de los *Black Hole Quenchers*. Se trata de una serie de moléculas capaces de apantallar la fluorescencia disipando la energía por un mecanismo no radiante. Por este motivo se les denomina de forma genérica *dark quenchers*. Este tipo de quenchers son muy valorados en ensayos de qPCR frente al uso de quenchers radiantes como TAMRA, porque con su uso se reduce notablemente la fluorescencia basal del crudo de reacción, se reduce la generación de falsos negativos en los ensayos y se evita la aparición del fenómeno *crosstalk* en reacciones *multiplex,* facilitando su diseño y optimización.

Los *Black Hole Quenchers* son una marca comercial desarrollada por *Biosearch Technologies*. Pertenecen al grupo de los colorantes azo, ya que su estructura presenta, en todos ellos, al menos un enlace azo, los cuales están directamente relacionados con su capacidad de absorción de la radiación visible. La estructura de los *Black Hole Quenchers* presenta un marcado momento dipolar debido a la distribución de grupos electrodadores y electroatractores en extremos opuestos de la molécula (Figura 22). Este momento dipolar va a ser fundamental para su interacción con los grupos fluoróforos mediante efecto FRET. Los *Black Hole Quenchers* presentan una adecuada robustez química, siendo los enlaces azo su punto más sensible. Notable es la isomerización fotoquímica reversible Z/E de estos enlaces, pero que no supone un impedimento para su función como quencher. Su robustez química los hace compatibles con las reacciones del ciclo de la síntesis de la amidita. Esto es particularmente importante porque los quenchers, al encontrarse en el extremo 3’ de la molécula se incorporan en las primeras etapas

de síntesis y deben soportar sin degradarse las condiciones de reacción de todos los ciclos de síntesis necesarios para la obtención del oligonucleótido.

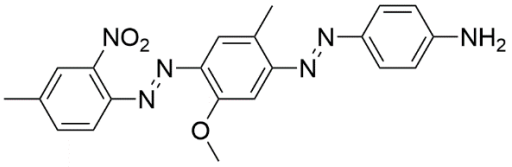


Figura 22. Estructura molecular de BHQ1.

BHQ1 presenta una intensa banda de absorción entre los 400 nm y los 600 nm, aproximadamente, con un máximo de absorción a 522 nm. Teniendo en cuenta el requisito de la superposición espectral entre el fluoróforo y el quencher, BHQ1 es un quencher óptimo para FAM, ya que tanto el máximo de emisión de éste (517 nm) como el máximo de absorción de aquél (522 nm) se encuentran muy cercanos, con una diferencia de 5 nm, y, por lo tanto, el solapamiento entre ambos espectros es muy extenso (Figura 23).

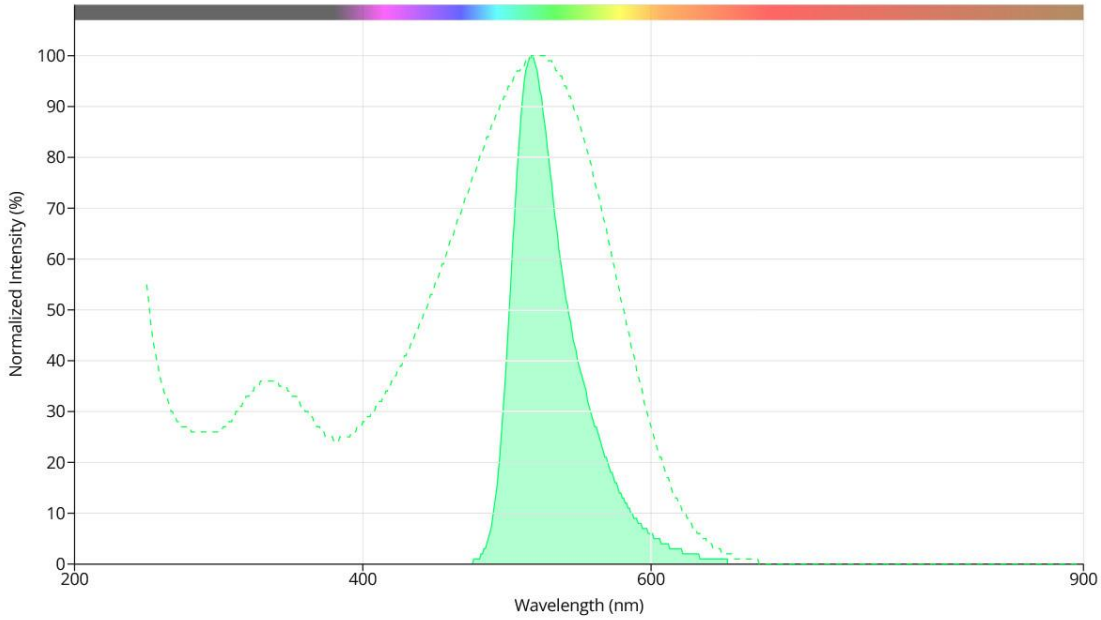


Figura 23. Superposición del espectro de absorción de BHQ1 (línea discontinua) con el espectro de emisión de FAM (línea continua rellena). Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9,10]

Una de las ventajas del amplio uso de BHQ1 como quencher de fluorescencia es que comercialmente es asequible tanto en la forma de fosforamidita como en la forma de CPG (Figura 24). Esta última es de especial interés, porque al estar ya acoplado al soporte sólido sobre el que se va a sintetizar el oligonucleótido se consigue evitar una de las etapas del ciclo de síntesis que suele tener un impacto más directo sobre la reducción del rendimiento global de la síntesis. En base a estas decisiones, se priorizó el uso del derivado de CPG de BHQ1.

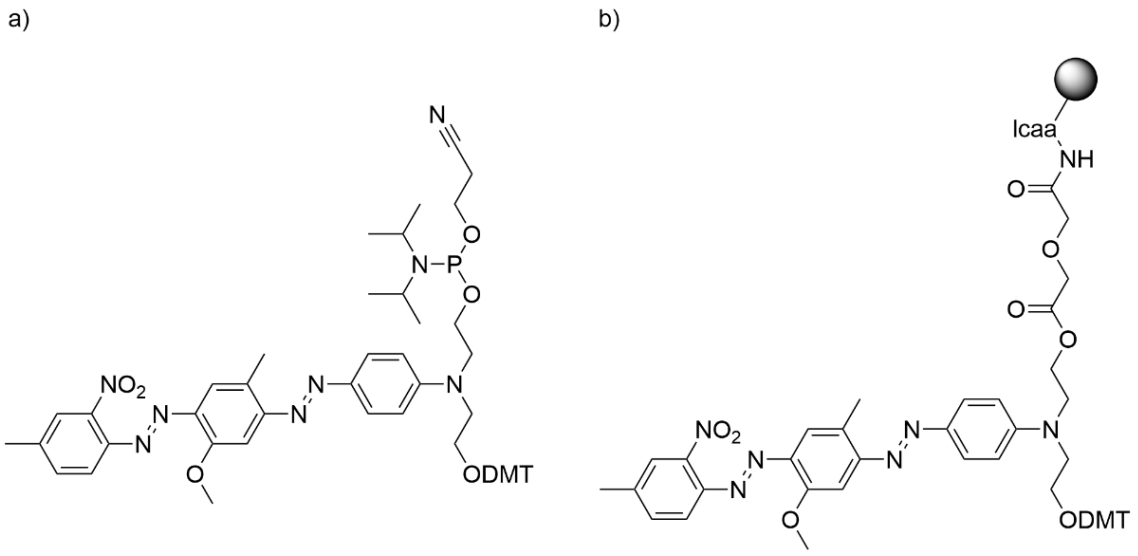


Figura 24. a) Estructura del derivado fosforamidita de BHQ1. b) Estructura del derivado CPG de BHQ1.

El método de la amidita es un método de síntesis de nucleótidos muy ampliamente extendido por las ventajas que aporta, como una mayor facilidad para la purificación de los productos después de cada etapa sintética. Sin embargo, presenta un importante inconveniente a la hora de llevar a cabo su optimización y es que al realizarse en fase sólida no es fácil llevar a cabo un análisis pormenorizado de cada etapa. Es por este motivo que, en este trabajo, la evaluación de las modificaciones introducidas en el método se realizó tras llevar a cabo la etapa de síntesis y la etapa de purificación. Es decir, se ha trabajado de forma conjunta en dos etapas en proceso de optimización . Cabe resaltar que, debido a la gran diversidad de combinaciones posibles en las secuencias de oligonucleótidos, los protocolos elaborados deben ser lo más generales posibles. Además, la experiencia adquirida durante el desarrollo del presente trabajo pone de manifiesto que cada una de las secuencias es única y que cada una de ellas requiere de una especial atención en distintas etapas del proceso de obtención.

La optimización de la producción de sondas FAM se comenzó por la etapa de síntesis. Para ello, se tomó como modelo inicial la secuencia YIA1-FAM ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***, que es una sonda de hidrólisis monoquencheada de características estándar, de una longitud de 24 nucleótidos y 66,7% GCs. Los reactivos (Tabla 3) y el método de síntesis (Sint.Met.1 Tabla 4) utilizados como punto de partida fueron aquellos desarrollados previamente en el laboratorio para la producción de primers ***(Referencia bibliográfica omitida por motivos de confidencialidad)***:

Tabla 3. Lista de reactivos en la síntesis optimizada de primers.

(Tabla omitida por motivos de confidencialidad)

Tabla 4. Detalles de las subrutinas del método Sint.Met.1.

Subrutina	Tiempo de reparto (s)	Tiempo de reacción (s)
Desbloqueo	XX[(a)]	XX[(a)]
Acoplamiento	XX[(a)]	XX[(a)]
Capado	XX[(a)]	XX[(a)]
Oxidación	XX[(a)]	XX[(a)]

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

La subrutina de desbloqueo usa el ácido tricloroacético (TCA) como reactivo de uso preferente para eliminar el grupo protector DMT, para así desproteger los grupos hidroxilo sobre los que van a reaccionar las fosforamiditas en etapas posteriores ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***.

En la subrutina de acoplamiento es necesario utilizar fosforamiditas de los correspondientes nucleótidos protegidos. Como punto de partida, se usaron aquellas que usaban los grupos bz, dmf y ac. Esta forma de trabajo permite que en el procedimiento posterior de digestión se puedan utilizar protocolos rápidos (*ultrafast)* ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***.

Los reactivos usados en las subrutinas de capado y de oxidación son los que se utilizan de forma habitual en la síntesis de oligonucleótidos[16].

La síntesis de los oligonucleótidos por el método de la amidita comienza por la elección del soporte sólido. Como se ha indicado previamente, se priorizó el uso de uno en el que el quencher que se va a utilizar se encuentra ya incorporado. ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***. Se evaluó el rendimiento total de la reacción en base a la intensidad de la absorbancia a 498 nm de la disolución resultante que contiene el catión tritilo, registrada por el equipo. El equipo realiza una comparación entre las absorbancias de los pasos, proporcionando un rendimiento cualitativo, pero no cuantitativo. De forma adicional, el equipo proporciona el valor V2, haciendo una comparativa de las absorbancias de los dos primeros pasos, que representa la fidelidad de la medida. Si el valor de V2 es mayor que 50, la diferencia en la desprotección entre ambos ciclos es tan alta que los valores de rendimiento proporcionados no pueden ser considerados veraces.

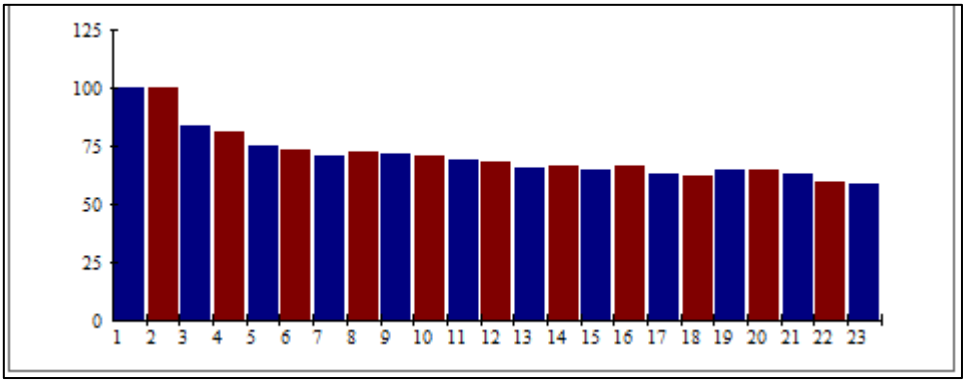


Figura 25. Gráfico resultado de los rendimientos de la primera síntesis de la sonda YIA1-FAM.

Es habitual que cada ciclo de síntesis del método de la amidita tenga un rendimiento del 99,5%. Para YIA1-FAM, un oligonucleótido con 24 nucleótidos supondría un rendimiento teórico máximo del 89%. Sin embargo, como se puede apreciar del registro del monitor de tritilo (Figura 25), para estas primeras condiciones el rendimiento total de la reacción fue inferior. ***(Información omitida por motivos de confidencialidad).*** Como alternativa, se creó una rutina nueva Sint.Met.2 en la que se modificaban los tiempos de reparto y de reacción de la subrutina de desbloqueo (Tabla 5).

Tabla 5. Comparativa entre los tiempos de reparto y reacción de la subrutina de desbloqueo entre Sint.Met.1 y Sint.Met.2.

(Tabla omitida por motivos de confidencialidad)

Se realizó una síntesis de YIA1-FAM utilizando este segundo método, Sint.Met.2, para introducir la primera base de la secuencia. El registro de tritilo mostró un rendimiento lo suficientemente bueno como para indicar que se estaba produciendo de forma cuantitativa y que era adecuado para continuar con la síntesis (Figura 26). ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***.

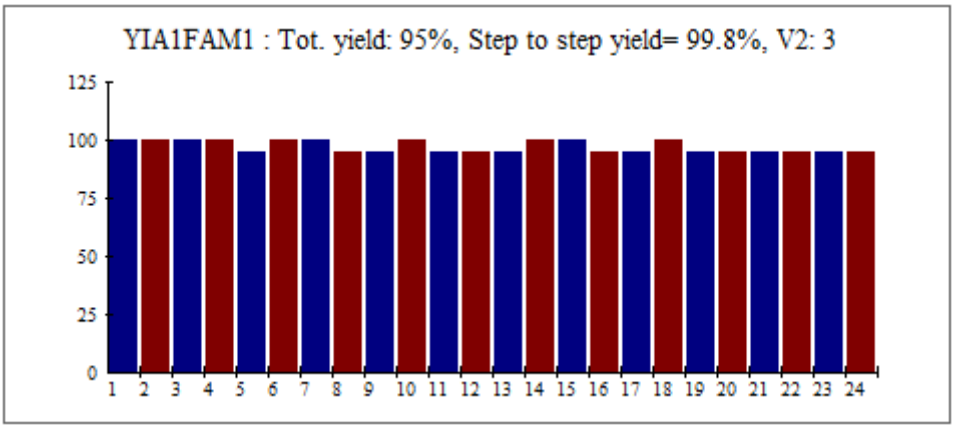


Figura 26. Gráfico resultado de los rendimientos de la primera síntesis de la sonda YIA1-FAM.

Una vez sintetizada la secuencia del oligonucleótido, se pasó a incorporar el fluoróforo. Para el acoplamiento de FAM, se disolvió la fosforamidita del fluoróforo en un volumen de acetonitrilo a una concentración recomendada por el proveedor ***(Referencia bibliográfica omitida por motivos de confidencialidad)***. Aparte, se creó una rutina nueva con el paso de acoplamiento modificado (Tabla 6 Sint.Met.3), con el tiempo de reacción indicado para todos los modificadores de secuencia y para quenchers y fluoróforos.

Tabla 6. Comparativa entre los tiempos de reparto y reacción de la subrutina de acoplamiento entre Sint.Met.1 y Sint.Met.3.

(Tabla omitida por motivos de confidencialidad)

Para poder comprobar si se había logrado sintetizar la secuencia completa, se tuvo que continuar con la digestión para que la sonda pudiera ser analizada por UPLC y masas. La muestra se digirió ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***. Estas condiciones eran ya utilizadas en el proceso de fabricación de primers desarrollado previamente en el laboratorio (Dig.Met.1) y que según la ***(Referencia bibliográfica omitida por motivos de confidencialidad)***. Se eligió esta opción porque este trabajo se enmarca dentro de un desarrollo industrial para la obtención de productos comerciales y las decisiones tomadas han estado influenciadas en gran medida por factores que afectan a la optimización del tiempo y de los recursos, como el tiempo de realización de cada uno de los subprocesos del protocolo, el coste/disponibilidad de los reactivos utilizados o dificultad de uso.

Una vez completada la digestión, se evaporó la mezcla para eliminar los reactivos de digestión y se disolvió para realizar el análisis del crudo (sin purificar por UPLC).

(Información omitida por motivos de confidencialidad)

El método usado para el análisis de unas primeras muestras fue un método ya desarrollado para el análisis de primers (PrimersUPLC) ***(Información y bibliografía omitida por motivos de***

confidencialidad) (Tabla 7). El último tramo del gradiente se reservó para el lavado y regeneración de la columna.

Tabla 7. Condiciones del método de análisis por UPLC PrimersUPLC. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

	Tramo	Minuto	%A	%B
Gradiente	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	10	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	20	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	22	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	23	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	24	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

Los cromatogramas obtenidos presentan un aspecto como el mostrado en la Figura 27 y en los que se puede apreciar tres zonas de elución bien diferenciadas. En el primer set de picos (tiempo de retención 0-3 minutos) se encuentran los reactivos en exceso y los subproductos obtenidos en los procesos de síntesis y digestión del oligonucleótido. Estos compuestos son, mayormente, moléculas orgánicas de baja masa molecular (en comparación con el oligonucleótido) que eluyen con el frente de la fase móvil y que apenas interaccionan con la fase estacionaria. De hecho, una ligera absorción a 493 nm denota la presencia de FAM libre en la muestra. Entre el minuto 6 y 8 se observa una señal que presenta absorción a 260 nm pero no a 493 nm, indicativo de la presencia de una secuencia de oligonucleótidos que no se ha unido al fluoróforo. Por último, se observa una serie de diferentes señales que presentan absorbancia tanto a 260 nm como a 493 nm entre los minutos 16 y 18, que se corresponden con la sonda completa. Los diferentes tiempos de retención observados para el oligonucleótido con y sin fluoróforo se corresponden con lo esperado porque el carácter hidrofóbico de *quenchers* y fluoróforos afecta notablemente a la retención del oligonucleótido en la columna[24,25].

La presencia de tantas señales entre los minutos 16 y 18 indica la degradación de una parte de la molécula, previsiblemente del *quencher* y/o del fluoróforo. La identificación de las diferentes especies del oligonucleótido con las correspondientes señales debía ser confirmadas por masas, sin embargo, la cercanía entre las señales supone un reto para el cálculo preciso de una masa única para cada señal.

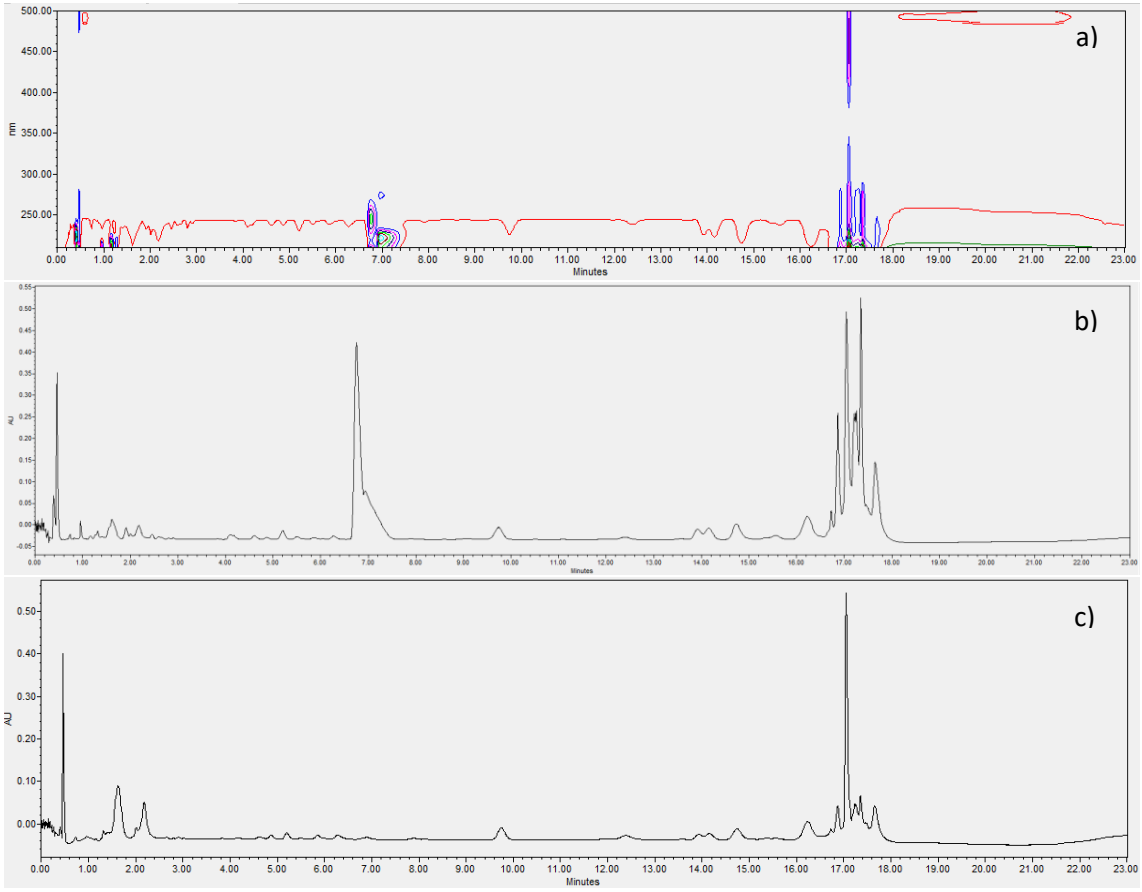


Figura 27. Cromatograma del análisis por UPLC del crudo de la sonda YIA1-FAM usando el método PrimersUPLC. a) Barrido 210-500 nm. b) Cromatograma 260 nm. c) Cromatograma 493 nm.

El siguiente punto que se optimizó fue el método de análisis por UPLC, con el objetivo de evitar el solapamiento de señales en el último tramo del cromatograma. Para ello, se partió del método ya existente para el análisis de primers (SondasFAMUPLC1) para crear uno nuevo. Como se muestra en la Tabla 8, se cambió el tramo del gradiente en el que aparecen los picos asociados a la sonda completa (tramo II) ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***, para lograr de esta forma una pendiente mucho más progresiva del gradiente que facilitara la separación.

*Tabla 8. Comparativa de los métodos de análisis por UPLC PrimersUPLC y SondasFAMUPLC1. %A: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. %B: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**.*

		PrimersUPLC			SondasFAMUPLC1		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	10	XX[(a)]	XX[(a)]	10	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	20	XX[(a)]	XX[(a)]	25	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	22	XX[(a)]	XX[(a)]	27	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	23	XX[(a)]	XX[(a)]	28	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	24	XX[(a)]	XX[(a)]	29	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

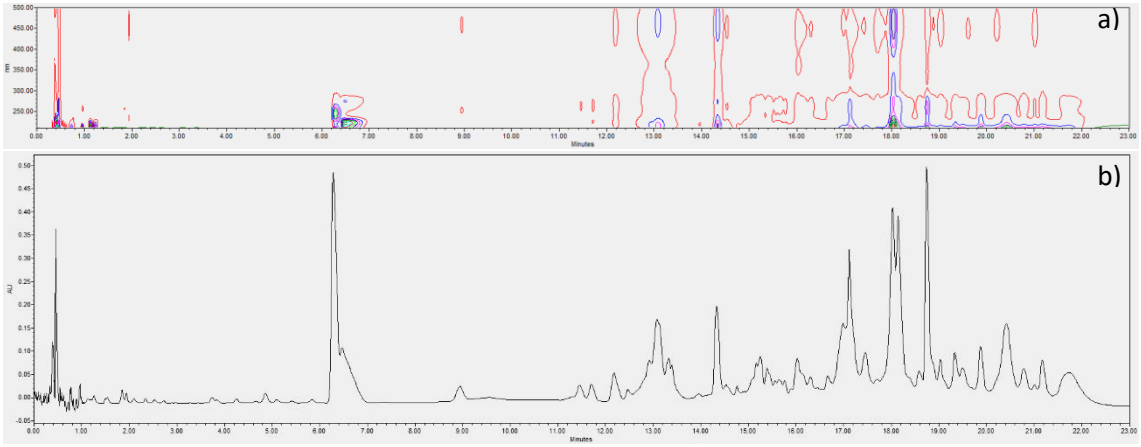


Figura 28. Cromatograma del análisis por UPLC del crudo de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMUPLC1. a) Barrido 210-500 nm. b) Cromatograma 260 nm.

El análisis por UPLC con el nuevo método permitió conseguir una mayor separación entre los picos cromatográficos, sin embargo, también aparecen una mayor cantidad de picos con absorbancias relativamente altas comparadas con los resultados anteriores (Figura 28). Para descartar la posibilidad de que se tratara de una acumulación de analito en la columna, se modificó de nuevo el método (SondasFAMUPLC2 Tabla 9), ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)*** y así arrastrar cualquier resto que se pudiera quedar retenido. Además, el primer tramo (tramo I) se modificó para hacer todavía más progresivo el gradiente en el siguiente tramo (tramo II). Por último, se modificó el volumen de inyección para no saturar la columna. El cromatograma resultante (Figura 29) muestra una reducción significativa de la absorbancia y una mayor definición de las señales. También se observa la reducción de la cantidad de señales presentes, lo que se atribuye a una mayor limpieza de la columna gracias a la etapa introducida de lavado con ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Por último, se observa también la modificación de los tiempos de retención de determinadas especies, como la asociada a la secuencia del oligonucleótido sin fluoróforo, que se retrasó 1 minuto. Este último cambio no fue un cambio significativo, ya que todavía se encontraba muy adelantado respecto al otro conjunto de señales.

*Tabla 9. Comparativa de los métodos de análisis por SondasFAMUPLC y SondasFAMUPLC2. %A: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. %B: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**.*

		SondasFAMUPLC1			**SondasFAMUPLC2**		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	10	XX[(a)]	XX[(a)]	8	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	25	XX[(a)]	XX[(a)]	25	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	27	XX[(a)]	XX[(a)]	27	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	28	XX[(a)]	XX[(a)]	28	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	29	XX[(a)]	XX[(a)]	29	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

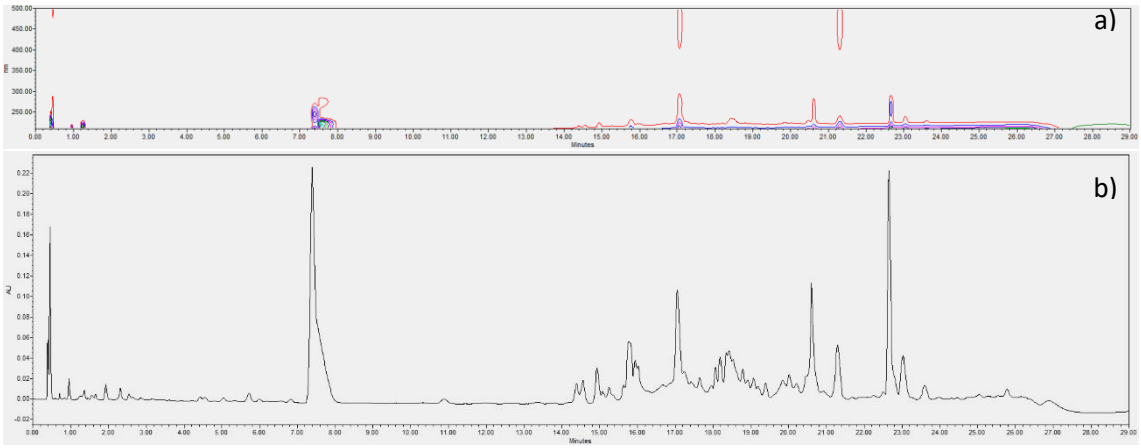


Figura 29. Cromatograma del análisis por UPLC del crudo de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMUPLC2. a) Barrido 210-500 nm. b) Cromatograma 260 nm.

El uso progresivo del método que incorpora el lavado con fase ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** hizo que fuera más frecuente el registro de cromatogramas que tenían una señal muy alta en el primer minuto del análisis junto con algunas otras residuales a tiempos de retención diferentes de los que se había observado anteriormente (Figura 30).

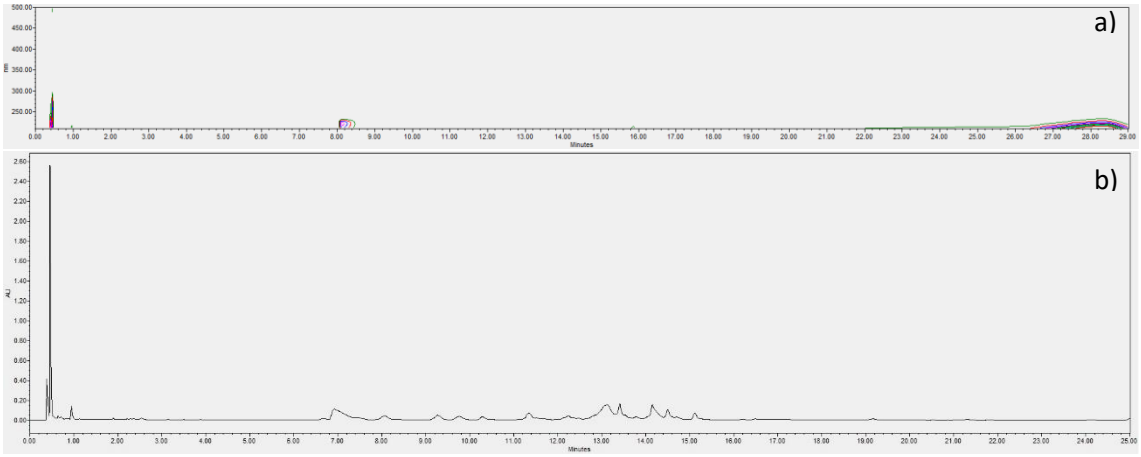


Figura 30. Cromatograma del análisis por UPLC del crudo de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMUPLC2 después de sucesivas inyecciones. a) Barrido 210-500 nm. b) Cromatograma 260 nm.

Este hecho observado puso de manifiesto la necesidad de introducir un tiempo de reequilibrado de la columna. ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***. Se realizaron los cálculos pertinentes (Ecuación 1):

(Ecuación omitida por motivos de confidencialidad)

(Información omitida por motivos de confidencialidad). Se decidió establecer un tiempo de equilibrado amplio (tramo VII). Por otro lado, para ajustar el tiempo del análisis y viendo que al disminuir la pendiente del gradiente no se producía una mejora significativa en la separación de las señales de la franja correspondiente a la sonda completa, se modificó la duración del tramo II (Tabla 10).

*Tabla 10. Comparativa de los métodos de análisis por SondasFAMUPLC, SondasFAMUPLC2 y SondasFAMUPLC3. %A: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. %B: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**.*

		SondasFAMUPLC1			**SondasFAMUPLC2**			**SondasFAMUPLC3**		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	10	XX[(a)]	XX[(a)]	8	XX[(a)]	XX[(a)]	8	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	25	XX[(a)]	XX[(a)]	25	XX[(a)]	XX[(a)]	21	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	27	XX[(a)]	XX[(a)]	27	XX[(a)]	XX[(a)]	23	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	28	XX[(a)]	XX[(a)]	28	XX[(a)]	XX[(a)]	24	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	29	XX[(a)]	XX[(a)]	29	XX[(a)]	XX[(a)]	25	XX[(a)]	XX[(a)]
	VII	-	XX[(a)]	XX[(a)]	-	XX[(a)]	XX[(a)]	35	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]			XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]			XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

El método desarrollado (SondasFAMUPLC3) se evaluó frente a una muestra de la sonda YIA1-FAM obtenida de un proveedor externo. El cromatograma obtenido (Figura 31 Ana.Met.1), registrando tanto a 260 nm como a 493 nm, muestra una única señal a unos 15 minutos. Este resultado revela la bondad de este método para determinar la pureza de sondas y, por lo tanto, se estableció como el método estándar para el análisis de este tipo de sondas.

Se realizó una última serie de inyecciones para comprobar la bondad del nuevo método con una muestra de la sonda YIA1-FAM de otro proveedor, observando un única señal registrada tanto a 260 como a 493 nm. SondasFAMUPLC3 se estableció como el método estándar para el análisis de este tipo de sonda.

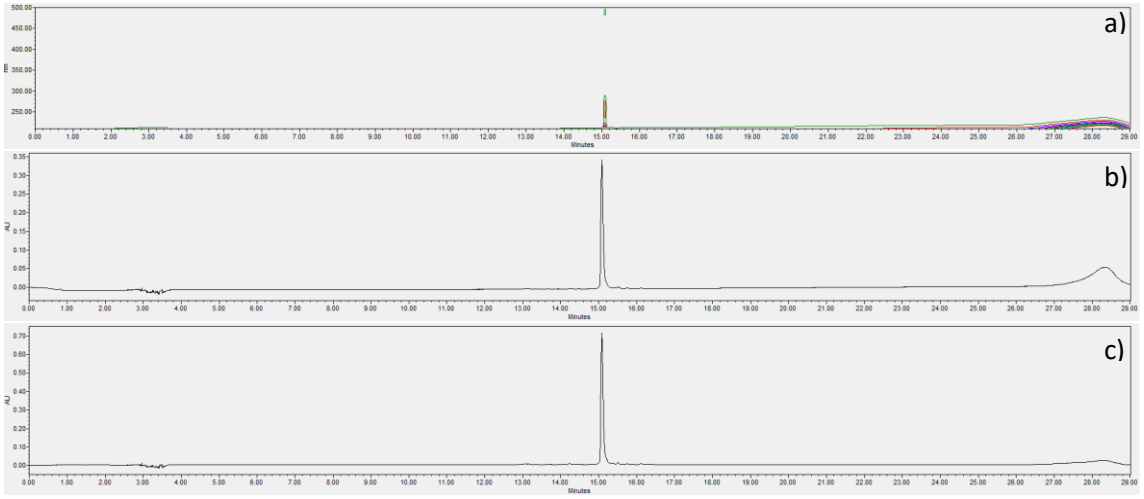


Figura 31. Cromatograma del análisis por UPLC de la muestra de YIA1-FAM usando el método SondasFAMUPLC3 (Ana.Met.1). a) Barrido 210-500 nm. b) Cromatograma 493 nm. c) Cromatograma a 260 nm.

Una vez acabado el proceso de optimización de análisis por UPLC de las sondas FAM, se trabajó en la optimización de la purificación por HPLC, siguiendo un flujo de trabajo similar. Para ello, se empezó purificando una muestra de YIA1-FAM utilizando el método ya desarrollado para primers (PrimersHPLC) ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. A este método se le añadió un tramo de equilibrado de la columna, en consideración a los resultados observados durante la optimización del método de purificación por UPLC y también para

ajustarlo a un tiempo de análisis de la misma duración (Tabla 11). Se analizó la absorbancia a 260 nm y la recogida de fracciones se hizo en base a la intensidad de los picos del cromatograma y de forma manual durante el proceso de optimización. Para este caso, debido a que las purificaciones requerían diferentes volúmenes de inyección de las muestras, se fueron haciendo nuevas síntesis para las sucesivas pruebas según la necesidad.

Tabla 11. Condiciones del método de purificación PrimersHPLC. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

		PrimersHPLC		
	Tramo	Minuto	%A	%B
Gradiente	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	1	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	6	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	25	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	27	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	35	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

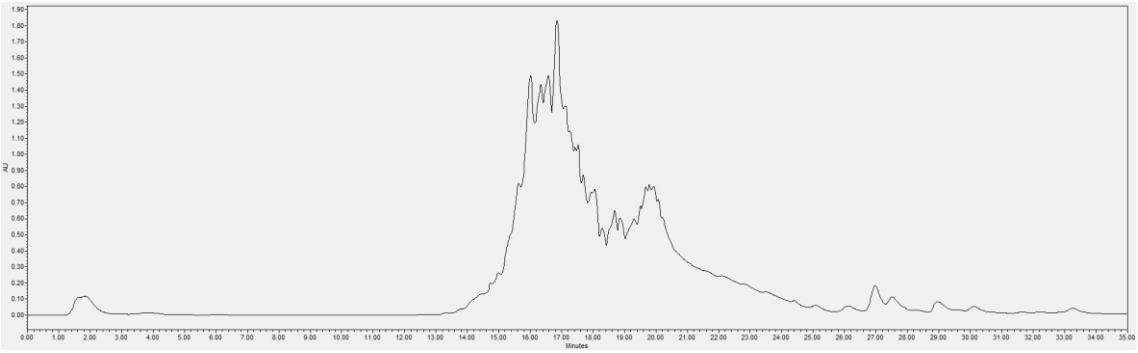


Figura 32. Cromatograma de la purificación por HPLC de la sonda YIA1-FAM usando el método PrimersHPLC.

Como se puede observar en el ejemplo de los cromatogramas resultantes (Figura 32), el método empleado inicialmente no era el adecuado. La aparición de un gran número de señales superpuestas indicaba que no existía una separación de los diferentes componentes de las muestras. No se llegaron a recopilar fracciones para su análisis por UPLC y masas.

Dado que prácticamente el total de los picos cromatográficos se registraron entre el minuto 14 y el 25, se modificó el método con una etapa de gradiente (tramo IV) ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Tabla 12).

Tabla 12. Comparativa de los métodos de purificación PrimersHPLC y SondasFAMHPLC1. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad).***

		PrimersHPLC			SondasFAMHPLC1		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	1	XX[(a)]	XX[(a)]	1	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	6	XX[(a)]	XX[(a)]	6	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	25	XX[(a)]	XX[(a)]	9	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	27	XX[(a)]	XX[(a)]	27	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	35	XX[(a)]	XX[(a)]	28	XX[(a)]	XX[(a)]
	VII	-	XX[(a)]	XX[(a)]	35	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

Otro posible factor causante del mal resultado de estas primeras purificaciones pudo ser el gran nivel de degradación que presentaba la sonda según los análisis por UPLC, lo que dificultaría en gran medida la purificación. Para solucionarlo, se hizo una nueva síntesis usando el mismo procedimiento, pero se modificó el protocolo de digestión que se aplicó. Como no se quería prescindir de la velocidad de la primera rutina (Dig.Met.1), se modificaron ligeramente las condiciones para que no fuera una digestión tan agresiva. De esta forma, se estudió la influencia de diferentes factores en los resultados, obteniéndose unas condiciones óptimas ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Todos estos cambios fueron incluidos en el nuevo protocolo (Dig.Met.2 Tabla 13). Para confirmar la integridad estructural de la sonda y de esta forma sirviera como muestra de optimización del protocolo de HPLC, se hizo un análisis UPLC del crudo (Figura 33).

Tabla 13. Comparativa de los métodos de digestión para sondas BHQ1/FAM, Dig.Met.1 y Dig.Met.2.

Método	Reactivos	Proporción	Tª (°C)	t
Dig.Met.1	X:X[(a)]	X:X[(a)]	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.2	X:X[(a)]	X:X[(a)]	XX[(a)]	XX[(a)]

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

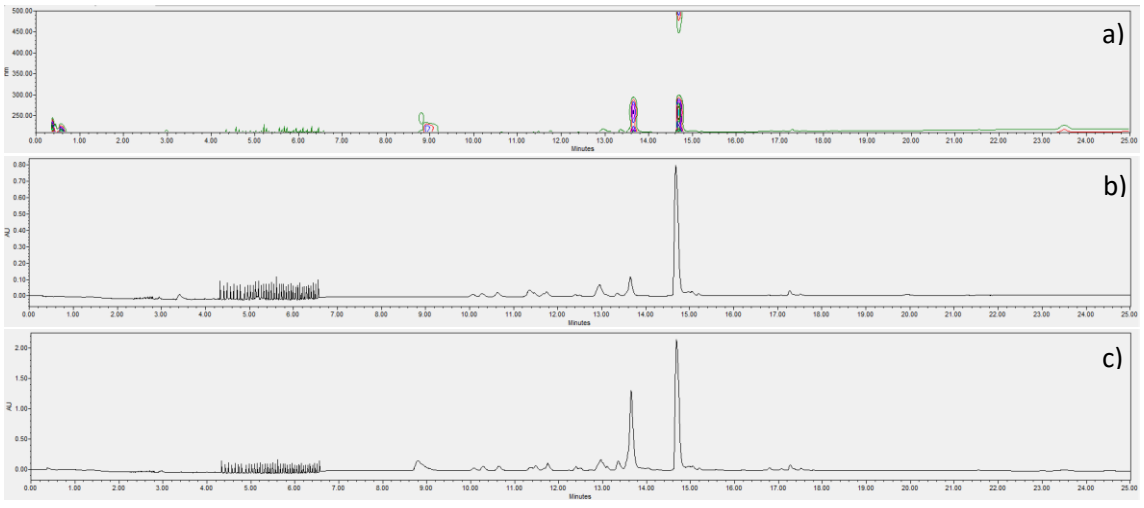


Figura 33. Cromatograma del análisis por UPLC de la nueva síntesis de YIA1-FAM. a) Barrido 210-500 nm. b) Cromatograma a 260 nm. c) Cromatograma a 493 nm.

En esta ocasión, el cromatograma reveló una muestra mucho más limpia, con dos señales cromatográficas principales, una con absorción a 493 nm indicativa de la presencia de FAM en la

sonda. Además, el tiempo de retención de esta señal, alrededor de 15 minutos, es muy similar al de la muestra del proveedor externo. La pequeña variabilidad observada se explica por la diferencia en el quencher utilizado.

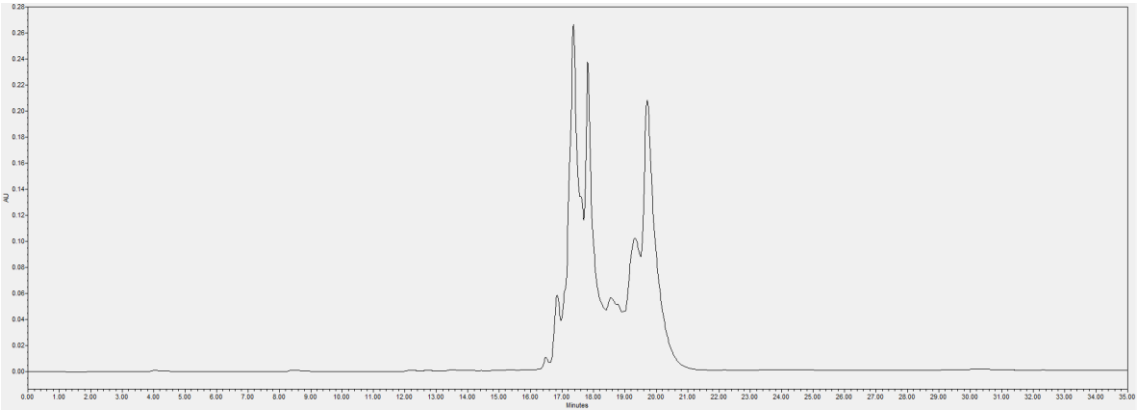


Figura 34. Cromatograma de la purificación por HPLC de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMHPLC1.

A continuación, se estudió el escalado para este nuevo método. Para ello, se inyectaron 100 µL de muestra de la nueva síntesis, para evitar saturar la columna. Con este segundo método, en sucesivos análisis, se observaron señales más definidas (Figura 35) que comparten tiempos de retención con las señales de los ensayos usando el método PrimersHPLC (Figura 32). Sin embargo, pese al gradiente tan progresivo establecido se siguen produciendo solapamientos entre picos. Como en todos los análisis sucesivos se veía este efecto, se achacó a que se producía un arrastre continuo de las diferentes especies del oligonucleótido de la muestra debido al caudal, ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. El uso de este nuevo método permitió una ligera separación entre dos grupos de señales cromatográficas (Figura 35).

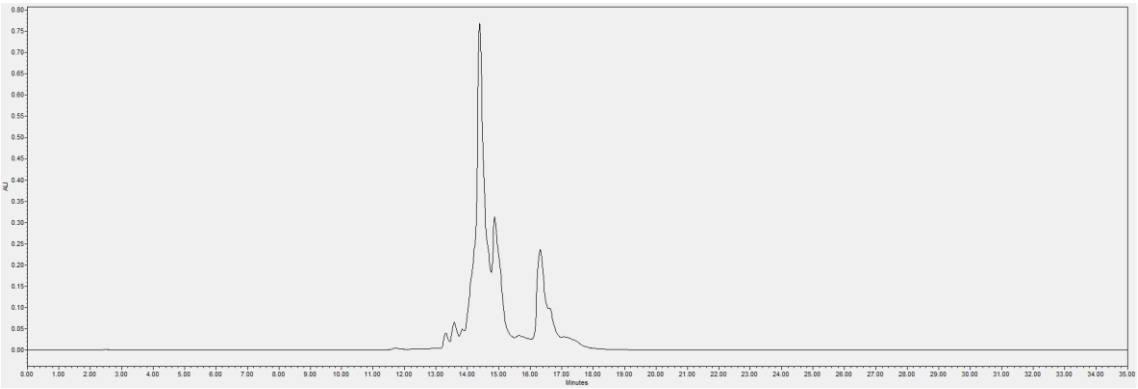


Figura 35. Cromatograma de la purificación por HPLC de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMHPLC2.

Aun habiendo conseguido una separación entre señales, todos los picos aparecían en un corto rango de tiempo de retención: minuto 16-21 con SondasFAMHPLC1 y minuto 13-18 con Sondas HPLC2. Es por ello que se decidió hacer un tercer método (Tabla 14 SondasFAMHPLC3) con el objetivo de aumentar la separación entre ellos. En este método se modificó el tiempo de análisis ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)*** y se trasladó el tiempo de equilibrado a una rutina independiente, por si este variara entre los diferentes tipos de sonda que se purificaran. Las medidas realizadas con estas modificaciones mostraron una separación similar entre los analitos de la muestra en comparación con los métodos anteriores.

Tabla 14. Comparativa de los métodos de purificación SondasFAMHPLC2 y SondasFAMHPLC3. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

		SondasFAMHPLC2			SondasFAMHPLC3		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	1	XX[(a)]	XX[(a)]	1	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	6	XX[(a)]	XX[(a)]	6	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	9	XX[(a)]	XX[(a)]	9	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	27	XX[(a)]	XX[(a)]	23	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	28	XX[(a)]	XX[(a)]	26	XX[(a)]	XX[(a)]
	VII	35	XX[(a)]	XX[(a)]	27	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

Teniendo en cuenta que el método SondasFAMHPLC3 fue el que permitió obtener una mejor separación del crudo de la síntesis, fue el elegido para continuar con la optimización de los parámetros del HPLC, denominado Pur.Met.1 a partir de ahora. Por último, se realizaron pruebas de escalado (volumen máximo de la muestra). En esta ocasión, sí que se recolectaron las fracciones correspondientes a los picos mayoritarios (Figura 36): YIA1-FAMF1 y YIA1-FAMF2. Se confirmó mediante análisis por UPLC de cada una de las dos fracciones que se había producido una separación entre el oligonucleótido sin y con el fluoróforo, viendo en ambos casos señales de alta absorbancia únicas, a tiempos de retención diferentes (Figura 37). YIA1-FAM2 también mostraba una señal a 493 nm indicando la presencia de FAM.

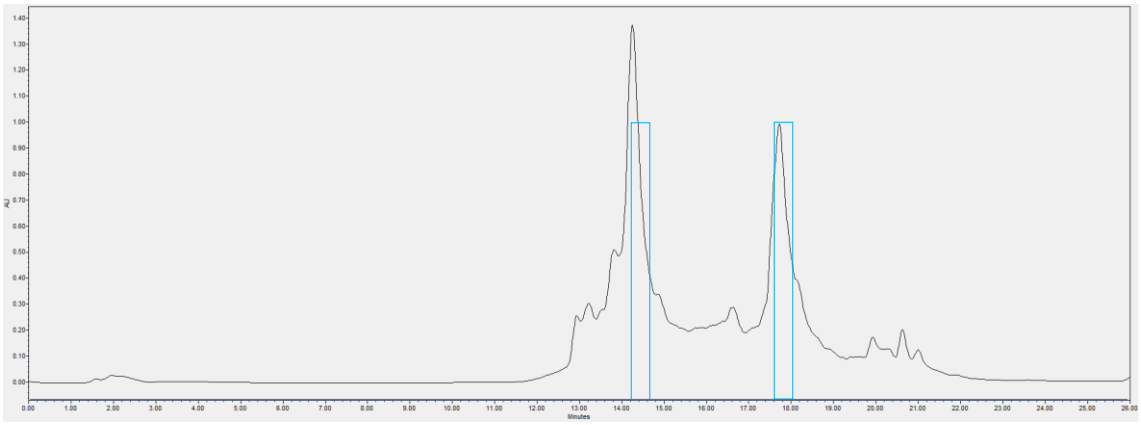


Figura 36. Cromatograma (línea negra) de la purificación por HPLC de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMHPLC3, inyectando volumen máximo de muestra. Se muestra la ventana de recolección de fracciones (línea azul) de YIA1-FAMF1 y YIA1-FAMF2 respectivamente.

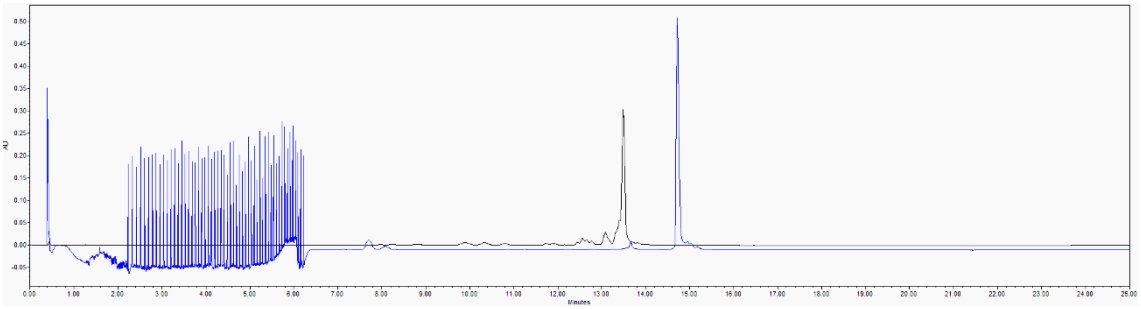


Figura 37. Análisis comparativo por UPLC de las fracciones YIA1-FAM1F1 (línea negra) y YIA1-FAMF2 (línea azul).

Al disponer de una fracción pura de cada uno de los dos compuestos principales de la purificación se procedió al análisis por espectrometría de masas. Esto permitió no sólo confirmar la identidad de las dos especies, si no poner a punto el método de análisis de masas. Siguiendo el mismo flujo de trabajo que en las dos ocasiones anteriores, se utilizó el método de análisis de masas previamente desarrollado para primers (Tabla 15).

Tabla 15. Condiciones del método de análisis de masas PrimerssMasas. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

		PrimersMasas		
	Tramo	Minuto	%A	%B
Gradiente	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	10	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	11	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	12	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	15	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

El método de elución usando en el análisis de masas proporcionó, en ambos casos, los picos correspondientes con los oligonucleótidos en los minutos finales del método como una señal muy débil que apenas se diferencia del ruido generado por el cambio de gradiente de fase (Figura 38). Aún con esta dificultad, se consiguió realizar la medida de dichas señales y se obtuvo una distribución de masas lo suficientemente clara en ambos casos. Dado que los oligonucleótidos analizados tienen una masa muy grande, para poder analizarlos se recurrió a fragmentarlos, medir la masa de estos fragmentos y calcular su masa por métodos de deconvolución. Los espectros de masas de YIA1-FAMF1 y YIA1-FAMF2 muestran, respectivamente, las masas de 3 (Figura 39):

- YIA1-FAMF1: 872 Da, 982 Da y 1122 Da.
- YIA1-FAMF2: 912 Da, 1049 Da y 1199 Da.

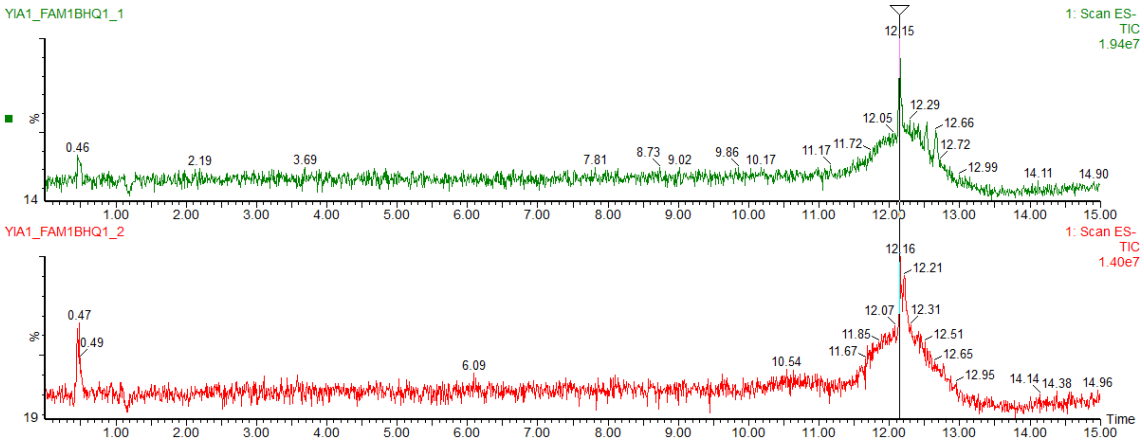


Figura 38. Cromatograma del análisis de masas de YIA1-FAMF1 (verde) y YIA1-FAMF2 (rojo).

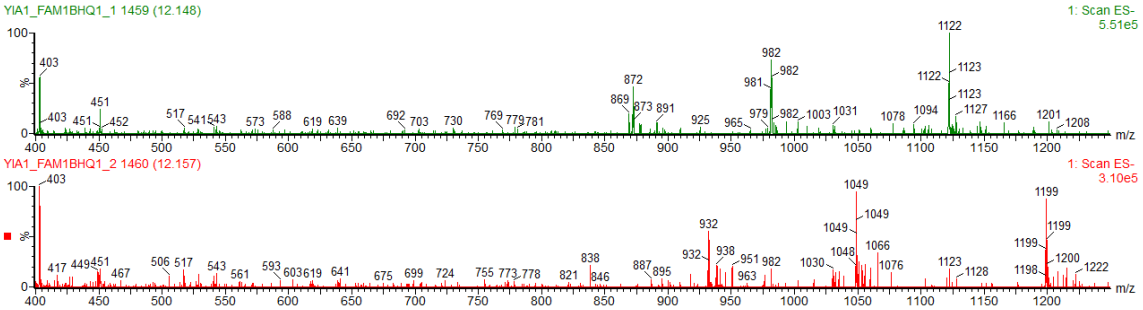


Figura 39. Espectros de masas de YIA1-FAMF1 (verde) y YIA1-FAMF2 (rojo).

La deconvolución de los espectros de masas se realizó con ayuda del software *MassLynx*. Los resultados obtenidos muestran una muy buena correspondencia entre la masa calculada para las sondas sintetizadas y la medida experimentalmente (Tabla 16):

Tabla 16. Comparativa de los elementos de la sonda, masa molecular teórica y masa molecular experimental calculada por la deconvolución de YIA1-FAMF1 y YIA1-FAMF2.

YIA1-FAMF1	**YIA1-FAMF2**
Elementos de la sonda	
Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad	***Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad***
Masa molecular teórica	
7305,8 + 554,17 = 7859,97 ***Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad***	537,5 + 7305,8 + 554,17 = 8397,47 ***Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad***
Masa molecular experimental calculada	
7862 (Figura 40)	8399 (Figura 41)

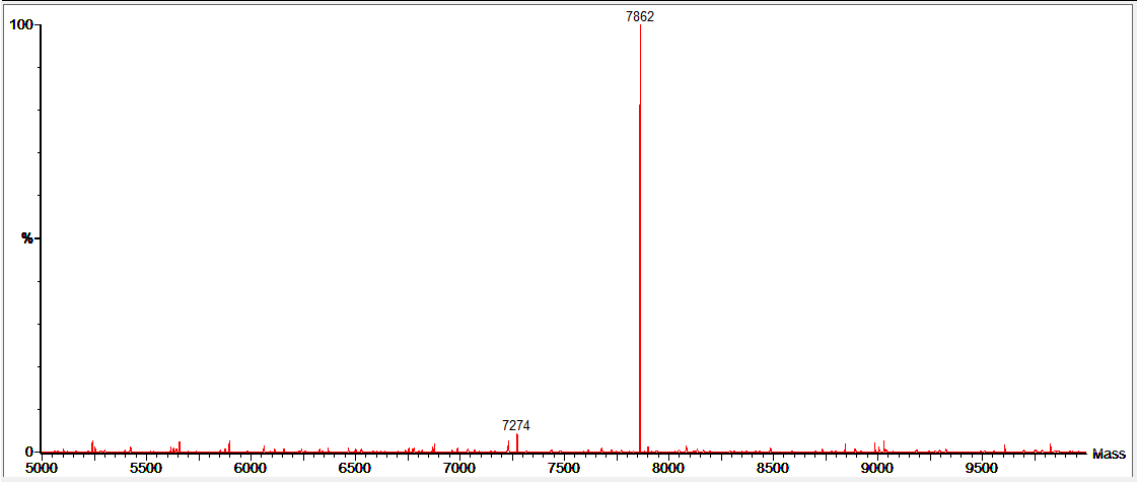


Figura 40. Masa de YIA1-FAMF1 calculada por deconvolución.

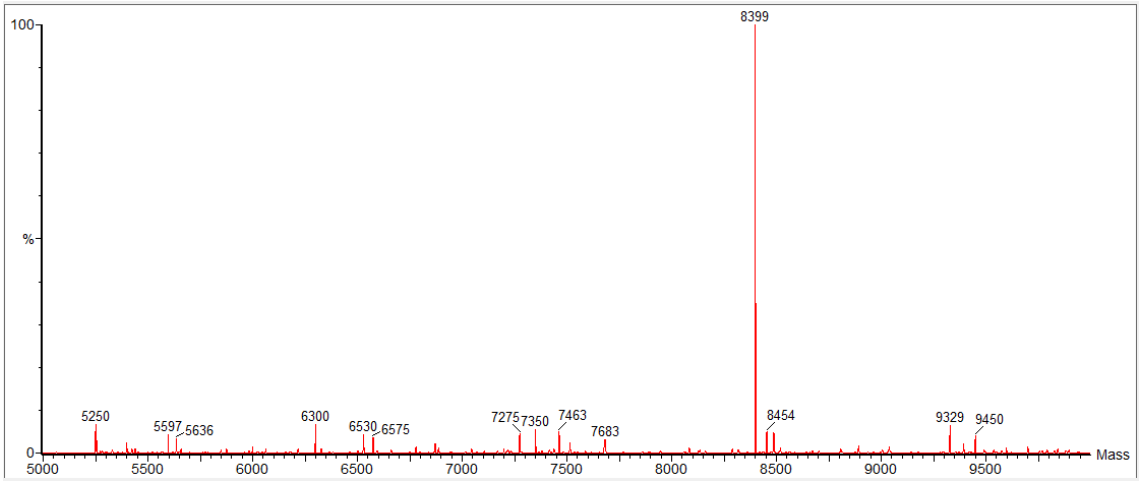
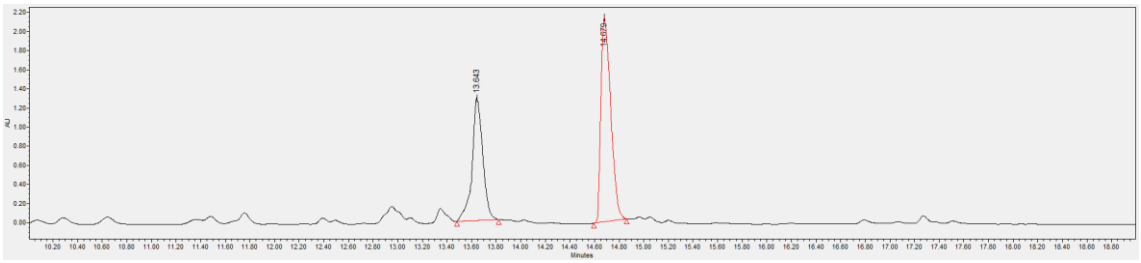


Figura 41. Masa de YIA1-FAMF2 calculada por deconvolución.

Finalmente, se cuantificó la cantidad de sonda obtenida. Para ello, se trabajó con un método de cuantificación indirecta a través del cálculo de concentraciones por espectrofotometría UV (ver **Sección Experimental**). De esta forma, se obtuvo que la fracción pura de YIA1-FAMF1 con un rendimiento global insuficiente.

Este resultado, pese a ser muy bajo, permitió comprobar que la síntesis de sondas era factible, aunque era necesario hacer mejoras en los métodos de síntesis, digestión y purificación. Entre los factores a los que se achaca este bajo rendimiento y que era necesario mejorar se encontraban el alto porcentaje de oligonucleótido que no incorporó FAM durante la fase de acoplamiento del fluoróforo en la síntesis de la sonda (aproximadamente un 40% según el área bajo la curva del análisis del crudo de la última síntesis de YIA1-FAM, Figura 42).



	Name	Retention Time (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1		13.643	7729670	39.59	1280004	bb			Unknown	
2		14.679	11795601	60.41	2131394	bb			Unknown	

Figura 42. Relación de áreas entre los picos cromatográficos de la sonda YIA1-FAM sin FAM (min. 13,64) y con FAM (min. 14,679).

Para mejorar el acoplamiento de FAM, la respuesta más inmediata fue desplazar la reacción hacia la formación de los productos. ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Se realizó una nueva síntesis de la sonda CMV2-FAM ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, otra sonda de hidrólisis monoquencheada de longitud de 28 nucleótidos y 53,6% GCs, con una masa molecular de 9478,17 Da. La síntesis de la cadena de oligonucleótidos se hizo como en anteriores ocasiones y se obtuvo un rendimiento esperado para la longitud del oligonucleótido (Figura 43). Para el acoplamiento de FAM se modificó la concentración de fosforamidita y de Activator 42®.***(Información y bibliografía omitida por***

motivos de confidencialidad). Se continuó con el protocolo de digestión Dig.Met.2 y se le hizo un análisis por UPLC al crudo con el método Ana.Met.1.

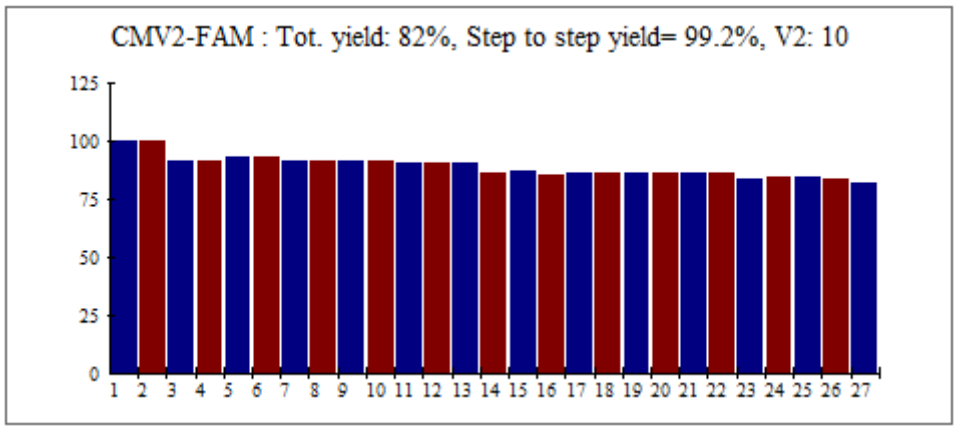
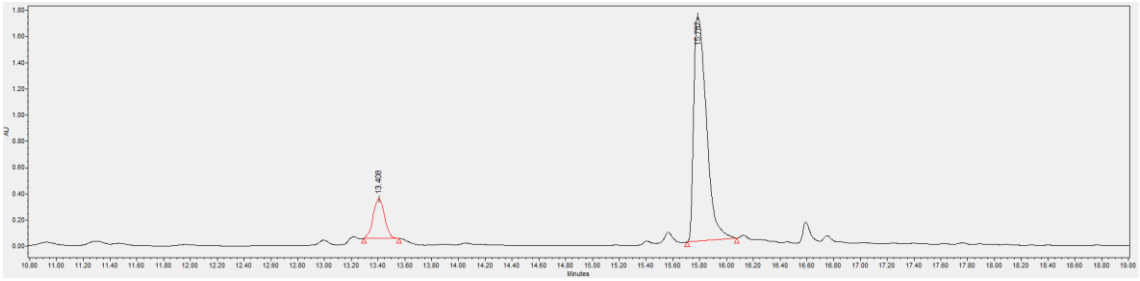


Figura 43. Gráfico resultado de los rendimientos de la primera síntesis de la sonda CMV2-FAM.



	Name	Retention Time (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1		13.408	1759590	13.48	299061	bb			Unknown	
2		15.787	11295027	86.52	1710164	bb			Unknown	

Figura 44. Relación de áreas entre los picos cromatográficos de la sonda CMV2-FAM sin FAM (min. 13,408) y con FAM (min. 15,787).

Se observó en el cromatograma (Figura 44) que los tiempos de retención de ambos oligonucleótidos (sin y con FAM) en las dos sondas sintetizadas fueron muy similares 13,643 min y 14,679 min para YIA1-FAM y 13,408 min y 15,787 min para CMV2-FAM respectivamente. Como se observará posteriormente, este patrón en los tiempos de retención se repetirá para el resto de las sondas sintetizadas. Además, se mejoró el porcentaje de sonda completa hasta un 86%. Se siguió con el protocolo de purificación Pur.Met.1 inyectando el volumen completo redisuelto de la muestra. La separación entre picos cromatográficos se conservó y se obtuvo una señal mucho más intensa correspondiente a la sonda completa (Figura 45). Los análisis por UPLC confirmaron la pureza de las fracciones recogidas, apareciendo un único pico en el cromatograma (Figura 46) de absorbancia variable entre fracciones dependiendo de la cantidad de oligonucleótido en cada una.

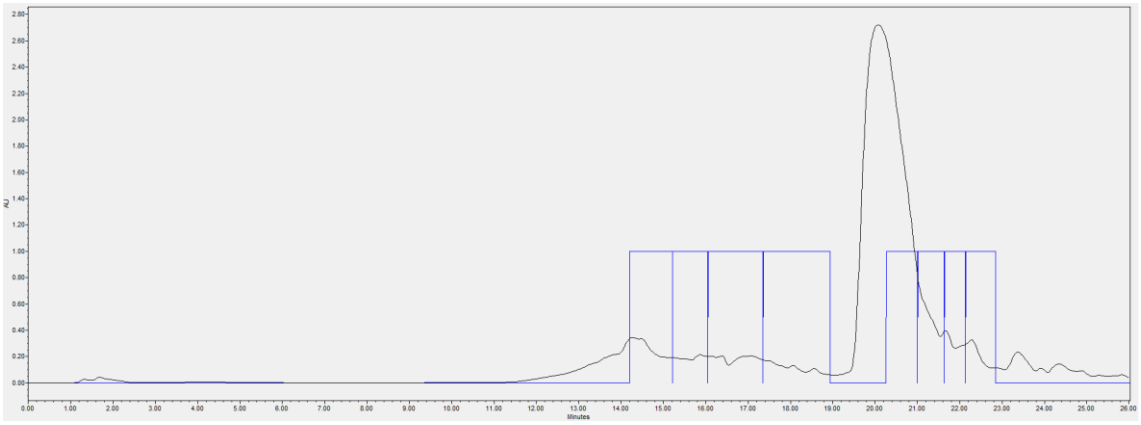


Figura 45. Cromatograma (línea negra) de la purificación por HPLC de la sonda YIA1-FAM usando el método SondasFAMHPLC3, inyectando volumen máximo de muestra. Se muestra la ventana de recolección de fracciones (línea azul).

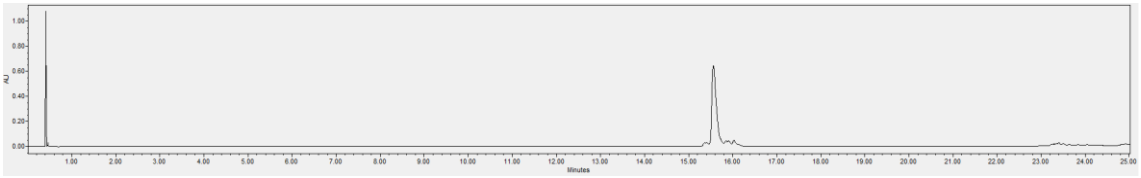


Figura 46. Cromatograma del análisis por UPLC de una de las fracciones de la purificación de CMV2-FAM.

Por último, se hizo el análisis de masas para verificar la identidad de la sonda (Figura 47). La masa obtenida tras la deconvolución fue de 9511 Da, muy próxima a la masa teórica calculada de la sonda de 9478,17 Da, supone una desviación del 0,35% que se considera que puede estar dentro del error experimental. Por lo tanto, se dio como buena la obtención de la sonda objetivo.

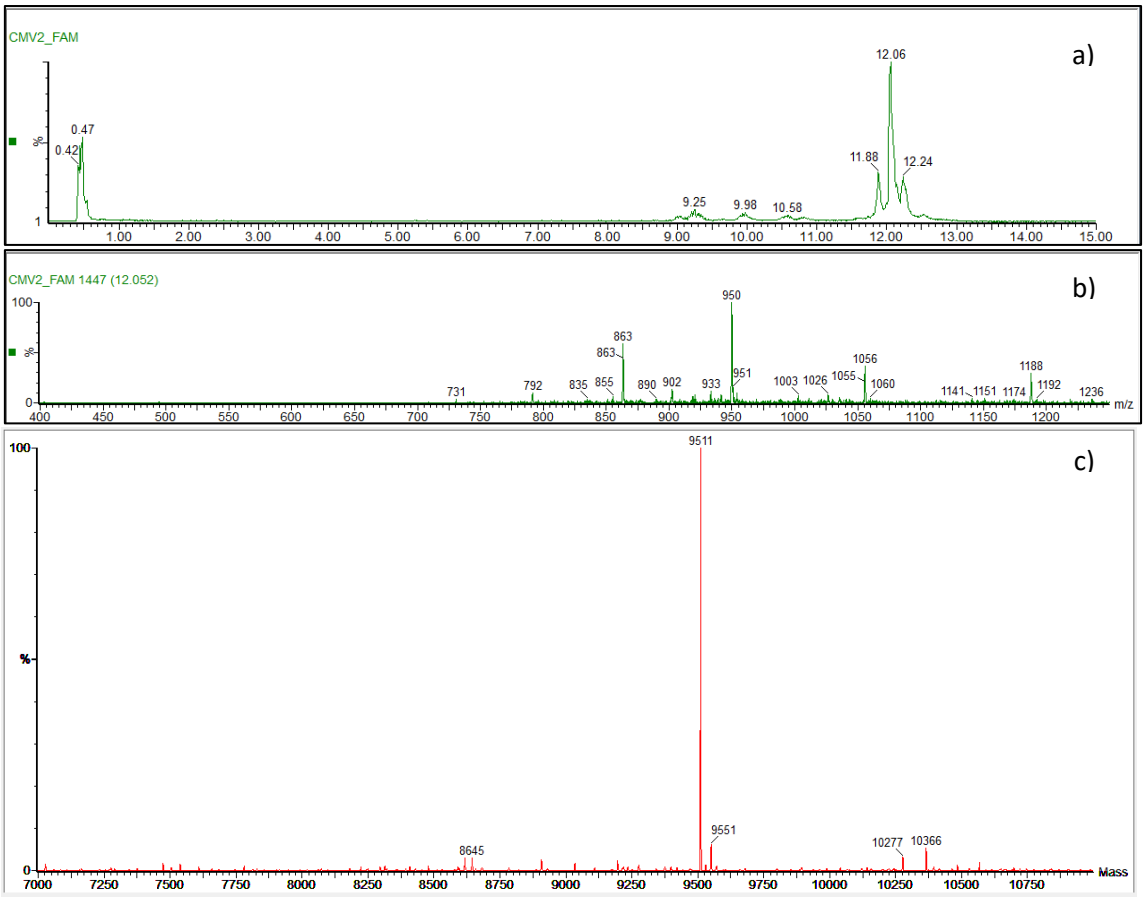


Figura 47. Análisis de masas de la sonda CMV2-FAM. a) Cromatograma. b) Espectro de masas. c) Masa deconvolucionada.

Sin embargo, se observó que el pico cromatográfico de la sonda aparecía de nuevo en el alrededor del minuto 12, correspondiente con el cambio de gradiente (tramo IV→V). Con CMV1-FAM no hubo problema porque la señal era lo suficientemente intensa para obtener un espectro con señales definidas que permitiera hacer la deconvolución, pero con YIA1-FAM se vio que este análisis podría verse comprometido. Para solucionar el problema se modificó el método de elución del análisis de masas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** en el tramo II para asegurar la elución de la sonda analizada (Tabla 17).

*Tabla 17. Comparativa de los métodos de análisis de masas PrimersMasas y SondasFAMMasas. %A: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. %B: porcentaje de la fase móvil **(información omitida por motivos de confidencialidad)**.*

		PrimersMasas			**SondasFAMMasas**		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	10	XX[(a)]	XX[(a)]	5	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	11	XX[(a)]	XX[(a)]	10	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	12	XX[(a)]	XX[(a)]	12	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	15	XX[(a)]	XX[(a)]	15	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

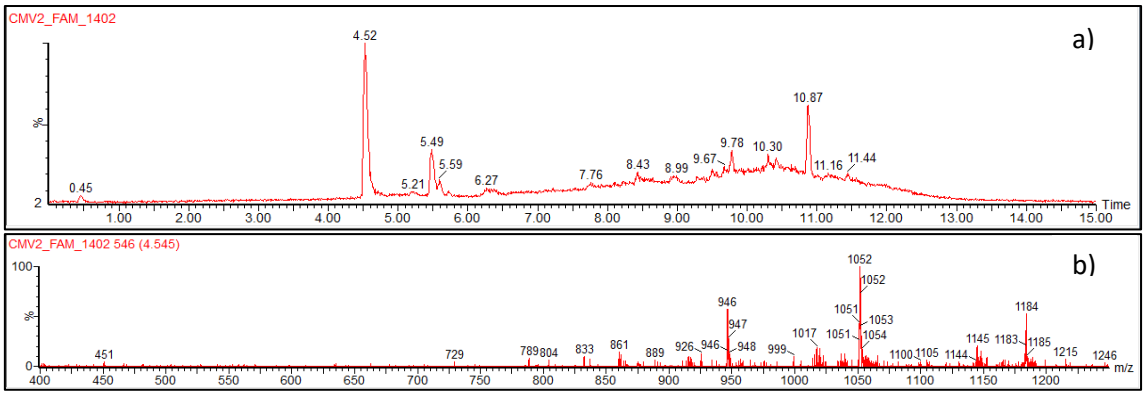


Figura 48. Análisis de masas de la sonda CMV2-FAM con el método SondasFAMMasas. a) Cromatograma. b) Espectro.

Como se puede observar en la Figura 48, hubo una gran diferencia entre los cromatogramas de los dos métodos desarrollados. En este último análisis, el espectro de masas correspondiente a la sonda CMV2-FAM generaba una señal en el minuto 4,52. Pese a verse un mayor número de picos, su análisis posterior concluyó que se trataba de artefactos sin una masa que se pudiera asociar a ningún defecto en la sonda estudiada ni a sus componentes.

Por último, se mezclaron todas las fracciones recogidas y puras y se cuantificó la cantidad de sonda obtenida. El rendimiento total del proceso fue ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)*** mayor que el logrado para YIA1-FAM, evidenciando una mejora del proceso de acoplamiento del fluoróforo. Con este último punto se finalizó la optimización del protocolo de síntesis, purificación y análisis de sondas FAM (Tabla 18).

Tabla 18. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas FAM con BHQ1.

Proceso		Método
Síntesis	Primera base	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos	Sint.Met.1
	Fluoróforo	Sint.Met.3
Digestión		Dig.Met.2
HPLC		Pur.Met.1
UPLC		Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1

El flujo de trabajo seguido para la optimización de este proceso se repitió para todo el resto de las modificaciones que se introdujeron después, incluyendo el uso de otros fluoróforos, el uso de otros quenchers para el mismo fluoróforo y la introducción de nuevas estructuras o bases modificadas, por lo que no se entrará en detalle de su desarrollo y sólo se comentarán los cambios significativos.

Pese a las ventajas que pudiera presentar BHQ1 como quencher, su gran inconveniente es que es un producto protegido bajo patente[28]. Aunque el uso de BHQ1 ha permitido el desarrollo de una metodología para la obtención de numerosas sondas, también condiciona la capacidad de comercialización de las mismas. Es por este motivo que, dentro del programa de I+D+i de la empresa se encuentra el del desarrollo de nuevos quenchers de fluorescencia de diseño propio. Dentro de este contexto se describió la síntesis de un quencher tipo azo que se denominó CBQX, en base a la denominación de "*Certest Biotec Quencher*".

El desarrollo de CBQX coincide temporalmente con el estallido de la pandemia provocada por el COVID-19. Este hecho, de repercusiones globales, afectó especialmente a las necesidades productivas de la empresa en la que se ha desarrollado el presente trabajo. En concreto, dada la actividad económica de Certest Biotec, tuvo lugar un aumento en la producción de sondas para la fabricación de test de qPCR. Por otro lado, la situación de confinamiento y bloqueo mundial supuso un acceso más difícil a los recursos y materias primas, dificultando la obtención de los reactivos necesarios para la fabricación de dichos test. Esto afectó especialmente a los *quenchers*, entre los que se encontraba BHQ1. Afortunadamente, el reciente desarrollo de CBQX permitió sortear estas dificultades y sustituir BHQ1 por el quencher de fabricación propia CBQX.

(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad). Se trata también de un quencher de fluorescencia no radiante, con una intensa banda de absorción entre los 400 nm y los 600 nm, aproximadamente, con un máximo de absorción a 505 nm (Figura 49). Este desplazamiento respecto del máximo de absorción de BHQ1 no supone ningún obstáculo en el *quencheo* de la fluorescencia ya que la superposición espectral entre FAM y CBQX es también muy extensa.

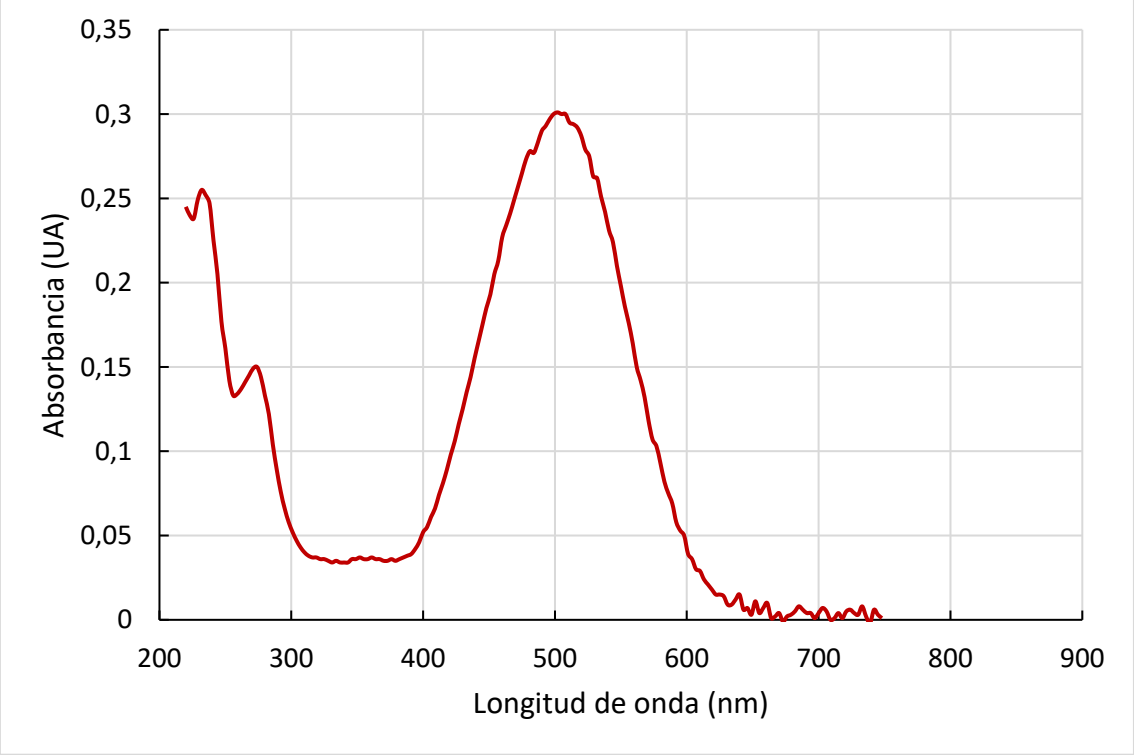


Figura 49. Espectro de absorción de CBQX (en acetonitrilo).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 50. a) Estructura molecular de CBQX. b) Estructura molecular del derivado fosforamidita de CBQX.

Para CBQX sólo se tiene disponibilidad del derivado fosforamidita y no del derivado unido a CPG (Figura 50). Este hecho hace que para que se pueda iniciar la síntesis del oligonucleótido se tenga que incorporar una etapa adicional en el ciclo sintético ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. El objetivo de esta etapa es que el CBQX pueda unirse al CPG, que actúa como soporte sólido de la síntesis y a partir del cual crece el resto del oligonucleótido. Este cambio supone una ligera modificación de la secuencia de métodos durante la síntesis y para el

que hubo que diseñar un nuevo método Sint.Met.4. ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Tabla 19). El resto de las condiciones de reacción se mantuvieron igual ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***.

Tabla 19. Detalles de las subrutinas del método Sint.Met.4.

Subrutina	Tiempo de reparto (s)	Tiempo de reacción (s)
Desbloqueo	XX[(a)]	XX[(a)]
Acoplamiento	XX[(a)]	XX[(a)]
Capado	XX[(a)]	XX[(a)]
Oxidación	XX[(a)]	XX[(a)]

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

Se estudiaron las condiciones de síntesis, digestión y purificación desarrolladas para BHQ1 y los resultados obtenidos indicaron que ambos quenchers son intercambiables sin que se observen diferencias significativas ni en rendimiento de la síntesis de las sondas ni en el quencheo de la fluorescencia de FAM. Por lo tanto, en muchos casos se usa de forma indistinta BHQ1 y CBQX, según la disponibilidad de los mismos. El protocolo final para la síntesis de sondas FAM con CBQX se resume en la Tabla 20.

Tabla 20. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas FAM con CBQX.

Proceso		Método
Síntesis	Quencher	Sint.Met.4
	Primera base	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos	Sint.Met.1
	Fluoróforo	Sint.Met.3
Digestión		Dig.Met.2
HPLC		Pur.Met.1
UPLC		Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1

II.1.2. HEX

La 6-hexaclorofluoresceína, más conocida como HEX, es otro de los fluoróforos derivados de la fluoresceína de uso habitual en aplicaciones de qPCR. Tiene una estructura molecular muy similar a FAM, a la que se han incorporado 6 átomos de cloro en los anillos aromáticos de la molécula (Figura 51a). La introducción de sustituyentes electroatractores en los anillos aromáticos respecto de FAM supone una modificación de los niveles energéticos, disminuyendo la energía entre el HOMO y el LUMO, y, por lo tanto, aumentando la longitud de onda de la fluorescencia emitida.

HEX posee una estructura rígida y plana formada por tres ciclos fusionados. Las características de su estructura le confieren una fluorescencia con unos valores muy altos de coeficiente de extinción molar (90000 $cm^{-1}M^{-1}$) y de rendimiento cuántico (0,7)[29]. Presenta un máximo de absorción a 533 nm y un máximo de emisión a 559 nm (Figura 52).

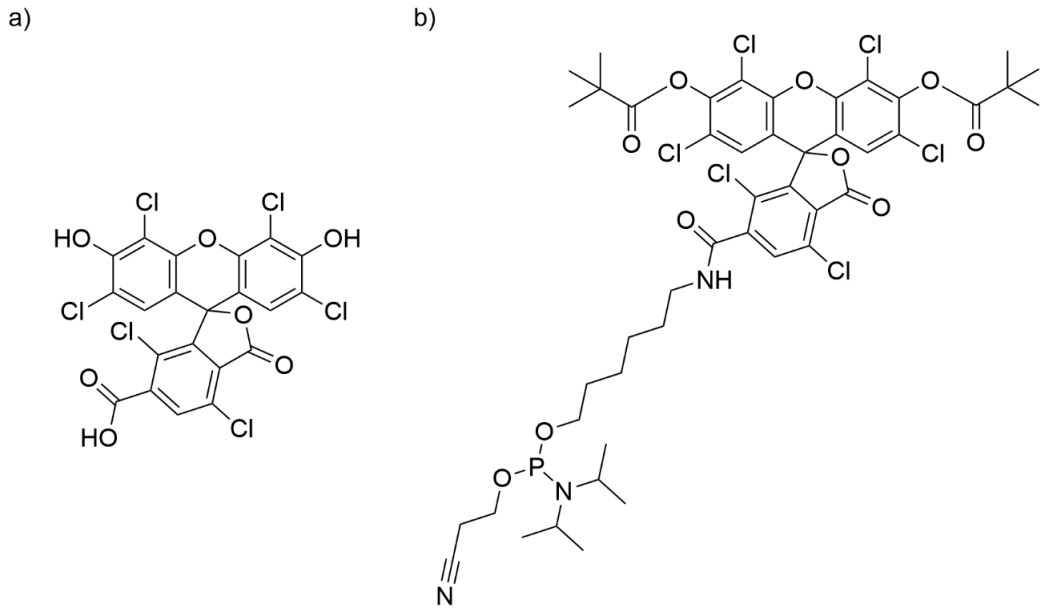


Figura 51. a) Estructura molecular de HEX. b) Estructura molecular del derivado fosforamidita de HEX.

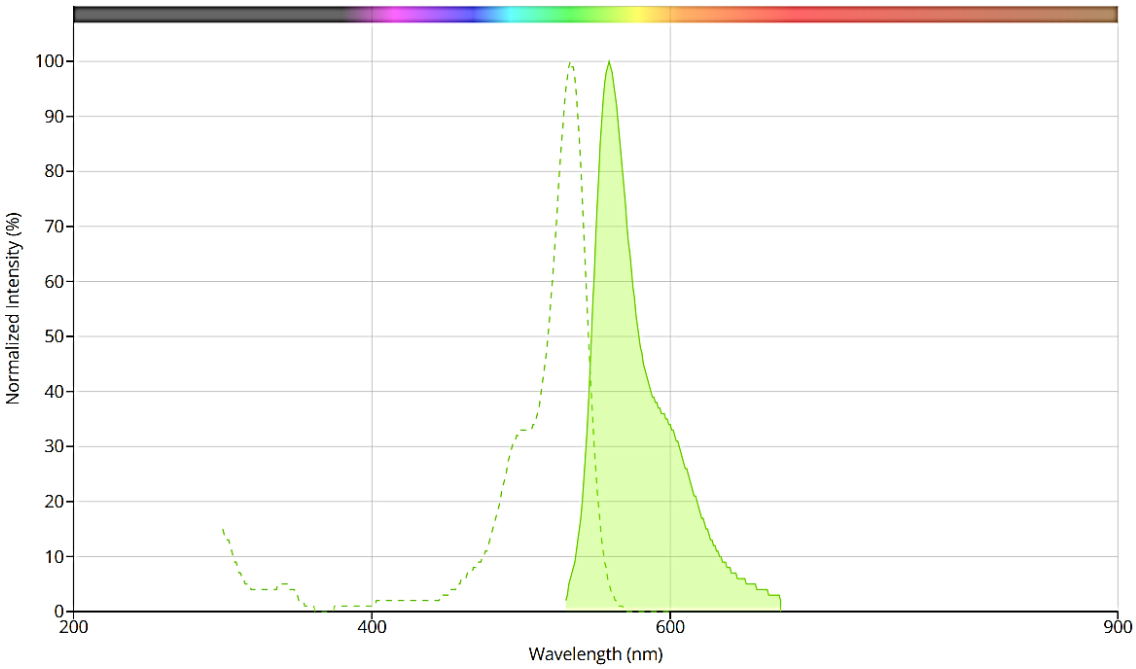


Figura 52. Espectro de absorción (línea de puntos verde sin relleno) y espectro de emisión (línea continua verde con relleno) de HEX. Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9]

Teniendo en cuenta el principio de solapamiento necesario para que se produzca el apantallamiento de la fluorescencia por efecto FRET, se dispone de varios *quenchers* para apantallar la fluorescencia de HEX. Tanto BHQ1 como CBQX cumplen con la condición de solapamiento entre las bandas de emisión del fluoróforo y de absorción del quencher. Sin embargo, este solapamiento es mayor en el caso del BHQ2 (Figura 53).

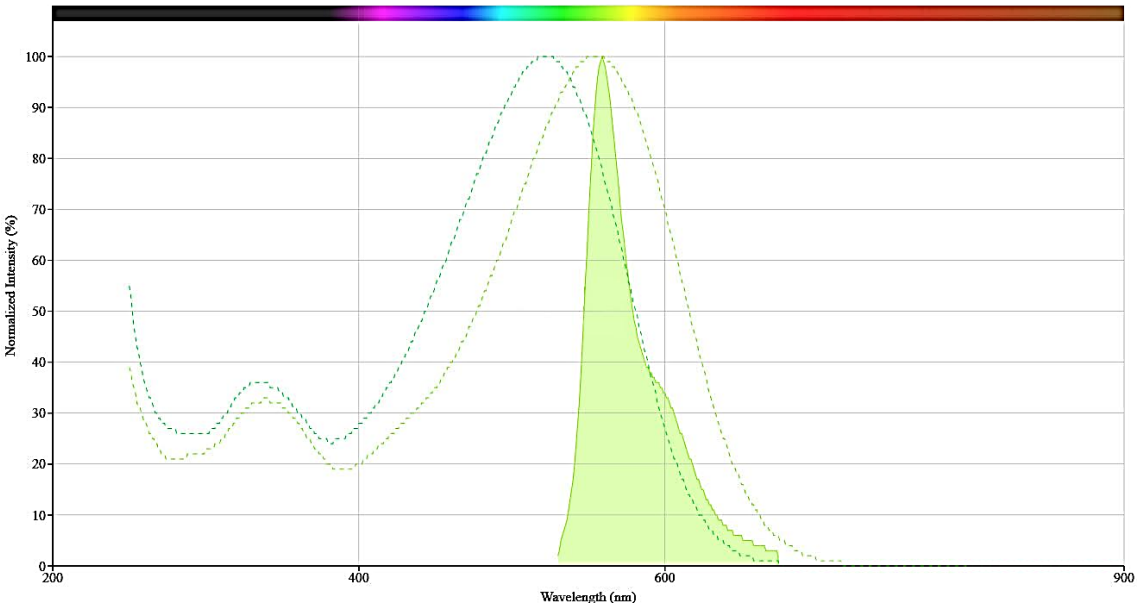


Figura 53. Superposición de los espectros de absorción de BHQ1 (línea discontinua oscura) y BHQ2 (línea discontínua clara) con el espectro de emisión de HEX (línea continua rellena). Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9,10]

Black Hole Quencher 2 o BHQ2 es un quencher de fluorescencia no radiante. Pertenece a la familia de los *Black Hole Quenchers* y, como tal, presenta enlaces azo en su estructura. Si bien BHQ1 y BHQ2 son moléculas isómeras, la disposición de los grupos funcionales varía entre sus estructuras (Figura 54). Este quencher presenta una intensa banda de absorción entre los 450 nm y los 650 nm, con un máximo de absorción a 554 nm (Figura 54). Por lo tanto, su rango de aplicación se encuentra desplazado hacia longitudes de onda más largas respecto a las de BHQ1. La proximidad con el máximo de emisión de HEX (559 nm) hace que el solapamiento entre bandas sea muy amplio, favoreciendo el apantallamiento por efecto FRET. BHQ2 también está disponible comercialmente tanto como fosforamidita como CPG (Figura 55).

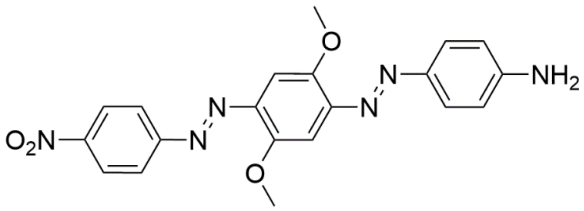


Figura 54. Estructura molecular de BHQ2.

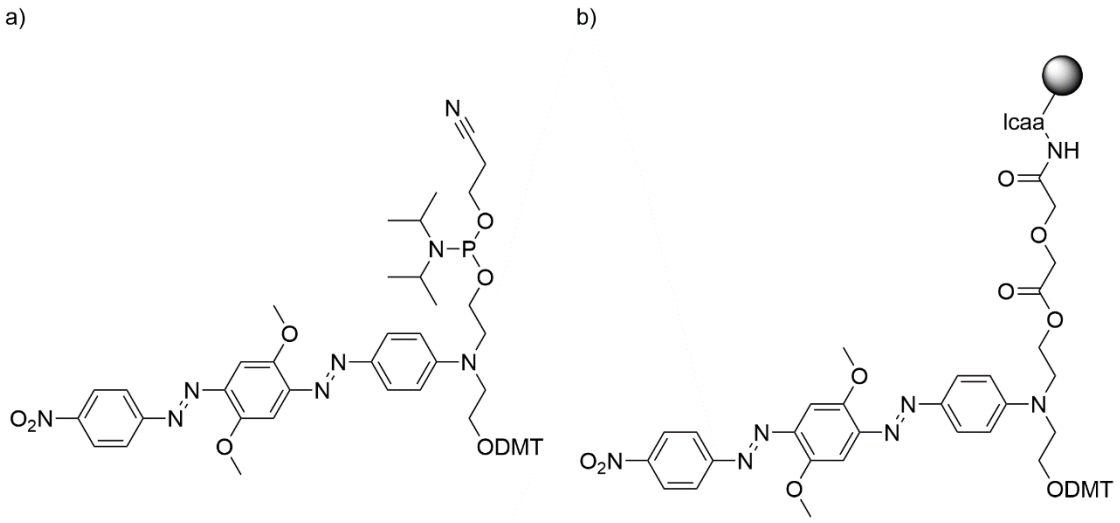


Figura 55. a) Estructura del derivado fosforamidita de BHQ2. b) Estructura molecular del derivado CPG de BHQ2.

La optimización del protocolo de elaboración de sondas que incorporan HEX tomó como base el protocolo desarrollado para FAM, motivado por la gran similitud entre ambas moléculas. Respecto a la síntesis, se mantuvieron todas las subrutinas y para el acoplamiento ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. En la etapa de digestión se hizo un estudio sistemático de varios protocolos: Dig.Met.2, que es el utilizado en el protocolo de FAM, y los nuevos Dig.Met.3 y Dig.Met.4 (Tabla 21) ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***.

Tabla 21. Métodos de digestión ensayados para las sondas BHQ2/HEX.

Método	Reactivos	Proporción	Tª (°C)	t
Dig.Met.2	XX[(a)]	X:X[(a)]	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.3	XX[(a)]	X:X[(a)]	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.4	XX[(a)]	X:X[(a)]	XX[(a)]	XX[(a)]

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

Sólo Dig.Met.2 y Dig.Met.4 dieron resultados satisfactorios. De entre ellos, se eligió el primero de ellos por ser de menor duración. Los métodos de HPLC, UPLC y masas se mantuvieron igual que los utilizadas en el protocolo de FAM.

El método de síntesis desarrollado para la obtención de sondas en las que HEX actúa como fluoróforo permite obtener productos que se corresponden con los resultados de las pruebas de caracterización a las que se les somete. Estas pruebas aseguran la identidad y la pureza de la molécula y, por lo tanto, indican su idoneidad para su uso en qPCR. Sin embargo, un análisis más exhaustivo de la pureza por métodos de UPLC permite apreciar la presencia de un hombro en la señal correspondiente a la sonda, pero las diferencias de masa se encontraban dentro del error. Las modificaciones introducidas en el método de purificación no permitieron una completa separación de estas señales superpuestas. Pese a que los datos de caracterización van en la dirección de confirmar la identidad del producto buscado, en los ensayos de funcionalidad por qPCR se obtenían unos niveles de fluorescencia final inferiores a los obtenidos con sondas homólogas de referencia.

En fuentes bibliográficas se describe que el tratamiento de HEX con aminas en medio acuoso, que es el método utilizado en la digestión de las sondas con HEX, puede llevar a una degradación parcial del fluoróforo a su derivado con estructura de arilacridina (la presencia de este derivado

aumenta con el incremento de la temperatura y del tiempo de incubación). El proceso que tiene lugar en estos casos se describe como el ataque nucleófilo de una amina sobre uno de los carbonos unidos al oxígeno del anillo tipo pirano, produciendo la apertura de la molécula. Posteriormente, la amina introducida realiza un ataque nucleófilo intramolecular para dar un derivado cíclico, con salida del grupo OH y formación de la especie acridina (Figura 56).[30]

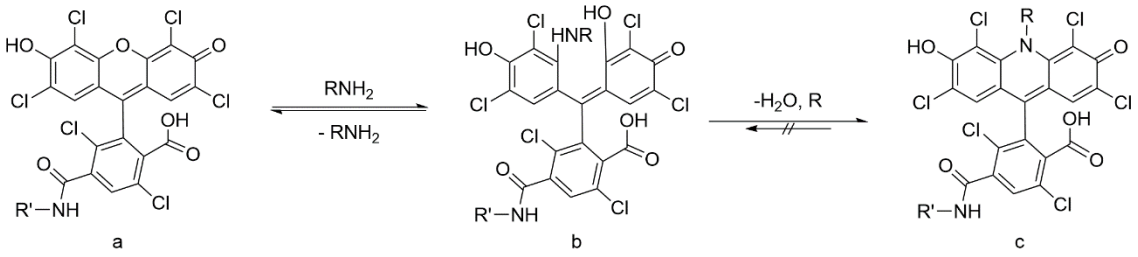


Figura 56. Mecanismo de formación del derivado arilacridina a partir de HEX. [29].

Este derivado de arilacridina posee propiedades ópticas muy diferentes a HEX. Su espectro de emisión presenta un máximo de emisión a 496 nm (desplazamiento hipsocrómico respecto a HEX) y su rendimiento cuántico de 0,1 es mucho menor (0,7 en HEX)[30]. Estos valores están de acuerdo con la menor fluorescencia final observada en los test de qPCR. Además, teniendo en cuenta el desplazamiento de la emisión de la fluorescencia a longitudes de onda más cortas, supone una amenaza de generación de fenómenos de *crosstalk* en el canal de FAM, pudiendo llegar a producir falsos positivos en el análisis. No obstante, sólo hay una diferencia de masa de 4 Da entre el derivado de acridina formado y HEX, una diferencia lo suficientemente pequeña para no ser detectada en el análisis de masas de las características que se disponía ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Dado que el objetivo final de esta investigación era obtener un método eficaz para la síntesis de sondas para qPCR, se consideró que no era operativo tener tiempos de reacción tan largos que demorasen el proceso. Por este motivo, se decidió explorar el uso de fluoróforos alternativos a HEX.

SIMA-HEX, también conocido como diclorodifenilfluoresceína, es un fluoróforo perteneciente a la familia de las fluoresceínas. Estructuralmente es muy similar a HEX, con la diferencia de que los sustituyentes cloro del esqueleto de xanteno no se encuentran presentes y, en su lugar, hay un par de sustituyentes fenilo (Figura 57). SIMA-HEX es mucho más estable frente a las condiciones básicas de digestión ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Los espectros de absorción y emisión de SIMA-HEX no presentan diferencias significativas respecto a los de HEX, si bien el máximo de absorción se encuentra desplazado 3 nm hacia el azul y el de emisión, 5 nm hacia el rojo (Figura 58). Además, SIMA-HEX mantiene un 90% de la intensidad de la fluorescencia emitida por HEX.[31]

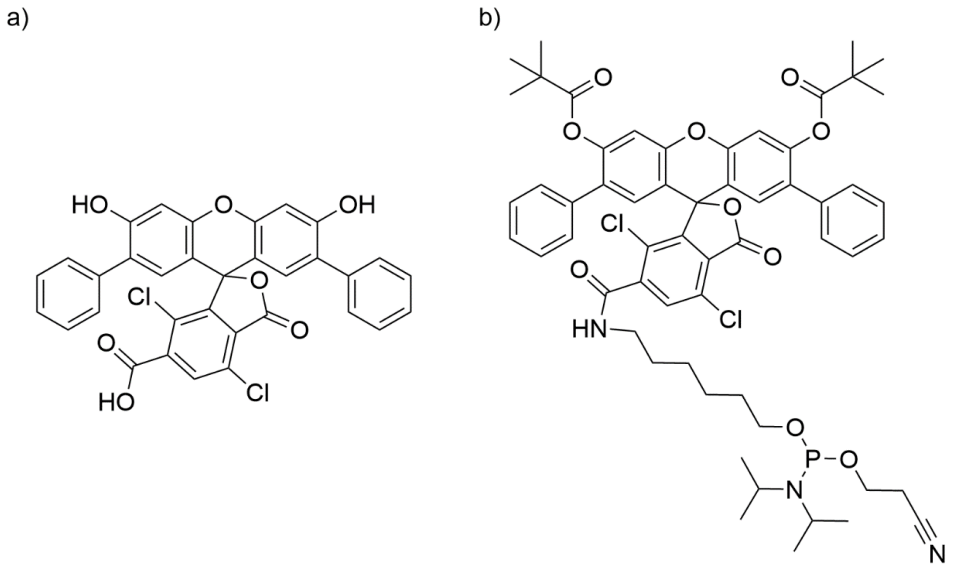


Figura 57. a) Estructura molecular de SIMA-HEX. b) Estructura molecular del derivado fosforamidita de SIMA-HEX.

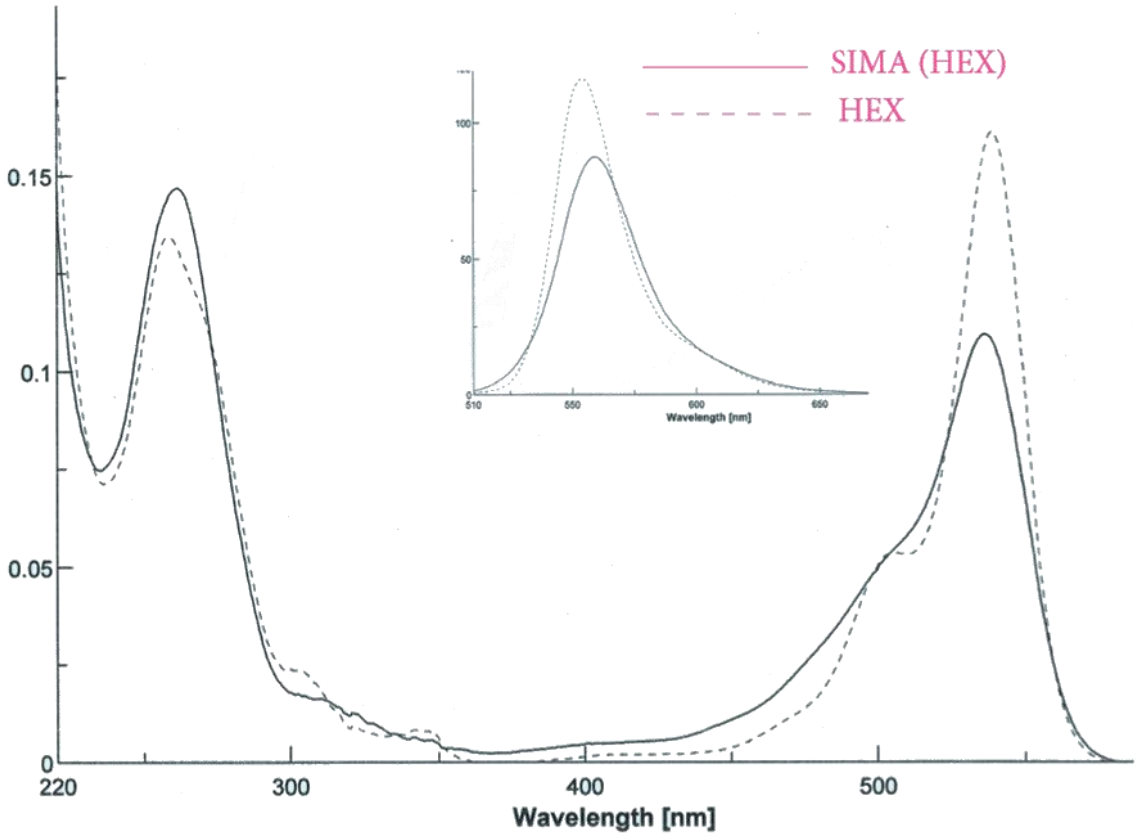


Figura 58. Comparativa de los espectros de absorción y emisión (recuadro) de HEX (línea de puntos) y SIMA-HEX (línea continua). Imagen obtenida de la fuente: https://www.glenresearch.com/reports/gr21-110[31].

Se estudiaron las condiciones de síntesis, digestión y purificación de sondas desarrolladas para HEX, usando SIMA-HEX en su lugar. También se realizaron para el uso de CBQX y BHQ1. Los resultados obtenidos indicaron que tanto los fluoróforos como los quenchers son intercambiables sin que se observen diferencias significativas ni en rendimiento de la síntesis de las sondas ni en su aplicación en qPCR. Por lo tanto, se aceptó la sustitución de HEX por SIMA-HEX cuando las sondas fabricadas con aquél se degradasen durante el tratamiento posterior a su

síntesis. Los protocolos finales para la elaboración de sondas HEX/SIMA-HEX con los diferentes quenchers se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas HEX/SIMA-HEX con BHQ1/BHQ2/CBQX.

Proceso		Método (BHQ1/BHQ2)	Método (CBQX)
Síntesis	Quencher	-	Sint.Met.4
	Primera base	Sint.Met.2	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos	Sint.Met.1	Sint.Met.1
	Fluoróforo	Sint.Met.3	Sint.Met.3
Digestión		Dig.Met.2	Dig.Met.2
HPLC		Pur.Met.1	Pur.Met.1
UPLC		Ana.Met.1	Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1	Mass.Met.1

II.1.3. ROX

La 5(6)-carboxi-X-rodamina, o comúnmente llamada ROX (Figura 59b), es un xantenoide derivado de la estructura de rodamina (Figura 59a).

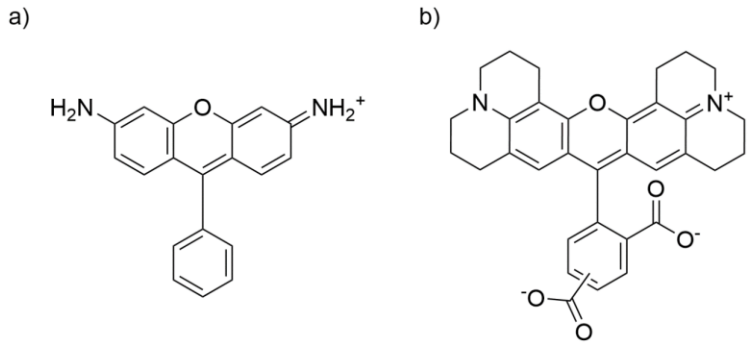


Figura 59. a) Estructura molecular de la rodamina. b) Estructura molecular de ROX.

Al igual que en las fluoresceínas, las rodaminas presentan una estructura rígida y plana formada por tres ciclos fusionados. La principal diferencia entre estas especies es que las rodaminas presentan sustituyentes amino en las posiciones en las que las fluoresceínas tienen grupos hidroxilo. Este cambio hace que las rodaminas presenten una mayor facilidad para ser modificadas y, por lo tanto, tengan un rango de máxima absorción muy amplio en el espectro y un coeficiente de extinción molar y rendimiento cuántico muy altos.[8,32,33] La sustitución de los grupos hidroxilo de las fluoresceínas por grupos amino en rodaminas hace que las bandas de absorción y de emisión sufran un desplazamiento batocrómico respecto a fluoresceínas. Además, las rodaminas son relativamente resistentes al *fotobleaching* y su espectro de fluorescencia no es tan dependiente del pH.

La capacidad de las aminas de las rodaminas de formar múltiples enlaces favorece la existencia de muchos derivados. Sin embargo, ROX es una de las rodaminas más usadas en qPCR debido a su alta intensidad de absorción y de emisión. Estas características se atribuyen a la rigidez estructural añadida por la introducción de múltiples puentes de propileno, que forman parte de ciclos fusionados, que previenen la desactivación de la fluorescencia mediante procesos no

radiantes[34]. Los métodos sintéticos más habituales para la obtención de ROX conducen a la obtención de una mezcla de los isómeros con el grupo carboxilo en posiciones C5 y C6 del anillo aromático. El uso de esta mezcla equimolar no supone ninguna afección a la funcionalidad del fluoróforo, ya que la variabilidad introducida no afecta a las propiedades luminiscentes. ROX presenta un máximo de absorción a 578 nm y un máximo de emisión a 604 nm (Figura 60). Su coeficiente de extinción molar es de 82000 $cm^{-1}M^{-1}$ y su rendimiento cuántico es 0,94 a pH 7,2[9].

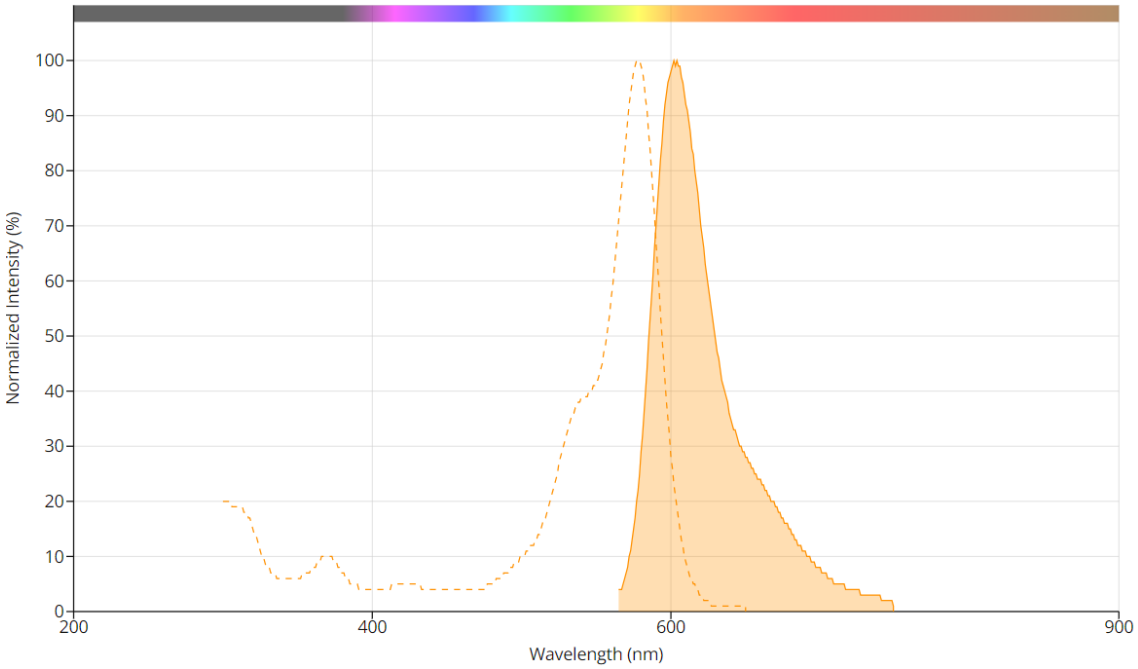


Figura 60. Espectro de absorción (línea de puntos naranja sin relleno) y espectro de emisión (línea continua naranja con relleno) de ROX. Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9].

En las sondas de ROX, aunque el máximo de emisión se ha desplazado hacia longitudes de onda más largas, todavía es posible utilizar BHQ2 como quencher de fluorescencia. Como se observa en la Figura 61, se produce solapamiento espectral entre ROX y BHQ2, que es uno de los requisitos necesarios para que se produzca efecto FRET.

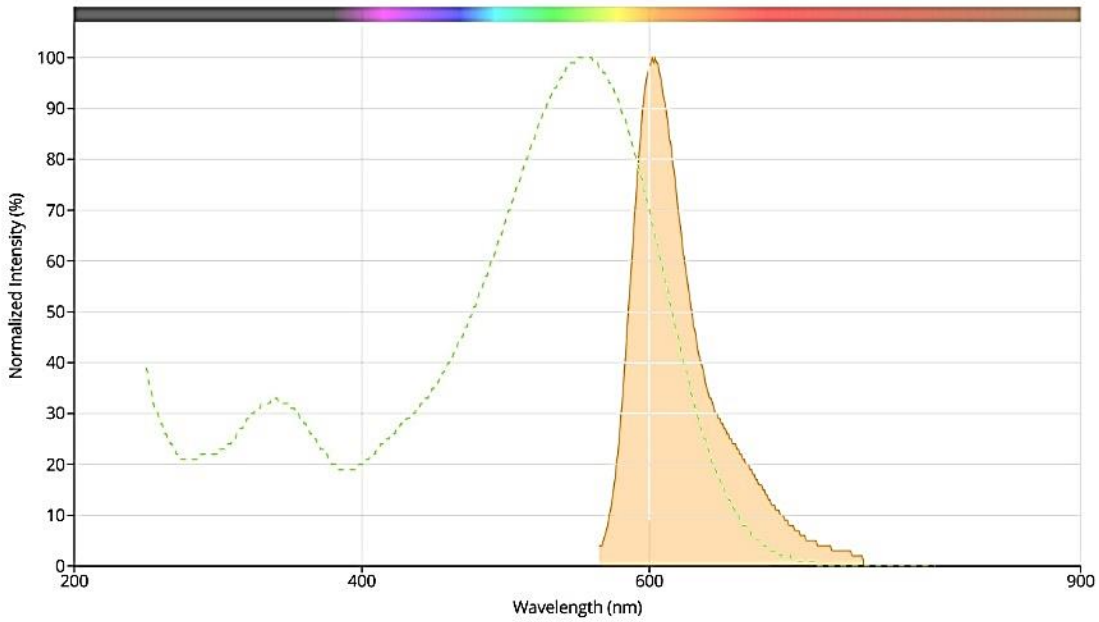


Figura 61. Superposición del espectro de absorción de BHQ2 (línea discontinua) con el espectro de emisión de ROX (línea continua rellena). Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9,10]

La optimización del protocolo de elaboración de sondas ROX se basó de nuevo en el protocolo desarrollado para FAM. Sin embargo, la síntesis de las sondas con ROX presenta una peculiaridad respecto al de las sondas que contienen el resto de los fluoróforos. No existe ningún derivado de ROX unido a un grupo amidita del que haya disponibilidad comercial. Es decir, ROX no se puede incorporar a la síntesis de la sonda mediante el método de la amidita y es necesario el uso de otros tipos de estrategias para hacerlo. Todos los procesos previos a la incorporación del fluoróforo se mantuvieron igual.

La estrategia sintética elegida para poder introducir ROX en las sondas involucra la formación de un enlace amida entre un modificador terminal con grupo fosforamidita que permita su unión al oligonucleótido y un derivado de ROX con un grupo funcional compatible para la formación del enlace. De esta forma se plantearon dos opciones:

1. que el fragmento unido a ROX aporte el extremo acilo.
2. que el fragmento unido a ROX aporte el extremo amina.

La primera alternativa sintética planteada se afrontó a través de una reacción de sustitución nucleófila en un derivado de ROX activado como éster de *N*-hidroxisuccinimida (ROX-NHS éster, Figura 62a). De esta forma, se buscaba la formación de un enlace amida entre ROX y un linker amino que posee un grupo fosforamidita (Figura 62b).

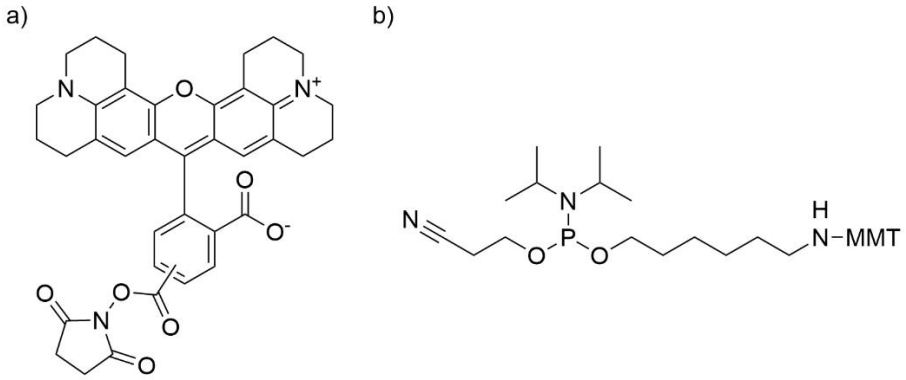


Figura 62. a) Estructura molecular del derivado ROX-NHS éster. b) Estructura molecular del 5'-amino-modifier C6.

El protocolo seguido se basa en el descrito para sustratos similares y tiene lugar en disolución ***(Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 63). Consta de tres etapas:

1. En la primera etapa se realiza la unión del *5'-amino-modifier C6* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** a la secuencia del oligonucleótido en proceso de síntesis. El linker, al poseer un grupo fosforamidita, se puede incorporar a la sonda como una etapa adicional de la síntesis de la amidita en fase heterogénea. Una vez formado el enlace fosfodiéster entre el último nucleótido de la sonda y el linker es necesario realizar una subrutina de desbloqueo para eliminar de la amina el grupo protector MMT.
2. A continuación, se libera la sonda del soporte sólido realizando el protocolo de digestión; en este caso se mantuvo el utilizado para las sondas HEX, ya que también incorporan BHQ2 en la secuencia de la sonda y, posteriormente, se evapora la mezcla de digestión.
3. En el siguiente paso, se disuelve el oligonucleótido en un tampón y se hace reaccionar, ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** para desplazar la reacción hacia los productos. Transcurrido el tiempo de reacción es necesario precipitar el oligonucleótido con etanol frío para separarlo del crudo de reacción.
4. Por último, el oligonucleótido se purifica por HPLC. Dada la mayor hidrofobicidad del fluoróforo ROX respecto a FAM y HEX, para este pasó se diseñó un nuevo método ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** para asegurar la elución de la sonda (Tabla 23).

Tabla 23 Comparativa de los métodos de purificación Pur.Met.1 y SondasROXHPLC1. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

		Pur.Met.1 (SondasFAMHPLC3)			**Pur.Met.2 (SondasROXHPLC1)**		
	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
Gradiente	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	1	XX[(a)]	XX[(a)]	1	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	6	XX[(a)]	XX[(a)]	6	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	9	XX[(a)]	XX[(a)]	9	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	23	XX[(a)]	XX[(a)]	18	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	26	XX[(a)]	XX[(a)]	24	XX[(a)]	XX[(a)]
	VII	27	XX[(a)]	XX[(a)]	27	XX[(a)]	XX[(a)]
	VIII	-	XX[(a)]	XX[(a)]	30	XX[(a)]	XX[(a)]
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 63. Protocolo de acoplamiento de ROX NHS éster ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

Después de la purificación con el nuevo método de HPLC se confirmó que de entre todas las fracciones recogidas, la sonda completa correspondía con las dos últimas señales del cromatograma. No fue necesario modificar los métodos ya desarrollados de UPLC y de masas ya que se obtuvieron resultados satisfactorios, similares a las sondas anteriormente optimizadas.

Las condiciones descritas inicialmente en el protocolo de acoplamiento llevaron a la obtención del oligonucleótido funcionalizado con ROX pero con un rendimiento muy bajo. Con el objetivo de mejorar la obtención del producto se estudiaron diferentes condiciones de reacción. De esta forma, se duplicó y triplicó la concentración de ROX-NHS éster. Sin embargo, los rendimientos obtenidos después de la precipitación y la purificación por HPLC no mejoraron respecto de las condiciones de reacción iniciales.

Bajo la hipótesis de que la etapa de purificación ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** pudiera ser el paso crítico que estuviera provocando los bajos rendimientos, se trató de prescindir de ella. Por eso, se estudió la reacción de sustitución nucleófila en fase heterogénea ***(Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad).*** De esta forma, el oligonucleótido unido al *5'-amino-modifier C6*, aún anclado al CPG, se hizo reaccionar con una disolución de ROX-NHS éster ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** a la concentración utilizada para la incorporación de los fluoróforos FAM y HEX, ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. A continuación, se lavó el oligonucleótido y se le aplicó el protocolo de digestión (Dig.Met.2). Los resultados obtenidos después de la purificación por HPLC (Pur.Met.2) mostraron que esta modificación no suponía una mejora en el rendimiento de la obtención de la sonda marcada con ROX, teniendo cromatogramas muy similares y rendimientos muy bajos.

Dado que la estrategia en la que el fragmento unido a ROX aporte el extremo acilo no resultó en la obtención del producto buscado con unos rendimientos adecuados, se buscó otro tipo de derivados de ROX con los que ensayar y desarrollar protocolos alternativos. De esta forma, se pasó a estudiar la estrategia en la que el fragmento unido a ROX aporta el extremo amina. Dentro de las posibilidades existentes se eligió como sustrato el compuesto ROX ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, en el que el fluoróforo presenta una amina terminal (Figura 64a). Por otro lado, el grupo fosforamidita procede de un fragmento con un grupo carboxilato activado como NHS-éster. El sustrato elegido por su disponibilidad y conveniencia fue el ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 64b).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 64. a) Estructura molecular del ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. b) Estructura molecular* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

Como punto de partida, se estudió una síntesis en fase heterogénea porque este tipo de síntesis permite una eliminación muy sencilla de los reactivos sobrantes y subproductos mediante sucesivos lavados con un disolvente. Para ello, se tomó el oligonucleótido unido al CPG en el propio sintetizador. En un primer ensayo, se llenó el reactor de síntesis con un exceso de una disolución de ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad*** (Figura 65).

Transcurrido este tiempo, se lavó el reactor con acetonitrilo, retirando de esta forma el exceso de reactivo.

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 65. Protocolo de acoplamiento de ROX ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

Después de la digestión (Dig.Met.2), de la posterior purificación manteniendo el método utilizado para las anteriores sondas ROX y el análisis de las fracciones recogidas mostró que se logró un rendimiento semejante a los obtenidos para sondas FAM y HEX. El protocolo sintético descrito resultó ser adecuado para la obtención de sondas con ROX. De hecho, de los tres protocolos probados hasta el momento, este último fue el que mejor resultados dio. Por lo tanto, se trabajó en la completa optimización del mismo ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Los protocolos finales para la elaboración de sondas ROX con BHQ2 se resumen en la Tabla 24.

*Tabla 24. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas ROX con BHQ2. *:* ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

Proceso		Método
Síntesis	Primera base	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos	Sint.Met.1
	Modificador amino	Sint.Met.3
	Fluoróforo	*
Digestión		Dig.Met.2
HPLC		Pur.Met.2
UPLC		Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1

Sin embargo, cuando se llevaron estas sondas a los ensayos de funcionalidad por qPCR, no se lograban unos niveles de fluorescencia lo suficientemente altos. Entre los cambios de métodos y reactivos utilizados que se plantearon, estuvo el uso de un quencher diferente para este tipo de sondas.

El *quencher* alternativo elegido para sondas con ROX fue *Eclipse Dark Quencher* (o simplificado, Eclipse). Se trata de un *quencher* no radiante desarrollado por ELITechGroup[37] y perteneciente al grupo de los colorantes azo. Su estructura consiste en dos anillos aromáticos unidos mediante un grupo azo. Uno de los anillos aromáticos presenta una deficiencia en densidad electrónica debida a los grupos funcionales de marcado carácter electroatractor (cloro y nitro) que lo sustituyen (Figura 66). Eclipse presenta una banda de absorción entre 390 nm y 625 nm siendo su máximo a 522 nm. Aunque el solapamiento de las bandas de emisión y de absorción es parcial con ROX (Figura 67), los ensayos desarrollados muestran que el apantallamiento de la fluorescencia de ROX se produce de forma efectiva cuando se usa Eclipse como quencher. Pese a que el solapamiento de los espectros es peor entre ROX y Eclipse que cuando se usa ROX y BHQ2, este no es el único factor que condiciona el mecanismo FRET. De hecho, la orientación de los dipolos del fluoróforo y del quencher es también muy importante, pero es un factor muy difícil de controlar en moléculas que pueden adoptar diferentes conformaciones. En este sentido, Eclipse presenta en su linker (diferente del de BHQ2) un esqueleto de prolina (Figura 68), que podría estar actuando directamente en este sentido y resultando en una mejora del mecanismo FRET.

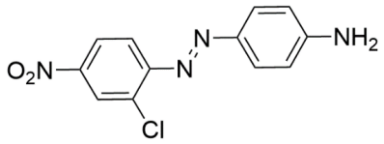


Figura 66. Estructura molecular de Eclipse.

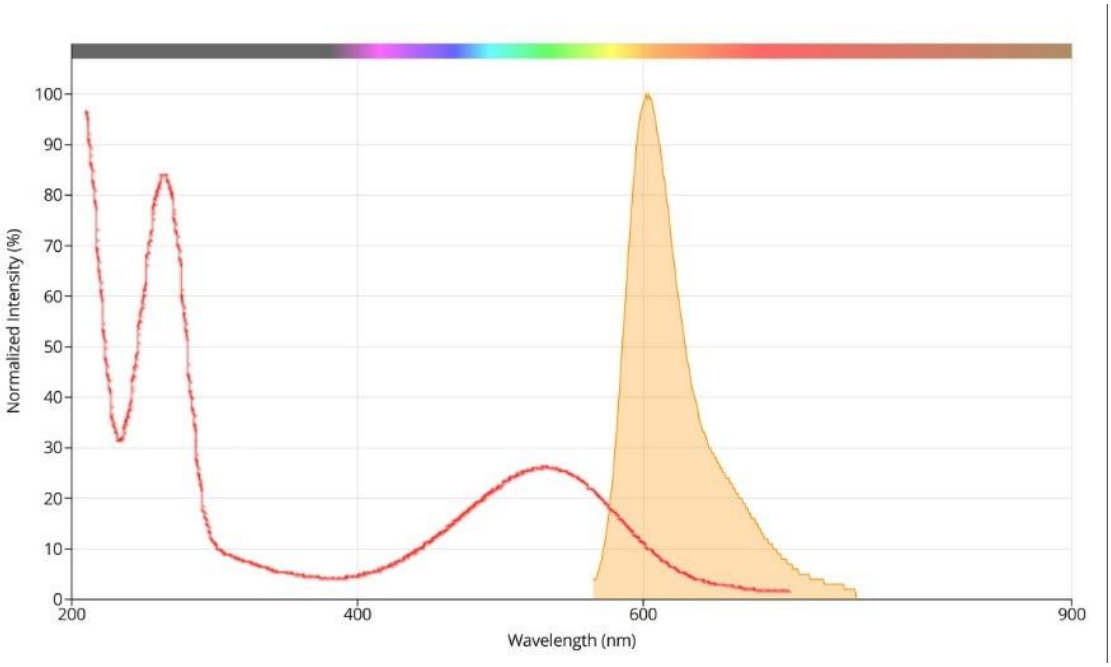


Figura 67. Superposición del espectro de absorción de Eclipse (línea roja) con el espectro de emisión de ROX (área naranja). Imagen modificada obtenida de ATT BIOQUEST[9] y https://www.glenresearch.com/reports/gr15-11[10]

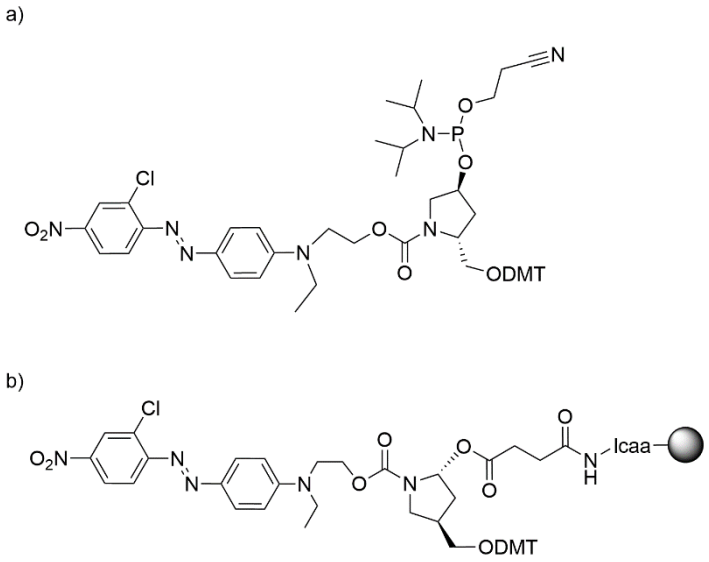


Figura 68. a) Estructura molecular del derivado fosforamidita de Eclipse. b) Estructura molecular del derivado CPG de Eclipse.

Eclipse es un quencher con una adecuada robustez química, que resiste las condiciones de reacción a las que es sometido en los ciclos del método de síntesis de la amidita. Comercialmente se encuentra asequible tanto en la forma de fosforamidita como en la forma de CPG (Figura 68). Como se ha indicado previamente, dentro del programa de I+D+i de Certest Biotec se encuentra el desarrollo de nuevos quenchers de fluorescencia. Dentro de este contexto, se ha desarrollado

la síntesis de un quencher tipo azo, análogo a Eclipse en su forma de amidita, que se denominó NeoEclipse. NeoEclipse reproduce el cromóforo de Eclipse, pero cambia el linker a partir del cual se unen los grupos fosforamidita y DMT (Figura 69). La medida de las propiedades luminiscentes de Eclipse y de NeoEclipse y los ensayos de estabilidad determinaron que son idénticos entre las dos especies, por lo que son perfectamente intercambiables entre sí.

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 69. Estructura molecular del derivado fosforamidita de NeoEclipse.

Se realizó un estudio sistemático de los protocolos de digestión, purificación, análisis y masas de las sondas Eclipse-ROX, para confirmar que no había ninguna incompatibilidad con los métodos utilizados hasta el momento. Los protocolos finales para la elaboración de sondas ROX con Eclipse/NeoEclipse se resumen en la Tabla 25.

*Tabla 25. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas ROX con Eclipse/NeoEclipse. *:* ***(Información omitida por motivos de confidencialidad**).*

Proceso		Método (Eclipse)	Método (NeoEclipse)
Síntesis	Quencher	-	Sint.Met.4
	Primera base	Sint.Met.2	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos	Sint.Met.1	Sint.Met.1
	Modificador amino	Sint.Met.3	Sint.Met.3
	Fluoróforo	*	*
Digestión		Dig.Met.2	Dig.Met.2
HPLC		Pur.Met.1	Pur.Met.2
UPLC		Ana.Met.1	Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1	Mass.Met.1

II.1.4. Cy5

El último de los fluoróforos con los que se ha trabajado es la Cyanina 5, también denominada como Cy5. La estructura de Cy5 es completamente diferente a la de los fluoróforos anteriores, que poseían un esqueleto básico derivado del xanteno. Por el contrario, Cy5 presenta una estructura de cianina. Su estructura general consiste en una cadena conjugada de polimetilenos, compuesta por un número impar de átomos de carbono, y en cuyos extremos se encuentran dos átomos de nitrógeno, de forma que en sus estructuras resonantes uno de ellos se encuentra oxidado a la forma de sal de iminio (Figura 70a)[38]. Para que las cianinas sean estables deben estar integradas en heterociclos que, en el caso de Cy5 son indoles en ambos extremos de la cadena (Figura 70b). Las propiedades fluorescentes de las cianinas están determinadas por la existencia de un sistema de electrones-π deslocalizados entre la amina (rica en densidad electrónica) y la sal de iminio (pobre en densidad electrónica). Por otro lado, la longitud de la cadena de polimetilenos condiciona las propiedades luminiscentes de la cianina, de forma que en cadenas más largas la mayor conjugación reduce el salto energético entre el HOMO y el LUMO y, por lo tanto, la fluorescencia emitida se desplaza hacia el rojo (longitudes de onda más largas). Estas propiedades también se ven influenciadas por la presencia de heteroátomos en los grupos terminales de la cianina al modificar la longitud efectiva del sistema de electrones π.[39–41].

Cy5 está formada por una cadena de polimetilenos integrada por 5 átomos de carbono que conectan dos grupos indol. La molécula presenta un coeficiente de extinción molar de 250000 $cm^{-1}M^{-1}$ y un rendimiento cuántico de 0,4 en etanol. Se trata de una molécula con una

fotoestabilidad relativamente baja y una baja sensibilidad al pH. Además, es fácil encontrar derivados de la molécula con diversas funcionalizaciones, entre ellas la forma fosforamidita (Figura 70c). Cy5 presenta un máximo de absorción a 651 nm y un máximo de emisión a 670 nm (Figura 71).

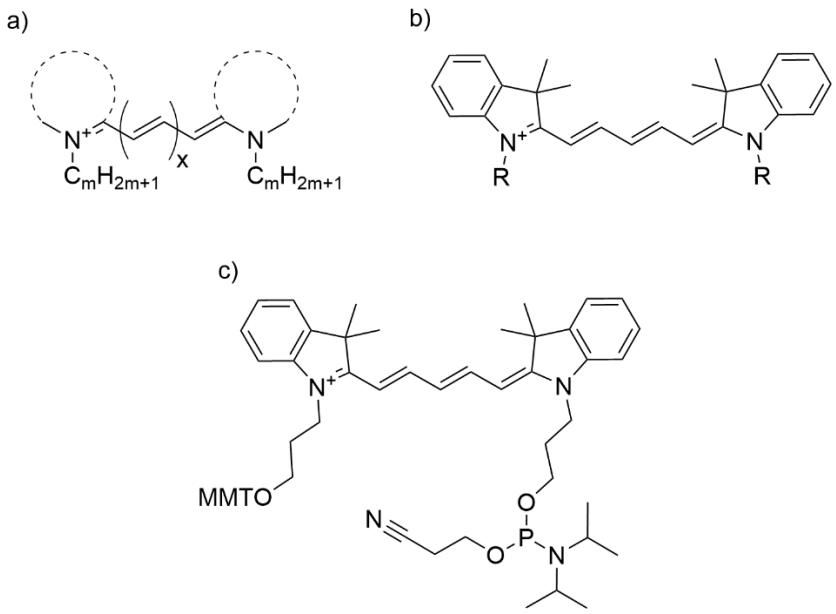


Figura 70. a) Estructura molecular general de las cianinas. b) Estructura molecular de Cy5. c) Estructura molecular del derivado fosforamidita de Cy5.

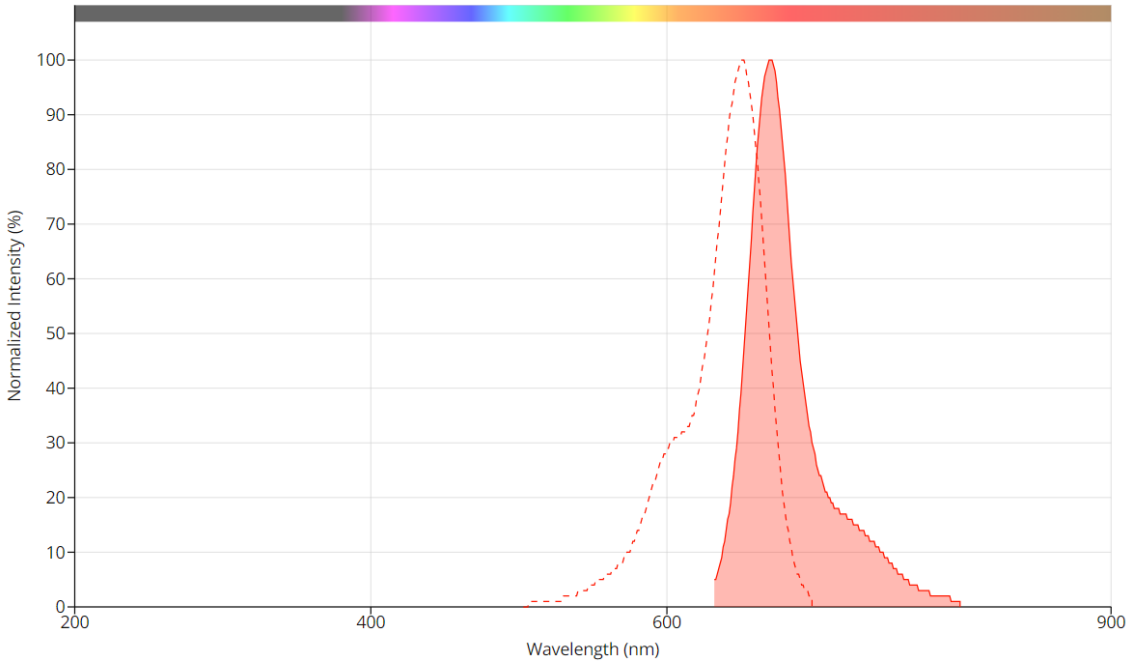


Figura 71. Espectro de absorción (línea de puntos roja sin relleno) y espectro de emisión (línea continua roja con relleno) de Cy5. Imagen obtenida de ATT BIOQUEST[9]

Los *quenchers* tradicionalmente utilizados para el apantallamiento de la fluorescencia de Cy5 son BHQ3, un colorante azo de la familia de los *Black Hole Quenchers*, y BBQ650, un *quencher* no radiante también de tipo azo (Figura 72).

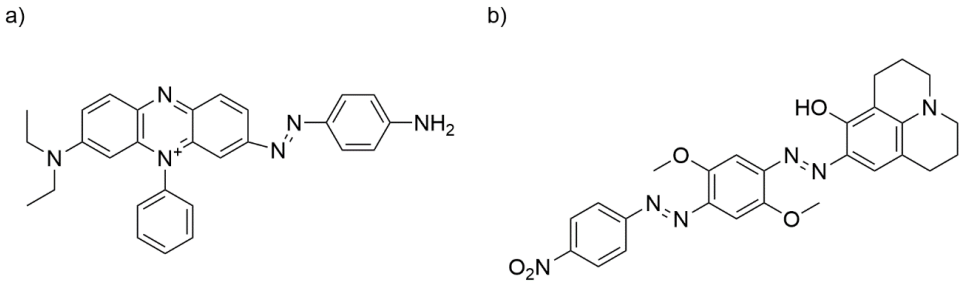


Figura 72. a) Estructura molecular de BHQ3. b) Estructura molecular de BBQ650.

Debido a su uso extendido, es fácil encontrar fuentes comerciales de derivados de los mismos en sus correspondientes formas fosforamidita y CPG. Por ello, se comenzó el estudio de los sistemas Cy5-quencher con estas especies. Sin embargo, en los primeros ensayos realizados con estas moléculas se observó la degradación de los *quenchers* unidos al CPG durante la primera subrutina de desbloqueo con TCA. En estos casos, la disolución ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** se tiñe de un color azul muy oscuro cuando debería mostrar una tonalidad rosácea debida a la presencia del ion tritilo.

Dado que no se había conseguido establecer un procedimiento adecuado con los quenchers específicos de Cy5, se adoptó como solución temporal el uso de BHQ2. Como se ha comentado previamente, este quencher presenta una intensa banda de absorción entre los 450 nm y los 650 nm, con un máximo de absorción a 554 nm. Si bien se cumple la condición del solapamiento de bandas con Cy5 para que se produzca el efecto FRET, este solapamiento es tan pequeño que no es una combinación óptima de sistema fluoróforo-quencher (Figura 73).

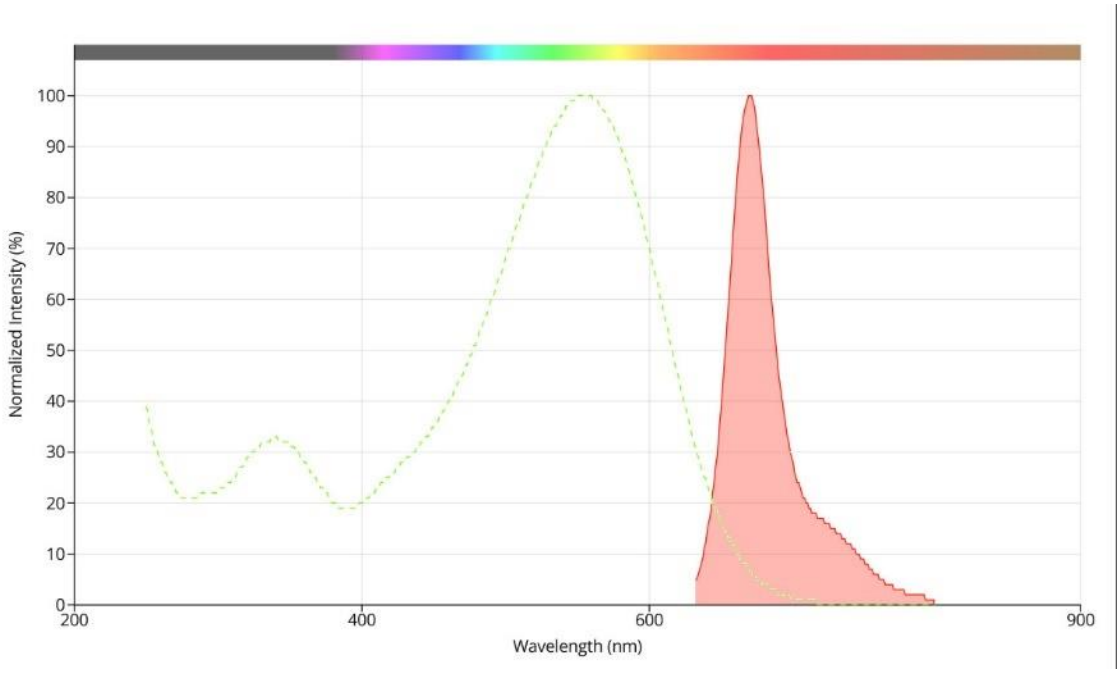
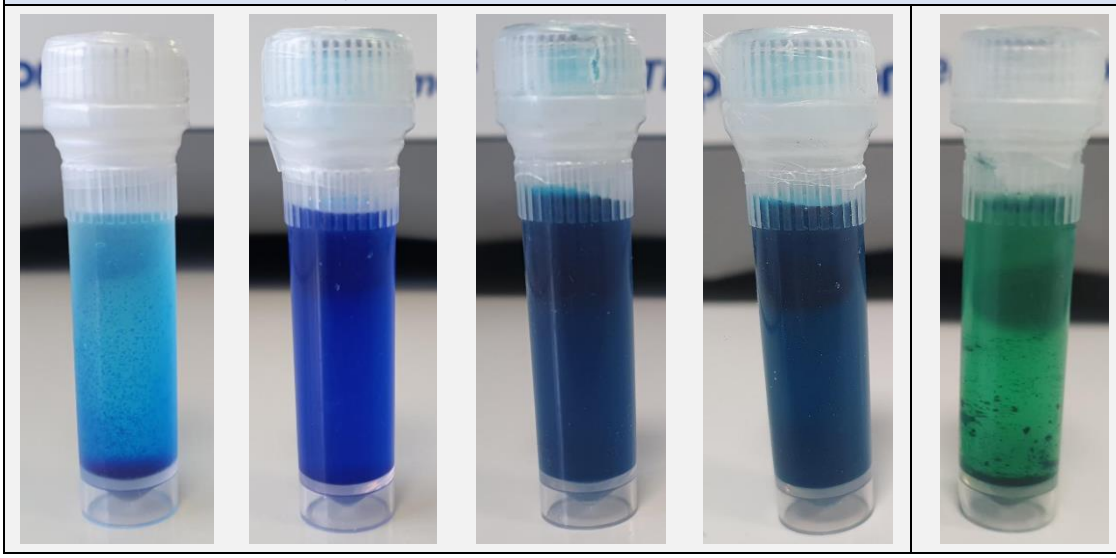


Figura 73. Superposición del espectro de absorción de BHQ2 (línea discontinua verde) con el espectro de emisión de Cy5 (línea continua rellena). Imagen modificada obtenida de ATT BIOQUEST[9,42].

Los oligonucleótidos que incorporan Cy5 presentan una gran tendencia a la degradación bajo las condiciones habituales de digestión del resto de sondas ***(Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad***. Sin embargo, se realizaron experimentos iniciales para ver si alguna de las digestiones utilizada para los otros fluoróforos eran viables. Estos experimentos confirmaron

que, durante la digestión, las condiciones utilizadas hasta el momento provocaban una degradación muy evidente de la sonda de Cy5. Bajo estas condiciones se observaba un cambio de la coloración azul intensa propia del fluoróforo a un tono verdoso, seguramente indicativo de la formación de otra especie química con unas características fluorescentes diferentes. Esta degradación se confirmó ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Tabla 26). El análisis posterior de esta disolución reveló una diferencia en masa respecto a la objetivo (Figura 74), ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 75).

Tabla 26. Degradación progresiva de Cy5 bajo las condiciones de Dig.Met.4.

dT_{10}-Cy5				
t =0	t =0,5 h	t =1 h	t =2 h	Redisuelto
				

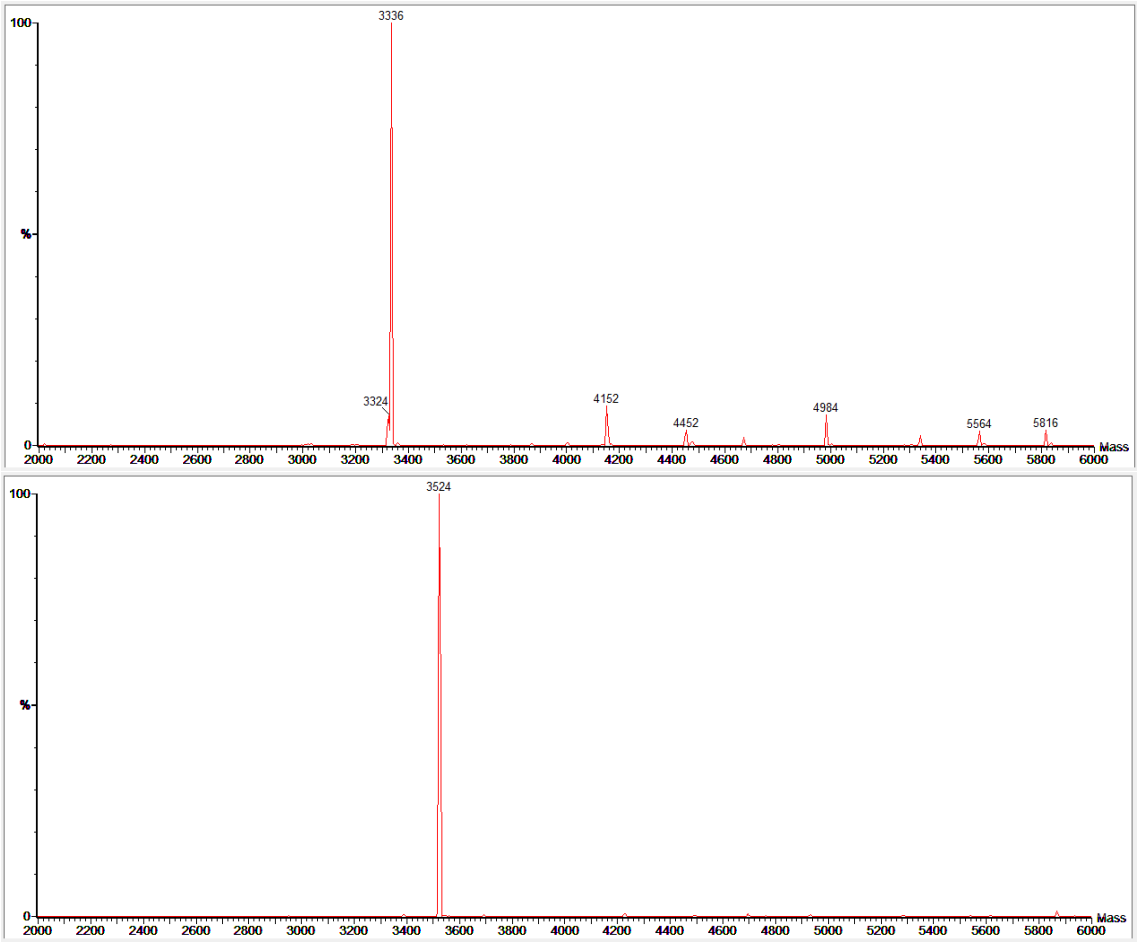


Figura 74. Comparativa de las masas deconvolucionadas de la muestra de dT_{10}-Cy5 tras el protocolo de digestion Dig.Met.1.

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 75. Especie propuesta de la degradación del fluoróforo Cy5.

Con el objetivo de evitar la degradación de las sondas con Cy5 se estudiaron las diversas condiciones para la etapa de digestión ***(Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad*** con las fosforamiditas utilizadas hasta el momento (Tabla 27).

Tabla 27. Condiciones suaves de digestión para sondas Cy5.

Método	Reactivos	Proporción	Tª (°C)	t
Dig.Met.5	NH_4OH	N/A	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.6	NH_4OH	N/A	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.7	NH_4OH	N/A	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.8	NH_4OH	N/A	XX[(a)]	XX[(a)]
Dig.Met.9	K_2CO_3 en MeOH	N/A	XX[(a)]	XX[(a)]

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

Sin embargo, estas condiciones de digestión más suaves, que no afectaron a la integridad del grupo fluoróforo, supusieron una desprotección parcial de los grupos protectores presentes en las aminas exocíclicas de las bases nitrogenadas usados hasta el momento. Si estas aminas no se encuentran completamente desprotegidas durante su uso en qPCR, la hibridación de la sonda con el DNA diana se ve seriamente comprometida al verse impedido el apareamiento de Watson

y Crick por la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias de las secuencias de DNA (Figura 76).

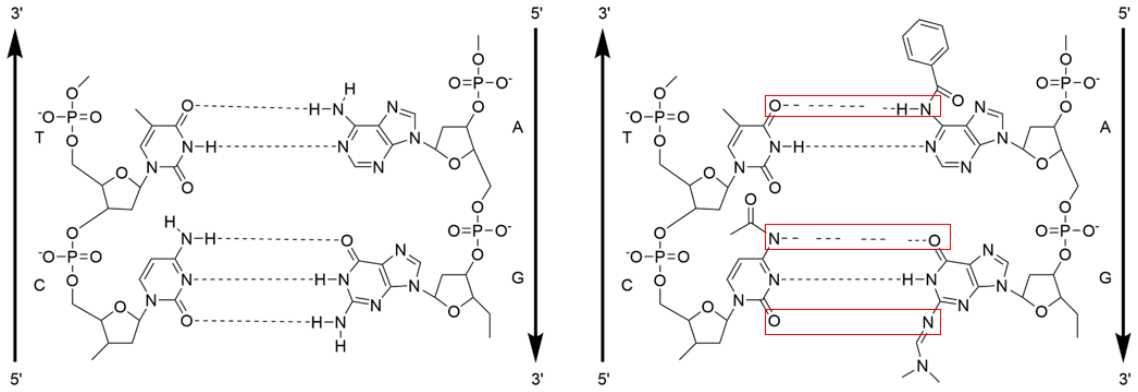


Figura 76. Interacciones por puentes de hidrógeno de los emparejamientos de Watson y Crick intactos (izda.) e impedidos (dcha.).

Visto que los experimentos realizados hasta el momento no fueron una solución viable, se decidió sustituir las bases nitrogenadas habituales ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. La presencia de estos nuevos grupos protectores implica revisar los reactivos usados durante el ciclo de síntesis por el método de la amidita. Afortunadamente, al ser un método más suave se encontraron pocas incompatibilidades, ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 77b).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 77. a) ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)****.*

(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad) en la etapa de capping del método de la amidita permite llevar a cabo la síntesis de sondas con Cy5 sin que se produzca la degradación de las mismas. Gracias al uso de estos reactivos se volvieron a probar las condiciones descritas en la Tabla 27, ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Se seleccionó como protocolo de síntesis el de más corta duración de los tres.

Posteriormente se realizó un estudio sistemático de los protocolos de digestión, purificación, análisis y masas de las sondas BHQ2-Cy5, para confirmar que no había ninguna incompatibilidad con los métodos utilizados hasta el momento. Los protocolos finales para la elaboración de sondas Cy5 con BHQ2 se resumen en la Tabla 28.

*Tabla 28. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas Cy5 con BHQ2. *: se utilizaron fosforamiditas TAC y Fast CapA.*

Proceso		Método
Síntesis	Primera base*	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos*	Sint.Met.1
	Fluoróforo	Sint.Met.2
Digestión		Dig.Met.7
HPLC		Pur.Met.2
UPLC		Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1

Dentro del programa de I+D+i de Certest Biotec para la obtención de nuevos quenchers de fluorescencia se ha desarrollado la síntesis de un quencher no radiante denominado CBQX3. Los

espectros de absorción de este tipo de moléculas son muy sensibles a los sustituyentes que presentan sus anillos aromáticos. ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. En el caso de CBQX3, ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 78), tiene una banda de absorción entre 535 nm y 675 nm en la que se encuentran dos máximos de absorción a 595 nm y a 654 nm, respectivamente (Figura 79), produciéndose un solapamiento espectral en mayor medida que con BHQ2 (Figura 80).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 78. Estructura molecular del derivado fosforamidita de CBQX3.

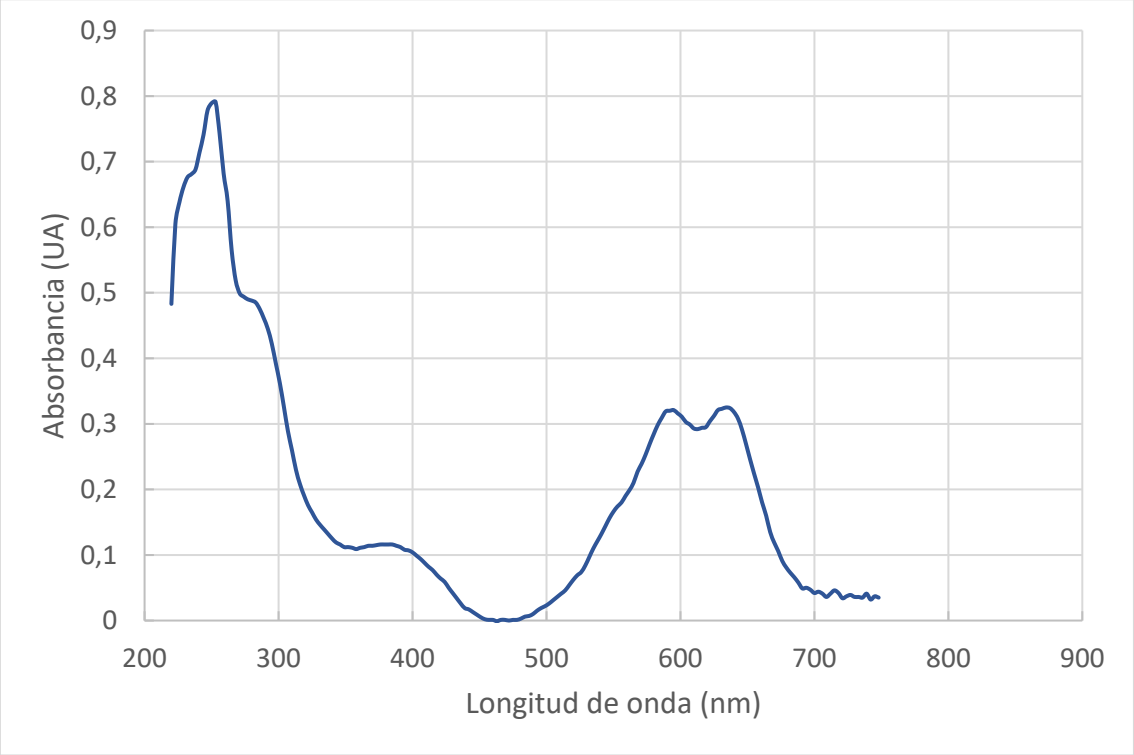


Figura 79. Espectro de absorción de CBQX3 en acetonitrilo.

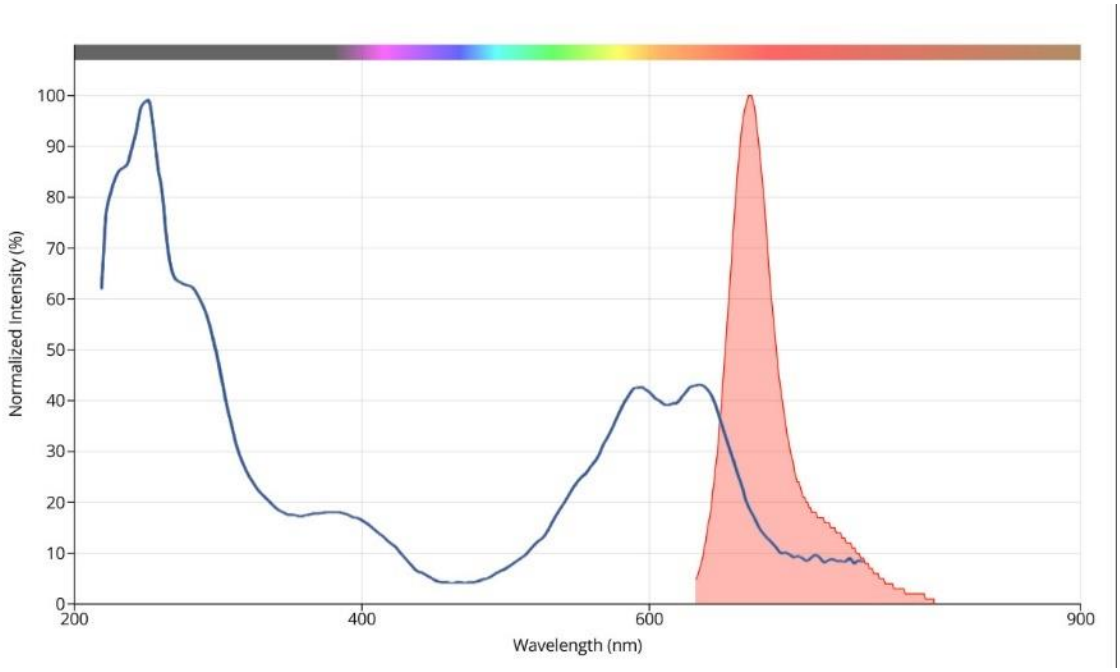


Figura 80. Superposición del espectro de absorción de CBQX3 (línea contínua azul) con el espectro de emisión de ROX (línea continua rellena roja). Imagen modificada obtenida de ATT BIOQUEST[9].

La molécula del quencher CBQX3 lleva incorporado un grupo fosforamidita que le permite introducirse al ciclo de síntesis del método de la amidita. Sin embargo, ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***, sólo puede ocupar posiciones terminales en una síntesis por este método. Es por ello por lo que se empleó una estrategia diferente al resto de los quenchers utilizados y es que fue necesario el uso de un *asymmetic doubler*. ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 81).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 81. Estructura molecular del asymmetric doubler.

La estrategia seguida para la síntesis de sondas con Cy5 con *asymmetic doubler*, usando un sintetizador automático, fue la siguiente (Figura 82):

1. Se hace reaccionar un CPG universal con el *asymmetic doubler* para crear un punto de funcionalización múltiple.
2. Se desprotege el grupo hidroxilo unido al grupo DMT.
3. Se hace reaccionar el quencher CBQX3 con la posición libre del *asymmetic doubler*.
4. Se desprotege el grupo hidroxilo unido al grupo levulinato ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad).***
5. Se hace reaccionar la fosforamidita de la base del extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido con la posición libre del *asymmetic doubler*. Para ello hubo que diseñar un nuevo método de síntesis Dig.Met.5 ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.
6. Se elonga el oligonucleótido según el método sintético habitual.
7. Se incorpora el Cy5 en el extremo 3' del oligonucleótido.

Dado que el rendimiento de acoplamiento de las fosforamiditas de ácidos nucleicos es mayor que para las fosforamiditas de otros aditivos, se decidió incorporar el CBQX3 en primer lugar, en el extremo protegido por el DMT, mientras que la cadena de DNA se elongó a partir del extremo

protegido por el levulinato, tal y como se describe en el método anterior. De esta forma, el reactivo que se espera que tenga una menor reactividad se incorpora en una etapa más inicial, en la que tiene más posibilidades de reaccionar.

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 82. Esquema de la reacción de la síntesis de una sonda Cy5 con el quencher CBQX3 usando el asymmetric doubler ***(Estructura del quencher omitida por motivos de confidencialidad)****.*

Se confirmó que los protocolos utilizados de digestión, purificación, análisis y masas ya desarrollados para sondas BHQ2-Cy5 (Tabla 28), no tenían ninguna incompatibilidad con las sondas CBQX3-Cy5. Los protocolos finales para la elaboración de sondas Cy5 con CBQX3 se resumen en la Tabla 29.

Tabla 29. Resumen de los métodos utilizados de cada uno de los procesos del protocolo de elaboración de sondas Cy5 con CBQX3. 1: desprotección con hidrazina previa. 2:.se utilizaron fosforamiditas TAC y Fast CapA.

Proceso		Método
Síntesis	Asymetric Doubler	Sint.Met.3
	CBQX3	Sint.Met.4
	Primera base[1,2]	Sint.Met.2
	Secuencia de nucleótidos[2]	Sint.Met.1
	Fluoróforo	Sint.Met.2
Digestión		Dig.Met.7
HPLC		Pur.Met.2
UPLC		Ana.Met.1
Masas		Mass.Met.1

II.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE SÍNTESIS, DIGESTIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SISTEMAS PRIMER-SONDA

Históricamente, las sondas de hidrólisis marcaron el origen de la qPCR y siguen teniendo una contribución importante a la hora de formar parte de los tests para la detección de DNA. Sin embargo, las necesidades de detectar pequeñas variaciones en las secuencias de DNA o de aumentar la especificidad de las sondas usadas ha hecho que se desarrollen sondas con mecanismos de acción y arquitecturas diferentes a las sondas de hidrólisis. La síntesis de estos productos ha supuesto en muchos casos la modificación del método de síntesis de oligonucleótidos establecido en la sección anterior para adaptarlo a las nuevas necesidades. A continuación, se describe el estudio realizado con cada una de las arquitecturas de sondas desarrolladas.

II.2.1. MOLECULAR BEACON

Los *molecular beacons* (balizas moleculares) son un tipo de sonda de hibridación que se caracterizan por un funcionamiento sencillo y su elevada sensibilidad y especificidad. Consisten en una hebra de DNA monocatenario que adopta una estructura en horquilla, gracias a la hibridación entre secuencias complementarias que se encuentran en los extremos de la sonda. Los *molecular beacons* están marcados con un fluoróforo en el extremo 5’ y un quencher en el extremo 3’. En estado basal y en ausencia de molécula objetivo, la hibridación entre las secuencias complementarias produce una aproximación muy estrecha entre fluoróforo y

quencher que induce un apantallamiento de la fluorescencia por *quenching* estático. En presencia de la secuencia a detectar, la hibridación con la sonda produce una apertura de la estructura, separando espacialmente ambos extremos y generando la señal fluorescente [46]. Los *molecular beacons* suelen tener una longitud de entre 25 y 35 nucleótidos y se dividen en dos partes principales que le proporcionan su particular funcionalidad: el tallo (*stem*) y el aro (*loop*). El tallo se corresponde con los últimos 5-7 nucleótidos de cada uno de los extremos terminales. Su complementariedad es la que permite la formación de la estructura en horquilla. El aro es la región monohebra de 18-30 nucleótidos encargada de reconocer e hibridar la secuencia objetivo produciendo la apertura de la estructura (Figura 83).

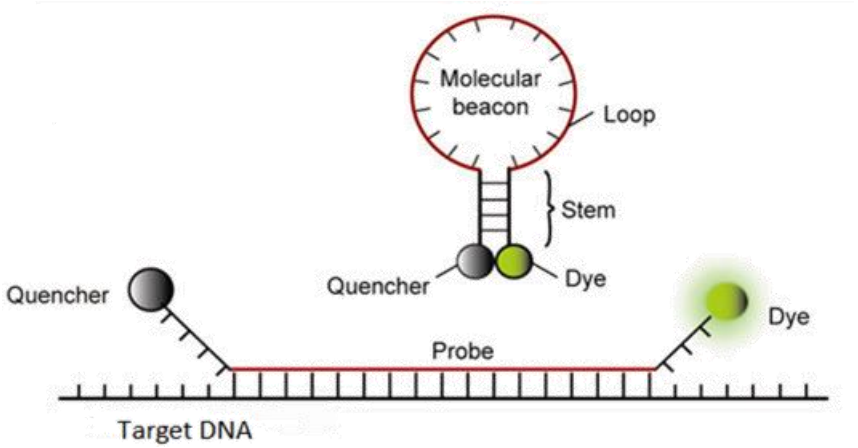


Figura 83. Principio funcional de la sonda molecular beacon. Imagen adaptada[47].

En comparación con las sondas lineales, una de las ventajas más significativas de los *molecular beacons* es la mayor especificidad con la que reconocen las secuencias diana, pudiendo llegar a discriminar SNPs en ensayos multiplex de qPCR[48–53]. Su mayor especificidad se atribuye a la transición entre tres fases al interactuar con las dianas. La estructura en horquilla del *molecular beacon* en estado nativo es menos estable que el dúplex con una diana correcta, pero más estable que el dúplex con una diana no totalmente complementaria (Figura 84).[54]

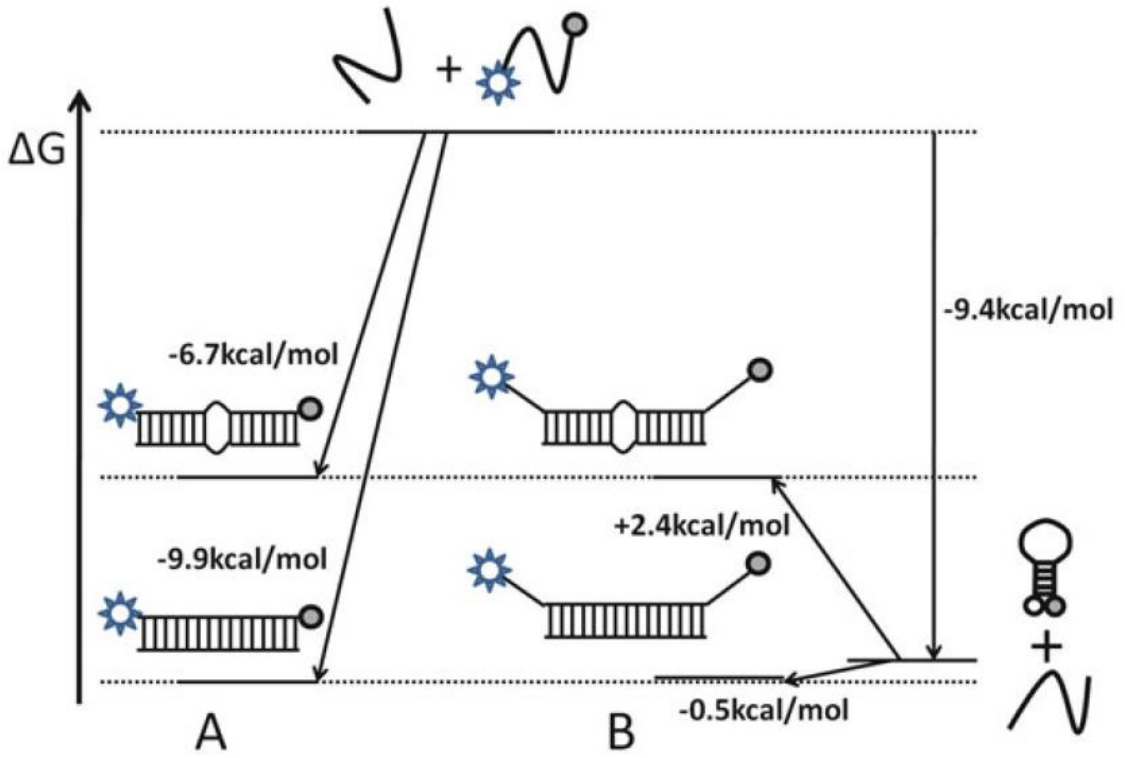


Figura 84. Diagrama de energía libre de hibridación. a) Sonda lineal de 15 bases. Cada una de las flechas indica el salto de energía de la sonda hibridada con la secuencia objetivo y la secuencia mismatch. b) Molecular beacon con un aro y un tallo de 15 y 13 bases respectivamente. Imagen obtenida de la fuente Yang et al. 2013[55]

Para que este fenómeno suceda y se produzca la detección discriminatoria entre secuencias tan similares es necesario un correcto diseño de ambas partes de la sonda. Éste se realiza de forma secuencial empezando por el aro. El diseño de la secuencia del aro es idéntico al de cualquier otra sonda de DNA, en el que se busca que sea complementaria a la sección del amplicón que se quiera detectar. La secuencia se diseña para que tenga una Tm entre 7-10°C mayor que la temperatura de hibridación del ensayo de qPCR y procurando que no forme estructuras secundarias intracatenarias. Este diseño se realiza utilizando herramientas bioinformáticas.[56]

Una vez terminado el proceso de elección de la secuencia del aro, se continua con el diseño de las secuencias del tallo. En este caso, el objetivo principal es tener una Tm por debajo de la del aro respecto a su secuencia objetivo y por encima de la del aro respecto a la secuencia mutada, además de estar entre 7 y 10°C por encima de la temperatura de detección del ensayo de qPCR. Para lograrlo, se modifica tanto la longitud como el contenido de bases GC en base a las características del ensayo. Normalmente, los tallos tienen una longitud de 5 a 7 bases con un alto contenido de GCs (entre el 75 y el 100%).[49] Para estimar la Tm del tallo se pueden utilizar programas de plegamiento de DNA como UNAfold.[57] De forma aproximada, tallos de 5 pares de bases ricos en GC tienen una Tm entre 55 y 60°C; tallos de 6 pares de bases ricos en GC tienen una Tm entre 60 y 65°C; y tallos de 7 pares de bases ricos en GC tienen una Tm entre 65 y 70°C.[58]

A priori, en términos de síntesis, purificación y análisis, los *molecular beacons* son prácticamente idénticos a las sondas de hidrólisis simples del apartado anterior[55]. Sin embargo, existe una serie de factores lo suficientemente significativos que los diferencia. En primer lugar, respecto a la síntesis, los *molecular beacons* son más largos por definición, lo que supone más ciclos de síntesis y, por lo tanto, rendimientos globales menores. A este aspecto también contribuye la riqueza de GCs en las secciones correspondientes al tallo. En relación a la purificación, además de que rendimientos de síntesis menores implican purificaciones más complejas, la formación de

estructuras secundarias modifica el comportamiento del oligonucleótido al atravesar la fase estacionaria de la columna, reduciendo los tiempos de retención respecto a las sondas de hidrólisis. Los ensayos iniciales llevados a cabo permitieron establecer un protocolo de elaboración sin ningún cambio significativo adicional a los desarrollados anteriormente para cada una de las sondas.

II.2.2. COOPERATIVE PRIMERS

Los *cooperative primers* (primers cooperativos) son un tipo de sonda compleja de hidrólisis. Su principal característica es que son una combinación de una sonda con su primer asociado, unido mediante un puente de polietilenglicol. Inicialmente desarrollados para evitar la formación de dímeros de primers en las reacciones de qPCR[59], con el diseño adecuado de sus partes pueden ser utilizados para la discriminación de SNPs[60]. El funcionamiento de los *cooperative primers* se basa en que la hibridación de la sonda, situada en 5', presenta una gran afinidad por la secuencia a detectar (denominada *capture*), lo que facilita la hibridación del primer situado en 3'. Este primer tiene un Tm más restrictivo, habitualmente por debajo de la temperatura del ensayo, haciendo que el evento de hibridación sólo ocurra por la proximidad entre las hebras de DNA. El puente de varias unidades de polietilenglicol actúa a dos niveles. En un primer nivel, ejerce de brazo "bisagra" que mantiene unidos los dos componentes principales de la sonda a la vez que permite la movilidad del primer para que se puedan producir los eventos de reconocimiento de la secuencia. En un segundo nivel, actúa de bloqueador de la DNA polimerasa, para evitar que se produzca elongación a partir de la secuencia de la sonda. La dinámica molecular para la generación de la señal se produce de manera secuencial. Primero, la sonda reconoce el DNA objetivo, después gracias a la proximidad entre hebras, el primer más restrictivo hibrida y se produce la amplificación del DNA, digiriéndose la secuencia de la sonda por la actividad nucleasa de la polimerasa y separando en el espacio fluoróforo y quencher, generando la señal fluorescente (Figura 85).

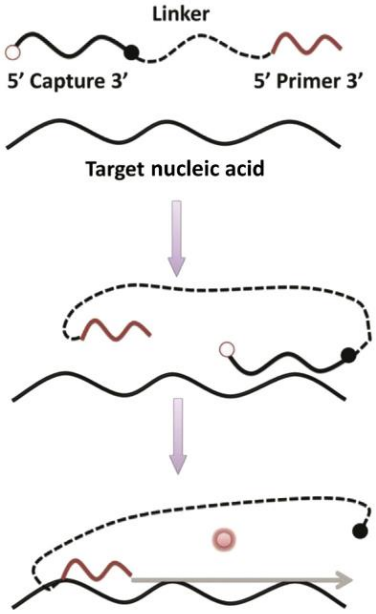


Figura 85. Dinámica de reconocimiento y generación de la señal fluorescente de los cooperative primers. *Imagen obtenida de Satterfield et al.*[59]

El protocolo de trabajo con los *cooperative primers* asegura que toda hibridación del primer genere una señal fluorescente, lo que la convierte en una sonda muy sensible. Para la

discriminación de SNPs la arquitectura de los *cooperative primers* permite actuar en el diseño a nivel de primer y a nivel de sonda. La Tm de ambas partes tiene que ser muy restrictiva, siendo siempre menor la del primer, con secuencias de tamaños más cortos que en los ensayos habituales[60]. Sin embargo, los criterios para este diseño no están establecidos. Los *cooperative primers* ya han sido utilizados en ensayos de qPCR para la detección de microorganismos como *M. tuberculosis*[59] y *Plasmodium malariae* y *Plamodium ovale*[61].

En términos de síntesis, purificación y análisis, los *cooperative primers*, la incorporación de 6 unidades de polietilenglicol supone una pequeña dificultad añadida respecto a las sondas de hidrólisis, ya que la incorporación de esta cadena supone una reducción parcial del rendimiento de la síntesis. Además, al ser una arquitectura compuesta por la combinación de sonda y primer, también se trata de moléculas de cadena larga, las cuales llevan asociados rendimientos globales inferiores, resultado de la suma de más etapas de síntesis. En cuanto a la purificación, se desconocía cómo afectan las diferentes estructuras que pudieran formar los diferentes componentes a su interacción con la columna.

Los ensayos iniciales llevados a cabo permitieron establecer un protocolo de elaboración modificando ligeramente los desarrollados anteriormente para cada una de las sondas. La principal diferencia fue la división del método de síntesis en las partes correspondientes de los diferentes componentes de los *cooperative primers* (sonda, puente de polietilenglicol y primer). Para la introducción de la cadena de polietilenglicol se usó el método Sint.Met.4 ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** para todas las inserciones realizadas de fosforamiditas de fluoróforos, *quenchers* o modificadores químicos.

II.2.3. SCORPIONS

Los *scorpions* son un tipo de sonda de hibridación compleja. Comparte características con las arquitecturas de los *molecular beacons* y de los *cooperative primers*. Los *scorpions* combinan primer y sonda unidos por una molécula de polietilenglicol al igual que los *cooperative primers*, salvo que en los *scorpions* el polietilenglicol sólo actúa como bloqueador de la DNA polimerasa. La parte de la sonda tiene estructura de *molecular beacon*, con su característica horquilla apantallada por *quenching* estático[62]. Su secuencia es complementaria a la de un determinado fragmento de la hebra de DNA objetivo. La generación de la señal fluorescente se inicia con el reconocimiento de la secuencia diana por el componente primer del *scorpion*. Gracias a la DNA polimerasa, a partir de este primer se producirá la elongación de su secuencia durante la reacción de qPCR. Durante la etapa de elongación del primer, llega un momento en el que se replica la sección de la secuencia objetivo complementaria a la secuencia del aro del componente de la sonda. En ciclos posteriores, esta parte de la sonda hibridará con el componente primer elongado, separando quencher y fluoróforo a una distancia tal entre ellos que anulará el efecto FRET y se producirá la señal fluorescente[62] (Figura 86).

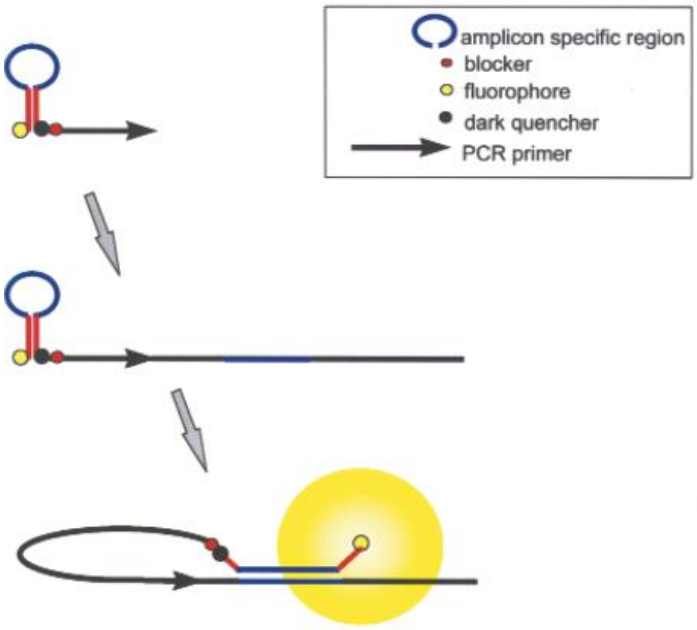


Figura 86. Estructura y dinámica de generación de señal de la sonda scorpion[62].

Este tipo de estructura hace de todo este mecanismo de reconocimiento y señalización un mecanismo unimolecular, a diferencia de otros sistemas de primers-sondas usados en qPCR. Esta particularidad le proporciona unas características interesantes a nivel de qPCR[63], entre ellas la capacidad de diferenciar entre SNPs[64]. La fidelidad de los *scorpions* se ha demostrado siendo utilizados para el desarrollo de ensayos en qPCR[65–67] y para la discriminación de SNPs[64,68].

El diseño de las sondas *scorpion* se realiza a tres niveles: primer, aro de la sonda y tallo de la sonda. En los tres casos se utilizan las herramientas ya usadas previamente para los *molecular beacons*. Sin embargo, a la hora del diseño hay que tener en cuenta que la secuencia de la sonda tiene que estar entre 1 y 40 bases alejada del primer al que se va a anclar y que se diseña dirigida a la secuencia complementaria del primer.

En términos de síntesis, purificación y análisis, los *scorpions* son muy similares a los *cooperative primers*. La unidad de polietilenglicol que se incorpora reduce el rendimiento total de la síntesis y, al tratarse de arquitecturas tan complejas, sus secuencias son generalmente más largas que las sondas habituales, lo que conlleva más etapas de síntesis y, por lo tanto, rendimientos menores. La purificación también podría llegar a ser compleja debido a la estructura secundaria que adoptan, que combina una región con estructura de horquilla además de la secuencia monohebra del fragmento del primer.

Los ensayos llevados a cabo para la síntesis de estas especies permitieron establecer un protocolo de elaboración similar al de los *cooperative primers* ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***. Para la síntesis de la zona del polietilenglicol, se usó el método Sint.Met.4 ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** para realizar todas las inserciones de fosforamiditas de fluoróforos, *quenchers* o modificadores químicos.

II.2.4. MGB

Los *Minor Groove Binders* (MGB) son un conjunto de moléculas generalmente compuestas por estructuras heterocíclicas con numerosos residuos amino cuya característica común es su gran

afinidad por el surco menor de la doble hélice del DNA[69]. Tienen una gran variedad de usos, desde fármacos[70] hasta su uso en PCR como bloqueantes de la extensión de primers, inhibidores de miRNAs e incluso en sondas de hidrólisis en ensayos de qPCR[71,72]. Los MGB suelen tener presente la estructura del tripéptido de dihidropirrolindol-carboxilato ($CDPI_3$) cuya afinidad por el DNA está mediada por interacciones hidrofóbicas y de Van de Wals, principalmente centradas en secuencias ricas en A/T como G/C en un región de 5 bases aproximadamente[73]. Los MGB se pueden incorporar a la estructura de una sonda de hidrólisis, lo que hace que aumente su Tm en un valor variable (entre 12 y 16°C) y se pueda acortar la longitud de la sonda a la vez que aumenta su especificidad[74]. La disponibilidad de su forma CPG facilita su incorporación a la secuencia de DNA (Figura 87).

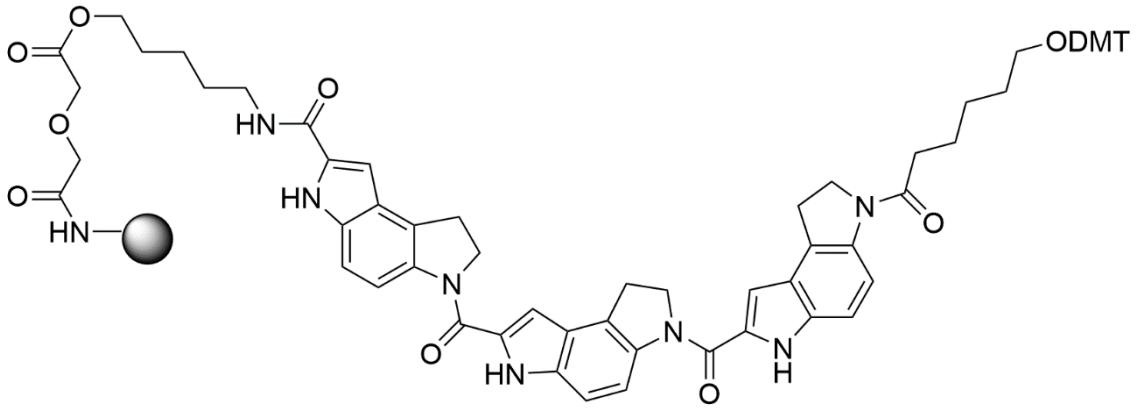


Figura 87. Estructura molecular del MGB $CDPI_3$[73].

Las sondas de hidrólisis con MGB son idénticas a nivel de ensayo de qPCR. En cuanto al diseño para poder discriminar entre SNPs, las sondas deberán acortarse para que cada nucleótido tenga una mayor contribución individual en el reconocimiento de la secuencia objetivo y que un *mismatch* pueda impedir la hibridación.

La adaptación de los métodos de síntesis de oligonucleótidos para la síntesis de sondas con MGBs presentó un mayor grado de dificultad que las desarrolladas previamente. Esta dificultad adicional procede del uso de fosforamiditas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** y que, durante la etapa de oxidación con yodo, los residuos de indol son susceptibles de ser iodados[75]. Para evitarlo, durante la reacción de oxidación se pasó a utilizar ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, por lo que se tuvieron modificar los tiempos de todas las rutinas utilizadas en el sintetizador. Al usar fosforamiditas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, las digestiones para todos los fluoróforos fueron con el método Dig.Met.7. Por último, debido al carácter cambio de solubilidad de la sonda que provoca la incorporación del MGB se crearon nuevos métodos de elución con unos tramos de ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** para HPLC y masas (Tabla 30).

Tabla 30. Condiciones del método de purificación Pur.Met.3 y el método de análisis de masas Mass.Met.2. %A: porcentaje de la fase móvil ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****. %B: porcentaje de la fase móvil* ***(información omitida por motivos de confidencialidad)****.*

		Pur.Met.3			Mass.Met.2		
Gradiente	Tramo	Minuto	%A	%B	Minuto	%A	%B
	I	0	XX[(a)]	XX[(a)]	0	XX[(a)]	XX[(a)]
	II	1	XX[(a)]	XX[(a)]	5	XX[(a)]	XX[(a)]
	III	6	XX[(a)]	XX[(a)]	10	XX[(a)]	XX[(a)]
	IV	9	XX[(a)]	XX[(a)]	12	XX[(a)]	XX[(a)]
	V	18	XX[(a)]	XX[(a)]	15	XX[(a)]	XX[(a)]
	VI	28	XX[(a)]	XX[(a)]	16	XX[(a)]	XX[(a)]
	VII	30	XX[(a)]	XX[(a)]	-	-	-
	VIII	35	XX[(a)]	XX[(a)]	-	-	-
	IX	40	XX[(a)]	XX[(a)]	-	-	-
Flujo (mL/min)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		
Volumen de inyección (µL)	-	XX[(a)]			XX[(a)]		

[(a)]: Dato omitido por motivos de confidencialidad.

II.2.5. LNAs

Los LNAs (*Locked Nucleic Acids*) son ribonucleótidos modificados en la ribosa con un puente metileno entre el 2'-O y el 4'-C. Este cambio introducido produce un bloqueo conformacional de la estructura de la molécula de la ribosa en la forma C3'-endo, lo que mejora su estabilidad. Cuando un LNA forma parte de la secuencia de un oligonucleótido produce un aumento de la Tm del mismo respecto a su homólogo de DNA, incrementándola de 3 a 9°C dependiendo de la base. Además, los LNAs presentan una mayor resistencia a la degradación por exonucleasas (ideal para el análisis de muestras biológicas) y una buena solubilidad en agua, disolvente donde ocurre la reacción de PCR[76].

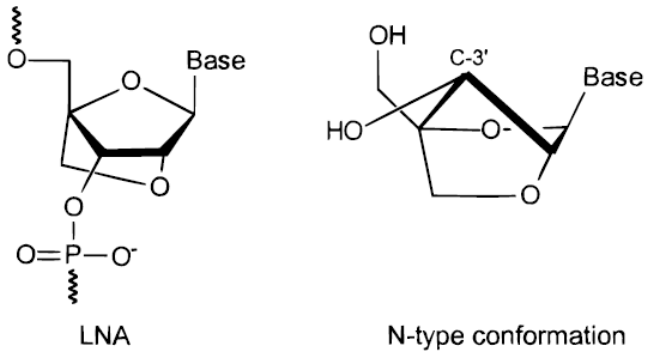


Figura 88. Estructura molecular de una base LNA y su conformación bloqueada en C3'-endo[77].

Generalmente, los LNAse incorporan en sondas de hibridación en la que sustituyen de bases DNA naturales por bases LNA para crear sondas híbridas DNA-LNA. Esta modificación produce, por un lado, el aumento general de la Tm de la sonda, lo que mejora su hibridación con la secuencia objetivo al estabilizar la formación del dúplex[78]. Esta unión más fuerte permite un acortamiento de la longitud de la sonda a la vez que aumenta su especificidad y facilita la discriminación entre SNPs. El uso de LNAs permite un alto grado de edición de las sondas en su diseño porque se actúa a nivel de nucleótido. El diseño de sondas LNA para la detección y

discriminación de SNPs viene condicionado por la base mutada de la secuencia objetivo. De forma general, existen unos criterios generales para realizar el diseño de sondas LNA para SNPs:

- ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***.

Para el diseño de las secuencias de sondas híbridas LNA-DNA se han utilizado herramientas computacionales. Una de ellas realiza un cálculo estimado de la Tm que tiene una sonda LNA. La segunda hace una estimación, en valores numéricos (scores), la formación de estructuras secundarias intracatenarias y la formación de dímeros de sonda. Estos valores tienen que estar lo más cercanos al rango de 15-25 para estructuras secundarias y 25-35 para dímeros. Superados estos valores es posible que el papel de la sonda diseñada no sea el óptimo.

La disponibilidad de las fosforamiditas de los LNAs de cada una de las fases permitió la fácil incorporación al proceso sintético, sin embargo, utilizando las condiciones habituales para el acoplamiento de nucleótidos, se obtuvieron peores rendimientos. La mejora de la etapa de acoplamiento suponía aumentar la concentración de activador ***(Información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** para proporcionar resultados óptimos. Otra modificación introducida en los métodos habituales fue debida a la naturaleza de los grupos protectores. Las bases de LNA están protegidas por grupos Bz, ac y dmf, lo que hace necesario usar métodos más suaves en el caso de sondas con Cy5. Por ese motivo, las sondas LNA con Cy5 se digirieron según el método Dig.Met.8 ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Cabe resaltar que las sondas ROX-LNA es un producto diferencial y exclusivo que no está ofertado en el mercado lo que ofrece una ventaja sobre los competidores ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.

CONCLUSIONES

El trabajo recogido a lo largo de este capítulo ha permitido establecer las condiciones adecuadas para la síntesis de sondas funcionales para su uso en qPCR. Se puede resumir:

- Los quenchers adecuados para las sondas que usan FAM como fluoróforo son BHQ1 y CBQX, de forma indistinta.
- Los quenchers adecuados para las sondas que usan HEX y SIMA-HEX como fluoróforo son BHQ1, BHQ2 y CBQX, de forma indistinta.
- Los quenchers adecuados para las sondas que usan ROX como fluoróforo son BHQ2, Eclipse y NeoEclipse, de forma indistinta. El protocolo de elaboración de este tipo de sondas desarrollado en este trabajo se ha realizado en torno al uso de Eclipse y NeoEclipse, logrando resultados casi al mismo nivel con BHQ2.
- Los quenchers adecuados para las sondas que usan Cy5 como fluoróforo son BHQ3, BBQ650 y CBQX3, de forma indistinta. El protocolo de elaboración de este tipo de sondas desarrollado en este trabajo se ha realizado en torno al uso de CBQX3, logrando resultados casi al mismo nivel con BHQ3 y BBQ650.
- Se han optimizado las condiciones de síntesis para sondas con FAM, estableciendo un método casi general para la síntesis de sondas. Pequeñas modificaciones sobre este método han permitido establecer métodos de síntesis para sondas con HEX, SIMA-HEX y Cy5.
- El fluoróforo HEX se degrada ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. SIMA-HEX es un fluoróforo resistente a estas condiciones que se puede intercambiar por HEX sin que afecte a la funcionalidad de la sonda.

- El método de síntesis de sondas con ROX incorpora una etapa de formación de un enlace amida por activación de un grupo carboxilato con ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** desarrollada en este trabajo.
- El método de síntesis de sondas con Cy5 requiere del uso de bases protegidas con ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** para su desprotección.
- El método de síntesis de sondas con CBQX3 requiere del uso de un *asymmetic doubler* dentro de una estrategia de síntesis ortogonal.
- Se han optimizado las condiciones de digestión para sondas con FAM, estableciendo un método casi general para la síntesis de sondas. Pequeñas modificaciones sobre este método han permitido establecer métodos de digestión para sondas con HEX, SIMA-HEX, ROX y Cy5.
- Se han optimizado las condiciones de purificación para sondas con FAM, estableciendo un método casi general para la síntesis de sondas. Pequeñas modificaciones sobre este método han permitido establecer métodos de purificación para sondas con HEX, SIMA-HEX, ROX y Cy5.
- Se han optimizado las condiciones de análisis por UPLC y masas para sondas con FAM, estableciendo un método general para la síntesis de sondas. El uso de CPG-quencher permite mejorar las etapas de síntesis. En el caso de no disponer de esta especie, se han diseñado rutas sintéticas alternativas.
- Se han establecido protocolos de trabajo que permiten obtener sondas funcionales, en las que se han analizado sus parámetros de calidad y se han convertido en artículos comerciales.
- Se han optimizado las condiciones de síntesis, digestión, purificación y análisis de sondas *molecular beacons*, *cooperative primers*, *scorpions*, MGB y LNA. La elaboración de sondas LNA-ROX, permite la obtención de un producto comercial diferencial exclusivo.

Bibliografía

(1) Rahman, M.-M.; Lim, S.-J.; Park, Y.-C. Development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Based Triplex PCR Marker for Serotype-Specific Escherichia Coli Detection. *Pathogens* **2022**, *11* (2), 115. https://doi.org/10.3390/pathogens11020115.

(2) Nelson, M. R.; Marnellos, G.; Kammerer, S.; Hoyal, C. R.; Shi, M. M.; Cantor, C. R.; Braun, A. Large-Scale Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Gene Regions. *Genome Res.* **2004**, *14* (8), 1664–1668. https://doi.org/10.1101/gr.2421604.

(3) Elnifro, E. M.; Ashshi, A. M.; Cooper, R. J.; Klapper, P. E. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13* (4), 559–570.

(4) *biomers.net | Fluorescent dyes - biomers.net Oligonucleotides*. https://biomers.net/en/products/dyes.html (accessed 2024-07-23).

(5) Duan, Y.; Liu, M.; Sun, W.; Wang, M.; Liu, S.; Li, Q. X. Recent Progress on Synthesis of Fluorescein Probes. *Mini-Rev. Org. Chem. 6* (1), 35–43. https://doi.org/10.2174/157019309787316111.

(6) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51* (6), L7–L21. https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-P.

(7) Cook, M. P.; Ando, S.; Koide, K. One-Step Synthesis of a Fluorescein Derivative and Mechanistic Studies. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (39), 5284–5286. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.07.084.

(8) Appendix: Characteristics of Fluorescent Organic Compounds. In *Molecular Fluorescence*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012; pp 521–550. https://doi.org/10.1002/9783527650002.app1.

(9) *Fluorescence Spectrum Viewer | AAT Bioquest*. https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer (accessed 2024-02-09).
(10) *Glen Report 15.11 - Redmond red and yakima yellow dyes, and eclipse non-fluorescent quencher*. https://www.glenresearch.com/reports/gr15-11 (accessed 2024-02-12).
(11) Fillon, Y.; Creasey, T.; Xiang, Q.; Martínez, C. Oligonucleotide Synthesis and Purification. In *PCR Technology Current Innovations*; Nolan, T., Bustin, S. A., Eds.; CRC Press; pp 39–56.
(12) Septak, M. Kinetic Studies on Depurination and Detritylation of CPG-Bound Intermediates During Oligonucleotide Synthesis. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (15), 3053–3058. https://doi.org/10.1093/nar/24.15.3053.
(13) Seliger, H.; Sanghvi, Y. S. An Update on Protection of 5′-Hydroxyl Functions of Nucleosides and Oligonucleotides. *Curr. Protoc.* **2024**, *4* (3), e999. https://doi.org/10.1002/cpz1.999.
(14) *Glen Report 20.24 - Deprotection - Volume 1 - Deprotect to Completion*. https://www.glenresearch.com/reports/gr20-24 (accessed 2024-08-14).
(15) Sack, M.; Hölz, K.; Holik, A.-K.; Kretschy, N.; Somoza, V.; Stengele, K.-P.; Somoza, M. M. Express Photolithographic DNA Microarray Synthesis with Optimized Chemistry and High-Efficiency Photolabile Groups. *J. Nanobiotechnology* **2016**, *14* (1), 14. https://doi.org/10.1186/s12951-016-0166-0.
(16) Oligonucleotide Synthesis and Purication. In *PCR Technology*; Nolan, T., Bustin, S. A., Eds.; CRC Press, 2013.
(17) *5′-Fluorescein Phosphoramidite*. https://www.glenresearch.com/fluorophores/10-5901.html (accessed 2024-08-15).
(18) *Glen Report 8.21 - 5′ LABELLING - FLUORESCEIN AND CYANINE DYES, BIOTIN*. https://www.glenresearch.com/reports/gr8-21 (accessed 2024-08-15).
(19) *Glen Report 34-21: Deprotection — Volume 3 — Dye-Containing Oligonucleotides, an Update*. https://www.glenresearch.com/reports/gr34-21 (accessed 2024-08-17).
(20) *Glen Report 25.13 - Technical Brief - Side Reaction of Fluorescein during Deprotection with Methylamine*. https://www.glenresearch.com/reports/gr25-13 (accessed 2024-06-21).
(21) Gilar, M. Oligonucleotide Separation Technology: Synthesis Challenges and HPLC Isolation Options.
(22) Fountain, K. J.; Gilar, M.; Budman, Y.; Gebler, J. C. Purification of Dye-Labeled Oligonucleotides by Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B* **2003**, *783* (1), 61–72. https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00490-7.
(23) *Best Practices for Oligonucleotide Analysis Using Ion-Pair Reversed-Phase (IP-RP) Liquid Chromatography – Columns and Chemistries*. https://www.waters.com/nextgen/be/en/library/application-notes/2020/best-practices-for-oligonucleotide-analysis-using-ion-pair-reversed-phase-ip-rp-liquid-chromatography-columns-and-chemistries.html (accessed 2024-08-17).
(24) Sinha, N. D.; Jung, K. E. Analysis and Purification of Synthetic Nucleic Acids Using HPLC. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2015**, *61* (1), 10.5.1-10.5.39. https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1005s61.
(25) Li, P.; Wang, J.; Gao, Y.-H.; Wu, L.-Q.; Sheng, L.-H.; Fu, B.-Q. Analysis of Fluorescent Dye-Labeled Oligonucleotides by Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, *37* (12), 1722–1726. https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60149-8.
(26) *Multiple Primer Analyzer - ES*. Thermo Fisher Cientific, Inc: Waltham, 2006. https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html (accessed 2024-03-23).
(27) Wei, X. ChemInform Abstract: Coupling Activators for the Oligonucleotide Synthesis via Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3615–3637. https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.001.

(28) Cook, R. M.; Lyttle, M.; Dick, D. Dark Quenchers for Donor-Acceptor Energy Transfer. US8410255B2, April 2, 2013. https://patents.google.com/patent/US8410255B2/en (accessed 2024-06-21).
(29) Chuvilin, A. N.; Smirnov, I. P.; Mosina, A. G.; Varizhuk, A. M.; Pozmogova, G. E. A Solution to the Common Problem of the Synthesis and Applications of Hexachlorofluorescein Labeled Oligonucleotides. *PLoS ONE* **2016**, *11* (11), e0166911. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166911.
(30) Chuvilin, A. N.; Serebryakova, M. V.; Smirnov, I. P.; Pozmogova, G. E. Byproduct with Altered Fluorescent Properties Is Formed during Standard Deprotection Step of Hexachlorofluorescein Labeled Oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (8), 1441–1443. https://doi.org/10.1021/bc900076e.
(31) *Glen Report 21.110 - New Fluorescent Phosphoramidites - SIMA (HEX), DyLight™*. https://www.glenresearch.com/reports/gr21-110 (accessed 2024-06-14).
(32) Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*; Molecular Probes, 2002.
(33) Autofluorescence and Fluorescence Labeling in Biology and Medicine. In *Molecular Fluorescence*; 2012; pp 479–505. https://doi.org/10.1002/9783527650002.ch15.
(34) Uddin, Md. J.; Marnett, L. J. Synthesis of 5- and 6-Carboxy-X-Rhodamines. *Org. Lett.* **2008**, *10* (21), 4799–4801. https://doi.org/10.1021/ol801904k.
(35) *Protocol for Conjugating NHS-Ester Modifications to Amino-Labeled Oligonucleotides*. https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/genomics/pcr/nhs-ester-oligonucleotide-conjugation (accessed 2023-06-13).
(36) Ball, R. W. Process for Conjugation of Nhs Esters with Oligonucleotides. US20130158243A1, June 20, 2013. https://patents.google.com/patent/US20130158243A1/en (accessed 2023-06-12).
(37) Reed, M. W.; Lukhtanov, E. A.; Gall, A. A.; Dempcy, R. O. Fluorescent Quenching Detection Reagents and Methods. US6699975B2, March 2, 2004. https://patents.google.com/patent/US6699975B2/en (accessed 2024-07-30).
(38) Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 1973–2012. https://doi.org/10.1021/cr990402t.
(39) Levitus, M.; Ranjit, S. Cyanine Dyes in Biophysical Research: The Photophysics of Polymethine Fluorescent Dyes in Biomolecular Environments. *Q. Rev. Biophys.* **2011**, *44* (1), 123–151. https://doi.org/10.1017/S0033583510000247.
(40) Widengren, J.; Schwille, P. Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (27), 6416–6428. https://doi.org/10.1021/jp000059s.
(41) Shindy, H. A. Basics, Mechanisms and Properties in the Chemistry of Cyanine Dyes: A Review Paper. *Mini-Rev. Org. Chem. 9* (4), 352–360. https://doi.org/10.2174/157019312804699528.
(42) *Absorption Spectrum Viewer | AAT Bioquest*. https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer (accessed 2024-08-08).
(43) *Glen Report 22.18 - Deprotection – Volume 4 – Alternatives To Ammonium Hydroxide*. https://www.glenresearch.com/reports/gr22-18 (accessed 2024-08-18).
(44) Sinha, N. D.; Michaud, D. P.; Roy, S. K.; Casale, R. A. Synthesis of Oligodeoxynucleoside Methylphosphonates Utilizing the Tert-Butylphenoxyacetyl Group for Exocyclic Amine Protection. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (15), 3119–3123. https://doi.org/10.1093/nar/22.15.3119.
(45) Rodriguez, A. A.; Cedillo, I.; Mowery, B. P.; Gaus, H. J.; Krishnamoorthy, S. S.; McPherson, A. K. Formation of the N(2)-Acetyl-2,6-Diaminopurine Oligonucleotide Impurity Caused by Acetyl Capping. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (15), 3243–3246. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.06.025.
(46) Fang, X.; Li, J. J.; Perlette, J.; Tan, W.; Wang, K. Molecular Beacons: Novel Fluorescent Probes. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (23), 747A-753A. https://doi.org/10.1021/ac003001i.

(47) Tong, S.; Cradick, T. J.; Ma, Y.; Dai, Z.; Bao, G. Engineering Imaging Probes and Molecular Machines for Nanomedicine. *Sci. China Life Sci.* **2012**, *55* (10), 843–861. https://doi.org/10.1007/s11427-012-4380-1.

(48) Tan, L.; Li, Y.; Drake, T. J.; Moroz, L.; Wang, K.; Li, J.; Munteanu, A.; Chaoyong, J. Y.; Martinez, K.; Tan, W. Molecular Beacons for Bioanalytical Applications. *The Analyst* **2005**, *130* (7), 1002–1005. https://doi.org/10.1039/b500308n.

(49) Goel, G.; Kumar, A.; Puniya, A. K.; Chen, W.; Singh, K. Molecular Beacon: A Multitask Probe. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99* (3), 435–442. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02663.x.

(50) Orru, G.; Coghe, F.; Faa, G.; Pillai, S.; Manieli, C.; Montaldo, C.; Pilia, F.; Pichiri, G.; Piras, V.; Coni, P. Rapid Multiplex Real-Time PCR by Molecular Beacons for Different BRAF Allele Detection in Papillary Thyroid Carcinoma. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* **2010**, *19* (1), 1–8. https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181a23bd5.

(51) Orrù, G.; Faa, G.; Pillai, S.; Pilloni, L.; Montaldo, C.; Pusceddu, G.; Piras, V.; Coni, P. Rapid PCR Real-Time Genotyping of M-Malton Alpha1-Antitrypsin Deficiency Alleles by Molecular Beacons. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* **2005**, *14* (4), 237–242. https://doi.org/10.1097/01.pas.0000178221.44474.b3.

(52) Li, X.; Huang, Y.; Guan, Y.; Zhao, M.; Li, Y. Universal Molecular Beacon-Based Tracer System for Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (22), 7886–7890. https://doi.org/10.1021/ac061518+.

(53) Alsmadi, O.; Muiya, P.; Khalak, H.; Al-Saud, H.; Meyer, B. F.; Al-Mohanna, F.; Alshahid, M.; Dzimiri, N. Haplotypes Encompassing the KIAA0391 and PSMA6 Gene Cluster Confer a Genetic Link for Myocardial Infarction and Coronary Artery Disease. *Ann. Hum. Genet.* **2009**, *73* (Pt 5), 475–483. https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2009.00534.x.

(54) Wang, K.; Tang, Z.; Yang, C. J.; Kim, Y.; Fang, X.; Li, W.; Wu, Y.; Medley, C. D.; Cao, Z.; Li, J.; Colon, P.; Lin, H.; Tan, W. Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (5), 856–870. https://doi.org/10.1002/anie.200800370.

(55) *Molecular Beacons*; Yang, C. J., Tan, W., Eds.; New York, 2013.

(56) Vet, J. A. M.; Marras, S. A. E. Design and Optimization of Molecular Beacon Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2005**, *288*, 273–290. https://doi.org/10.1385/1-59259-823-4:273.

(57) Markham, N. R.; Zuker, L. S.; Zuker, M. *UNAFold*. "UNAFold" - "Unified Nucleic Acid Folding and hybridization package." http://www.unafold.org/ (accessed 2024-08-06).

(58) *molecular beacons*. https://www.molecular-beacons.org/MB_SC_design.html (accessed 2024-08-06).

(59) Satterfield, B. C. Cooperative Primers: 2.5 Million–Fold Improvement in the Reduction of Nonspecific Amplification. *J. Mol. Diagn.* **2014**, *16* (2), 163–173. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.10.004.

(60) Kent, J. O.; Christensen, M. C. Highly Selective Cooperative Primers for Multiplex Detection of Rare Mutations. bioRxiv July 23, 2021, p 2021.07.23.453558. https://doi.org/10.1101/2021.07.23.453558.

(61) Ansah, F.; Suurbaar, J.; Darko, D.; Anabire, N. G.; Blankson, S. O.; Domson, B. K. S.; Soulama, A.; Kpasra, P.; Chirawurah, J. D.; Amenga-Etego, L.; Kanyong, P.; Awandare, G. A.; Aniweh, Y. Development of Cooperative Primer-Based Real-Time PCR Assays for the Detection of Plasmodium Malariae and Plasmodium Ovale. *J. Mol. Diagn. JMD* **2021**, *23* (10), 1393–1403. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.07.022.

(62) Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S. P.; Brown, T.; Little, S. Detection of PCR Products Using Self-Probing Amplicons and Fluorescence. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (8), 804–807. https://doi.org/10.1038/11751.

(63) Carters, R.; Ferguson, J.; Gaut, R.; Ravetto, P.; Thelwell, N.; Whitcombe, D. Design and Use of Scorpions Fluorescent Signaling Molecules. In *Molecular Beacons: Signalling Nucleic Acid*

Probes, Methods, and Protocols; Marx, A., Seitz, O., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2008; pp 99–115. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-040-3_8.

(64) Thelwell, N.; Millington, S.; Solinas, A.; Booth, J.; Brown, T. Mode of Action and Application of Scorpion Primers to Mutation Detection. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (19), 3752–3761.

(65) Nolan, T.; Bustin, S. A. *PCR Technology : Current Innovations, Third Edition*; Taylor & Francis Group: Milton, UNITED KINGDOM, 2013.

(66) Hart, K. W.; Williams, O. M.; Thelwell, N.; Fiander, A. N.; Brown, T.; Borysiewicz, L. K.; Gelder, C. M. Novel Method for Detection, Typing, and Quantification of Human Papillomaviruses in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39* (9), 3204–3212. https://doi.org/10.1128/jcm.39.9.3204-3212.2001.

(67) Saha, B. K.; Tian, B.; Bucy, R. P. Quantitation of HIV-1 by Real-Time PCR with a Unique Fluorogenic Probe. *J. Virol. Methods* **2001**, *93* (1), 33–42. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00288-3.

(68) Solinas, A.; Brown, L. J.; McKeen, C.; Mellor, J. M.; Nicol, J.; Thelwell, N.; Brown, T. Duplex Scorpion Primers in SNP Analysis and FRET Applications. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (20), e96. https://doi.org/10.1093/nar/29.20.e96.

(69) Paul, A.; Nanjunda, R.; Kumar, A.; Laughlin, S.; Nhili, R.; Depauw, S.; Deuser, S. S.; Chai, Y.; Chaudhary, A. S.; David-Cordonnier, M.-H.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. Mixed up Minor Groove Binders: Convincing A·T Specific Compounds to Recognize a G·C Base Pair. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (21), 4927–4932. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.005.

(70) Paul, A.; Guo, P.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. A New Generation of Minor-Groove-Binding—Heterocyclic Diamidines That Recognize G·C Base Pairs in an AT Sequence Context. *Molecules* **2019**, *24* (5), 946. https://doi.org/10.3390/molecules24050946.

(71) Sylvain, K.; Aurélie, H.; Marc, M.; Christophe, R. Rapid Screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR Assay Using Sequence-Specific Primers and a Minor Groove Binder Probe, a Novel Type of TaqMan™ Probe. *J. Immunol. Methods* **2004**, *287* (1), 179–186. https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.01.027.

(72) Chen, J.; Chen, F.; Zhou, Q.; Li, W.; Chen, Y.; Song, Y.; Zhang, X.; Xue, C.; Bi, Y.; Cao, Y. Development of a Minor Groove Binder Assay for Real-Time PCR Detection of Porcine Sapelovirus. *J. Virol. METHODS* **2014**, *198*, 69–74. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.12.003.

(73) *TaqMan probes based on oligonucleotide-hairpin minor groove binder conjugates | Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. https://link.springer.com/article/10.1134/S1068162007060143 (accessed 2024-07-05).

(74) Kutyavin, I. V.; Afonina, I. A.; Mills, A.; Gorn, V. V.; Lukhtanov, E. A.; Belousov, E. S.; Singer, M. J.; Walburger, D. K.; Lokhov, S. G.; Gall, A. A.; Dempcy, R.; Reed, M. W.; Meyer, R. B.; Hedgpeth, J. 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes Increase Sequence Specificity at PCR Extension Temperatures. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (2), 655–661. https://doi.org/10.1093/nar/28.2.655.

(75) *Glen Report 29.11 - CDPI₃ MGB™-Oligonucleotide conjugates and their applications*. https://www.glenresearch.com/reports/gr29-11 (accessed 2024-08-26).

(76) *Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties | SpringerLink*. https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-004-4926-6 (accessed 2023-06-13).

(77) *LNA (Locked Nucleic Acid): An RNA Mimic Forming Exceedingly Stable LNA:LNA Duplexes | Journal of the American Chemical Society*. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja9822862 (accessed 2023-06-12).

(78) Kaur, H.; Arora, A.; Wengel, J.; Maiti, S. Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes. *Biochemistry* **2006**, *45* (23), 7347–7355. https://doi.org/10.1021/bi060307w.

(79) You, Y.; Moreira, B. G.; Behlke, M. A.; Owczarzy, R. Design of LNA Probes That Improve Mismatch Discrimination. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (8), e60. https://doi.org/10.1093/nar/gkl175.
(80) *Tm Prediction | GeneGlobe*. https://geneglobe.qiagen.com/us/tools/tm-prediction (accessed 2024-08-01).
(81) *LNA Oligo Optimizer | GeneGlobe*. https://geneglobe.qiagen.com/us/tools/lna-oligo-optimizer (accessed 2024-08-01).

III. CAPÍTULO 2: DISEÑO DE SONDAS LNA Y PROYECTOS qPCR

Todo el trabajo realizado durante el **Capítulo 1**: Elección del sistema Primer - Sonda, proporcionó la capacidad de elaborar diferentes tipos de arquitectura de sonda en los 4 principales fluoróforos utilizados de forma habitual en los ensayos de qPCR. La valoración de estas arquitecturas resultó en la elección de las sondas LNA por diferentes motivos que se adecuaban a las necesidades y características del proyecto:

- Alto nivel de diseño: el diseño/edición de sondas LNA ocurre a nivel de nucleótido, proporcionando una gran cantidad de posibilidades y versatilidad.
- Rendimiento de síntesis: por su longitud reducida y altos niveles de acoplamiento durante la síntesis del oligonucleótido, se obtienen gran cantidad de sonda por protocolo de elaboración.
- Apantallamiento de la fluorescencia altamente eficiente: también debido a su corta cadena, *quencher* y fluoróforo se encuentran más próximos en el espacio, lo que beneficia el efecto FRET.
- Compatibilidad con ensayos multiplex. Su estructura sencilla no produce interferencias en los ensayos multiplex de qPCR al producirse interacciones entre componente de la reacción.
- Compatibilidad con los protocolos de elaboración de los fluoróforos.

Todo esto, junto con las directrices iniciales descritas en la bibliografía[1], supuso un punto de partida sólido para el diseño de sondas específicas con capacidad discriminatoria de SNPs de los microorganismos patógenos y de polimorfismos humanos asociados a enfermedades de más demanda para Certest Biotec S.L. en el momento del desarrollo de la tesis doctoral.

III.1. PATÓGENOS

III.1.1. *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*. CEPAS HIPERVIRULENTAS.

Clostridium difficile es un bacilo grampositivo, anaerobio estricto, capaz de formar esporas que le permiten su supervivencia en aguas, suelos y ambientes hospitalarios. Su transmisión por vía orofecal facilita que las superficies, objetos médicos y personal infectados se conviertan en una fuente de infección intrahospitalaria, llegándose a considerar el principal agente causal de diarrea nicosomial asociada al tratamiento con antibióticos, colitis pseudomembranosa e incluso complicaciones como la colitis fulminante[2]. No todas las cepas son nocivas, sólo aquellas que codifican las toxinas (toxina binaria A y B) que producen los síntomas antes mencionados en los pacientes. Su tratamiento es cada vez más difícil debido a la creciente tasa de resistencia a antibióticos entre los patógenos de infección intrahospitalaria[3]. Estas cepas resistentes a antibióticos se denominan hipervirulentas y en el caso de *C. Difficile* es el que presenta resistencia a antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas. Dicha resistencia se da por la aparición de una mutación en el gen gyrA, presente en los ribotipos 078, 027, 001, 014 y 046, teniendo los dos primeros la toxina binaria y la deleción del gen tcdC[4].

El método de diagnóstico consiste principalmente en el cultivo de muestras de los infectados o en detección de la toxina producida por la bacteria. Ambos métodos son costosos tanto en tiempo como en dinero y necesitan de material y personal especializado[5]. Es por ello que se desarrolló de un ensayo de qPCR para la detección diferencial simultánea de las cepas hipervirulentas (toxina binaria y gen gyrA mutado). Como parte de la primera experiencia en el diseño de sondas LNA se consideró un sistema sencillo en el que se buscaba diferenciar entre los ribotipos 027 y 078 (mutación C184T Tabla 31). Teniendo en cuenta la especificidad de los

ribotipos, se decidió estudiar únicamente la detección del ribotipo 078 (Tabla 31), para lo que se trabajó en el diseño de sondas LNA. El diseño de las secuencias de las sondas (Tabla 32) se realizó teniendo en cuenta las directrices y restricciones de la bibliografía. (Tabla 32).

Tabla 31. Secuencia genética objetivo de los ribotipos 027 y 078. En rojo, el sitio polimórfico.

Nombre de la secuencia	Secuencia objetivo
VIR1C (Secuencia ribotipo 027)	**Información omitida**[(a)]
VIR2PC (Secuencia ribotipo 078)	**Información omitida**[(a)]

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Tabla 32. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas inicialmente para las mutaciones del ribotipo 078. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo, el sitio polimórfico.

Nombre de la secuencia	Secuencia 5' →3'	Tm (°C)	S1-S1	SS	N
L.CTC.1.FAM.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	65	32	25	16
L.CTC.1.FAM.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	69	40	25	19

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Se realizaron en paralelo dos ensayos de qPCR en formato monoplex. En cada uno de los ensayos se testaban los diseños realizados de la sonda frente a los controles positivos artificiales de la secuencia genética objetivo (en adelante DNA molde) de cada uno de los ribotipos. Los dos diseños produjeron una señal fluorescente, sin embargo, sólo L.CTC.1.FAM.BHQ1.1 reconocía específicamente el ribotipo 078, mientras que L.CTC.1.FAM.BHQ1.2 amplificaba por igual ambas variantes. Aun siendo el mejor de los candidatos, se siguió observando una pequeña amplificación en el canal del ribotipo 027 (Figura 89).

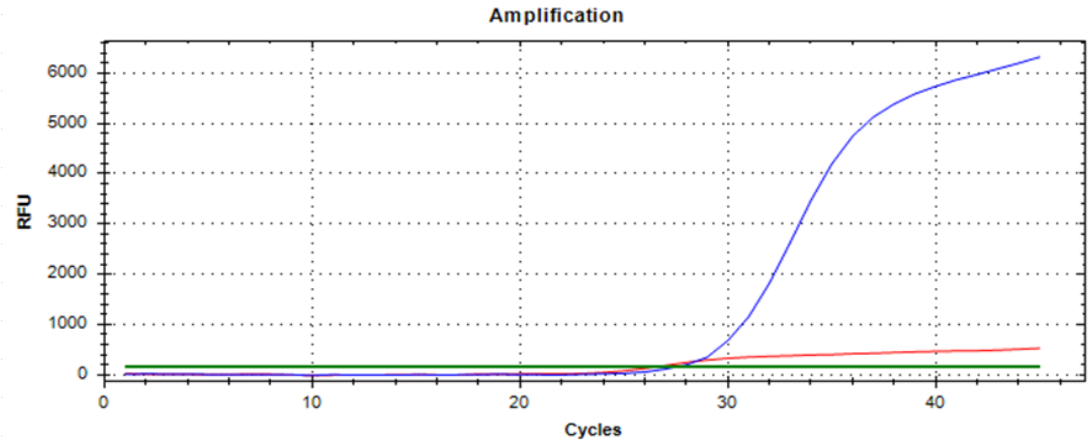


Figura 89. Amplificación de DNAs sintéticos representantes de las secuencias de: VIR1PC (ribotipo 027) rojo, VIR2PC (ribotipo 078) azul de la sonda CTC1-FAML1 .

La sonda L.CTC.1.FAM.BHQ1.2 presenta valores más altos de longitud de la secuencia y de Tm, lo que puede estar influyendo directamente en el comportamiento de la misma al favorecer amplificaciones inespecíficas.

III.1.2. TUBERCULOSIS. HIPERPLEX DE RESISTENCIAS.

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa, crónica y granulomatosa causada por *M. tuberculosis*. Esta enfermedad fue declarada en 1993 como una "emergencia sanitaria mundial" debido a su magnitud como problema de salud pública.

M. tuberculosis pertenece al género Mycobacterium, el único miembro de la familia Mycobacteriaceae, incluida en el suborden Corynebacterineae, orden Actinomycetales. Se agrupa en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que comprende a día de hoy nueve especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. mungi* y *M. orygis*.

En general, el examen microscópico directo de las muestras clínicas mediante técnicas específicas de tinción (baciloscopia), es la técnica menos sensible pero la más rápida y económica para diagnosticar la tuberculosis. No obstante, dado que su sensibilidad (40% en muestras respiratorias) y su especificidad no son absolutas, es necesario realizar siempre cultivos para un diagnóstico de certeza. El problema de cultivar *M. tuberculosis* es que es una micobacteria de crecimiento lento y los cultivos deben mantenerse un mínimo de 7 semanas antes de descartarlos como negativos. Esto hace que su diagnóstico sea lento y requiere de laboratorios con adecuadas medidas de seguridad y de personal cualificado y entrenado[6].

El tratamiento de la tuberculosis es difícil, requiere de tiempo (de 6 a 12 meses) y de múltiples antibióticos. Consiste en una fase inicial intensiva de tratamiento (2 meses) con rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PAZ) y etambutol (EMB) o estreptomicina (SM) diseñada para matar bacilos en crecimiento activo y semi-latentes, seguido de una fase de continuación (4 meses) con RIF e INH para eliminar los bacilos residuales y reducir el número de recaídas.

La generación de la resistencia a los antibióticos empleados en el tratamiento contra la tuberculosis es un problema de salud pública. La tuberculosis resistente a múltiples medicamentos (MDR-TB) se define como aquella que presenta resistencia a los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces: la rifampicina y la isoniazida. Se han descrito diversos genes cuya mutación se asocia con la resistencia a fármacos. Así, la resistencia a rifampicina en más del 96% de los casos se debe a mutaciones localizadas en una región de 81 nucleótidos del gen rpoB. En cuanto a la isoniazida, se han descrito diversos genes katG, inhA, ahpC y kasA, que en su conjunto son responsables de la resistencia a este fármaco en, aproximadamente, un 90% de los casos; la mutación más prevalente es la que sucede en el codón 315 del gen katG. La resistencia a etambutol se debe, en un 47-65% de los casos, a una mutación en el gen embB y la resistencia a estreptomicina (antibiótico de segunda línea) se debe, en un 70%, a la mutación del gen rpsL y del gen rrs[7,8].

Debido a que existe una gran necesidad de contar con métodos rápidos y fiables de detección de la resistencia a las fármacos antituberculosos que puedan llevar a tratamientos eficientes y que lleguen a consolidar un control más efectivo, presenta gran interés desarrollar un test basado en sondas LNA que, además de identificar el patógeno *M. tuberculosis*, detecte si la cepa es sensible o resistente a los principales antibióticos. Este test se trata de un ensayo multiplex complejo debido a las diferentes variantes que existen dentro del mismo gen.

III.1.2.1. GEN KATG

En este primer caso los esfuerzos se centraron en las resistencias a isoniazida, concretamente en el gen katG (Tabla 33). Inicialmente, la estrategia diseñada para el ensayo de multiplex de qPCR

consistía en una única prueba en la que las sondas para las secuencias mutadas discriminaran no sólo entre la secuencia salvaje (*wildtype*) y mutada, sino también entre las diferentes secuencias mutadas.

Tabla 33. Secuencias genéticas wt y mutadas del gen katG. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de la secuencia	Secuencia objetivo
KAT1 (wt)	**Información omitida**[(a)]
KAT2 (mut.)	**Información omitida**[(a)]
KAT3 (mut.)	**Información omitida**[(a)]
KAT4 (mut.)	**Información omitida**[(a)]
KAT5 (mut.)	**Información omitida**[(a)]
KAT6 (mut.)	**Información omitida**[(a)]

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Sin embargo, debido a la complejidad tanto en el diseño (secuencias muy similares unas a otras y Tm coincidentes en algunos casos) como a los resultados preliminares obtenidos en los que había reacciones cruzadas entre varias de las sondas para las secuencias mutadas, fue necesario abordar el problema con otro enfoque.

La siguiente estrategia con la que se abordó el problema fue la de hacer multiplexes independientes para hacer una discriminación entre la secuencia wildtype y cada una de las secuencias mutadas, pero sin que hubiera discriminación entre estas. Para las secuencias dadas se diseñaron sus correspondientes sondas LNA, teniendo la variante wildtype marcada en HEX que sería común a todos los ensayos y las secuencias mutadas en FAM (Tabla 34):

Tabla 34. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas inicialmente para las mutaciones del gen katG. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de la secuencia	Secuencia 5' →3'	Tm	S1-S1	SS	N
L.KAT.1.HEX.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	69	33	14	12
L.KAT.2.FAM.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	69	27	17	13
L.KAT.3.FAM.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	69	25	17	13
L.KAT.4.FAM.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	69	36	14	12
L.KAT.5.FAM.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	70	29	19	13
L.KAT.6.FAM.BHQ1.1	**Información omitida**[(a)]	70	33	18	13

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Estos diseños se estudiaron en ensayos monoplex para determinar que las sondas funcionaban todas ellas de forma independiente. Cabe resaltar que los primers (forward y reverse) utilizados eran comunes a todas las secuencias (Figura 91):

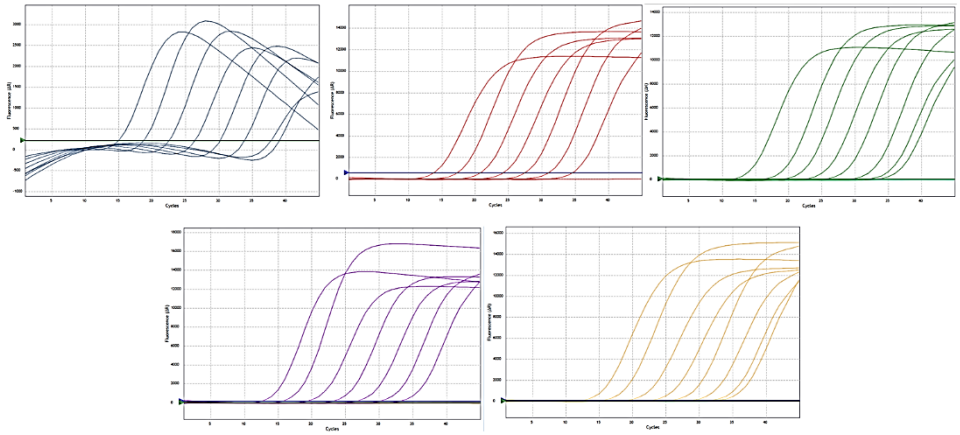


Figura 90. Amplificación de diluciones seriadas (1/10) de DNAs sintéticos representantes de las secuencias de interés. Reacciones monoplex. Azul: KAT1 (HEX), rojo: KAT2 (FAM), verde: KAT3 (FAM), morado: KAT4 (FAM), naranja: KAT5 (FAM).

Todas las sondas mostraron resultados aceptables, exceptuando la sonda L.KAT.1.HEX.BHQ1.1, en la que se aprecia efecto hook, probablemente debido a la descomposición parcial de HEX. Se consideró diseñar una secuencia adicional, ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** para modificar la Tm y así mejorar la hibridación de la sonda. También se sustituyó HEX como fluoróforo por SIMA-HEX (Tabla 35):

Tabla 35. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas para KAT1 para la mejora del efecto hook. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de la secuencia	Secuencia 5' →3'	Tm	S1-S1	SS	N
L.KAT.1.SHEX.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	71	33	14	14
L.KAT.1.SHEX.BHQ1.3	**Información omitida**[(a)]	71	33	14	13

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

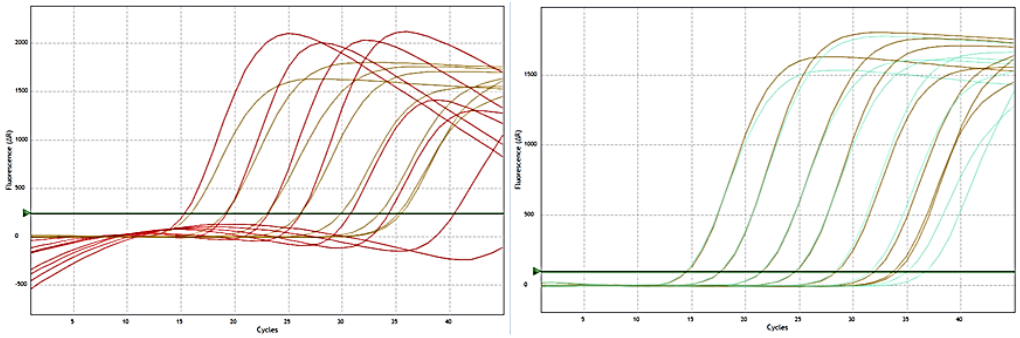


Figura 91. Análisis de amplificación de diluciones seriadas (1/10) de diferentes diseños de sonda KAT1. Rojo: KAT1-HEXL, marrón: KAT1-SHEXL2, verde: KAT1-SHEXL3.

Las modificaciones introducidas permitieron corregir ese efecto hook, aunque la intensidad de la fluorescencia obtenida no fue demasiado alta (Figura 91). La secuencia finalmente seleccionada fue L.KAT.1.SHEX.BHQ1.2, por corregir el efecto hook, por tener la intensidad de fluorescencia más alta y por presentar unas curvas que respetan el orden de diluciones seleccionado y no entrecruzarse unas con otras, como sí que sucede con L.KAT.1.SHEX.BHQ1.3.

Una vez comprobada la efectividad de las sondas en monoplex, el siguiente paso fue ensayar la reacción en versión multiplex. Para ello, se estudió cada una de las sondas mutantes frente a la sonda wildtype (Figura 92):

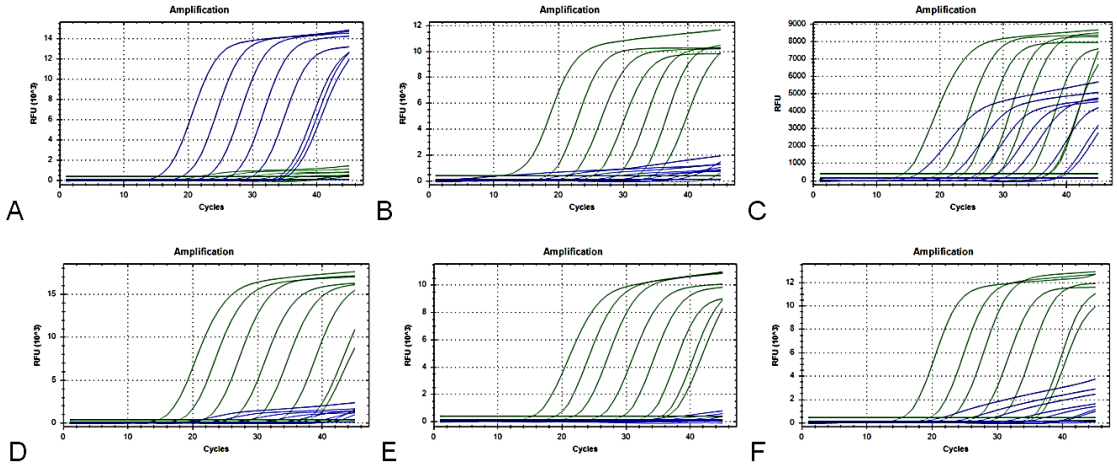


Figura 92. Amplificación de diluciones seriadas (1/10) de DNAs sintéticos representantes de las secuencias de interés. Se muestra en verde el canal FAM y en azul el canal HEX. A) KAT1. B) KAT2. C) KAT3. D) KAT4. E) KAT5 F) KAT6.

En este punto se observó la aparición de reacciones cruzadas en las que se utilizaba como molde las secuencias de DNA sintético 100% homólogas a cada una de las combinaciones de mutaciones. Concretamente, con la sonda KAT3 se observó una señal muy intensa por parte de la reacción cruzada y también con KAT6, KAT4, KAT1 y KAT2 (por orden decreciente). Por lo tanto, se vio necesario rediseñar la sonda de KAT1 para que no reconociera el resto de las sondas mutantes, pero sí, única y exclusivamente, la wildtype (Tabla 36).

Tabla 36. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas para KAT1 para la mejora de la inespecificidad. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de la secuencia	**Secuencia 5' →3'**	**Tm**	**S1-S1**	**SS**	**N**
L.KAT.1.SHEX.BHQ1.4	**Información omitida**[(a)]	73	33	13	14
L.KAT.1.SHEX.BHQ1.5	**Información omitida**[(a)]	67	33	13	14
L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6	**Información omitida**[(a)]	70	28	14	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Con estos tres nuevos diseños (L.KAT.1.SHEX.BHQ1.4, L.KAT.1.SHEX.BHQ1.5 y L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6) se buscaron Tms con mayor diferencia entre sí para ver el efecto que se produce y solucionar los problemas de reacciones cruzadas en las multiplexes. De las tres sondas diseñadas, L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6 fue la que daba mejores resultados (Figura 93).

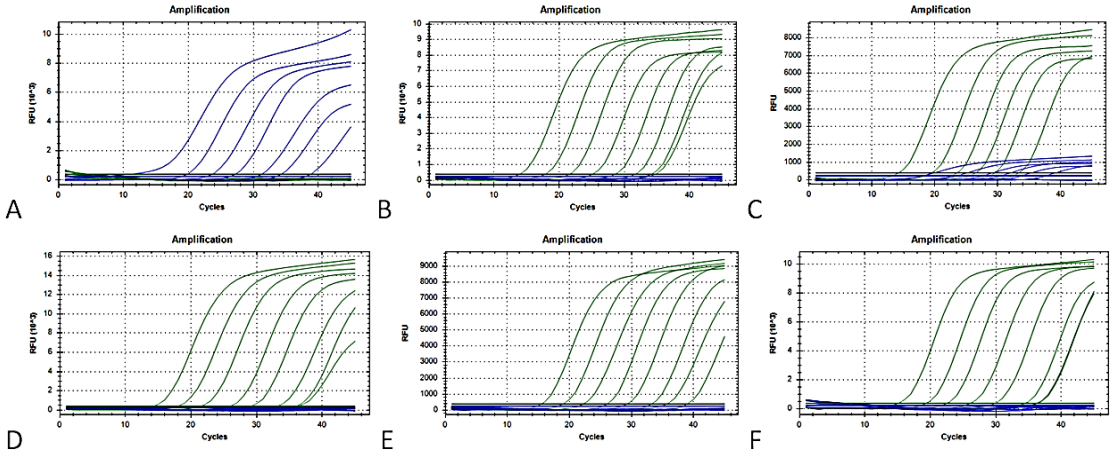


Figura 93. Amplificación de diluciones seriadas (1/10) de DNAs sintéticos representantes de las secuencias de interés. Reacción multiplex con la sonda L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6. Se muestra en verde el canal FAM y en azul el canal HEX. A) KAT1. B) KAT2. C) KAT3. D) KAT4. E) KAT5. F) KAT6.

Es sabido que el tamaño de la sonda condiciona los resultados que se obtienen por qPCR. De hecho, se observó que afecta en gran medida a la especificidad de la sonda, ya que se consigue eliminar la mayoría de las reacciones cruzadas como se puede observar en los casos de KAT2, KAT3, KAT4, KAT5 y KAT6 (Figura 92 B-F vs Figura 93 B-F) cuando se modificó la longitud de la sonda como L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6. Además, se consiguió que no se produjera amplificación por parte de la sonda mutante de KAT1, por lo que nos hizo pensar que L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6 hibridaba de una forma más eficiente y por competición inhibía la hibridación de la sonda mutante. Este factor resultó interesante, ya que se podría utilizar el factor de competidor para inhibir la reacción cruzada de una sonda en particular mediante la incorporación a la reacción de un "competidor" que consistiría en la secuencia de la sonda pero sin fluoróforo ni quencher. Todavía queda el caso de KAT3 que todavía era reconocida por la sonda wildtype. Esto se solucionó mediante ajuste de concentraciones de las sondas y mediante un ciclo térmico más restrictivo.

Se quiso mejorar el prototipo. Por eso, una vez finalizada la optimización inicial se buscó la mejora en la aparición de inespecificidades, por lo que se diseñaron nuevas sondas de todas las secuencias, tanto wildtype (que dio inicialmente la mayor cantidad de problemas) como las mutantes. Además, un sistema tan complejo como este representaba una oportunidad excepcional para estudiar diferentes versiones de las sondas LNA y compararlas. Se diseñaron tres nuevas secuencias para cada una de las variantes, teniendo en cuenta la experiencia adquirida (Tabla 37):

Tabla 37. Tabla con los segundos grupos de secuencias para el sistema KAT con los resultados de Tm, autohibridación (S1-S1), estructura secundaria (SS) y longitud de la sonda (N). En rojo las posiciones polimórficas.

Variaciónes	Sonda	Secuencia 5' →3'	Tm	S1-S1	SS	N
KAT1	L.KAT.1.SHEX.BHQ1.7	**Información omitida**[(a)]	72	33	18	16
	L.KAT.1.SHEX.BHQ1.8	**Información omitida**[(a)]	73	36	18	13
	L.KAT.1.SHEX.BHQ1.9	**Información omitida**[(a)]	71	33	14	11
KAT2	L.KAT.2.FAM.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	68	25	14	16
	L.KAT.2.FAM.BHQ1.3	**Información omitida**[(a)]	68	26	14	13
	L.KAT.2.FAM.BHQ1.4	**Información omitida**[(a)]	70	26	19	12
KAT3	L.KAT.3.FAM.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	69	26	19	14
	L.KAT.3.FAM.BHQ1.3	**Información omitida**[(a)]	68	25	14	13
	L.KAT.3.FAM.BHQ1.4	**Información omitida**[(a)]	69	25	17	13
KAT4	L.KAT.4.FAM.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	69	36	14	12
	L.KAT.4.FAM.BHQ1.3	**Información omitida**[(a)]	69	46	14	11
	L.KAT.4.FAM.BHQ1.4	**Información omitida**[(a)]	70	36	19	12
KAT5	L.KAT.5.FAM.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	70	26	19	11
	L.KAT.5.FAM.BHQ1.3	**Información omitida**[(a)]	69	26	19	12
	L.KAT.5.FAM.BHQ1.4	**Información omitida**[(a)]	69	29	19	12
KAT6	L.KAT.6.FAM.BHQ1.2	**Información omitida**[(a)]	70	28	17	16
	L.KAT.6.FAM.BHQ1.3	**Información omitida**[(a)]	70	29	19	11
	L.KAT.6.FAM.BHQ1.4	**Información omitida**[(a)]	70	27	18	11

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Para estos diseños se presentaron una serie de alternativas:

- KAT1: los dos primeros diseños se crearon ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***.
- KAT4: se trataba de un diseño complejo ya que el score de autohibridación no baja de 36 debido a las dos Cs del triplete que siempre van a ser LNAs. ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***.
- KAT5: en el primer diseño había un porcentaje demasiado elevado de bases LNA lo que afecta a la solubilidad de la sonda haciéndola menos soluble. ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***.
- KAT6: la diferencia entre el segundo y tercer diseño era muy pequeña ***(Información omitida por motivos de confidencialidad)***.

Cuando se compararon por qPCR con los resultados ya existentes, se observó una mejora evidente para la sonda wildtype para todas las últimas sondas sintetizadas en comparación con L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6. En todos los casos, se observó una fluorescencia final mayor, lo que indica una hibridación más eficiente. Dentro de estas tres nuevas sondas, no existían diferencias entre ellas más allá de las que se podrían achacar a variaciones experimentales (Figura 94). En el caso de las sondas mutadas no se aprecian grandes diferencias, aunque en algún caso sí que hay una pequeña mejora.

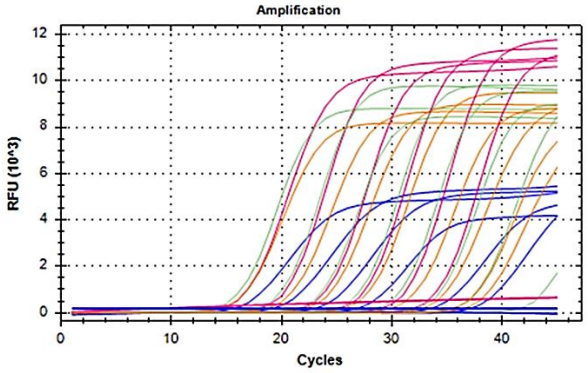


Figura 94. Comparativa de sondas SHEX. Azul: SHEXL6, Rosa: SHEXL7, Verde: SHEXL8, Naranja: SHEXL9

En los tres casos se diseñó la sonda con una Tm superior a L.KAT.1.SHEX.BHQ1.6 y, curiosamente, con unos resultados más altos en los scores de autohibridación se obtuvieron mejores resultados. Es posible que este factor no sea tan determinante o que, como es debido a una estimación, el rango de valores en el que se encuentran los valores óptimos de las sondas diseñadas (S1-S1=25-35) sean más amplios o estén desplazados a valores más altos.

III.1.2.2. GEN RPOB

Una vez resuelta esta problemática, se comenzó a trabajar en el gen rpoB. La mayoría de las cepas que presentan resistencia a rifampicina tienen mutaciones dentro de una región específica de 81 pb dentro del gen rpoB[9,10] (Figura 95).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 95. Región de 81 nucleótidos del gen rpoB donde se encuentran las principales mutaciones que confieren resistencia a rifampicina. Imagen adaptada de ***(Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)****.*

Debido a la gran cantidad de mutaciones posibles y su extensión a lo largo de todo el gen, la estrategia llevada a cabo fue diseñar 5 multiplex (denominadas RPA, RPB, RPC, RPD y RPE), cada una de ellas dirigida a una sección diferente del gen (aunque en algunos casos coincide parte de la secuencia). Los primers usados fueron comunes. Además, se sintetizaron 7 DNA molde diana diferentes, que agrupan todas las mutaciones a detectar, también comunes (Figura 96).

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 96. Recopilación de los 7 DNA moldes sintéticos comunes para las 5 multiplex dirigidas a mutaciones que confieren resistencia a rifampicina. Resaltadas el fragmento de secuencia hacia el que está dirigida cada una de las multiplexes: RPA (sombreado morado), RPB (letras naranjas), RPC (sombreado verde), RPD (letras lila) y RPE (sombreado gris). También resaltadas las mutaciones (letras azules).

Tabla 38. Recopilación de las mutaciones en las diferentes secuencias de RPA. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de la secuencia	Canal	Secuencia 5'→3'
RPA1 (wt)	HEX	**Información omitida**[(a)]
RPA2 (mut.)	FAM	**Información omitida**[(a)]
RPA3 (mut.)	FAM	**Información omitida**[(a)]
RPA4 (mut.)	FAM	**Información omitida**[(a)]
RPA5 (mut.)	FAM	**Información omitida**[(a)]

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

RPO1-F: ***Información omitida por motivos de confidencialidad*** Tm = 66,1°C

RPO1-R: ***Información omitida por motivos de confidencialidad*** Tm = 66,5°C

Se diseñaron sondas LNA para las secuencias que corresponden con el ensayo RPA (Tabla 38). Como ocurren en estos casos, la reacción fue testada en monoplex, para ver si cada secuencia diseñada era específica frente al DNA molde al que iba dirigida y luego se procedió a desarrollar la multiplex.

La alta Tm de los primers condicionaba en gran medida el diseño de las sondas y dejaba poca libertad a la hora de situar las bases LNA. Además, la existencia de más de una mutación en la secuencia dificultaba el diseño de las sondas. Se sintetizaron las siguientes secuencias (Tabla 39):

Tabla 39. Lista de secuencias de las primeras sondas LNA diseñadas para las secuencias RPA. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.RPA.1.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	47	24	69	12
L.RPA.2.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	44	17	69	11
L.RPA.3.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	44	26	68	13
L.RPA.4.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	45	16	69	13
L.RPA.5.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	46	12	69	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Los resultados no fueron muy adecuados con este set de síntesis. La sonda L.RPA.1.SHEX.CBQX.1 no es específica y su señal específica es muy poco sensible, posiblemente debido a que la base sobre la que se ha puesto el triplete de bases LNA (que es la parte sobre la que se centra capacidad discriminatoria) se ha colocado en la ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** que menos varía entre las secuencias. El resto de las sondas presentaba poca sensibilidad, en general, exceptuando L.RPA.3.FAM.CBQX.1 que no presentaba señal alguna. Además, L.RPA.5.FAM.CBQX.1 presentaba crosstalk en el canal de HEX. La poca sensibilidad de las señales específicas era seguramente causada por la poca diferencia de Tm que había entre

primers y sondas impidiendo el orden correcto de hibridación (sondas antes que primers). Debido a la imposibilidad de añadir más bases LNA a las sondas, se decidió entonces modificar los primers para que tuvieran una Tm menor y volver a probar estos diseños, salvo los de L.RPA.3.FAM.CBQX.1 y L.RPA.5.FAM.CBQX.1, de los que se sintetizaron nuevos (Tabla 40). Con estas nuevas condiciones y sondas diseñadas se testaron de nuevo los ensayos de PCR (Figura 97).

RPO2-F: ***Información omitida por motivos de confidencialidad*** Tm = 61,9°C

RPO2-R: ***Información omitida por motivos de confidencialidad*** Tm = 59,3°C

Tabla 40. Lista de secuencias de las segundas sondas LNA diseñadas para las secuencias RPA3 y 5. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.RPA.3.FAM.CBQX.2 (antisense)	**Información omitida**[(a)]	40	19	68	13
L.RPA.5.FAM.CBQX.2 (antisense)	**Información omitida**[(a)]	52	22	68	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

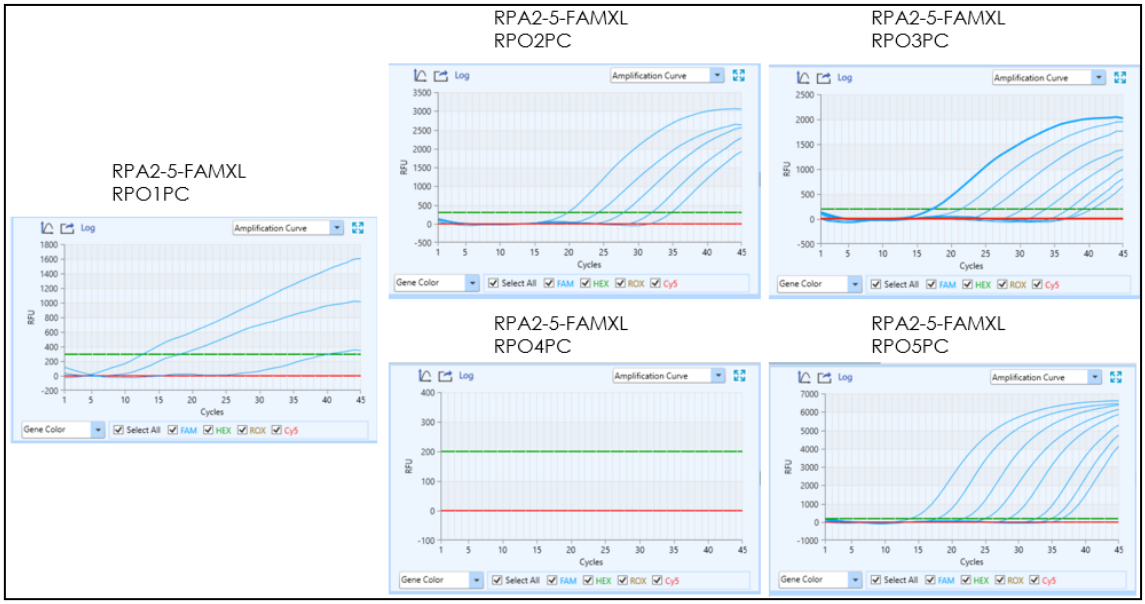
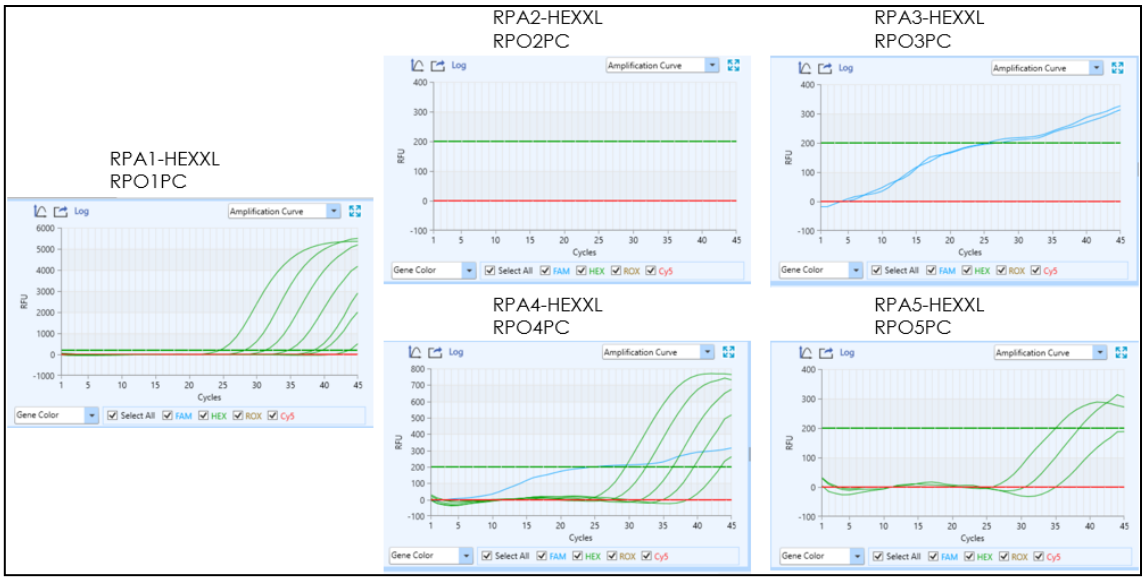


Figura 97. Resultados qPCR de sondas RPA incluyendo los nuevos primers y sustituyendo L.RPA.3.FAM.CBQX.1 y L.RPA.5.FAM.CBQX.2 por los nuevos diseños L.RPA.3.FAM.CBQX.2 y L.RPA.5.FAM.CBQX.2. Comprobación de inespecificidades y funcionalidad.

En esta nueva prueba se añadieron todos los DNA moldes para comprobar si había reconocimiento inespecífico (Figura 97). En todos los casos no se aprecia la aparición de una señal inespecífica. La señal que aparece en RPO1 (secuencia wt) se corresponde más con drift (señal fluorescente producida por la hidrólisis no enzimática de la sonda), una señal inespecífica que se relaciona con la hidrólisis no enzimática de la sonda. Aunque no se vieron inespecificidades, la única sonda que dio resultados buenos respecto a intensidad de fluorescencia fue L.RPA.5.FAM.CBQX.2. En los demás casos, se trataban de señales poco intensas



o incluso nulas, como en caso de L.RPA.4.FAM.CBQX.1. Sin embargo, son resultados mejores que los obtenidos con los primers anteriores.

Figura 98. Resultados qPCR de la sonda 20220329.I2.RPA1-HEXX[(a)]L con nuevos primers. Comprobación de inespecificidades y funcionalidad.

Además, se observó que la sonda para la secuencia wt presentaba dos casos claros de inespecificidades, tanto en RPO4PC como en RPO5PC (Figura 98). Fue necesario realizar nuevos diseños para todos los casos, exceptuando L.RPA.5.FAM.CBQX.2 (Tabla 41).

Tabla 41. Lista de secuencias de las siguientes versiones de las sondas LNA diseñadas para las secuencias RPA. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.RPA.1.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	37	19	64	12
L.RPA.1.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	45	23	65	12
L.RPA.2.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	32	15	65	12
L.RPA.3.FAM.CBQX.3 (antisense)	**Información omitida**[(a)]	29	15	65	12
L.RPA.4.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	35	14	65	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Se modificó la Tm de las sondas para la secuencia wt para evitar inespecificidades y se ajustaron los nuevos diseños de las secuencias mutadas a las condiciones de los nuevos primers. En el caso de RPA1 hizo dos diseños nuevos.

Ambas sondas L.RPA.1.SHEX.CBQX.2 y L.RPA.1.SHEX.CBQX.3 (Figura 99) resultaron ser específicas (ya que la pequeña señal que aparece en RPO4PC es despreciable considerando el rango de valores habituales de la intensidad de la fluorescencia en ensayos de qPCR). Se siguió adelante con la versión 3 porque mostraba mayor nivel de fluorescencia final.

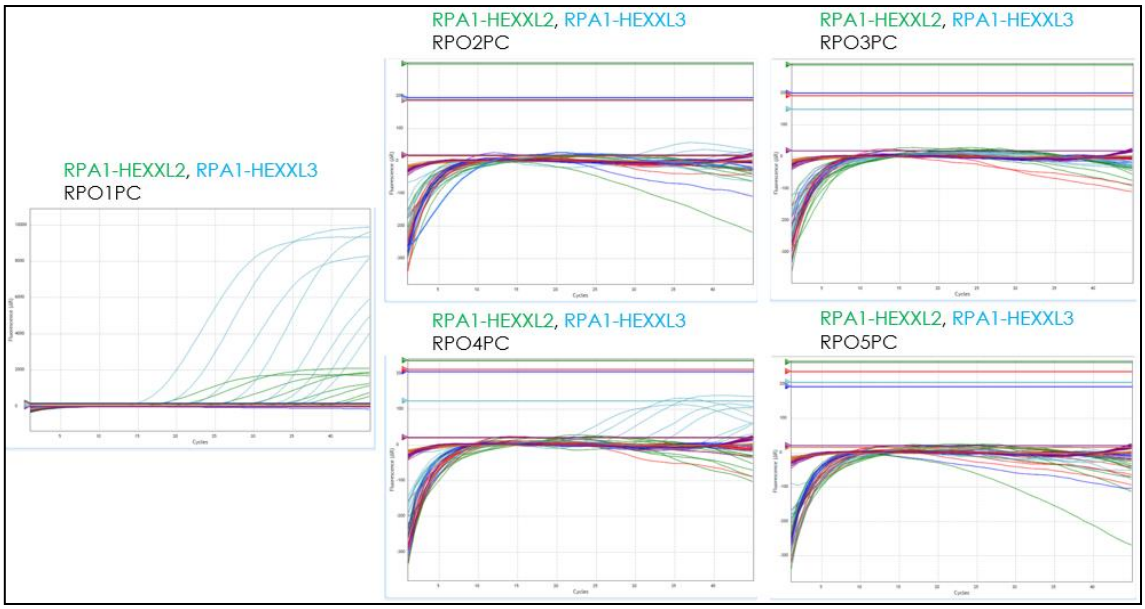


Figura 99. Resultados qPCR de las sondas L.RPA.1.SHEX.CBQX.2 y L.RPA.1.SHEX.CBQX.3. Comprobación de inespecificidades y funcionalidad.

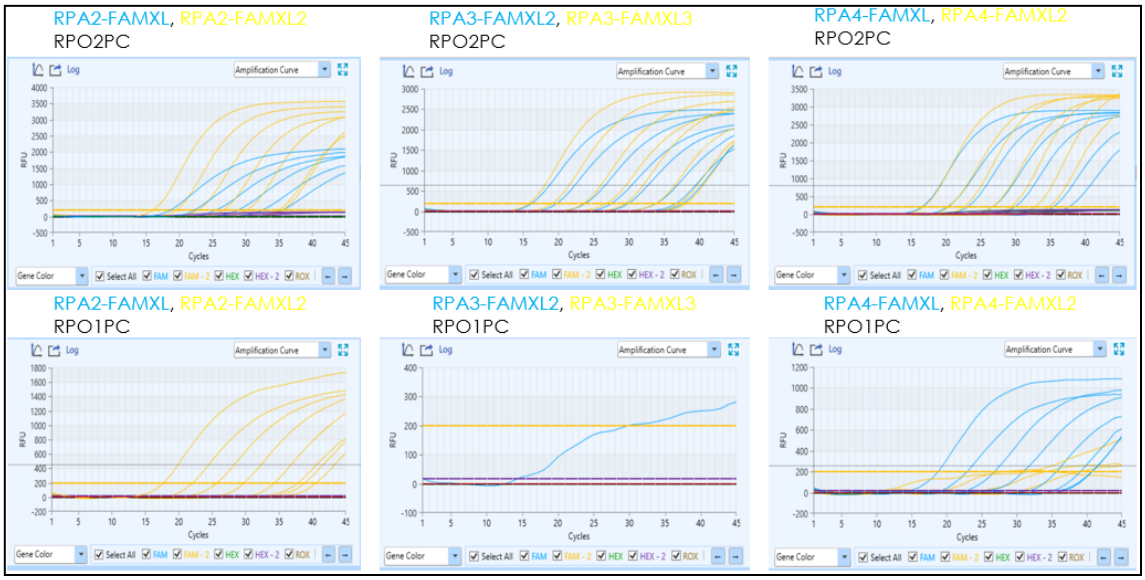


Figura 100. Resultados qPCR de los nuevos diseños de RPA2, 3 y 4. Comprobación de inespecificidades y funcionalidad.

La nueva sonda de L.RPA.2.FAM.CBQX.2 es muy inespecífica y tampoco mejora en gran medida las fluorescencias finales de la señal específica por lo que se siguió con la primera versión. Respecto a RPA3, ambos nuevos diseños son igual de buenos, ya que esa pequeña diferencia puede deberse a variaciones experimentales. Se escogió L.RPA.3.FAM.CBQX.3 por facilidades de nomenclatura. Finalmente, se eligió el nuevo diseño L.RPA.4.FAM.CBQX.2 ya que presentaba menos señal inespecífica que la inicial, aunque las específicas son muy similares (Figura 100).

Una vez seleccionadas todas las secuencias, se continuó con la optimización del test multiplex utilizando las sondas L.RPA.1.FAM.CBQX.3, L.RPA.2.FAM.CBQX.1, L.RPA.3.FAM.CBQX.3, L.RPA.4.FAM.CBQX.2 y L.RPA.5.FAM.CBQX.2. Sin embargo, las señales de todas las secuencias prácticamente desaparecieron. Una de las hipótesis de este efecto es que al hacer la multiplex y permanecer todas las sondas en conjunto en la misma mezcla, se formen dímeros de sonda antes de hibridar cada una con su diana. El aumento de afinidad que producen las bases LNA por su

complementario no está sólo dirigido a la secuencia diana si no a todas las secuencias presentes en la reacción. Si a esto se le suma la posibilidad de que, entre dos sondas, haya complementariedad entre dos bases LNA, este efecto se exacerba y pueden llegar a crearse dímeros muy estables.

Header_Hybridization	
Header_Name	Header_Score
RPA4_FAMXL2 - RPA5_FAMXL2	66
RPA1_HEXXL3 - RPA5_FAMXL2	61
RPA1_HEXXL3 - RPA3_FAMXL3	54
RPA2_FAMXL - RPA5_FAMXL2	53

Figura 101. Lista de score de formación de dímeros de sonda entre las secuencias de la multiplex. Se muestran las sondas que intervienen en el dímero y las interacciones entre las bases y la fuerza de estos ***(Información y bibliografía omitidas por motivos de confidencialidad).***

Como se puede observar en el análisis que se hizo de la posible formación de heterodímeros (Figura 101), existen combinaciones con scores muy altos, que confirman la hipótesis planteada. A partir de estos datos, las posibles soluciones que se propusieron fueron realizar nuevos diseños dirigidos a la hebra diana antisense y que la combinación de algunas de las sondas seleccionadas no produzca esta bajada en la multiplex, o bien la posibilidad de usar sondas MGB en alguno de los casos más problemáticos para que no haya esa complementariedad LNA-LNA entre diferentes sondas de la mezcla.

El desarrollo de las sondas RPB, RPC, RPD y RPE ha seguido un desarrollo similar al de RPA.

III.1.3. COVID-19.

III.1.3.1. DESARROLLO INICIAL VARIANTE UK (SUK)

A finales de 2019 se informó por primera vez de un nuevo coronavirus causante de afecciones respiratorias agudas, el Sars-Cov-2, en Wuhan (China). El 11 de marzo de 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de pandemia. A partir de ese momento, numerosos ensayos se han realizado para tratar de reducir el contagio y minimizar la sintomatología. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) creen que los síntomas del 2019-nCoV pueden aparecer en tan solo dos días o hasta 14 tras la exposición, siendo los más comunes fiebre, tos, mialgia y disnea[12].

A lo largo de toda la pandemia, el Sars-Cov-2 ha provocado un gran impacto en la salud humana de todo el mundo, debido al gran número de casos. A causa de su elevada transmisibilidad, su propagación mundial y la biología propia de los virus, se han detectado diversas variantes de Sars-Cov-2 con diferentes mutaciones en el genoma. Las diferentes mutaciones pueden causar un aumento de la transmisibilidad, un aumento en la gravedad de la sintomatología y un escape a la respuesta inmune adquirida tras la infección natural o la generada por vacunas.

A principios de febrero de 2020 se detectó la primera variante del Sars-CoV-2 la cual poseía la mutación D614G en el gen que codifica la proteína S[13]. En unos pocos meses, se convirtió en la variante predominante mundialmente. Actualmente, hay tres variantes principales, caracterizadas por diferentes mutaciones: la variante británica (B.1.1.7), la variante sudafricana (B.1.351) y la variante brasileña (P.1).

La variante británica (B.1.1.7) se detectó por primera vez en el sudeste de Inglaterra en diciembre de 2020. Según los estudios epidemiológicos y filogenéticos, esta variante se caracteriza por una transmisibilidad más elevada que el virus original. Sin embargo, esta variante no es más virulenta ni tienen una tasa de reinfección mayor que la original. Su genoma presenta 28 modificaciones en relación con la secuencia inicial del genoma del Sars-Cov-2. La mutación característica de esta variante es la deleción 69/70, la cual ha afectado a la sensibilidad de algunas pruebas de PCR que emplean como diana el gen S. La deleción de los aminoácidos 69 y 70 de la proteína S se relaciona con escapes inmunitarios en pacientes inmunodeprimidos y con un aumento de infectividad viral *in vitro*. Esto hace que la deleción 69/70 se convierta en una excelente diana para la identificación presuntiva de esta variante[14].

La variante sudafricana (B.1.351) se caracteriza por la presencia de la mutación N501Y. La variante británica también presenta esta mutación, pero los análisis filogenéticos indican que no se trata de la misma variante. La variante sudafricana (B.1.351) está asociada a una mayor capacidad de transmisión y una mayor carga vírica, pero no se ha demostrado que ocasione síntomas más graves.

Por último, la variante brasileña (P.1), al igual que la sudafricana, presenta la mutación E484K, la cual está relacionada con la reducción a la acción de la inmunidad. Asimismo, se estima que la transmisibilidad de esta variante es mayor que el virus original.

Es importante identificar las mutaciones que se acumulan dentro del genoma del SARS-CoV-2, no solo para vigilar la propagación geográfica del virus, sino también para identificar rápidamente la variación antigénica que pueda afectar las respuestas inmunitarias al virus. En la actualidad, la secuenciación del genoma del virus es la herramienta más completa para realizar una correcta vigilancia, sin embargo, el uso de la qPCR se ha convertido en una herramienta complementaria que ayuda a la vigilancia epidemiológica. Existen diferentes productos de qPCR a tiempo real para la detección de las diferentes variantes. El objetivo de este proyecto es desarrollar un producto que permita la detección virus 2019-nCoV y de la deleción 69/70 mediante PCR a tiempo real.

Se tomaron como base las siguientes secuencias (Tabla 42) para proceder al diseño de las sondas LNA (Tabla 43).

Tabla 42. Secuencias objetivo de la deleción de la variante británica. En rojo las posiciones delecionadas.

Nombre de la secuencia	Secuencia objetivo
NCO2.5 (wt)	**Información omitida**[(a)]
NCO2.6 (mut.)	**Información omitida**[(a)]
	Información omitida[(a)]

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Tabla 43. Secuencia del primer set de sondas LNA diseñadas para la deleción. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases.

Nombre secuencia	Secuencia de Partida	Secuencia LNA	Tm	S1-S1	SS	N
NCO2.5-HEXX (wt)	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	69	48	21	18
	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	69	38	22	18
	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	70	40	26	16
NCO2.6-FAMX (mut.)	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	69	43	24	16
	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	69	29	21	14
	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	71	38	27	17

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

En el set primero (L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.1 y L.NCO.2.6.FAM.CBQX.1) y en el tercero (L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.3 y L.NCO.2.6.FAM.CBQX.3) simplemente se seleccionaron algunas bases para poder modificar el tamaño de la sonda sin cambiar la Tm. El segundo set de sondas LNA (L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.2 y L.NCO.2.6.FAM.CBQX.2) se centró en la zona delecionada. Alineando ambas secuencias, se colocó el triplete de LNAs en las tres bases seguidas que no coinciden en el alineamiento y no son complementarias entre sí ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Como se puede apreciar, alguno de los scores de autohibridación volvía a salirse del rango determinado por la bibliografía. Sin embargo, se siguió adelante con el experimento debido a la dificultad del diseño para que entraran dentro de los parámetros. En las pruebas en multiplex, en el caso de la wildtype, la sonda L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.2 no funcionó y L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.1 resultó ser más específica que L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.3. En el caso de la sonda mutante, ninguna de las secuencias diseñadas fue específica, ya que todas reconocían la secuencia wildtype, así que se descartaron. Estas sondas LNA se ensayaron frente a sondas de hidrólisis de DNA, teniendo mejores resultados con estas últimas, aunque se tuvieron que hacer ensayos más restrictivos.

Debido a los resultados, se plantearon las diferentes causas del fallo de las sondas LNA y se elucidaron varias hipótesis:

- Para las secuencias que no dieron resultado, la sonda quedaba muy cerca de la zona donde empezaba el primer reverse por lo que era posible que no hubiera habido una unión previa de la sonda.
- Para las secuencias no específicas, es posible que los valores de Tm, S1-S1 y SS de la sonda fueran muy altos y que aun con el *mismatch* (que disminuye la Tm) la sonda acabara por hibridar de todas formas. A continuación, se probaría a bajar la Tm y no limitar tanto los valores de autohibridación y formación de estructuras secundarias.
- Las 6 secuencias diseñadas no tenían una longitud adecuada para ser sondas LNA, lo que era probable que limitara su poder discriminatorio. Se intentará modificar las secuencias.

Se diseñaron 4 nuevos sets de secuencias teniendo en cuenta estos factores (Tabla 44) para ver si podían mejorar las sondas de DNA y poder realizar un ensayo a 60°C:

Tabla 44. Secuencia del segundo set de sondas LNA para la optimización del ensayo multiplex.

Nombre secuencia	Secuencia de Partida	Secuencia LNA	Tm	S1-S1	SS	N
NCO2.5-HEXX (wt)	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.4	**Información omitida**[(a)]	60	48	17	15
	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.5	**Información omitida**[(a)]	68	48	26	17
	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.6	**Información omitida**[(a)]	67	48	22	17
	L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.7	**Información omitida**[(a)]	68	44	22	16
NCO2.6-FAMX (mut.)	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.4	**Información omitida**[(a)]	68	37	24	15
	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.5	**Información omitida**[(a)]	66	43	24	15
	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.6	**Información omitida**[(a)]	61	37	15	15
	L.NCO.2.6.FAM.CBQX.7	**Información omitida**[(a)]	68	47	22	16

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Tras ver los resultados del segundo set de secuencias, se seleccionó la pareja L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.4 y L.NCO.2.6.FAM.CBQX.4 por ser las sondas más específicas y presentar mejores fluorescencias que el resto (Figura 102). L.NCO.2.6.FAM.CBQX.7 fue descartada por inespecificidad mientras que L.NCO.2.6.FAM.CBQX.5 se eliminó por tener una señal específica baja (bajos niveles de fluorescencia resultantes). L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.6 y L.NCO.2.6.FAM.CBQX.6 quedaron muy próximas a la pareja de sondas seleccionada, pero alcanzaron menores niveles de fluorescencia.

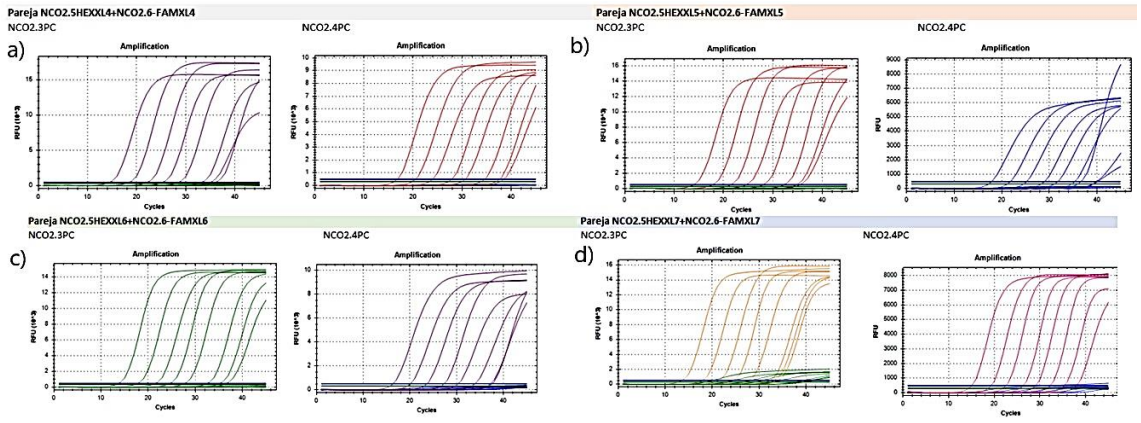


Figura 102. Resultados de los ensayos multiplex con el segundo set de sondas diseñado. A) L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.4/ L.NCO.2.6.SHEX.CBQX.4. B) L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.5/ L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.5. C) L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.6/ L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.6. D) L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.7/ L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.7.

Con la pareja de sondas seleccionadas ya se pudo diseñar el ensayo con una fase de hibridación. Posteriormente se optimizaron las concentraciones de las sondas.

Poco después, se descubrió que tanto L.NCO.2.5.SHEX.CBQX.4 como L.NCO.2.6.SHEX.CBQX.4 tenían ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, debido a un error en su síntesis. Al ser la sonda que mejores prestaciones tuvo, esta situación da pie a nuevas cuestiones sobre el diseño de sondas LNA. En concreto, sobre si era necesario ser un poco más restrictivo con la

Tm de las nuevas sondas diseñadas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Es por ello que el trabajo con las bases UNAs sería interesante ya que estas logran el efecto contrario de los LNA, modificando la Tm por base. De esta forma, con la combinación de ambas modificaciones se lograría un nivel de modulación de la Tm en las sondas muy preciso que ayudara a alcanzar ensayos en secuencias complicadas, con exceso de la proporción de A/T (Tm total muy baja) o con exceso de la proporción G/C (Tm total muy alta).

III.1.3.1.1. DESARROLLO POSTERIOR MULTIPLEX VARIANTES

Tras el desarrollo de un kit para la detección discriminatoria de la cepa británica, concretamente dirigido a la deleción HV69/70 del gen S (encargado de la codificación de la proteína de la espícula de coronavirus), se detectó la aparición de nuevas variantes del virus. Entre ellas se encuentran las más tempranas como la sudafricana y la brasileña, o las más tardías como la variante Delta o la variante Omicrón. Debido a la necesidad de dar una respuesta adecuada a cada variante, se diseñaron secuencias para la detección de más de 14 SNPs diferentes. En alguno de los casos, la misma posición del genoma ha sufrido sustituciones de nucleótidos diferentes que suponen la codificación de aminoácidos diferentes. A continuación, se resumen todas las sondas diseñadas a partir de las secuencias consenso del genoma de estas diferentes variantes:

III.1.3.1.1.1. VARIANTES

III.1.3.1.1.1.1. VAR1

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S, presentes en las variantes británica, sudafricana, brasileña y de Bristol. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 61,3°C Tm (Primer Reverse) = 59°C

VAR1-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 45. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR1. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.1.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	58	28	68	13
L.VAR.1.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	56	24	68	13
L.VAR.1.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[a]	50	22	68	13

[a]: *Información omitida por motivos de confidencialidad.*

VAR1.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 46. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR1.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.1.2.SHEX.CBQX.1 L.VAR.1.2.Cy5.CBQX3.1	**Información omitida**[a]	47	28	65	13
L.VAR.1.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[a]	37	23	68	12
L.VAR.1.2.SHEX.CBQX.3 L.VAR.1.2.Cy5.CBQX3.3	**Información omitida**[a]	35	23	67	12
L.VAR.1.2.Cy5.CBQX3.4	**Información omitida**[a]	41	26	69	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.2. VAR2

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S, situada sólo a 7 nucleótidos de distancia de la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S, por lo que tienen primers comunes. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

VAR2-FAMXL (mut.) :

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 47. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.2.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	28	17	69	12
L.VAR.2.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	28	15	68	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR2.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 48. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR2.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.2.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	59	33	68	13
L.VAR.2.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[a]	25	13	69	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.3. VAR3

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en las variantes sudafricana, brasileña y de Bristol. Además, en la misma posición existe la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** presente en la variante india. Al tratarse de la misma posición, compartirán primers. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 57,6°C Tm (Primer Reverse) = 58,7°C

VAR3-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 49. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR3. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.3.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	26	9	65	12
L.VAR.3.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	26	9	69	13
L.VAR.3.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[a]	26	9	66	13
L.VAR.3.FAM.CBQX.4	**Información omitida**[a]	26	9	64	13

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR3.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 50. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR3.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	18	9	70	12
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[a]	20	6	73	12
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[a]	18	9	64	12
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.4	**Información omitida**[a]	18	8	66	11
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.5	**Información omitida**[a]	18	6	65	12
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.6	**Información omitida**[a]	20	8	66	11
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.7	**Información omitida**[a]	18	8	60	12
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.8	**Información omitida**[a]	18	9	60	12
L.VAR.3.2.SHEX.CBQX.9	**Información omitida**[a]	18	9	61	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR3.3-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 51. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR3.3. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.3.3.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	29	18	64	12
L.VAR.3.3.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	35	21	68	12
L.VAR.3.3.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[a]	31	18	66	12
L.VAR.3.3.FAM.CBQX.4	**Información omitida**[a]	25	16	62	12
L.VAR.3.3.ROX.Eclipse.5	**Información omitida**[a]	25	10	62	12
L.VAR.3.3.ROX.Eclipse.6	**Información omitida**[a]	31	11	65	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.4. VAR4

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante sudafricana. En la misma posición existe la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** presente en la variante brasileña, por lo que al tratarse de la misma posición compartirán primers. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 61,5°C Tm (Primer Reverse) = 60,1°C

VAR4-FAMXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 52. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR4. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.4.FAM.CBQX.1	**Información omitida**	32	19	67	13
L.VAR.4.FAM.CBQX.2	**Información omitida**	18	15	68	12
L.VAR.4.FAM.CBQX.3	**Información omitida**	31	14	70	13

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR4.2-HEXXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 53. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR4.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.4.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	42	21	67	12
L.VAR.4.2.SHEX.CBQX.2 L.VAR.4.2.ROX.Eclipse.2	**Información omitida**[a]	42	21	67	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR4.3-HEXXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 54. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR4.3. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.4.3.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	50	22	68	16
L.VAR.4.3.SHEX.CBQX.2 L.VAR.4.3.ROX.Eclipse.2	**Información omitida**[a]	34	12	67	15

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.5. VAR5

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 61,2°C Tm (Primer Reverse) = 61,3°C

VAR5-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 55. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR5. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.5.FAM.CBQX.1 L.VAR.5.ROX.Eclipse.1	**Información omitida**[(a)]	51	30	63	14
L.VAR.5.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	32	19	60	14
L.VAR.5.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	45	27	65	13

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR5.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 56. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR5.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.5.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	48	20	66	14
L.VAR.5.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	48	19	66	12
L.VAR.5.2.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	39	21	66	13

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.6. VAR6

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante de Liverpool. En la misma posición exista la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Al tratarse de la misma posición compartirán primers. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 62°C Tm (Primer Reverse) = 61,6°C

VAR6-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 57. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR6. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.6.FAM.CBQX.1 L.VAR.6.Cy5.CBQX3.1	**Información omitida**[(a)]	40	15	63	12
L.VAR.6.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	40	15	63	12
L.VAR.6.FAM.CBQX.3 L.VAR.6.Cy5.CBQX3.3	**Información omitida**[(a)]	40	27	65	12
L.VAR.6.FAM.CBQX.4	**Información omitida**[(a)]	36	15	64	12

[(a)]: *Información omitida por motivos de confidencialidad.*

VAR6.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 58. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR6.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.6.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	39	15	63	12
L.VAR.6.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	39	14	65	12
L.VAR.6.2.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	29	10	62	12
L.VAR.6.2.SHEX.CBQX.4	**Información omitida**[(a)]	39	15	63	12

[(a)]: *Información omitida por motivos de confidencialidad.*

VAR6.3-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 59. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR6.3. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.6.3.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	36	20	64	12
L.VAR.6.3.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	28	15	65	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.7. VAR7

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante Lamba. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 59,4°C Tm (Primer Reverse) = 59,5°C

VAR7-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 60. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR7. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.7.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	62	17	62	13
L.VAR.7.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	66	17	64	13
L.VAR.7.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[a]	66	15	66	12
L.VAR.7.FAM.CBQX.4	**Información omitida**[a]	66	13	60	12
L.VAR.7.FAM.CBQX.5	**Información omitida**[a]	62	15	64	12
L.VAR.7.FAM.CBQX.6	**Información omitida**[a]	66	15	65	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR7.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 61. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR7.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.7.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	52	19	62	13
L.VAR.7.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[a]	58	23	60	13
L.VAR.7.2.FAM.CBQX.3	**Información omitida**[a]	58	25	64	13
L.VAR.7.2.FAM.CBQX.4	**Información omitida**[a]	46	17	63	13

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.8. VAR8

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante Lambda. La mutación queda bastante cerca del primer Forward, lo que dificulta el diseño de la sonda ya que impide desplazar dicha mutación a una posición céntrica dentro de la sonda donde capacidad discriminatoria sería mayor. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 59,2°C Tm (Primer Reverse) = 58,5°C

VAR8-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 62. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR8. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.8.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[a]	36	24	64	12
L.VAR.8.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[a]	30	21	61	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

VAR8.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 63. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR8.2. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.8.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	41	24	63	12
L.VAR.8.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[a]	31	19	64	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.9. VAR9

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S en la variante Delta plus. Sólo se pretende detectar la diana mutante. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 58,8°C Tm (Primer Reverse) = 60,0°C

VAR9-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 64. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR9. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.9.FAM.CBQX.1 L.VAR.9.ROX.Eclipse.1	**Información omitida**[a]	38	19	62	12
L.VAR.9.FAM.CBQX.2 L.VAR.9.ROX.Eclipse.2	**Información omitida**[a]	10	8	65	12

[a]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.10. VAR10

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S en la variante Delta plus. Sólo se pretende detectar la diana mutante. Se diseñaron sondas para las siguientes secuencias:

Tm (Primer Forward) = 57,3°C Tm (Primer Reverse) = 55,7°C

VAR10-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 65. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR10. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.10.Cy5.CBQX3.1 L.VAR.10.ROX.Eclipse.1	**Información omitida**[(a)]	40	22	61	12
L.VAR.10.Cy5.CBQX3.2 L.VAR.10.ROX.Eclipse.2	**Información omitida**[(a)]	25	21	63	13

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.11. VAR11

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** del gen ORF1ab presente en la variante Omicrón. Sólo se pretende detectar una de las cuatro mutaciones que se descubrieron en su momento por lo que no hay diseño para la secuencia wt. Se diseñaron sondas para la siguiente secuencia:

Tm (Primer Forward) = 59,2°C Tm (Primer Reverse) = 58,7°C

VAR11-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 66. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR11. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.11.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	24	18	62	14
L.VAR.11.FAM.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	26	19	63	14

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

III.1.3.1.1.1.12. VAR12

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante Omicrón. Sólo se pretende detectar una de las cuatro mutaciones que se descubrieron en su momento por lo que no hay diseño para la secuencia wt. Se diseñaron sondas para la siguiente secuencia:

Tm (Primer Forward) = 59,4 °C Tm (Primer Reverse) = 58,7°C

VAR12-ROXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 67. Secuencias de la sonda LNA para VAR12. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.12.ROX.Eclipse.1 L.VAR.12.FAM.CBQX.1 L.VAR.12.SHEX.CBQX.1 L.VAR.12.Cy5.CBQX3.1	**Información omitida**[a]	33	13	62	13

[a]: *Información omitida por motivos de confidencialidad.*

III.1.3.1.1.1.13. VAR13

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante Omicrón. Sólo se pretende detectar una de las cuatro mutaciones que se descubrieron en su momento por lo que no hay diseño para la secuencia wt. Se diseñaron sondas para la siguiente secuencia:

Tm (Primer Forward) = 58,8°C Tm (Primer Reverse) = 59,3°C

VAR13-CY5XL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 68. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR13. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.13.Cy5.CBQX3.1 L.VAR.13.FAM.CBQX.1 L.VAR.13.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[a]	36	17	62	12
L.VAR.13.Cy5.CBQX3.2	**Información omitida**[a]	32	14	63	13

[a]: *Información omitida por motivos de confidencialidad.*

III.1.3.1.1.1.14. VAR14

Los diseños fueron dirigidos a la mutación puntual ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** de la proteína S presente en la variante Omicrón. Sólo se pretende detectar una de las cuatro mutaciones que se descubrieron en su momento por lo que no hay diseño para la secuencia wt. Se diseñaron sondas para la siguiente secuencia:

Tm (Primer Forward) = 58,7°C Tm (Primer Reverse) = 59,3°C

VAR14-HEXXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tabla 69. Lista de secuencias de las sondas LNA para VAR14. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. Resaltada en verde la opción definitiva.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.VAR.14.SHEX.CBQX.1 L.VAR.14.Cy5.CBQX3.1	**Información omitida**[(a)]	48	19	62	13
L.VAR.14.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	43	17	62	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

En cada una de las variantes, los diferentes diseños se probaron en ensayos qPCR monoplex para observar su funcionalidad y certificar que eran específicas y no producían ningún tipo de reacción cruzada con la secuencia equivocada. Además, durante la optimización de estas pruebas se modificaron condiciones de la reacción de PCR variando la temperatura de extensión y la concentración de primers y/o sonda.

En el caso particular de VAR1, para inhibir la inespecificidad de las sondas seleccionadas (L.VAR.1.2.SHEX.CBQX.3 reconoce la diana de VAR1) se ideó una estrategia diferente, en la que se introducía un oligonucleótido competidor, L.VAR.1.C.3 ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.

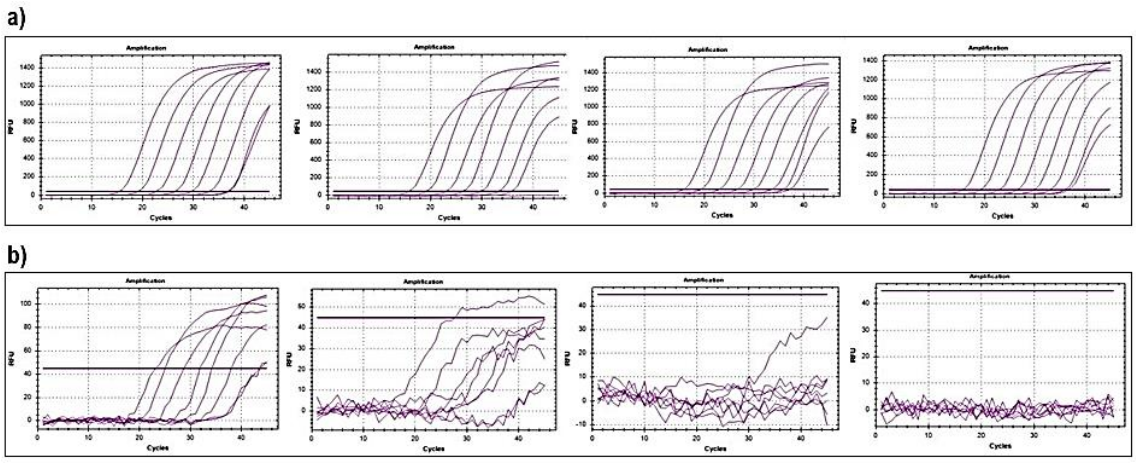


Figura 103. Resultados PCR L.VAR.1.2.Cy5.CBQX3.3. a) Señales específicas en orden creciente de volumen de competidor (L.VAR.1.C.3) de izquierda a derecha. b) Señales inespecíficas en orden creciente de volumen de competidor (L.VAR.1.C.3) de izquierda a derecha.

Como se puede observar en la Figura 103, la señal específica no se vio alterada, mientras que la inespecífica se ve reducida hasta casi desaparecer ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Con estos resultados, se decidió introducir este oligonucleótido en la mezcla de reacción.

También hay algunas secuencias que se sintetizaron en diferentes fluoróforos para ver que el cambio de canal no suponía una pérdida de rendimiento de la sonda en la reacción y determinar las futuras opciones de las que se dispondrán para hacer las multiplexes que detecten diferentes variantes de forma simultánea. Por otro lado, no todos los sets que se produjeron acabaron

formando parte de un kit de PCR multiplex final que se convirtiera en producto de Certest Biotec, S.L.

III.1.3.1.1.2. ENSAYOS DESARROLLADOS

La estrategia comercial de Certest Biotec, S.L. decidió lanzar al mercado 3 kits de detección de COVID-19 y de sus variantes más críticas durante el periodo de pandemia. A continuación, se describe el estudio realizado, junto con el departamento de biología molecular de la empresa, para el desarrollo de estos kits funcionales.

III.1.3.1.1.2.1. SARS-CoV-2 Variant I (VAR1)

El primero de los tests desarrollados tenía como objetivo detectar cuál de las variantes, entre la británica, sudafricana, brasileña y de Bristol, eran causante de la infección una vez que se había detectado un positivo por COVID. Se decidió realizar la siguiente combinación de sets y de canales en PCR (Tabla 70):

Tabla 70. Resumen de especificaciones y correspondencias entre mutaciones y canales de SARS-CoV-2 Variant I (VAR1).

Diana	Canal	Gen	Set
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en las variantes sudafricana, brasileña y de Bristol.	FAM	S	VAR3
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en la variante sudafricana.	HEX	S	VAR4.3
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en la variante brasileña.	ROX	S	VAR4.2
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en las variantes británica, sudafricana, brasileña y de Bristol.	Cy5	S	VAR1

Debido a la posibilidad de interacciones o interferencias entre los cuatro sets que intervienen en el kit, se tuvo que optimizar la reacción modificando parámetros en la reacción de PCR ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Mediante estas combinaciones se obtuvieron resultados satisfactorios tanto con los controles sintéticos de DNA (Figura 104) como con los controles sintéticos de RNA y muestras clínicas (Figura 105):

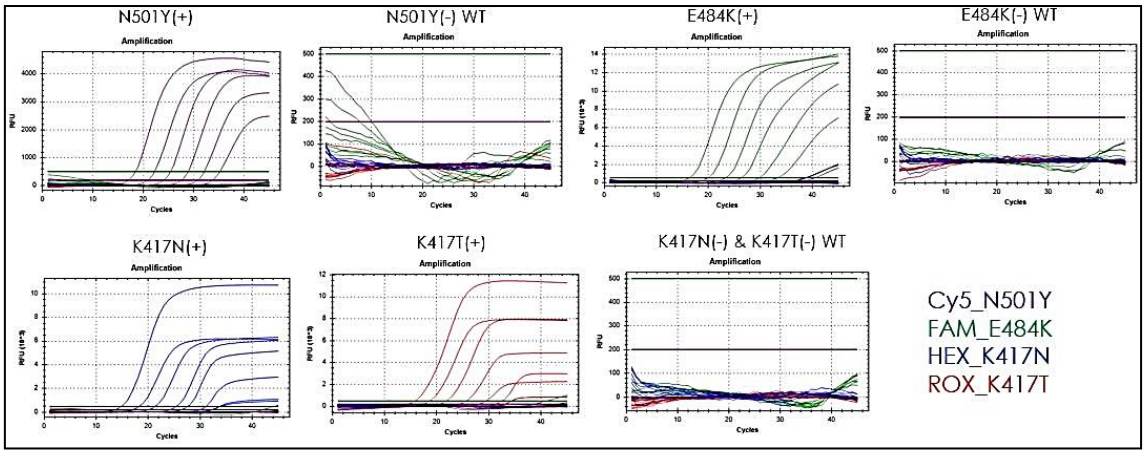


Figura 104. Comprobación de la funcionalidad en PCR de SARS-CoV-2 Variant I frente a los fragmentos DNA sintéticos que contienen las mutaciones a detectar.

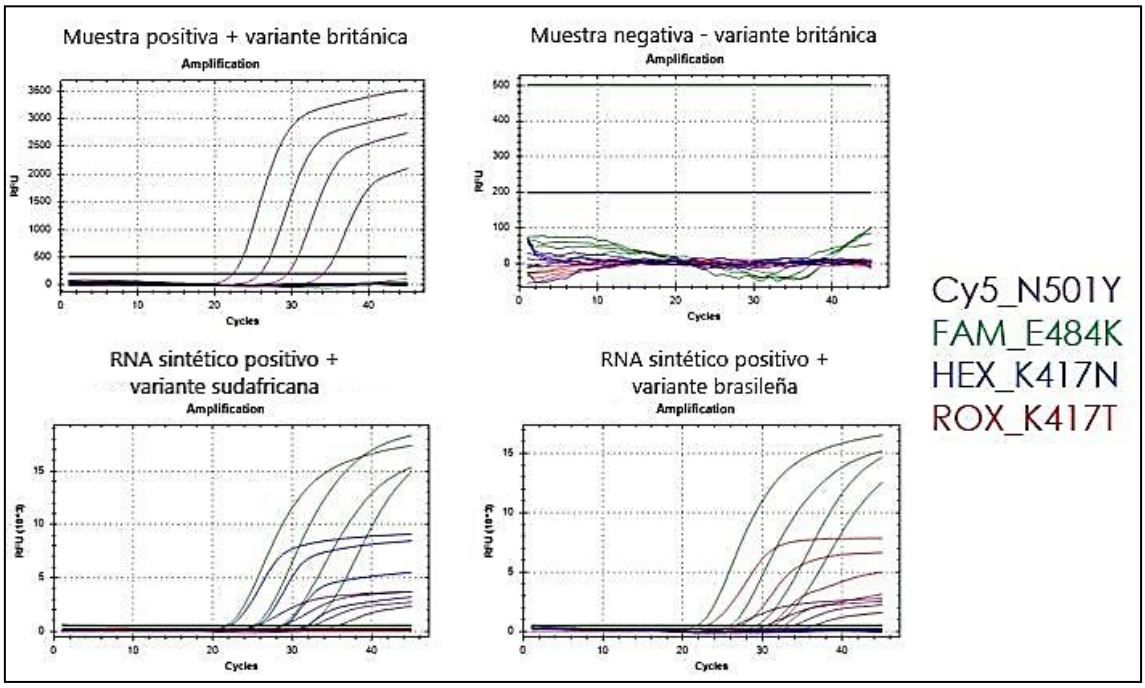


Figura 105. Comprobación de la funcionalidad en PCR de SARS-CoV Variant I frente a fragmentos RNA sintéticos y muestras clínicas que tienen las muestras a detectar.

III.1.3.1.1.2.2. SARS-CoV-2 Variant II (VAI1):

Este segundo test desarrollado pretendía, una vez obtenido un resultado positivo por COVID, diferenciar cuál de las variantes bajo investigación era causante de la infección. En este caso, se centraba en la discriminación de 3 mutaciones puntuales. El test también contaba con un control endógeno (Tabla 71):

Tabla 71. Resumen de especificaciones y correspondencias entre mutaciones y fluoróforos de SARS-CoV-2 Variant II (VAI1).

Diana	Canal	Gen	Set
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en las variantes indias delta, kappa y B1.617.3; y de Liverpool.	FAM	S	VAR6
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en las variantes india delta, kappa, B1.617.3, épsilon; y californiana.	HEX	S	VAR7
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en las variantes india kappa y B1.617.3.	ROX	S	VA3.3
Control endógeno	CY5	-	-

De nuevo hubo que optimizar la reacción ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Una vez más, se obtuvieron resultados satisfactorios tanto en los controles sintéticos de DNA (Figura 106) como en las evaluaciones clínicas.

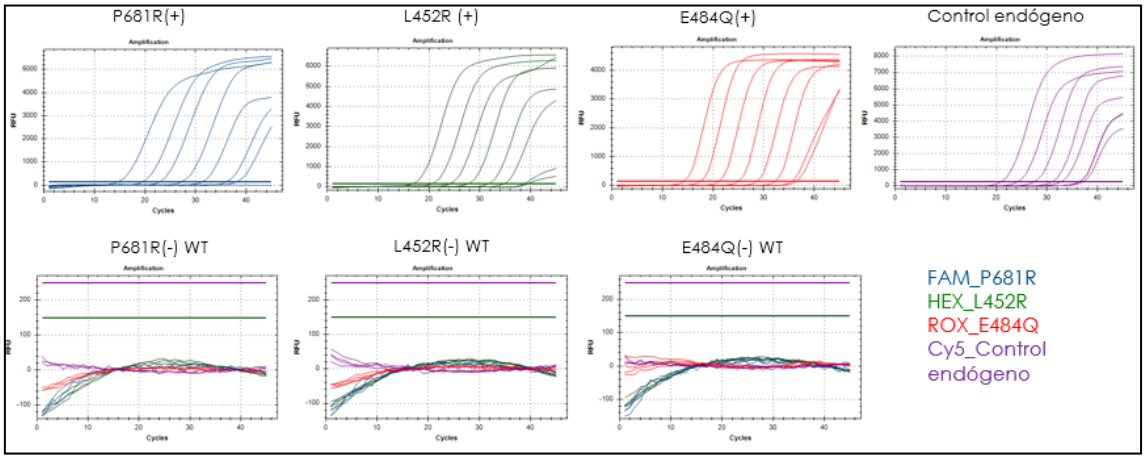


Figura 106. Comprobación de la funcionalidad en qPCR de SARS-CoV-2 Variant II frente a los fragmentos DNA sintéticos que contienen las mutaciones a detectar.

III.1.3.1.1.2.3. SARS-CoV-2 Variant III (VAO1):

Por último, el tercer kit se desarrolló para la detección de la variante Omicrón, que destacaba por su gran capacidad infectiva. En esta ocasión, el test sólo contaba con dos sets para la discriminación de mutaciones propias de la variante Omicrón junto con un control endógeno (Tabla 72).

Tabla 72. Resumen de especificaciones y correspondencias entre mutaciones y fluoróforos de SARS-CoV Variant III (VAO1).

Diana	Canal	Gen	Set
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en la variante Omicrón.	FAM	ORF1ab	VAR11
Mutación puntual **(información omitida por motivos de confidencialidad)**. Presente en la variante Omicrón.	HEX	S	VAR13
Control endógeno	ROX	-	-
-	CY5	-	-

De nuevo, fue necesario optimizar los parámetros de la reacción, aunque en este caso, fue ligeramente más sencillo ya que sólo se encontraban presentes tres de sets de primers y sondas que puedan interaccionar entre ellos. También se obtuvieron resultados satisfactorios finales para este kit en los controles sintéticos de DNA (Figura 107) y en las evaluaciones clínicas.

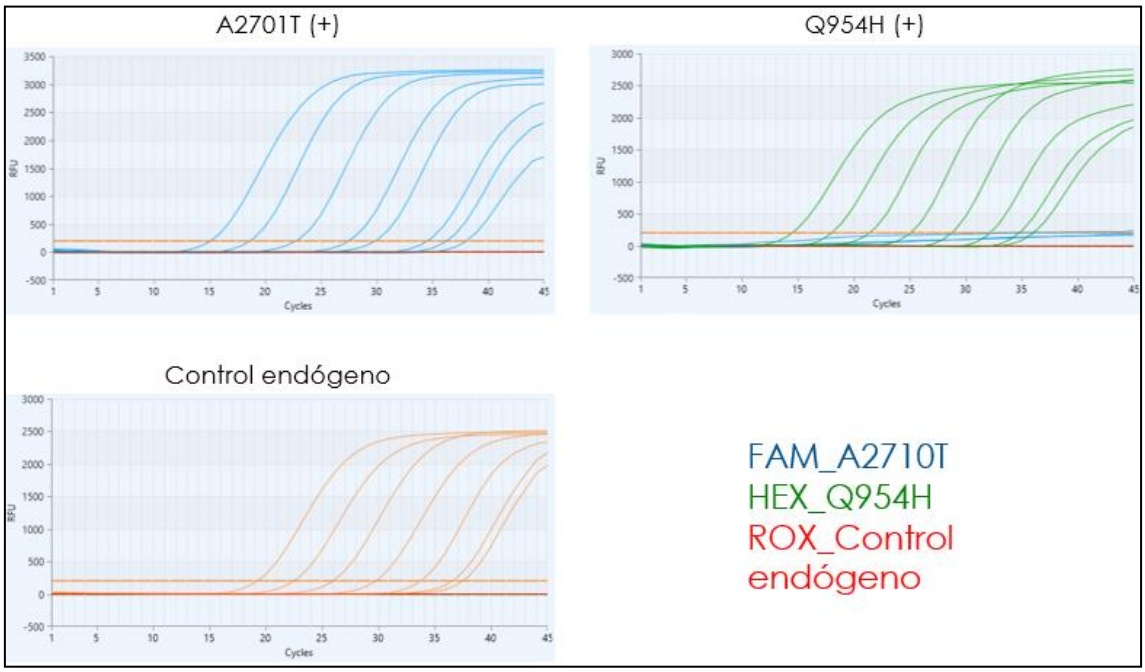


Figura 107. Comprobación funcional en PCR de SARS-CoV Variant III frente a los fragmentos sintéticos de DNA sintéticos que contienen las mutaciones a detectar.

III.2. POLIMORFISMOS HUMANOS LIGADOS A ENFERMEDADES

III.2.1. HLA-B27

El sistema del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) es un conjunto de genes que codifica proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC en inglés) humano. HLA representa un papel importante en la inmunopatogénesis de muchas enfermedades. La asociación más fuerte se encuentra entre el alelo HLA-B27 y la espondilitis anquilosante (EA), aunque hay una larga lista de enfermedades asociadas con HLA.

La genotipificación de HLA por técnicas basadas en PCR se ha convertido en una alternativa a los métodos serológicos ampliamente usados en la práctica clínica, superando las limitaciones de estos ensayos. HLA-B*27 presenta un marcado polimorfismo genético, abarcando 160 subtipos conocidos, codificados por 213 alelos que muestran prevalencia distinta según el grupo étnico[15]. Estudios a nivel global indican que HLA-B*27:05, HLA-B*27:04 y HLA-B*27:02 están fuertemente relacionados con la EA, siendo HLA-B*27:05 el subtipo más extendido y claramente asociado con la EA[16].

La asociación de este alelo con múltiples patologías y su carácter fundamental en la confirmación del diagnóstico de espondilitis anquilosante por asociación, convierte a este test genético en una ayuda fundamental en el diagnóstico clínico. Es por ello por lo que se comenzó con el desarrollo y puesta a punto de una prueba de diagnóstico molecular por qPCR para la determinación de la predisposición genética a sufrir espondilitis anquilosante y otras enfermedades inmunitarias relacionadas con el alelo HLA-B*27, diferenciando los subtipos de riesgo.

Para el desarrollo del diseño de kits para HLA-B27 se diseñaron sondas para la discriminación entre las siguientes secuencias:

B272-FAMXL (mut.):

Información omitida por motivos de confidencialidad

B272.2-HEXXL (wt):

Información omitida por motivos de confidencialidad

Tm (Primer Forward) = 59,3°C

Tm (Primer Reverse) = 58,7°C

En una primer momento, se diseñaron y se sintetizaron dos posibles secuencias para cada una de las mutaciones, una más restrictiva en cuanto a Tm que la otra (Tabla 73):

Tabla 73. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas inicialmente para las mutaciones del gen B272. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.B272.FAM.CBQX.1 (mut.)	**Información omitida**[(a)]	38	18	62	12
L.B272.FAM.CBQX.2 (mut.)	**Información omitida**[(a)]	32	21	64	14
L.B272.2.SHEX.CBQX.1 (wt)	**Información omitida**[(a)]	42	20	62	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.2 (wt)	**Información omitida**[(a)]	42	15	64	13

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

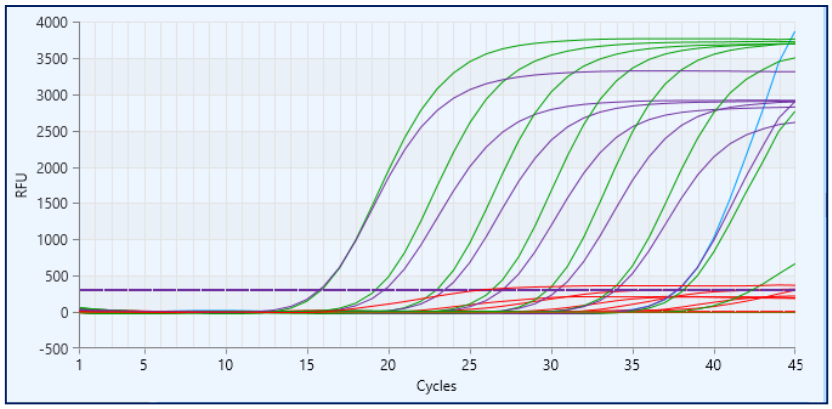


Figura 108. Diseños para detectar el alelo mutado de HLA-B27. Señal específica en FAM, L.B272.FAM.CBQX.1 en verde, L.B272.FAM.CBQX.2 en morado. Señal inespecífica en HEX, en rojo L.B272.FAM.CBQX.2.

En el caso de la sonda en FAM para la variante mutante, L.B272.FAM.CBQX.1 mostró señal específica, mientras que L.B272.FAM.CBQX.2 reconoció también el DNA wt (Figura 108). Además, L.B272.FAM.CBQX.1 presenta también una fluorescencia ligeramente mayor que L.B272.FAM.CBQX.2 por lo que se escogió la primera opción. La aparición de señal inespecífica de L.B272.FAM.CBQX.2 sumado a la menor fluorescencia específica es posible que se deba a una competición de ambas dianas por la sonda disponible. ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.

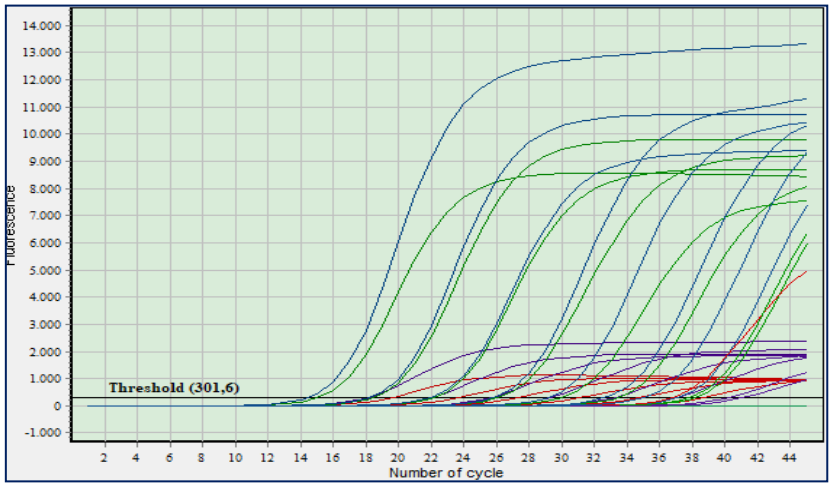


Figura 109. Diseños para detectar el alelo wt de HLA-B27. Señal específica HEX, L.B272.2.SHEX.CBQX.1 en verde y L.B272.2.SHEX.CBQX.2 en azul. Señal inespecífica en FAM, L.B272.2.SHEX.CBQX.1 en morado y L.B272.2.SHEX.CBQX.2 en rojo.

En el caso de las sondas en HEX para la variante wt, ambas resultaron ser inespecíficas al amplificar el DNA mutado (Figura 109). Por ello, se tuvieron que diseñar nuevas secuencias, restringiendo la longitud de la sonda al mínimo y ajustando la Tm. Se sintetizaron las siguientes secuencias (Tabla 74):

Tabla 74. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas para la variante wt del gen B272. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.B272.2.SHEX.CBQX.3 (wt)	**Información omitida**[(a)]	42	19	62	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.4 (wt)	**Información omitida**[(a)]	42	15	62	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.5 (wt)	**Información omitida**[(a)]	40	16	63	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.6 (wt)	**Información omitida**[(a)]	40	18	63	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Las sondas L.B272.2.SHEX.CBQX.3 y L.B272.2.SHEX.CBQX.4 no generaron señal de fluorescencia. Ambas sondas se descartaron (Figura 110). Los parámetros de diseño acabaron siendo muy similares a la sonda L.B272.2.SHEX.CBQX.1, que acabó teniendo unas fluorescencias totales cercanas a las 10000 RFU. Sin embargo, el experimento se repitió obteniendo idénticos resultados.

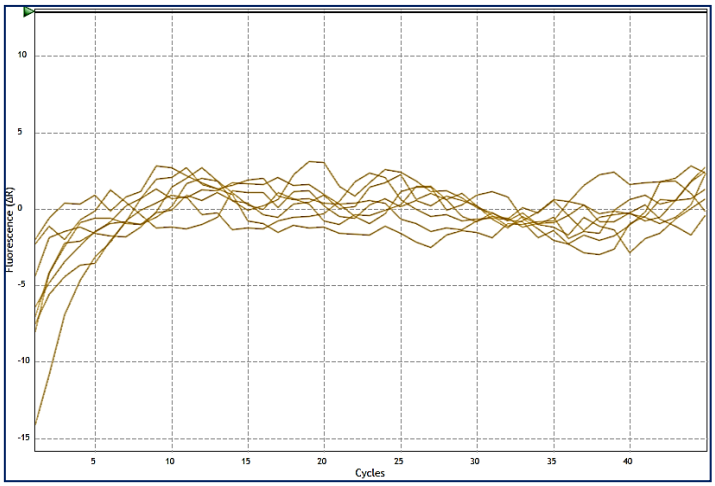


Figura 110. Diseños para detectar el alelo wt de HLA-B27. Diseño 3 en verde y diseño 4.

La sonda L.B272.2.SHEX.CBQX.6 resultó ser inespecífica de nuevo. En base a los resultados obtenidos, de los 4 nuevos diseños se seleccionó L.B272.2.SHEX.CBQX.5 por ser la única sonda específica, aunque la intensidad de su fluorescencia fuera baja (Figura 111). Este hecho remarca la influencia del uso de LNA en la síntesis de sondas: la diferencia de la posición de una única base LNA supone una variación muy notable en el rendimiento por qPCR, tanto en ratio especificidad/inespecificidad como en fluorescencia total.

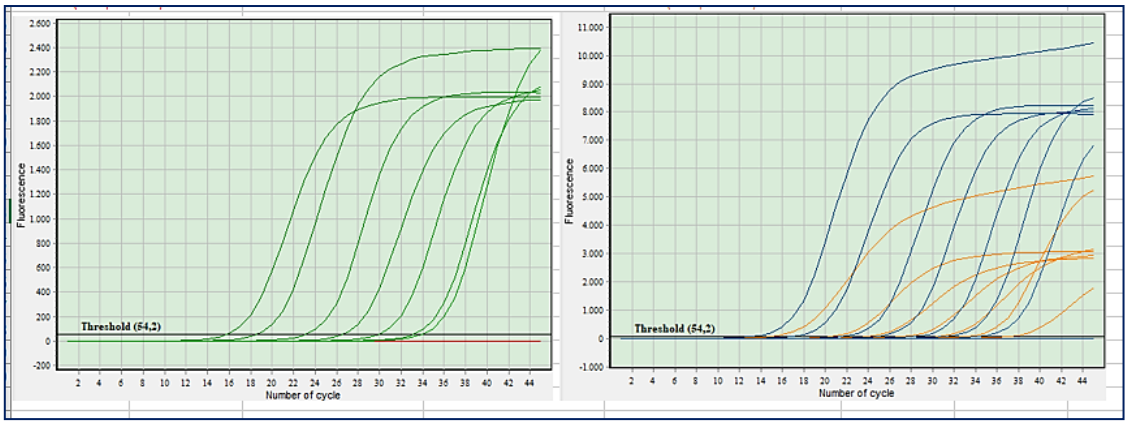


Figura 111. Diseños para detectar el alelo wt de HLA-B27. Izquierda L.B272.2.SHEX.CBQX.5, señal específica en verde. Derecha L.B272.2.SHEX.CBQX.6, señal específica en azul e inespecífica en naranja.

Para intentar compensar la baja fluorescencia, se estudió modificar la cantidad de sonda usada. Al trabajar de esta forma empezaron a aparecer también señales inespecíficas con esta sonda (Figura 112):

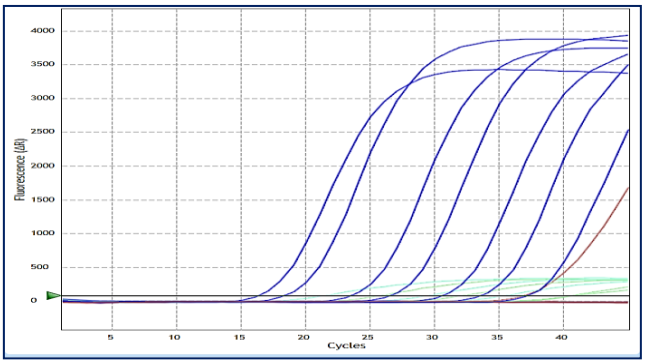


Figura 112. Diseños para detectar el alelo wt de HLA-B27. L.B272.2.SHEX.CBQX.5, en azul la señal específica, en azul claro la inespecífica.

Se intentó eliminar esta señal inespecífica. Para ello, se modificaron las condiciones de reacción de la PCR ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Sin embargo, no se consiguió que esta señal desapareciera. Vistos los resultados, se desarrollaron nuevos diseños, en base a la versión L.B272.2.SHEX.CBQX.5 y con el objetivo de evitar los problemas encontrados (Tabla 75):

Tabla 75. Lista de secuencias de las sondas LNA diseñadas para la variante wt del gen B272. Tercera versión diseñada a partir de la secuencia L.B272.2.SHEX.CBQX.5 La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1	SS	Tm	N
L.B272.2.SHEX.CBQX.7	**Información omitida**[(a)]	40	14	63	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.8	**Información omitida**[(a)]	40	16	62	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.9	**Información omitida**[(a)]	42	17	62	12
L.B272.2.SHEX.CBQX.10	**Información omitida**[(a)]	40	16	60	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

La estrategia seguida en el diseño de estas nuevas versiones fue procurar mantener la misma Tm que en L.B272.2.SHEX.CBQX.5, intentando no modificar demasiado los scores de formación de dímeros de primer (S1-S1) y de formación de estructuras secundarias (SS) en los tres primeros casos (L.B272.2.SHEX.CBQX.7, L.B272.2.SHEX.CBQX.8 y L.B272.2.SHEX.CBQX.9), mientras que en el último (L.B272.2.SHEX.CBQX.10) se probaron otras Tms más.

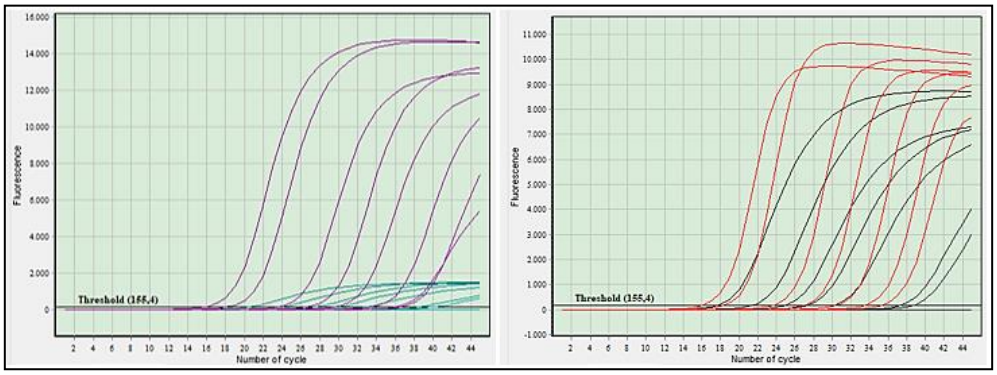


Figura 113. Diseños para detectar el alelo wt de HLA-B27. Izquierda L.B272.2.SHEX.CBQX.7, en morado la señal específica, en azul, la inespecífica. Derecha L.B272.2.SHEX.CBQX.8, en rojo la señal específica, en negro la señal inespecífica.

Debido a la gran señal inespecífica que presenta L.B272.2.SHEX.CBQX.8, se descartó directamente. En cambio, la sonda L.B272.2.SHEX.CBQX.8, aunque es levemente inespecífica, daba una fluorescencia final mucho más alta que L.B272.2.SHEX.CBQX.5. Además, tiene una ratio señal específica/inespecífica más alta que este último (Figura 113). Será la sonda L.B272.2.SHEX.CBQX.7 la que se compare con las secuencias L.B272.2.SHEX.CBQX.9 y L.B272.2.SHEX.CBQX.10 (Figura 114).

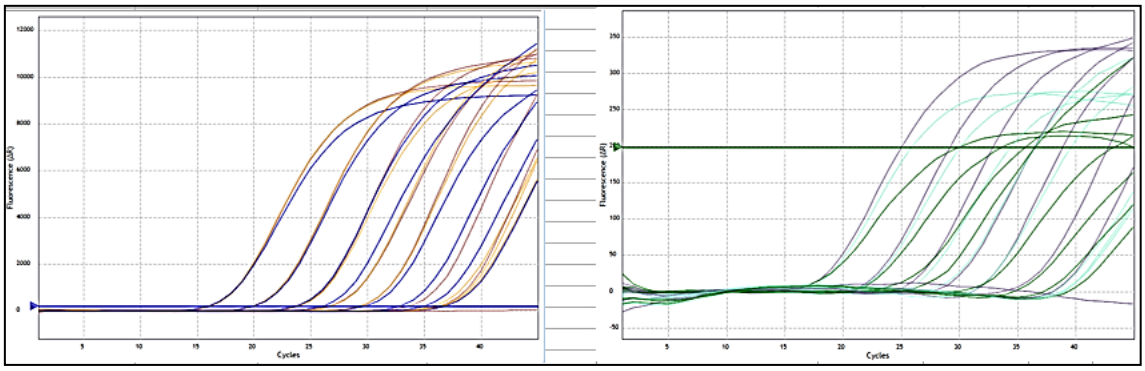


Figura 114. Diseños para detectar el alelo wt de HLA-B27. Izquierda señales específicas de L.B272.2.SHEX.CBQX.7 (naranja), L.B272.2.SHEX.CBQX.9 (amarillo) y L.B272.2.SHEX.CBQX.10 (azul). Derecha señales inespecíficas de L.B272.2.SHEX.CBQX.7 (morado), L.B272.2.SHEX.CBQX.9 (azul claro) y L.B272.2.SHEX.CBQX.10 (verde).

Los diseños de L.B272.2.SHEX.CBQX.9 y L.B272.2.SHEX.CBQX.10 generaron resultados muy similares a los de L.B272.2.SHEX.CBQX.7 y, aunque la señal inespecífica de L.B272.2.SHEX.CBQX.9 y L.B272.2.SHEX.CBQX.10 es menor que la de L.B272.2.SHEX.CBQX.7, no se podría asegurar que no se debiera a diferencias experimentales. Se intentó eliminar la señal inespecífica ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Se mantuvo la modificación de la temperatura por ser el único factor que disminuye la señal inespecífica, dejando la señal específica a unos niveles aceptables. De entre estos 3 últimos diseños aceptados, el que menos rendimiento perdía respecto a fluorescencia final y a la aparición de señal inespecífica fue L.B272.2.SHEX.CBQX.7, con lo que se decidió continuar con esta sonda en pruebas sucesivas. Se hicieron las síntesis de esta secuencia utilizando otros fluoróforos y quencher con el fin de ver si en otros canales la

inespecificidad desaparecía, sin embargo, no se obtubieron resultados satisfactorios. De la misma forma que ocurrió con VAR1, se decidió probar con una estrategia de competidores, sintizando oligonucleótidos con las secuencias de L.B272.FAM.CBQX.1 y L.B272.2.SHEX.CBQX.7, llamados L.B272.C.1 y L.B272.2.C.7 (Figura 115).

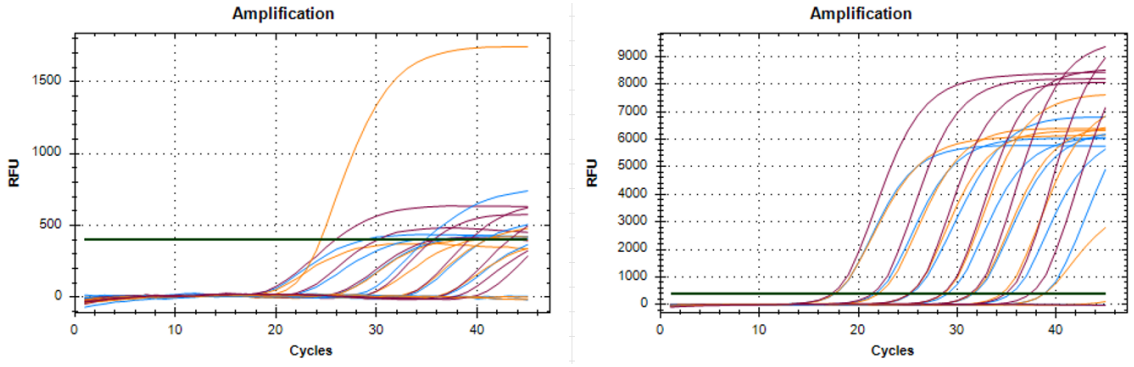


Figura 115. Estrategia de oligos competidores para eliminar la señal inespecífica para detectar el alelo wt. Izquierda señales inespecíficas: sin competidores (azul), L.B272.C.1 (amarillo) y L.B272.2.C.7 (morado). Derecha señales específicas: sin competidores (azul), L.B272.C.1 (amarillo) y L.B272.2.C.7 (morado).

Como se puede observar, esta estrategia tampoco ofrece una mejora respecto a la aparición de la inespecificidad y tampoco tiene efecto sobre la señal específica. Pese a que los resultados obtenidos por qPCR tenían margen de mejora respecto a una situación ideal, la sonda pudo ser usada. Para ello, se usó en un termociclador en modo genotipado, en el que la señal no se interpreta como un resultado positivo, logrando así tener la discriminación deseada en la detección de este alelo de HLA asociado a la aparición de Espondilitis Anquilosante.

La dificultad que se encontró en el diseño de sondas para los nuevos kits demandado por la sección de PCR se incrementa hasta un nivel en el que la tecnología LNA presenta limitaciones. Las características demandadas en los nuevos kits requieren de muchos intentos y la realización de numerosos diseños de sondas sobre la misma secuencia diana para seguir avanzando en estos desarrollos y, en algunos casos, sin llegar a una solución final satisfactoria. Es por ello por lo que se planteó el uso de un nuevo modificador de la secuencia que nos permitiera regular la afinidad de las sondas por sus dianas y lograr así esa especificidad tan necesaria y que tanto cuesta lograr en estos constructos cada vez más complejos. Se decidió por terminar usando *Unlocked Nucleic Acids* (UNAs).

Los UNAs son derivados acíclicos de los ribonucleótidos en los que se ha escindido el enlace entre el C2' y el C3' de la ribosa de la molécula. Esto produce que la estructura sea mucho más flexible que el caso de los RNAs, DNAs y, en mayor medida de los LNAs (Figura 116)[17]. Cuando forma parte de la secuencia de un oligonucleótido produce una desestabilización del dúplex formado, lo que se traduce en un descenso de la Tm de ese nucleótido respecto a su homólogo de DNA, disminuyéndola de 7 a 10°C[18]. Además, este descenso es aditivo con cada base UNA que se incorpore a la secuencia.

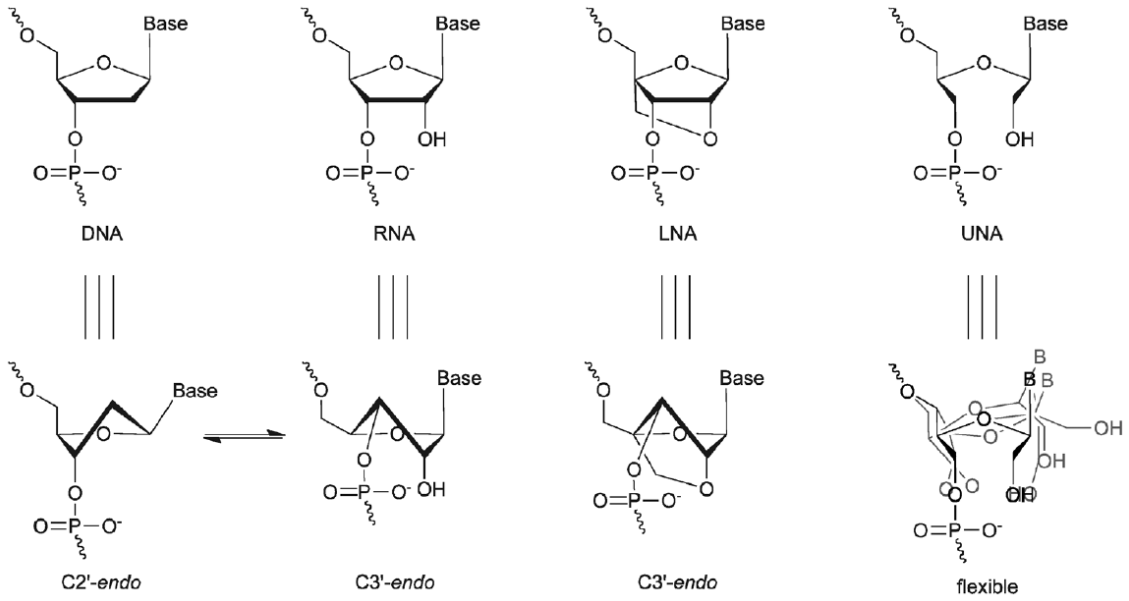


Figura 116. Estructuras (arriba) y conformaciones que suelen adoptar (abajo) los monómeros de DNA, RNA, LNA y UNA respectivamente. Se puede observar la mayor flexibilidad de los UNAs que contrasta en gran medida con la rigidez de los LNAs[17].

El efecto que produce el uso de bases UNA sobre la capacidad de discriminación del oligonucleótido ha sido estudiada[19]. La adición de una única base UNA no produce apenas una mejora en la capacidad de discriminación de la secuencia ya sea sobre la base mutada como de las vecinas. En cambio, cuando se utilizan un par de bases UNA por oligonucleótido observamos dos efectos. Cuando se realiza un diseño en el que las bases UNA modificadas se encuentran muy próximas a la mutación, la desestabilización térmica que generan en ese pequeño sector disminuye la importancia del *mismatch* en el cómputo global de la Tm y de la hibridación con la secuencia complementaria, produciendo también un descenso en su capacidad de discriminación. Sin embargo, se han observado mejoras en la discriminación de *mismatches* cuando en oligonucleótidos en torno a las 20 bases de longitud, se modifican bases que distan 4 nucleótidos de distancia respecto a la mutación. Es posible que la flexibilidad local que se introduce y por tanto la desestabilización de los dúplex formados, aumente la capacidad de detectar un simple *mismatch* porque puedan tener un efecto cooperativo en la posibilidad o no de hibridar[17–19].

Además de esta capacidad para modular la discriminación de un *mismatch*, los UNAs también tienen otras muchas aplicaciones como son la síntesis de aptámeros, la síntesis de oligonucleótidos antisense para el silenciamiento de genes mediante la focalización en mRNAs, la síntesis de siRNAs y en la modulación en la formación de triplex[19,20].

(información omitida por motivos de confidencialidad) En este punto se consiguió encontrar un proveedor que suministrara fosforamiditas UNA, lo cual favoreció y simplificó su uso. Tanto la incorporación a nuestro proceso sintético de las fosforamiditas UNA como la síntesis de sondas combinando ambas modificaciones ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** no supusieron ningún inconveniente y no hubo que modificar el protocolo ya establecido. Tampoco hubo contratiempos en su digestión, purificación y caracterización, ni tampoco problemas de solubilidad en agua. Sin embargo, el obstáculo se encontraba en el diseño, ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Además, tampoco se contaba con herramientas de predicción de Tm, formación de dímeros ni estructuras secundarias así que en el caso de estas sondas comenzábamos totalmente a ciegas. La aproximación que se tomó fue realizar los cálculos de las

propiedades anteriores para la sonda ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** y luego añadir bases ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.

Se decidió comenzar a trabajar con este nuevo concepto de sondas con B272.2-HEXX[(a)], ya que es la versión más simple de un ensayo qPCR y todavía no se había encontrado una solución óptima. Se comenzó con una única modificación ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** y con ello se logró la especificidad y la funcionalidad deseada. La longitud de la sonda también se modificó ya que según la bibliografía el efecto discriminatorio producido por los ***(información y bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)*** (Tabla 76).

Tm (Primer Forward) = 59,3°C

Tm (Primer Reverse) = 58,7°C

*Tabla 76. Secuencia de la sonda mixta diseñada para la variante wt del gen B272. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. La base UNA está destacada con un "-" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. *Datos referentes a la sonda sin la base UNA.*

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1*	SS*	Tm*	N
LU.B272.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	40	21	66	15

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

El estudio de la primera sonda ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** diseñada y sintetizada generó resultados prometedores. ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, pero la sonda proporciona una señal específica considerable (alrededor de los 6000 RFUs). Estos resultados confirmaban que el concepto de sondas mixtas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** funciona en qPCR. En este caso, la una señal inespecífica fue menor que para las sondas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** independientes por lo que podría llegar a tener capacidad discriminatoria (Figura 117). Sin embargo, era necesario realizar más experimentos para ver cómo cambia el rendimiento en qPCR de estas sondas dependiendo de la base que se modificara.

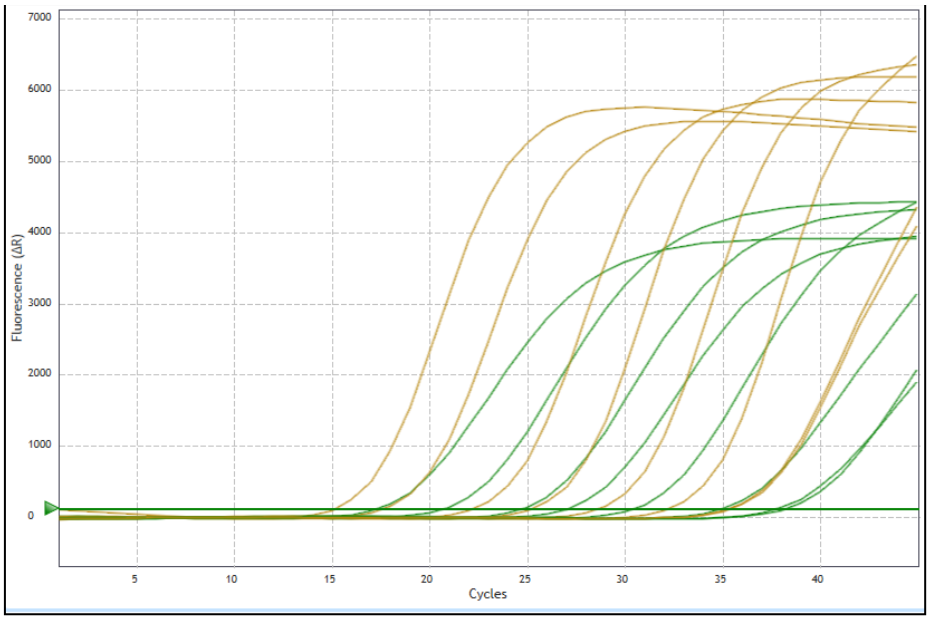


Figura 117. Fluorescencia específica (marrón) vs fluorescencia inespecífica (verde) de la sonda LU.B272.2.SHEX.CBQX.1.

Para LU.B272.2.SHEX.CBQX.1, se teoriza que la modificación ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** en el extremo de la secuencia quizá no sea suficiente para generar la desestabilización local que se traduzca en el necesario descenso de la Tm. Por ello, se sintetizaron nuevas sondas (Tabla 77).

*Tabla 77. Lista de secuencias de sondas mixta diseñadas para la variante wt del gen B272. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. La base UNA está destacada con un "-" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. *Datos referentes a la sonda sin la base UNA*

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1*	SS*	Tm*	N
LU.B272.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	40	12	61	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	40	14	64	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.4	**Información omitida**[(a)]	26	12	55	15

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Para LU.B272.2.SHEX.CBQX.2 se siguió una estrategia conocida en la bibliografía respecto al uso de ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, las dos flanqueando la secuencia en ambos extremos de ella. En el caso de LU.B272.2.SHEX.CBQX.3 se decidió modificar una base ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Finalmente, la versión LU.B272.2.SHEX.CBQX.4 se sintetizó para estudiar un caso extremo y ver si un exceso de bases ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** en la base mutada era lo indicado. Los resultados de la funcionalidad de las sondas fueron muy pobres, obteniendo sólo señal específica únicamente en la versión 3, pero con apenas intensidad (en torno a 1000 RFUs). Aunque la señal específica era baja, no generó señal inespecífica. Los resultados obtenidos posiblemente están relacionados con que las Tms iniciales de LU.B272.2.SHEX.CBQX.2 y LU.B272.2.SHEX.CBQX.4 eran inadecuadas para introducirles bases ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** (Figura 118).

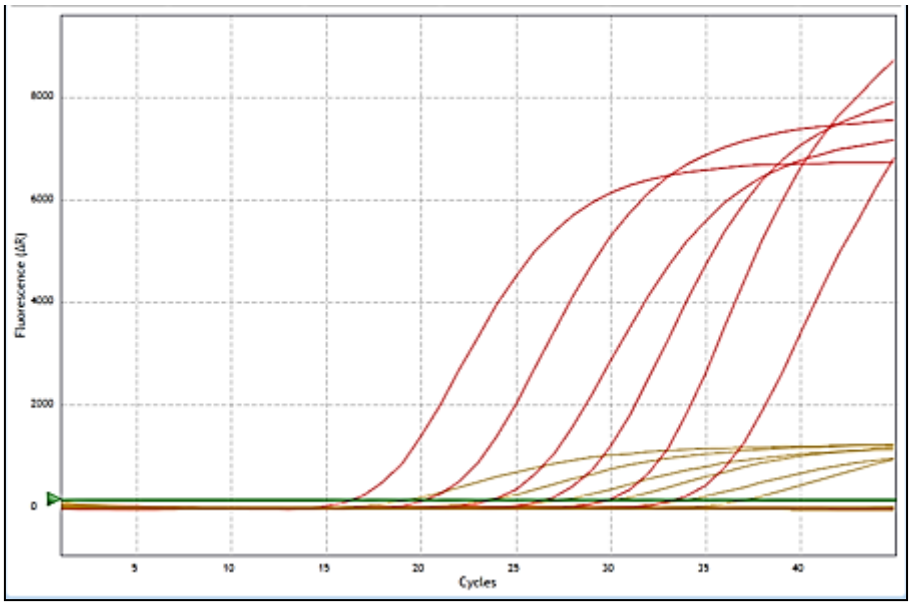


Figura 118. Fluorescencias específicas de L.B272.2.SHEX.CBQX.7 (rojo) utilizado como control, y LU.B272.2.SHEX.CBQX.2 (gris), LU.B272.2.SHEX.CBQX.3 (marrón) y LU.B272.2.SHEX.CBQX.4 (lila).

*Tabla 78. Lista de secuencias de sondas mixta diseñadas para la variante wt del gen B272. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. La base UNA está destacada con un "-" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. *Datos referentes a la sonda sin la base UNA*

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1*	SS*	Tm*	N
LU.B272.2.SHEX.CBQX.5	**Información omitida**[(a)]	26	14	58	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.6	**Información omitida**[(a)]	40	17	64	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.7	**Información omitida**[(a)]	40	12	59	15

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Para el diseño a diseñar nuevas sondas (Tabla 78) se plantearon diferentes estrategias. Con LU.B272.2.SHEX.CBQX.5 se sustituyó una de las bases ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** para comprobar si el aumento de Tm era el suficiente para producir algo de señal. LU.B272.2.SHEX.CBQX.6 se diseñó de forma que la ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** estuviera más próxima a la base mutada, manteniendo la Tm inicial ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Por último, LU.B272.2.SHEX.CBQX.7 cuenta con un diseño más restrictivo que el anterior, manteniendo la Tm. De nuevo no se obtuvo señal utilizando estas tres nuevas sondas (ver Figura 119).

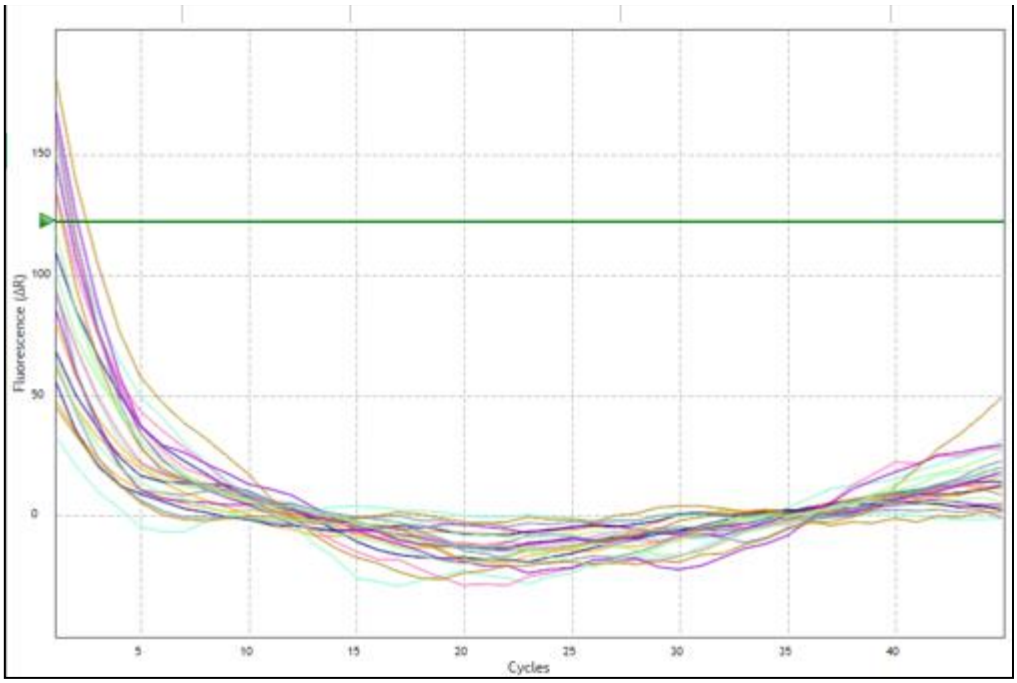


Figura 119. Fluorescencias específicas de LU.B272.2.SHEX.CBQX.5, LU.B272.2.SHEX.CBQX.6 y LU.B272.2.SHEX.CBQX.7.

En base a los resultados obtenidos en el uso de bases ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** en secuencias cortas hace que la sonda no hibride con la diana. Sin embargo, con este tipo de sondas sí que se obtienen resultados con aquellos diseños que sólo tiene una sustitución ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Teniendo en cuenta esta premisa, se hicieron unos últimos diseños (Tabla 79) introduciendo modificaciones de una sola base ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** y modificando las Tms iniciales.

*Tabla 79. Lista de secuencias de sondas mixta diseñadas para la variante wt del gen B272. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. La base UNA está destacada con un "-" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones polimórficas. *Datos referentes a la sonda sin la base UNA*

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1*	SS*	Tm*	N
LU.B272.2.SHEX.CBQX.8	**Información omitida**[(a)]	40	18	67	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.9	**Información omitida**[(a)]	40	21	66	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.10	**Información omitida**[(a)]	40	17	64	15
LU.B272.2.SHEX.CBQX.11	**Información omitida**[(a)]	40	17	64	15

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

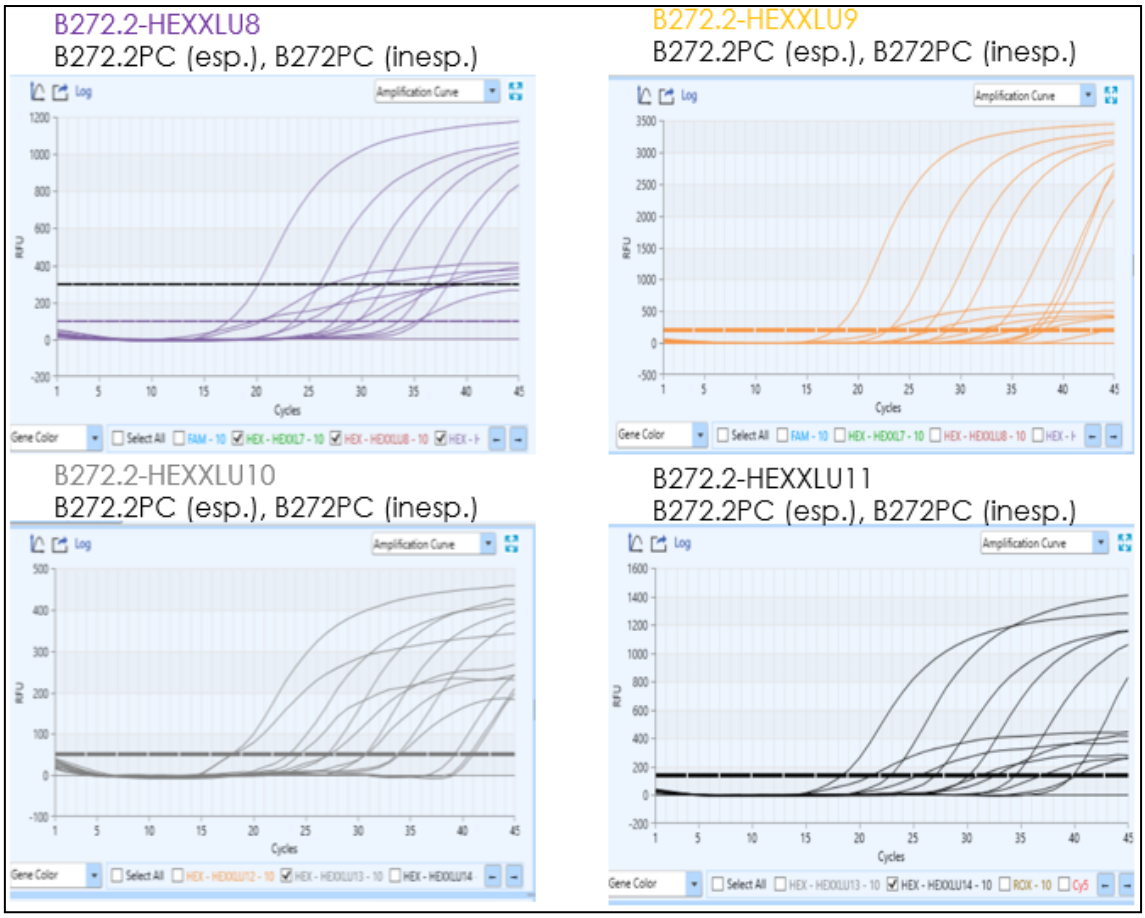


Figura 120. Fluorescencias específicas e inespecíficas de las secuencias LU.B272.2.SHEX.CBQX.8 (morado), LU.B272.2.SHEX.CBQX.9 (amarillo), LU.B272.2.SHEX.CBQX.10 (gris) y LU.B272.2.SHEX.CBQX.11 (negro).

En este último set de sondas se logró obtener señal en todos los casos. Sin embargo, no se obtuvieron resultados totalmente específicos. De hecho, en el peor de los casos, LU.B272.2.SHEX.CBQX.10, su señal inespecífica está al nivel de la específica y con fluorescencias finales muy bajas. No obstante, LU.B272.2.SHEX.CBQX.9, es la sonda que mejor rendimiento ha tenido entre las sondas que se han estudiado, exceptuando LU.B272.2.SHEX.CBQX.7. Analizando la secuencia de LU.B272.2.SHEX.CBQX.9, se trata de una de las sondas de este último set y la base ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** a la suma de Tm total. Si la comparamos con LU.B272.2.SHEX.CBQX.8, la Tm de ésta es algo mayor pero la base ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***, por lo que la bajada que provoca en la temperatura es ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Viendo este efecto, todos los diseños anteriores podrían tener una Tm final inapropiada para obtener buenos resultados en el ensayo.

La falta de herramientas bioinformáticas para la predicción de las propiedades de los diseños ha dificultado en gran medida el avance hacia la obtención de sondas con una mayor funcionalidad de la obtenida. Por otro lado, el estudio del uso de sondas mixtas LNA y UNA no ha aportado resultados satisfactorios para su aplicación al diseño de kits de detección de patógenos por qPCR. Sin embargo, con este trabajo se ha demostrado que es posible llevar a cabo su síntesis y se abre una línea de investigación para encontrar nuevas aplicaciones.

III.2.2. HLA-B57/58

Las reacciones adversas a fármacos (RAM) son una causa nada despreciable de morbilidad y mortalidad en la medicina moderna[21]. Según *Alomar et al*[22]*.* cada año mueren más de 100.000 personas por RAM. La mayoría de las RAM graves pertenecen a las reacciones imprevisibles de tipo B, que son poco frecuentes, no guardan relación con la dosis y se producen en individuos con una predisposición genética subyacente. Estudios farmacogenéticos han relacionado la aparición de varias RAM con diferentes alelos de HLA. Dos de estos ejemplos son el HLA-B*57:01 asociado a la reacción de hipersensibilidad del Abacavir (antiretroviral combinado para el tratamiento del VIH)[23] y el HLA-B*58:01/02 asociado a reacciones adversas cutáneas graves al alopurinol (medicamento utilizado para reducir niveles altos de ácido úrico en el organismo)[24].

Al tratarse de medicamentos de uso corriente, es de gran interés clínico el desarrollo de un test genético de qPCR que permita identificar estas variantes. El diseño del ensayo se enfoca en la detección específica del alelo B*57:01, considerando los 46 subtipos descritos hasta la fecha para B*57:01, así como los 27 subtipos descritos para B*57:01:01, todos ellos asociados a la enfermedad. A su vez, el diseño se centra en la discriminación de alelos similares a B*57:01 estos son B*57:02, B*57:03, B*57:04 (no asociados a enfermedad) y B*58:01 y B*58:02, pero no en su identificación. Para diferenciar entre los polimorfismos de estos alelos, se recurrió al diseño de sondas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.

La estrategia planteada en el ensayo fue el uso de dos primers comunes con dos sondas. Cada sonda estaba dirigida a una zona común para diferentes alelos, de tal manera que la futura sonda B572 en el canal HEX reconociera exclusivamente una región común para los alelos HLA-B57:01, HLA-B57:02, HLA-B57:03 y HLA-B57:04 y la futura sonda B573 en el canal FAM exclusivamente identificara una región común para HLA-B57:01, HLA-B58:01 y HLA-B58:02, sin que hubiera reacciones cruzadas. El mayor problema que se afrontó en este diseño tanto para la selección de dichas regiones como para el diseño de las sondas ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** fue la presencia de residuos no conservados entre alelos. La presencia de estos nucleótidos no conservados en los oligonucleótidos debía ser reducida al máximo posible, ya que, como los diseños de primers y sondas se enfocan para tener una Tm específica, la posibilidad de que haya una posición en la que la base nitrogenada varíe podría tener una gran influencia en la hibridación con la secuencia objetivo.

Las regiones seleccionadas para el diseño de las sondas se muestran en la Tabla 80. Como se puede apreciar en el alineamiento de los alelos de HLA-B57, representado en la Figura 121, la sonda B573 contiene ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Otra dificultad añadida al diseño fue que la sonda B572 ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** limita en gran medida las posibles modificaciones de bases ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.

Tm (Primer Forward) = 59,7°C

Tm (Primer Reverse) = 60,2°C

Tabla 80. Secuencias de los diferentes componentes del test para HLA-B57 de qPCR. En rojo, las posiciones mutadas a detectar. En azul, el residuo no conservado.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'
B572-HEX	**Información omitida**[(a)]
B573-FAM	**Información omitida**[(a)]

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

(Imagen omitida por motivos de confidencialidad)

Figura 121. Alineamiento de las secuencias genéticas de los alelos B57:01, B57:02, B57:03, B57:04, B58:01 y B58:02. Resaltado en rojo los nucleótidos nos conservados entre subtipos. Destacado primer Forward (amarillo), Reverse (verde), región de diseño de la sonda B572-HEX (morado), región de diseño de la sonda B573-FAM (gris) y posición mutada a detectar (azul).

El planteamiento que se llevó a cabo para el diseño de la sonda B572.2-HEX fue el modificar el número de bases para no tener Tms excesivamente altas que pudieran producir señales inespecíficas. De esta forma, se diseñaron 3 secuencias diferentes (Tabla 81). B572.2-HEXXL1 sólo tiene modificado un residuo. Lo mismo ocurre con B572.2-HEXXL2 ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. En el caso de B572.2-HEXXL3 se introdujo una alternativa ya conocida en la bibliografía ***(Bibliografía omitida por motivos de confidencialidad)***.

Tabla 81. Lista de secuencias de las sondas LNA para la región B572. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones mutadas a detectar.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1*	SS*	Tm*	N
L.B572.2.SHEX.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	33	12	70	12
L.B572.2.SHEX.CBQX.2	**Información omitida**[(a)]	33	12	67	12
L.B572.2.SHEX.CBQX.3	**Información omitida**[(a)]	33	10	64	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

En el caso de B573-FAM, el problema específico se abordó con el diseño de dos sondas con la misma Tm objetivo para cada una de las secuencias posibles (Tabla 82). En el ensayo de qPCR se procedió incluyendo ambas sondas a la mitad de la concentración cada una, con el objetivo de que cada una reconociera de forma similar a su respectiva secuencia con la base ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** y se obtuvieran señales fluorescentes de intensidades comparables. Ambas sondas contribuirían a la señal fluorescente en el canal de FAM.

Tabla 82. Lista de secuencias de las sondas LNA para la región B573. La base LNA está destacada con un "+" a su izquierda. Tm: Temperatura de melting. S1-S1: score de la formación de dímeros de primer. SS: score de la formación de estructuras secundarias. N: tamaño de la sonda en número de bases. En rojo las posiciones mutadas a detectar. En azul, el residuo no conservado.

Nombre de secuencia	Secuencia 5'→3'	S1-S1*	SS*	Tm*	N
L.B573.1.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	20	10	65	12
L.B573.2.FAM.CBQX.1	**Información omitida**[(a)]	30	14	65	12

[(a)]: Información omitida por motivos de confidencialidad.

Con este sistema de sondas diseñado, la tabla de correspondencias para identificar un alelo o grupo de alelos determinado quedaría según los reflejado en la Tabla 83.

Tabla 83. Tabla de correspondencias señal/alelo.

Diana	Señal HEX	Señal FAM
Alelo B*57:01:01:01	✓	✓
Alelo B*57:02:01:01	✓	✗
Alelo B*57:03:01:01	✓	✗
Alelo B*57:04:01:01	✓	✗
Alelo B*58:01:01:01	✗	✓
Alelo B*58:02:01:01	✗	✓

En primer lugar, se confirmó la funcionalidad de las 5 sondas en monoplex frente a cada uno de los alelos a analizar. Se emplearon los siguientes controles positivos:

- B571.3PC: homología con el alelo B*57:01:01:01. Debería ser reconocida por las sondas B572.2-HEX, B573.1-FAM y B573.2-FAM.
- B572.2PC: homología con los alelos B*57:02:01:01 y B*57:03:01:01. Debería ser reconocida por la sonda B572.2-HEX.
- B574.2PC: homología con el alelo B*57:04:01:01. Debería ser reconocida por la sonda B572.2-HEX.
- B581.2PC: homología con el alelo B*58:01:01:01. Debería ser reconocida por las sondas B573.1-FAM y B573.2-FAM.
- B582.2PC: homología con el alelo B*58:02:01:01. Debería ser reconocida por las sondas B573.1-FAM y B573.2-FAM.

En estas pruebas se descartaron las sondas L.B572.2.SHEX.CBQX.1 y L.B572.2.SHEX.CBQX.2 por presentar una señal inespecífica al reconocer la secuencia de HLA-B58:01 y HLA-B58:02. Tanto L.B573.1.FAM.CBQX.1 como L.B573.2.FAM.CBQX.1 tuvieron resultados apropiados, al no presentar inespecificidades y generar una señal fluorescente lo suficientemente intensa, en torno a las 7000 RFUs. Después se procedió al diseño de los ensayos multiplex (Figura 122).

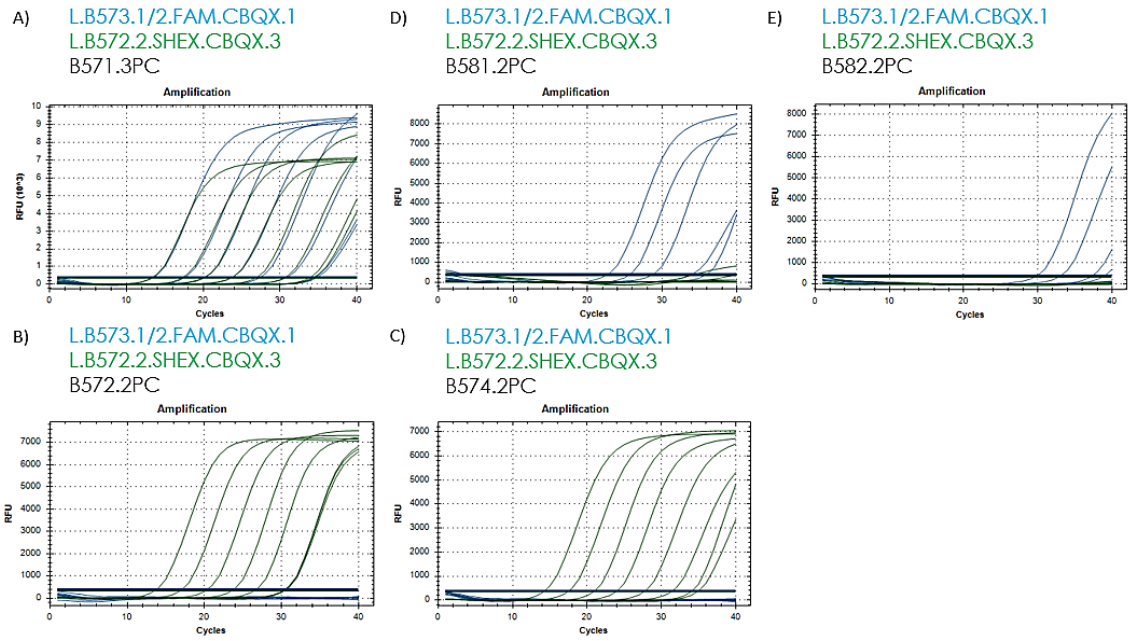


*Figura 122. Comprobación de la funcionalidad en qPCR multiplex de las sondas de HLA-B57/58 frente a los fragmentos de DNA sintéticos que las secuencias de los 5 alelos diferentes B*57:01:01:01 [(a)], B*57:02:01:01, B*57:02:01:01 (B), B*57:04:01:01 (C), B*58:01:01:01 (D) y B*58:02:01:01 (E).*

L.B572.2.SHEX.CBQX.3 proporcionaba una señal con Cts tempranos, respetando el orden dilución y sobrepasando las 7000 RFUs. Esta sonda ofrece, por lo tanto, un fácil análisis de los resultados para sus alelos objetivo (todos los controles positivos del conjunto B*57:01). Sin embargo, presentaba una inespecificidad muy leve en los ciclos finales del control positivo B581.2PC (alelo B58:01:01:01).

El par L.B573.1.FAM.CBQX.1 y L.B573.2.FAM.CBQX.1 reconocieron todas las dianas. La señal que generaban era muy similar a L.B572.2.SHEX.CBQX.3 en el caso del control positivo B571.3PC, con los mismos Cts pero con una mayor intensidad de señal. Sin embargo, para los controles positivos de B58 se observaron retrasos de Cts, perdiendo la señal de las diluciones menos concentradas, especialmente en el caso de B582.2PC. Este resultado es un resultado esperado, ya que la secuencia de los controles positivos sólo representa una de las posibilidades de ese residuo ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***. Los tres diseños propuestos dieron resultados aceptables que se dieron por válidos. El desarrolló del test pasó a pruebas de validación.

CONCLUSIONES

El trabajo recogido a lo largo de este capítulo ha permitido establecer las condiciones adecuadas para la síntesis de sondas funcionales para su uso en qPCR. Se puede resumir:

- Se ha diseñado y sintetizado una sonda LNA para la detección discriminatoria en ensayo multiplex del ribotipo 078 frente al ribotipo 027 de *C. Difficile*.
- Se han diseñado y sintetizado sondas LNA para la detección discriminatoria en sus correspondientes ensayos multiplex de diferentes cepas de *M. Tuberculosis* con polimorfismos en el gen katG frente a la cepa *wildtype*.
- Se han diseñado y sintetizado sondas LNA operativas para la detección discriminatoria en sus correspondientes ensayos multiplex de diferentes cepas de *M. Tuberculosis* con polimorfismos en una sección del gen rpoB frente a la cepa *wildtype*.

- Se han diseñado y sintetizado sondas LNA para la detección discriminatoria en ensayo multiplex de la variante B1.1.7 de COVID-19 con una deleción en el gen de la proteína S frente a la cepa *wildtype*.
- Se han diseñado y sintetizado sondas LNA para la detección discriminatoria en ensayo multiplex de las 14 mutaciones diferentes en el genoma de COVID-19 con una deleción frente a la cepa *wildtype*. Se han desarrollado 3 kits diferentes de qPCR para detección de variantes de COVID-19 de alto interés comercial:
    - SARS-COV-2 VARIANT I: sondas VAR3, VAR4.3, VAR4,2 y VAR1.
    - SARS-COV-2 VARIANT II: sondas VAR6, VAR7 y VAR3.3
    - SARS-COV-2 VARIANT III: sondas VAR 11 y VAR13
- Para la sonda VAR1 se ha realizado una estrategia de oligonucleótido LNA competidor, que evita que se produzca un reconocimiento inespecífico de la sonda con su misma secuencia.
- Se han diseñado y sintetizado sondas LNA operativas para la detección discriminatoria en ensayo multiplex del alelo mutado HLA-27 asociado a espondilitis anquilosante. Sólo se consiguió desarrollar la sonda específica para el alelo wildtype.
- Se reconoció el límite de la tecnología LNA, para determinadas secuencias (HLA-B27) o para sistemas muy complejos, en los que hay varias secuencias mutadas con varios nucleótidos mutados en cada una de ellas.
- Se han diseñado y sintetizado sondas LNA para la detección discriminatoria en ensayo multiplex de los alelos HLA-B57:01:01:01 y HLA-B58:01/02 frente a HLA-B57:01:01:02, HLA-B57:01:01:03, HLA-B57:01:01:04 incluso con la presencia de un residuo no conservado en la secuencia.
- Se han diseñado y sintetizado con éxito sondas mixtas.
- Es necesario desarrollar herramientas que permitan establecer unas directrices claras para la mejora del diseño de sondas mixtas.
- Es posible hacer diseños de sondas LNA dirigidas a secuencias con posiciones degeneradas combinando las dos posibles versiones que conforman el degenerado. Si bien esto sólo es viable para pocas posiciones degeneradas debido al incremento del número necesario de posibles sondas (cálculo combinatorio).
- Los desarrollos LNA más óptimos son sondas de secuencias ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** y con las bases LNA adicionales necesarias para llegar a una Tm ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** la de los primers.
- ***(información omitida por motivos de confidencialidad)*** los rangos de scores de formación de homodímeros (25-35 S1-S1) y formación de estructuras secundarias (15-25 SS). ***(información omitida por motivos de confidencialidad)***.
- Al tratarse de un modificador de secuencia, el uso de LNAs se puede combinar con otra estructura de las ya analizadas o presente en la bibliografía para potenciar las características de estas.

BIBLIOGRAFÍA

(1) You, Y.; Moreira, B. G.; Behlke, M. A.; Owczarzy, R. Design of LNA Probes That Improve Mismatch Discrimination. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (8), e60. https://doi.org/10.1093/nar/gkl175.

(2) *Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio | Infectio*. https://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-articulo-enfermedad-asociada-clostridium-difficile-prevalencia-S0123939212700164 (accessed 2023-06-13).

(3) González-García, N.; Gómez-Pavón, J.; Martínez-Porras, J. L. Diagnóstico, Tratamiento y Control de La Infección Causada Por Clostridium Difficile. *Rev. Esp. Geriatría Gerontol.* https://doi.org/10.1016/S0211-139X(05)74875-7.

(4) de Boer, R. F.; Wijma, J. J.; Schuurman, T.; Moedt, J.; Dijk-Alberts, B. G.; Ott, A.; Kooistra-Smid, A. M. D.; van Duynhoven, Y. T. H. P. Evaluation of a Rapid Molecular Screening Approach for the Detection of Toxigenic Clostridium Difficile in General and Subsequent Identification of the tcdC Δ117 Mutation in Human Stools. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *83* (1), 59–65. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.017.

(5) Bagdasarian, N.; Rao, K.; Malani, P. N. Diagnosis and Treatment of Clostridium Difficile in Adults: A Systematic Review. *JAMA* **2015**, *313* (4), 398–408. https://doi.org/10.1001/jama.2014.17103.

(6) Brodie, D.; Schluger, N. W. The Diagnosis of Tuberculosis. *Clin. Chest Med.* **2005**, *26* (2), 247–271, vi. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2005.02.012.

(7) Rivera, D. F.; Camargo, D. G. Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Médicas UIS* **2015**, *28* (1), 39–51.

(8) Lange, C.; Chesov, D.; Heyckendorf, J.; Leung, C. C.; Udwadia, Z.; Dheda, K. Drug-Resistant Tuberculosis: An Update on Disease Burden, Diagnosis and Treatment. *Respirol. Carlton Vic* **2018**, *23* (7), 656–673. https://doi.org/10.1111/resp.13304.

(9) Zaw, M. T.; Emran, N. A.; Lin, Z. Mutations inside Rifampicin-Resistance Determining Region of rpoB Gene Associated with Rifampicin-Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11* (5), 605–610. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005.

(10) Jamieson, F. B.; Guthrie, J. L.; Neemuchwala, A.; Lastovetska, O.; Melano, R. G.; Mehaffy, C. Profiling of rpoB Mutations and MICs for Rifampin and Rifabutin in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52* (6), 2157–2162. https://doi.org/10.1128/JCM.00691-14.

(11) Marín, M.; de Viedma, D. G.; Ruíz-Serrano, M. J.; Bouza, E. Rapid Direct Detection of Multiple Rifampin and Isoniazid Resistance Mutations in Mycobacterium Tuberculosis in Respiratory Samples by Real-Time PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (11), 4293–4300. https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4293-4300.2004.

(12) Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; Cheng, Z.; Yu, T.; Xia, J.; Wei, Y.; Wu, W.; Xie, X.; Yin, W.; Li, H.; Liu, M.; Xiao, Y.; Gao, H.; Guo, L.; Xie, J.; Wang, G.; Jiang, R.; Gao, Z.; Jin, Q.; Wang, J.; Cao, B. Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond. Engl.* **2020**, *395* (10223), 497–506. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

(13) Korber, B.; Fischer, W. M.; Gnanakaran, S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Abfalterer, W.; Hengartner, N.; Giorgi, E. E.; Bhattacharya, T.; Foley, B.; Hastie, K. M.; Parker, M. D.; Partridge, D. G.; Evans, C. M.; Freeman, T. M.; Silva, T. I. de; Angyal, A.; Brown, R. L.; Carrilero, L.; Green, L. R.; Groves, D. C.; Johnson, K. J.; Keeley, A. J.; Lindsey, B. B.; Parsons, P. J.; Raza, M.; Rowland-Jones, S.; Smith, N.; Tucker, R. M.; Wang, D.; Wyles, M. D.; McDanal, C.; Perez, L. G.; Tang, H.; Moon-Walker, A.; Whelan, S. P.; LaBranche, C. C.; Saphire, E. O.; Montefiori, D. C. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence That D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **2020**, *182* (4), 812-827.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043.

(14) *European Centre for Disease Prevention and Control. Threat Assessment Brief: Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom.* https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapidincrease-sars-cov-2-variant-united-kingdom.

(15) Khan, M. A. An Update on the Genetic Polymorphism of HLA-B*27 With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting). *Curr. Rheumatol. Rep.* **2017**, *19* (2), 9. https://doi.org/10.1007/s11926-017-0640-1.

(16) *HLA-B27 and Its Pathogenic Role : JCR: Journal of Clinical Rheumatology*. https://journals.lww.com/jclinrheum/Citation/2008/02000/HLA_B27_and_Its_Pathogenic_Role.14.aspx (accessed 2023-06-12).

(17) Campbell, M. A.; Wengel, J. Locked vs. Unlocked Nucleic Acids (LNA vs. UNA): Contrasting Structures Work towards Common Therapeutic Goals. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (12), 5680–5689. https://doi.org/10.1039/c1cs15048k.

(18) Pasternak, A.; Wengel, J. Thermodynamics of RNA Duplexes Modified with Unlocked Nucleic Acid Nucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (19), 6697–6706. https://doi.org/10.1093/nar/gkq561.

(19) Langkjaer, N.; Pasternak, A.; Wengel, J. UNA (Unlocked Nucleic Acid): A Flexible RNA Mimic That Allows Engineering of Nucleic Acid Duplex Stability. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (15), 5420–5425. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.06.045.

(20) Pasternak, A.; Wengel, J. Unlocked Nucleic Acid--an RNA Modification with Broad Potential. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (10), 3591–3597. https://doi.org/10.1039/c0ob01085e.

(21) Shoshi, A.; Hoppe, T.; Kormeier, B.; Ogultarhan, V.; Hofestädt, R. GraphSAW: A Web-Based System for Graphical Analysis of Drug Interactions and Side Effects Using Pharmaceutical and Molecular Data. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* **2015**, *15*, 15. https://doi.org/10.1186/s12911-015-0139-5.

(22) Alomar, M. J. Factors Affecting the Development of Adverse Drug Reactions (Review Article). *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* **2014**, *22* (2), 83–94. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.02.003.

(23) *HLA-B*5701 y reacción de hipersensibilidad a abacavir. Métodos de estudio y relevancia clínica | Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-hla-b5701-reaccion-hipersensibilidad-abacavir-metodos-S0213005X08765108 (accessed 2024-08-27).

(24) Hung, S.-I.; Chung, W.-H.; Liou, L.-B.; Chu, C.-C.; Lin, M.; Huang, H.-P.; Lin, Y.-L.; Lan, J.-L.; Yang, L.-C.; Hong, H.-S.; Chen, M.-J.; Lai, P.-C.; Wu, M.-S.; Chu, C.-Y.; Wang, K.-H.; Chen, C.-H.; Fann, C. S. J.; Wu, J.-Y.; Chen, Y.-T. HLA-B*5801 Allele as a Genetic Marker for Severe Cutaneous Adverse Reactions Caused by Allopurinol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (11), 4134–4139. https://doi.org/10.1073/pnas.0409500102.

IV. SECCIÓN EXPERIMENTAL

IV.1. PRODUCTOS SINTETIZADOS.

La denominación de los productos se ha hecho en base a una codificación alfanumérica para facilitar su identificación, según los criterios de la Figura 126.

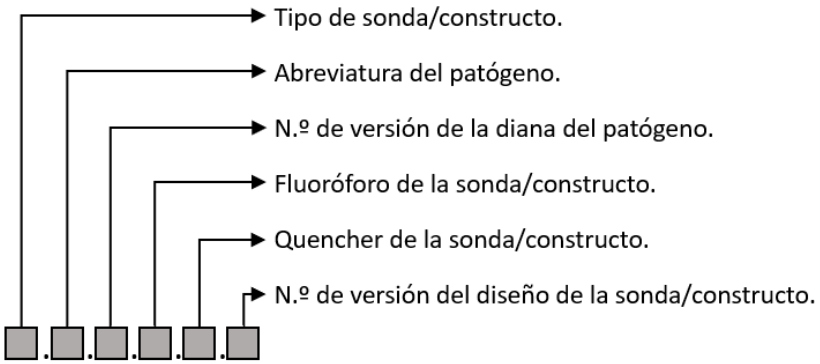


Figura 123. Código alfanumérico para la denominación de los oligonucleótidos nombrados en este trabajo.

La información contenida en este capítulo ha sido completamente omitida por motivos de confidencialidad