

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**OBTENCIÓN DE UNA COLUMNA
MONOLÍTICA DE INMUNOAFINIDAD
COMO CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO
DE UN MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO
DE ANTICUERPOS POLICLONALES**

Diego Sebastián Insuasty Cepeda

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

Obtención De Una Columna Monolítica De Inmunofinidad Como Contribución Al Desarrollo De Un Método De Enriquecimiento De Anticuerpos Policlonales

Diego Sebastián Insuasty Cepeda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Químicas

Director (a):

Doctora Zuly Jenny Rivera Monroy

Línea de Investigación: Química Analítica

Grupo de Investigación: Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.

- Isaac Newton

Agradecimientos

Agradezco a Colciencias por la financiación del proyecto: “Diseño, síntesis y caracterización de Columnas Monolíticas para la separación de Biomoléculas”. Contrato FP44842-037-2015.

A la Universidad Nacional de Colombia, la Facultad de Ciencias y el programa Maestría en Ciencias-Químicas, por la financiación de mi plan de estudios dentro de la Beca Auxiliar Docente.

A mis compañeros del grupo de investigación SAMP, por contribuir con sus consejos y cooperación, a superar los diferentes obstáculos que se presentaron durante esta investigación. También por generar un ambiente de amistad, colaboración y respeto; que me permitió disfrutar y aprovechar al máximo este proceso.

Al profesor Mauricio Maldonado por su colaboración en esta investigación, así como por su gran generosidad y apoyo en momentos difíciles.

Al profesor Javier García por enseñarme el valor de la humildad, la perseverancia, y el optimismo. También por contribuir con su conocimiento en la culminación de este trabajo y por sus innumerables aportes en mi formación académica y personal.

Le agradezco inmensamente a la profesora Zuly Rivera por sus consejos, enseñanzas y apoyo incondicional, tanto académico como emocional, que me permitieron crecer inmensamente como ser humano y como profesional. Mi más sincera admiración y gratitud por la vocación con que afronta su labor, la cual transmite a sus estudiantes el cariño y la pasión por la ciencia.

Finalmente agradezco a mi familia, que con su amor infinito, su valiosa compañía, y sus palabras de aliento, se convirtieron en mi motor para recorrer con alegría, entusiasmo y fortaleza esta fascinante travesía.

Resumen

Los metabolitos tienen gran potencial en el diseño de biomarcadores ya que la presencia o ausencia de estos brinda información valiosa de un sistema biológico. En algunas patologías se ha encontrado que estos metabolitos se presentan en bajas concentraciones, en estadios tempranos o asintomáticos, por lo que es difícil detectarlos. Dentro de este contexto, un material monolítico orgánico de *poli(GMA-co.EDMA)* fue funcionalizado con un péptido por adición de Michael (tiol-maleimido, química *click*). El péptido, unido covalentemente al monolito, contiene la secuencia SPINNTKPHEAR derivada de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH). Se determinó, mediante ensayo de ELISA, que el soporte monolítico obtenido permite aislar selectivamente anticuerpos policlonales contra la secuencia SPINNTKPHEAR, ya que estos son retenidos en la superficie química del material mediante una interacción de inmunoafinidad. En este proyecto se desarrolló un nuevo método para aislar y preconcentrar metabolitos, específicamente anticuerpos, utilizando materiales monolíticos, lo que podría contribuir a la mejora de las estrategias de detección de enfermedades basadas en interacciones de inmunoafinidad.

Palabras clave: Soporte monolítico orgánico, Virus del Papiloma Humano, química Click, bioafinidad, SPPS-Fmoc/tBu.

Abstract

Metabolites have great potential in the biomarkers design since the presence or absence of these provides valuable information of a biological system. In some pathologies, it has been found that these metabolites are in low concentrations, in early or asymptomatic stages, so it is difficult to detect them. Here in, an organic monolithic material of *poly*(GMA-*co*-EDMA) was functionalized with a peptide by thiol-maleimide Michael addition click reaction. The covalently bound peptide, to the monolith, corresponds to the sequence SPINNTKPHEAR derived from the L1 protein of the Human Papilloma Virus (HPV). Using ELISA assays, it was determined that the obtained monolithic support allows to selectively isolated polyclonal antibodies against the sequence SPINNTKPHEAR, since these are retained in the chemical surface of the material by immunoaffinity interaction. In this project was developed a new strategy for isolating and preconcentrating metabolites, specifically antibodies, using monolithic materials, it could contribute to the improvement of diseases detection strategies based in immunoaffinity interactions.

Keywords: Organic monolithic support, Human Papilloma Virus, Click chemistry, bioaffinity, SPPS-Fmoc/tBu.

Contenido

	Pág.
1. Marco Teórico	23
1.1 Columnas Monolíticas.....	23
1.2 Antecedentes.....	25
1.3 Definición de soporte monolítico.....	26
1.4 Soportes monolíticos orgánicos.....	27
1.4.1 Síntesis de soportes monolíticos orgánicos	27
1.4.2 Aplicación de soportes monolíticos orgánicos.....	29
1.4.3 Modificación de monolitos reactivos.....	30
1.4.4 Soportes monolíticos derivados de GMA.....	30
1.4.5 Monolitos orgánicos modificados como soportes para separación por afinidad.32	
1.5 Química Click	33
2. Hipótesis	35
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo General.....	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. Metodología	39
4.1 Reactivos y materiales	40
4.2 Obtención de péptidos derivados de la secuencia SPINNTKPHEAR.....	41
4.2.1 Reacción de remoción del grupo Fmoc: desprotección	42

4.2.2	Reacción de activación de los Fmoc-aminoácidos y acople de los mismos a la resina.....	43
4.2.3	Reacción de monitoreo (Test de Kaiser).....	43
4.2.4	Reacción de desprotección de las cadenas laterales y separación del péptido de la resina.....	44
4.3	Caracterización de los péptidos por cromatografía analítica RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF	44
4.3.1	Análisis por RP-HPLC.....	44
4.3.2	Purificación de los péptidos por extracción en fase sólida (SPE).....	45
4.3.3	Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	45
4.4	Síntesis de un soporte monolítico orgánico de <i>poli(GMA-co-EDMA)</i>	45
4.5	Funcionalización del <i>poli(GMA-co-EDMA)</i> con un péptido derivado de la proteína L1 del VPH.....	46
4.5.1	Funcionalización del <i>poli(GMA-co-EDMA)</i> con el ácido 6-maleimidohexanoico.....	46
4.5.2	Funcionalización del monolito con el péptido sintético	46
4.6	Interacción de inmunoafinidad entre péptidos derivados de la secuencia L1 VPH (1-12) y anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12).....	47
4.6.1	Obtención de los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12).....	47
4.6.2	Protocolo ELISA.	47
4.7	Interacción de inmunoafinidad entre el monolito <i>poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH(1-12)</i> y anticuerpos policlonales anti- L1 VPH (1-12)	48
5.	Resultados y discusión.....	51
5.1	Síntesis, purificación y caracterización de los péptidos derivados de L1 VPH (1-12) 52	
5.2	Estudio de la interacción de antígeno-anticuerpo entre los péptidos sintéticos y anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) por ensayos de ELISA.....	55

5.3	Síntesis del material monolítico orgánico de <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) funcionalizado con un péptido derivado del L1 VPH (1-12).....	57
5.3.1	Obtención del monolito <i>poli</i> (GMA-co-EDMA).....	57
5.3.2	Obtención del monolito <i>poli</i> (GMA-co-EDMA)- <i>AMhx</i>	60
5.3.3	Funcionalización del <i>poli</i> (GMA-co-EDMA)- <i>AMhx</i> con el péptido CX-L1 VPH (1-12).....	63
5.4	Interacción antígeno-anticuerpo entre los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) y el monolito <i>poli</i> (GMA-co-EDMA)- <i>AMhx</i> -CX-L1-VPH (1-12).....	66
6.	Conclusiones	69
ANEXO A.	Síntesis y caracterización de los péptidos diseñados	81
ANEXO B.	Determinación del título mediante ensayo de ELISA	89
ANEXO C.	Estudio de la reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y la L-Cisteína	96
ANEXO D.	Mecanismos de reacción involucrados en esta investigación	101

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Variación de la altura de plato teórico (izquierda) y la presión (derecha) con el flujo de la fase móvil, empleando una columna CAPCELL PAK C18 (2,0 × 50 mm) con diferentes tamaños de partícula ²⁷	24
Figura 1-2 Análisis cromatográfico de una mezcla de péptidos sintéticos empleando: (A) la columna empacada Eclipse XDB-C18 y la (B) columna Chromolith® C18 ³⁰	24
Figura 1-3 Fotomicrografía de una estructura de poliuretano de poro abierto ^{28,31}	25
Figura 1-4 Imagen de una columna monolítica de sílica Chromolith® por SEM. A la izquierda estructura bimodal del lecho poroso. A la derecha acercamiento a un macroporo o 'through-pore' ^{36,37}	27
Figura 1-5 Esquema de síntesis para un soporte monolítico polimérico ²⁸	28
Figura 1-6 Distribución de tamaño de poro en un monolito de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA). Efecto del tiempo (A) y de la temperatura (B) de reacción ^{28,45}	29
Figura 1-7 Algunos monómeros usados comúnmente en la síntesis de soportes monolíticos orgánicos ²⁸	29
Figura 1-8 Inmovilización covalente de moléculas con grupos amino, sobre monolitos de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA). Métodos de: Epóxido (A), Base de Schiff (B), Carbonildiimidazol (C) y Disuccinimidilo (D).	31
Figura 4-1 Esquema general para la síntesis de un soporte monolítico orgánico de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) modificado químicamente con un péptido.	39
Figura 4-2 Diagrama de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu). Test de Kaiser: Color característico para amina secundaria (A), amina primaria (B) y ausencia de grupos amino-Prueba negativa (C).	42

Figura 5-1 Péptido L1 VPH (1-12)-XC: Estructura (A), comportamiento de la síntesis (B), perfil cromatográfico (C) y espectro de masas MALDI-TOF (D) del compuesto puro.	54
Figura 5-2. Materiales empleados en la fabricación del molde para contener un monolito de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA).	58
Figura 5-3 Imagen de SEM del polímero de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) sintetizado (10, 20 y 200 μ m).	59
Figura 5-4 Espectro infrarrojo del monolito de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) (A) y del monolito <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)-AMhx (B).	60
Figura 5-5 Espectro Raman del monolito de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) (A) y del monolito <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)-AMhx (B).	61
Figura 5-6 Caracterización por SEM de de los soportes monolíticos de <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA) (A) y <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)-AMhx (B).	62
Figura 5-7 Reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y la L-Cisteína empleando diferentes disolventes: Agua (A), Etanol (B), Metanol y Acetonitrilo (D).	64
Figura 5-8 Monitoreo por RP-HPLC de la reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y el péptido L1 VPH (1-12) en Agua. Tiempo cero (A), 24 horas de reacción (B).	65
Figura 5-9 Espectro IR del <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH(1-12).	66
Figura 5-10 Estudio de la interacción antígeno-anticuerpo sobre materiales monolíticos. (A) <i>poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA); (B) Ensayo en ausencia de monolito; y (C-D) <i>Poli</i> (GMA- <i>co</i> -EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH (1-12). A, B y D incubados con suero Post IV y C con suero preinmune.	67
Figura 5-11 Curva de calibración para el péptido CX-L1 VPH (1-12) mediante ensayo de ELISA. Eje x: Diluciones partiendo de una concentración de péptido de 1 μ g/mL.	68

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1 Péptidos análogos al péptido L1 VPH (1-12): SPINNTKPHEAR.....	40
Tabla 5-1 Caracterización de los péptidos sintetizados.	53
Tabla 5-2 Péptidos análogos de la secuencia L1 VPH (1-12), título del anticuerpo policlonal determinado mediante ensayo de ELISA.....	56
Tabla 5-3 Análisis elemental de los soportes monolíticos <i>poli</i> (GMA-co-EDMA) y <i>poli</i> (GMA-co-EDMA)-AMhx.....	62

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Término	Abreviatura	Siglas
<i>ABCN</i>	1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo)	
<i>6-Cl-HOBt</i>	1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol	
<i>Pbf</i>	2,2,4,6,7-pentametildihidrodenzofuran-5-sulfonilo	
<i>TMB</i>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina	
<i>Ahx</i>	Ácido 6-aminohexanoico	X
<i>AMhx</i>	Ácido 6-maleimidohexanoico	
<i>Glu</i>	Ácido glutámico	E
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético	
<i>Arg</i>	Arginina	R
<i>Asn</i>	Asparagina	N
<i>Cys</i>	Cisteína	C
<i>DCC</i>	Diciclohexilcarbodiimida	
<i>DCM</i>	Diclorometano	
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Inmunosorbent Assay	
<i>EDT</i>	Etanoditiol	
<i>EDMA</i>	Etilendimetacrilato	
<i>Fmoc</i>	Fluorenilmetiloxicarbonilo	
<i>GC</i>	Gas Chromatography	
<i>GMA</i>	Glicidilmetacrilato	
<i>HPLC</i>	High Efficient Liquid Chromatography	
<i>His</i>	Histidina	H

Término	Abreviatura	Siglas
<i>IR</i>	Infrared Spectroscopy	
<i>Ile</i>	Isoleucina	I
<i>IPA</i>	Isopropanol	
<i>LC</i>	Liquid Chromatography	
<i>Lys</i>	Lisina	K
<i>MS</i>	Mass Spectroscopy	
<i>MALDI</i>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization	
<i>MeOH</i>	Metanol	
<i>DMF</i>	N,N-Dimetilformamida	
<i>OtBu</i>	O-Terbutilo	
<i>Pro</i>	Prolina	P
<i>Pap</i>	Prueba de papanicolaou	
<i>RP-HPLC</i>	Reverse Phase High Efficient Liquid Chromatography	
<i>SEM</i>	Scanning Electron Microscopy	
<i>SAMP</i>	Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas	
<i>SPE</i>	Solid Phase Extraction	
<i>SPPS</i>	Solid Phase Peptide Synthesis	
<i>Boc</i>	t-butiloxicarbonilo	
<i>tBu</i>	Terbutilo	
<i>THF</i>	Tetrahidrofurano	
<i>TMB</i>	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina	
<i>TOF</i>	Time of Flight	
<i>Thr</i>	Treonina	T
<i>TIPS</i>	Triisopropilsilano	
<i>Trt</i>	Tritil	
<i>VPH</i>	Virus del Papiloma Humano	

Introducción

Las sustancias producidas en un organismo durante los procesos químicos biológicos se denominan metabolitos¹. Estos compuestos pueden tener diversas aplicaciones, como agentes antitumorales², anticancerígenos³, antibacterianos⁴, antifúngicos⁵ y antioxidantes⁶. Otra aplicación importante de los metabolitos, es su uso como biomarcadores⁷, convirtiéndolos en candidatos para el desarrollo de métodos de diagnóstico de enfermedades. Los metabolitos se encuentran, por lo general, en muy bajas concentraciones dentro de los fluidos corporales, lo que dificulta su detección y obtención. Por esta razón, han surgido investigaciones en torno al desarrollo de métodos y materiales para la pre-concentración de metabolitos, para así facilitar su detección^{8,9}. Dentro de los materiales usados para el enriquecimiento de metabolitos, de tipo proteico, han cobrado gran relevancia los soportes monolíticos orgánicos, ya que debido a su macroporosidad, es posible hacer fluir fácilmente moléculas de gran tamaño a través de su estructura interna, manteniendo una excelente interacción entre el analito y el soporte gracias a su mesoporosidad¹⁰. Soportes monolíticos modificados en su superficie, son utilizados para pre-concentrar diversas moléculas orgánicas de gran tamaño, con alta selectividad principalmente por métodos de extracción y microextracción^{11,12}.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un material para pre-concentrar metabolitos (anticuerpos), se plantea el uso de un material monolítico funcionalizado con un péptido (antígeno), la captura del analito será por interacción de inmutofinidad (interacción antígeno-anticuerpo).

El modelo de estudio escogido para esta investigación fueron anticuerpos policlonales contra secuencias peptídicas de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH). La proteína L1 está presente en el 90% de la cápside del VPH y está involucrada directamente en el proceso de infección del virus en células hospederas¹³. En investigaciones previas en nuestro grupo de investigación *Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP-código COL0115666)*, se generaron anticuerpos policlonales contra el péptido SPINNTKPHEAR por inmunización de conejos Nueva Zelanda; los sueros obtenidos fueron evaluados por ELISA y métodos electroquímicos¹⁴. Este péptido es reconocido por anticuerpos de pacientes infectadas con VPH, que presentan lesiones en el cuello uterino¹⁵.

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública a nivel mundial que está asociado principalmente a la infección por VPH. Es el cuarto cáncer más común en mujeres alrededor del mundo, con un estimado de 528.000 casos nuevos y 266.000 muertes cada año. En Colombia son diagnosticados cerca de 4500 casos nuevos anualmente, siendo el segundo cáncer más frecuente en mujeres y el primero en mujeres entre 15 a 44 años¹⁶.

Actualmente el método de diagnóstico más importante para el cáncer cervical es la prueba de Papanicolaou (Pap), también llamada citología vaginal. Esta consiste en tomar muestras de la endocérvix, cérvix y vagina con la ayuda de un espéculo, para luego ser analizadas con el fin de encontrar anomalías en las células del epitelio cervical siguiendo el sistema Bethesda¹⁷. Gracias a esta prueba ha sido posible reducir la mortalidad causada por el cáncer cervical hasta en 50%, sin embargo la prueba tiene una sensibilidad baja (entre el 50 y 60 %) y presenta una tasa de falsos negativos cercana al 30%¹⁸. Un factor de riesgo significativo es el bajo nivel socioeconómico y educativo, siendo más vulnerables las mujeres de países en vía de desarrollo donde la cobertura de la citología es limitada por aspectos tecnológicos, médicos y culturales^{19,20}.

Dentro de este contexto, existe la necesidad de diseñar un método de diagnóstico complementario a la citología, en lo posible con mejor sensibilidad, menos invasivo y más

fácil de aplicar, para aumentar cobertura. Teniendo en cuenta que en ciertos episodios asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad el nivel de anticuerpos varía, siendo generalmente muy bajos. En este sentido, un método de inmunodiagnóstico requiere desarrollar métodos de preconcentración de los anticuerpos para lograr un nivel de detección adecuado. Con base en lo anterior surgió el proyecto *“Diseño y Síntesis de Péptidos derivados de la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) para la (i) modificación de superficies monolíticas y (ii) la funcionalización de electrodos”* que plantea contribuir en el desarrollo de un método de preconcentración de anticuerpos a través de una interacción de inmuoafinidad y desarrollar un método electroquímico para la detección de estos anticuerpos. Adicionalmente, este trabajo está enmarcado en la ejecución del proyecto *“Diseño síntesis y caracterización de columnas monolíticas para la separación de biomoléculas”* Contrato FP44842-037-2015, financiado por COLCIENCIAS.

1. Marco Teórico

1.1 Columnas Monolíticas

La cromatografía líquida (LC) es uno de los métodos analíticos más ampliamente usados en la industria, docencia e investigación. Gracias a esta técnica ha sido posible separar y caracterizar analitos de carácter polar, apolar²¹, iónico²², quiral²³, y biomoléculas²⁴ entre otros.

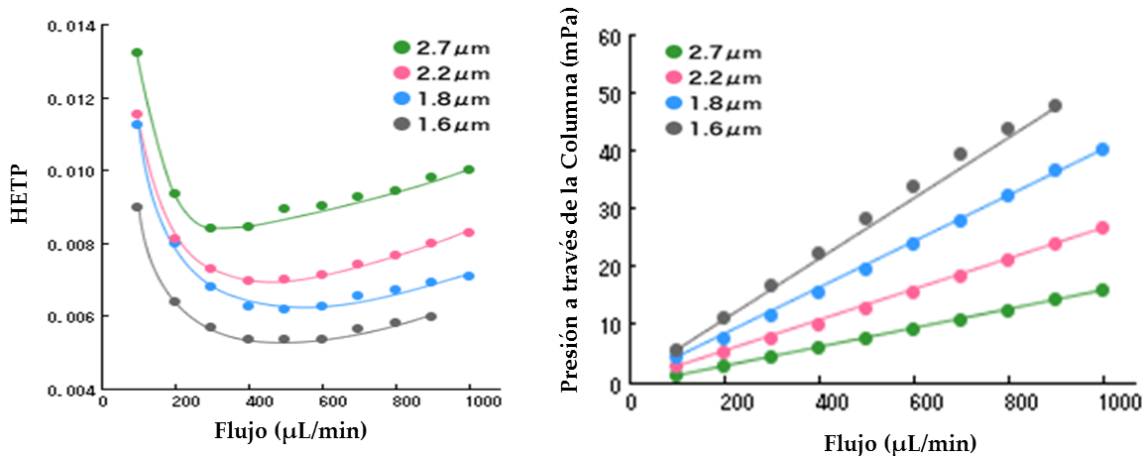
La columna cromatográfica es el corazón de la técnica y la naturaleza química de la misma determina sus interacciones con el analito, las cuales son necesarias para la separación. Las columnas empacadas utilizadas en la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) consisten en un tubo que contiene partículas esféricas (diámetro 2-10 μm), que generalmente son de sílice microporosa. Estas columnas tienen gran área superficial y por esta razón presentan interacciones eficientes entre la fase estacionaria y los analitos, lo que se traduce en un alto poder de resolución. Las columnas empacadas comerciales tienen entre 160.000 y 170.000 platos teóricos por metro²⁵.

La necesidad de separar biomoléculas (cuyos coeficientes de difusión son muy bajos) ha llevado a la búsqueda de sistemas con alta transferencia de masa, que se ha logrado disminuyendo el tamaño de las partículas lo que causa aumento de la presión del sistema (Figura 1-1), siendo necesario el uso de equipos capaces de trabajar a altas presiones, que son costosos ²⁶.

Como una alternativa a las columnas empacadas, se han desarrollado las columnas monolíticas, las cuales consisten en un lecho mesoporoso interconectado a través de

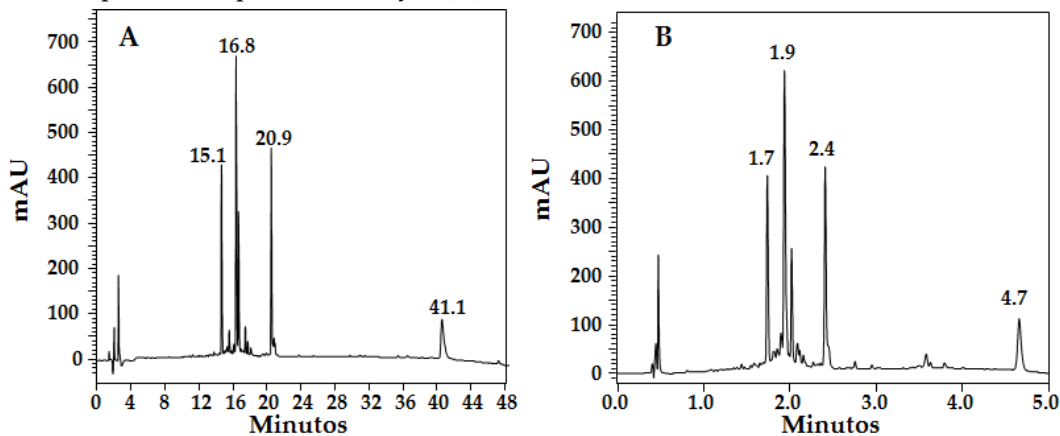
macroporos formando una pieza única^{26,28}. El lecho mesoporoso le brinda a la estructura una alta área superficial por lo que existe una excelente interacción entre los analitos y la fase estacionaria.

Figura 1-1 Variación de la altura de plato teórico (izquierda) y la presión (derecha) con el flujo de la fase móvil, empleando una columna CAPCELL PAK C18 (2,0 × 50 mm) con diferentes tamaños de partícula²⁷.



A diferencia de las columnas empacadas, los soportes monolíticos tienen la ventaja de poseer macroporos que les confiere una alta permeabilidad, permitiendo el uso de flujos altos, sin generar presiones altas, y en consecuencia tiempos de análisis más cortos. Se ha reportado que con las columnas monolíticas puede llevarse a cabo un análisis por HPLC hasta diez veces más rápido con respecto a una columna empacada, sin comprometer la resolución²⁹ (Figura 1-2).

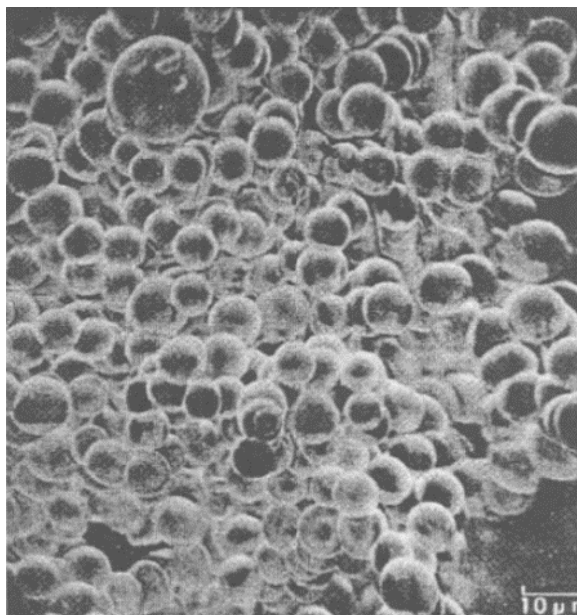
Figura 1-2 Análisis cromatográfico de una mezcla de péptidos sintéticos empleando: (A) la columna empacada Eclipse XDB-C18 y la (B) columna Chromolith® C18³⁰.



1.2 Antecedentes

La primera estructura continua porosa correspondiente a un monolito se reportó en 1969, cuando se preparó un hidrogel para separación de moléculas por exclusión por tamaño^{28,31}. Esta columna separaba las moléculas como se esperaba, sin embargo, no superaba otras técnicas usadas en el momento, por esta razón no fue caracterizada y quedó en el olvido por varios años. Posteriormente, se prepararon espumas de poliuretano *in situ* dentro de una columna larga³², presentando ventajas como: (i) prevención del sangrado de la columna debido a que el polímero quedaba adherido covalentemente al soporte, (ii) alta versatilidad debido a la facilidad de incorporar la espuma a diferentes tipos de molde, (iii) posibilidad de controlar parámetros como densidad, porosidad y área superficial, manipulando las condiciones de reacción y (iv) posibilidad de modificar químicamente la superficie. La efectividad de este material, radica en que el poliuretano entrecruzado durante el proceso de síntesis no es soluble en la mezcla de polimerización, por lo que se separa en una nueva fase conformada por unidades esféricas interconectadas entre sí (Figura 1-3). Estas son las bases fundamentales de la síntesis de columnas monolíticas, en la actualidad.

Figura 1-3 Fotomicrografía de una estructura de poliuretano de poro abierto^{28,31}.



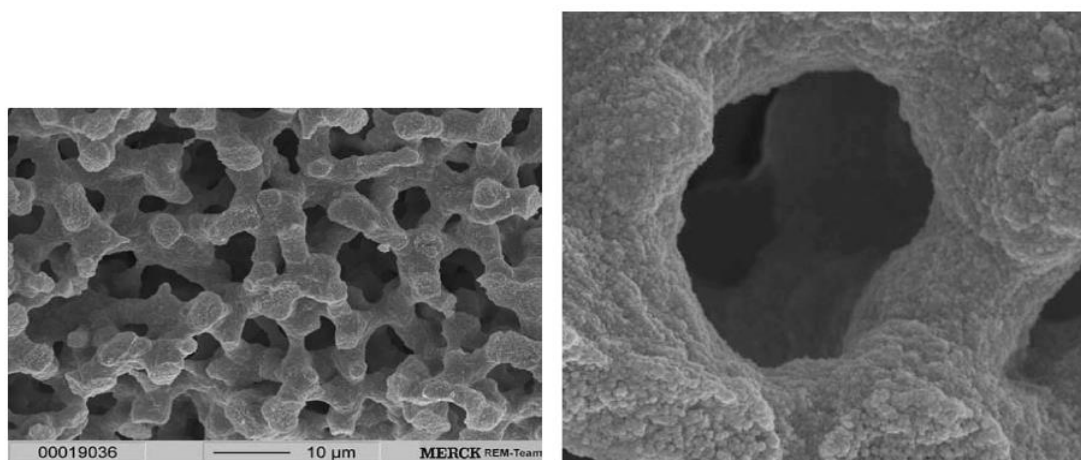
Estas columnas fueron usadas inicialmente en cromatografía de gases (GC), sin embargo, a temperaturas mayores a 200° C el poliuretano es inestable siendo una limitación importante de la técnica. Luego se reportaron estos mismos materiales en HPLC, encontrando una excelente resistencia a la presión y eficiencias de 1720 platos teóricos por metro, valor muy similar al de columnas empacadas de la época³³.

Dos décadas después (1989), Hjertén y colaboradores desarrollaron una columna monolítica que consistía en un polímero funcionalizado como intercambiador iónico, con el que lograron separar mezclas complejas de proteínas²⁸. En la actualidad existe una amplia variedad de soportes monolíticos con una gran gama de formas (microesferas³⁴, discos²⁸, y tubos²⁸) y de modos de interacción (quiral, iónica, hidrofóbica y de afinidad).

1.3 Definición de soporte monolítico

Un soporte monolito es una pieza única de un material continuo y poroso sellado herméticamente dentro de un molde, garantizando que el flujo ocurre a través de su estructura y no entre las paredes (axial). Este material se caracteriza por tener una distribución de tamaño de poro bimodal. Los poros más grandes corresponden a los macroporos o 'through-pores' que están interconectados entre sí en forma de canales por medio de los cuales la fase móvil fluye fácilmente. El tamaño, la forma en que están interconectados y la tortuosidad del camino que recorren estos macroporos, junto con la estructura mesoporosa, son los parámetros que controlan la cinética de transferencia de masa y la eficiencia de la columna²⁶. Entre los through-pores se encuentran aglomeraciones de sólido mesoporoso, denominados 'porons'³⁵. Existe relación entre la porosidad total y la estabilidad mecánica del soporte sólido y entre la porosidad interna con la interacción de la fase estacionaria con los analitos. En la Figura 1-4 se observa la estructura porosa bimodal de una columna monolítica de sílica obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se pueden apreciar los 'through-pores' como canales de gran tamaño interconectando los 'porons'^{36,37}.

Figura 1-4 Imagen de una columna monolítica de sílica Chromolith® por SEM. A la izquierda estructura bimodal del lecho poroso. A la derecha acercamiento a un macroporo o 'through-pore'^{36,37}.



1.4 Soportes monolíticos orgánicos

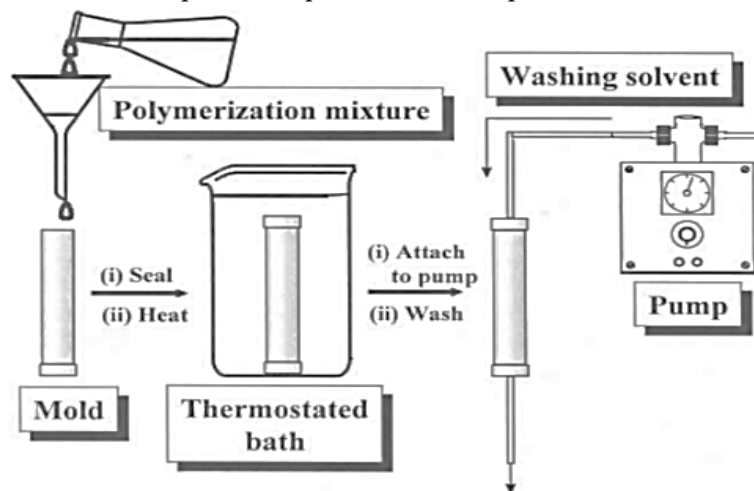
Existen dos clases de soportes monolíticos, los de naturaleza inorgánica, sintetizados a partir de sílice y los de carácter orgánico, conformados por diferentes tipos de polímeros^{26,28,38}. Los primeros han sido ampliamente estudiados por Nakanishi y Tanaka³⁹⁻⁴¹. Estos monolitos se han obtenidos de manera reproducible y son fabricados comercialmente por Merck dentro de la línea Chromolith®, sin embargo, son costosos, sintetizarlos es complicado y tienen baja estabilidad a pH altos.

Por otro lado, las columnas orgánicas poliméricas se preparan fácilmente *in situ*, tienen alta permeabilidad y biocompatibilidad, estabilidad en amplio rango de pH y la modificación de la superficie química es sencilla^{28,42,43}.

1.4.1 Síntesis de soportes monolíticos orgánicos

Los monolitos orgánicos (Figura 1-5), han sido clasificados debido a su forma como discos, tubos, micro esferas y microtips⁴⁴. Los soportes monolíticos orgánicos pueden acoplarse a prácticamente cualquier tipo de molde lo que les confiere gran versatilidad.

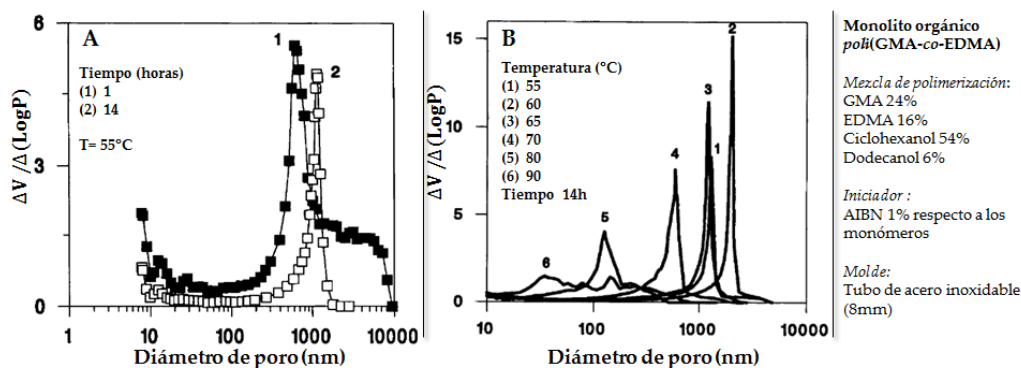
Figura 1-5 Esquema de síntesis para un soporte monolítico polimérico²⁸



La síntesis de monolitos orgánicos consiste en mezclar uno o varios monómeros y entrecruzantes en un solvente orgánico conocido como porógeno. Luego agregar un iniciador de polimerización y adicionar esta mezcla al molde deseado. Finalmente, llevar el molde a una temperatura adecuada, momento en el cual ocurrirá la polimerización, durante esta etapa se forman núcleos de polímero insolubles en la mezcla, estos empiezan a interconectarse produciendo la estructura de una sola pieza. El porógeno atrapado dentro de la estructura se retira por lavados y finalmente quedan los espacios que corresponden a los 'through-pores'. Variables como (i) la temperatura⁴⁵, (ii) el tiempo de reacción, (iii) el porógeno, (iv) los monómeros y la proporción de estos en la reacción son las que determinan las propiedades del sólido, como son, la distribución de tamaño de poro, área superficial y resistencia a la presión²⁸.

A manera de ejemplo en la Figura 1-6 se muestra el efecto de la temperatura y del tiempo de polimerización en la distribución del tamaño de poro para monolitos de *poli*(Glicidilmetacrilato-*co*-Etilendimetacrilato) (*poli*(GMA-*co*-EDMA)). Como se puede apreciar, con excepción de 55°C, se observa que "el tamaño de poro disminuye al aumentar la temperatura", siendo consecuente con el mecanismo de polimerización que se basa en la nucleación en presencia de un agente precipitante⁴⁵.

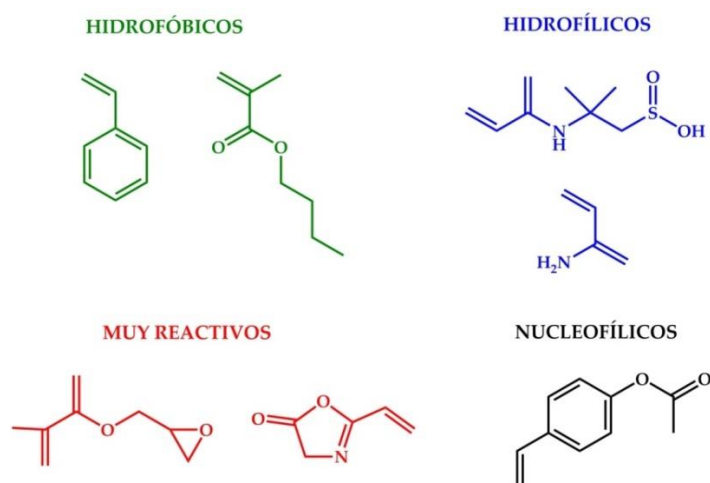
Figura 1-6 Distribución de tamaño de poro en un monolito de *poli(GMA-co-EDMA)*. Efecto del tiempo (A) y de la temperatura (B) de reacción^{28,45}.



1.4.2 Aplicación de soportes monolíticos orgánicos

La obtención de las matrices monolíticas orgánicas es fácil y versátil porque se pueden preparar en diferentes moldes y con diversas naturalezas químicas. Estos soportes monolíticos tienen gran número de aplicaciones como cromatografía de gases⁴⁶, electrocromatografía capilar⁴⁷, catálisis⁴⁸ y extracción en fase sólida, entre otros⁴⁹. En el caso de los monolitos orgánicos, está reportada una gran variedad de entrecruzantes y monómeros, que dependiendo de su naturaleza química, le confieren a la superficie del polímero diferentes propiedades (Figura 1-7). Por esta razón, eligiendo el monómero de partida adecuado, se puede hacer la separación selectiva de analitos particulares.

Figura 1-7 Algunos monómeros usados comúnmente en la síntesis de soportes monolíticos orgánicos²⁸.



Gracias a su macroporosidad, las columnas monolíticas han sido muy utilizadas en el análisis de biomoléculas presentando ventajas frente a las columnas empacadas. Se ha reportado el análisis de una gran variedad de péptidos²⁹, proteínas⁵⁰, anticuerpos⁵¹ e incluso microorganismos⁵² usando soportes monolíticos.

1.4.3 Modificación de monolitos reactivos

La elección del monómero (Figura 1-7), depende de los analitos que se requieren separar, sin embargo tiene dos limitaciones importantes: (i) el soporte puede ser utilizado para solo un desafío de separación; si se tiene un nuevo sistema de analitos es necesario utilizar otro soporte con el monómero y entrecruzante adecuados, y se deben optimizar nuevamente todas las variables de reacción. (ii) Existe un número limitado de monómeros con los que puede ser sintetizado el monolito, por lo que los posibles sistemas de analitos a resolver serán de igual manera restringidos.

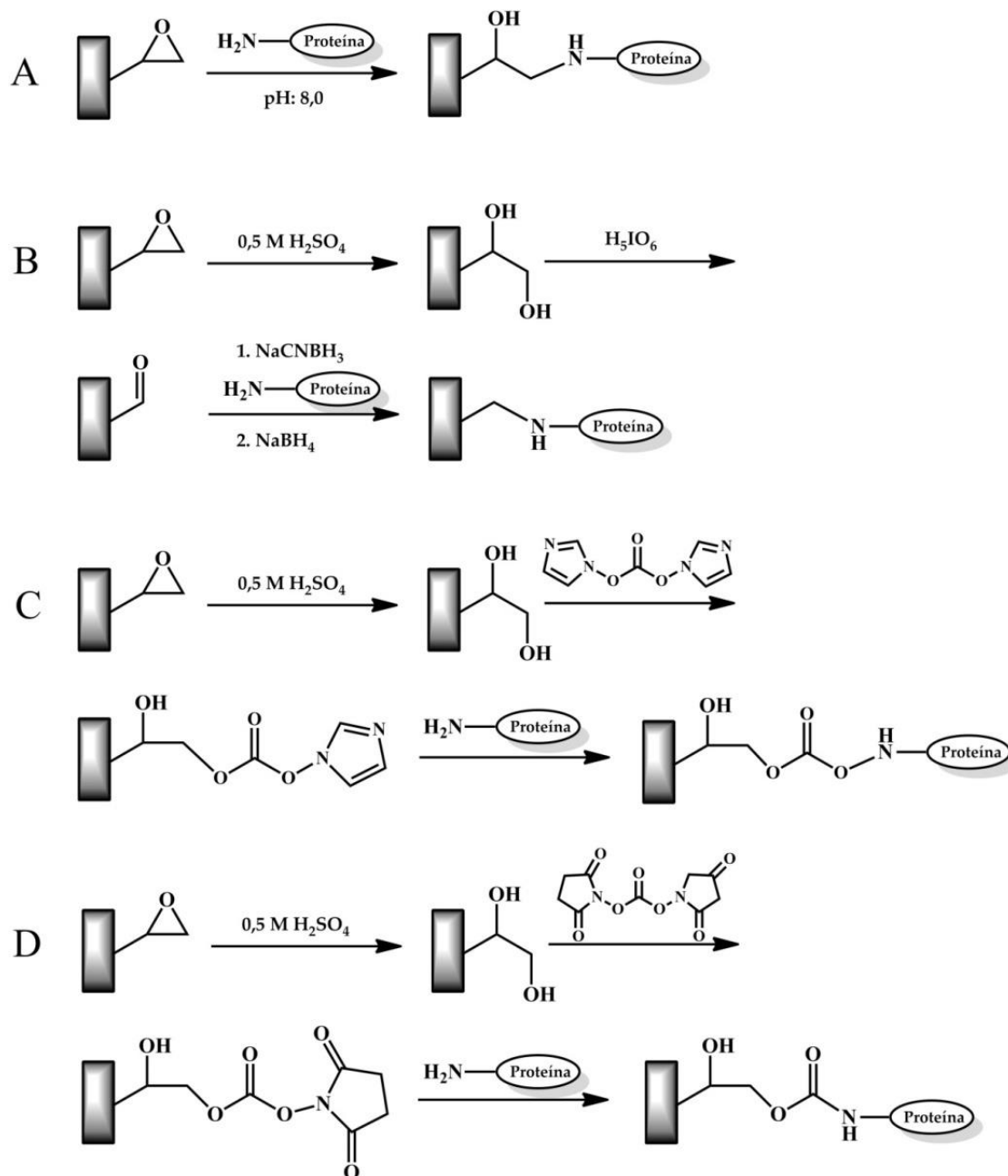
Estas dos limitaciones son resueltas haciendo uso de monómeros orgánicos altamente reactivos, los cuales poseen dentro de su estructura sitios activos que pueden ser utilizados para modificar la superficie, proceso conocido como 'grafting'. Esta metodología confiere dos ventajas: (i) No es necesario volver a optimizar variables en la obtención del monolito, como temperatura, tiempo de reacción, proporción de monómeros, iniciador y porógenos. Y (ii) un aumento en la versatilidad del método, ya que la superficie de un monolito reactivo ya estandarizado, puede ser modificada con una gran variedad de moléculas, que son las responsables de las interacciones con el analito en la separación²⁸.

1.4.4 Soportes monolíticos derivados de GMA

El glicidilmetacrilato (GMA) es uno de los monómeros más ampliamente empleados en la síntesis de soportes monolíticos, ya que gracias a la reactividad del grupo 2,3-epoxipropilo, es factible la apertura del anillo epóxido para la incorporación de una nueva molécula sobre la superficie⁵³. En la figura 1-8, se ilustran algunos esquemas de

funcionalización de monolitos de GMA, comúnmente empleados para lograr la inmovilización de biomoléculas con grupos amino (como los péptidos y proteínas).

Figura 1-8 Inmovilización covalente de moléculas con grupos amino, sobre monolitos de *poli*(GMA-co-EDMA). Métodos de: Epóxido (A), Base de Schiff (B), Carbonildiimidazol (C) y Disuccinimidilo (D).



El método de epóxido consiste en el ataque directo de los grupos amino sobre el grupo epóxido del monolito (Figura 1-8A). Esta estrategia es relativamente sencilla y rápida de desarrollar; sin embargo, los grupos epóxido son susceptibles a hidrólisis lo cual conlleva a rendimientos menores a los obtenidos en otros métodos⁵⁴. Los otros métodos involucran la conversión de los grupos epoxi en derivados reactivos que permiten la unión del ligando de interés a través de sus grupos amino, sin embargo, el gran número de grupos amino presentes en el péptido o la proteína, dificulta que el anclaje químico sea dirigido, lo que repercute en la reproducibilidad de los métodos, ya que es difícil que la inmovilización de la proteína se realice siempre sobre el mismo grupo amino. Algunos ejemplos de este tipo de inmovilización, incluyen el método de bases de Schiff (Figura 1-8B) y el uso de carbonildiimidazol (Figura 1-8C) o Carbonato de Di-(N-succinimidilo) (Figura 1-8D). Estas estrategias son más efectivas que el método de epóxido, para la unión de proteínas, se obtienen mayores rendimientos y menos reacciones colaterales⁵⁴.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se plantea en este trabajo obtener un monolito orgánico derivado del GMA, e inmovilizar en su superficie un péptido, derivado de la proteína L1 del VPH, de forma covalente, dirigida y reproducible.

1.4.5 Monolitos orgánicos modificados como soportes para separación por afinidad.

La separación por afinidad utilizando HPLC, extracción o microextracción en fase sólida, se lleva a cabo por el reconocimiento específico de la molécula diana con la molécula unida a la columna. La amplia aplicabilidad de esta técnica radica en que las biomoléculas tienen motivos o sitios que interactúan específicamente con una molécula natural o artificial. Las separaciones por cromatografía de afinidad involucran tres pasos principales: (i) incubación de la muestra con el soporte que tiene el ligando inmovilizado para permitir que la molécula objetivo (diana) en la muestra se una al ligando, (ii) lavado de los componentes que no se unieron al ligando y (iii) elución de la molécula diana ya

sea variando pH o fuerza iónica de la solución, de manera tal que se rompa la interacción de la molécula diana con el soporte de afinidad⁵⁵.

Las últimas tendencias de purificación mediante afinidad reportan el uso de columnas monolíticas modificadas con diferentes moléculas y metabolitos para lograr separaciones muy específicas, ya que este tipo de soportes tienen una porosidad bimodal (macro y mesoporosa), que permite altos flujos de trabajo y permeabilidad, conservando una excelente transferencia de masa, lo que convierte a estos materiales en una buena opción para el análisis de compuestos de gran tamaño, como lo son las biomoléculas involucradas comúnmente en las separaciones de afinidad. Dentro de estas columnas monolíticas las más comúnmente usadas son las de GMA y EDMA por varias razones: (i) Están comercialmente disponibles, (ii) estos materiales son relativamente sencillos de preparar (iii) existen varios métodos de modificación de este tipo de monolitos para hacer una adecuada unión de los ligandos y (iv) estos monolitos tienen una gran variedad de tamaño de poro, formas y áreas superficiales convirtiéndolos en materiales sumamente versátiles⁵⁴.

1.5 Química Click

La química *click* es el término empleado para identificar las reacciones químicas que unen dos grupos funcionales de manera selectiva, rápida y confiable ⁵⁶. Este tipo de reacciones cumple con ciertas características, tales como: (i) Simplicidad en condiciones de reacción, (ii) ortogonalidad y (iii) eficiencias elevadas, por lo que han sido ampliamente usadas en química orgánica, polímeros y materiales⁵⁷. Algunos ejemplos de estas reacciones son: (i) reacciones de cicloadición (Diels-Alder), (ii) apertura de anillos tensionados (grupo epóxido) y (iii) reacciones de adición. La reacción de adición de Michael entre el grupo tiol y el grupo maleimido transcurre mediante la desprotonación en medio básico del grupo tiol para formar el ion tiolato, que posteriormente puede efectuar un ataque nucleofílico sobre el enlace α,β -insaturado del grupo maleimido. Se ha reportado que esta reacción es altamente eficiente, ortogonal y se da en condiciones de reacción sencillas y

por esta razón ha sido empleada en la detección de biomoléculas que tienen grupos tiol, como por ejemplo el glutatión y la cisteína⁵⁸.

La reacción entre el grupo tiol y anillos tensionados como los epóxidos de los monolitos de *poli*(GMA-*co*-EDMA) tiene altos rendimientos y alta selectividad. La reacción transcurre mediante la desprotonación del grupo tiol en presencia de hidróxido de Litio (LiOH), para formar el tiolato, que posteriormente reacciona con el carbono más sustituido del epóxido^{56,59}.

2. Hipótesis

Un material monolítico de *poli*(GMA-*co*-EDMA) funcionalizado con un péptido, derivado de la proteína L1 del VPH, puede atrapar selectivamente anticuerpos policlonales contra el mismo péptido.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Obtener un material monolítico funcionalizado con un péptido derivado de la proteína L1 del VPH, que permita atrapar selectivamente anticuerpos policlonales contra el mismo péptido.

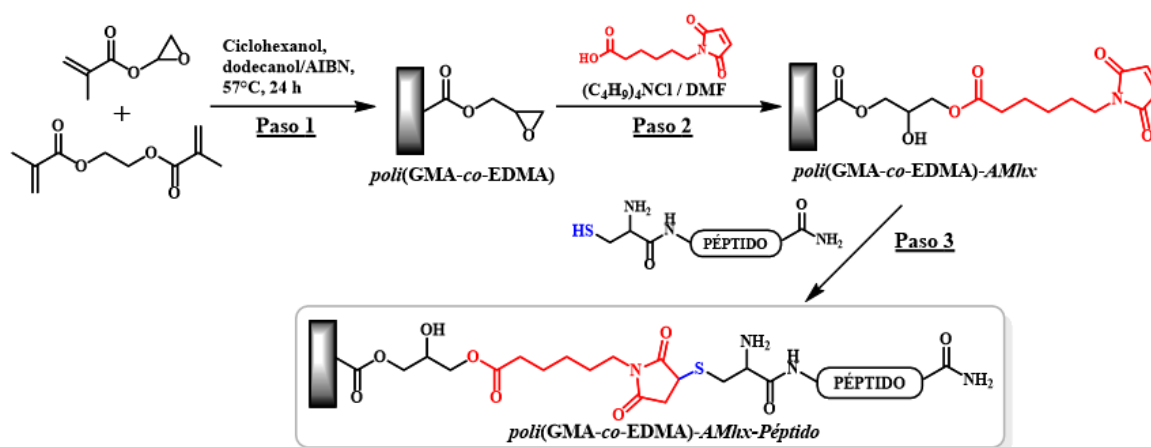
3.2 Objetivos específicos

- Obtener péptidos derivados de la secuencia SPINNTKPHEAR, y caracterizarlos mediante RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI/TOF.
- Evaluar, mediante ensayo de ELISA, la interacción antígeno-anticuerpo entre los péptidos obtenidos y anticuerpos policlonales contra la secuencia SPINNTKPHEAR.
- Obtener una columna monolítica de *poli*(GMA-co-EDMA).
- Unir covalentemente al soporte monolítico, el péptido que presente mejor reconocimiento antígeno-anticuerpo y que tenga los mejores rendimientos sintéticos.
- Evaluar la capacidad del soporte monolítico funcionalizado, para atrapar anticuerpos policlonales anti-SPINNTKPHEAR.

4. Metodología

En este trabajo se sintetizó un material monolítico con su superficie química funcionalizada con un péptido derivado de la proteína L1 del VPH (Figura 4-1). Para obtener este material fue necesario realizar los siguientes pasos: (i) Sintetizar el material monolítico de *poli*(GMA-co-EDMA) el cual presenta grupos 2,3-epoxipropilo altamente reactivos expuestos en su superficie (Figura 4-1. Paso 1). (ii) Funcionalizar la superficie con el grupo maleimido, para esto el ácido 6-maleimidohexanoico se hizo reaccionar con los grupos epóxidos expuestos en el monolito, mediante una apertura de anillos tensionados (Figura 4-1. Paso 2) y (iii) efectuar una segunda funcionalización, en la cual el doble enlace del grupo maleimido reacciona con un grupo tiol presente en la cisteína terminal del péptido CXSPINNTKPHEAR (Figura 4-1. Paso 3).

Figura 4-1 Esquema general para la síntesis de un soporte monolítico orgánico de *poli*(GMA-co-EDMA) modificado químicamente con un péptido.



Los péptidos diseñados y sintetizados, para su posterior incorporación al soporte monolítico, son descritos en la Tabla 4-1. Para este estudio se seleccionó la secuencia L1 VPH (1-12): SPINNTKPHEAR, a partir de la cual se diseñaron las moléculas que se describen a continuación: (i) a la secuencia se incorporaron en el extremo C-terminal, una cisteína y el ácido 6-aminohexanoico (*Ahx*) como espaciador, el código de este péptido corresponde a L1 VPH (1-12)-CX. (ii) También se obtuvo una molécula que contenía la secuencia seleccionada, pero esta vez con el espaciador y la cisteína en el extremo N-terminal, Péptido: CX-L1 VPH (1-12). Con el fin de estudiar si péptidos más cortos derivados de la secuencia seleccionada, podrían reconocer los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12), (iii) fueron diseñados tres péptidos cortos que contenían diferentes partes de la secuencia del péptido L1 VPH (1-12). Estos péptidos contienen en su estructura Cys y *Ahx* en el extremo N-terminal. (iv) Finalmente, fue sintetizado el péptido L1 VPH (1-12)_n como péptido control, ya que con esta molécula oxidada fueron inmunizados conejos Nueva Zelanda para obtener los anticuerpos policlonales, esto se realizó en un trabajo anterior del grupo SAMP.

Tabla 4-1 Péptidos análogos al péptido L1 VPH (1-12): SPINNTKPHEAR

Código	Secuencia
L1 VPH (1-12) _n	CG ¹ SPINNTKPHEAR ¹² GC
L1 VPH (1-12)-XC	¹ SPINNTKPHEAR ¹² - <i>Ahx</i> -C
CX-L1 VPH (1-12)	C- <i>Ahx</i> - ¹ SPINNTKPHEAR ¹²
CX-L1 VPH (1-5)	C- <i>Ahx</i> - ¹ SPINN ⁵
CX-L1 VPH (5-9)	C- <i>Ahx</i> - ⁵ NTKPH ⁹
CX-L1 VPH (8-12)	C- <i>Ahx</i> - ⁸ PHEAR ¹²

4.1 Reactivos y materiales

La resina Rink amida y los reactivos Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-

Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ahx-OH, dicitclohexilcarbodiimida y 1-hidroxi-6-clorobenzotriazol fueron adquiridos en AAPPTec (Louisville, KY, USA). Los reactivos acetonitrilo, ácido trifluoroacético, diclorometano, diisopropiletilamina, N,N-dimetilformamida, etanoditiol, isopropanol, metanol, triisopropilsilano y L-Cisteína fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany). Las columnas SPE Supelclean™, ácido 6-maleimidohexanoico, cloruro de tetrabutil amonio, glicidilmetacrilato, etilendimetacrilato, ciclohexanol, dodecanol, 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo), silica gel, Tween 20, y 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (Sistema de substrato líquido para ELISA) fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El fosfato diácido de potasio, fosfato ácido de sodio, cloruro de sodio y cloruro de potasio, fueron adquiridos en AppliChem Panreac (Barcelona, España).

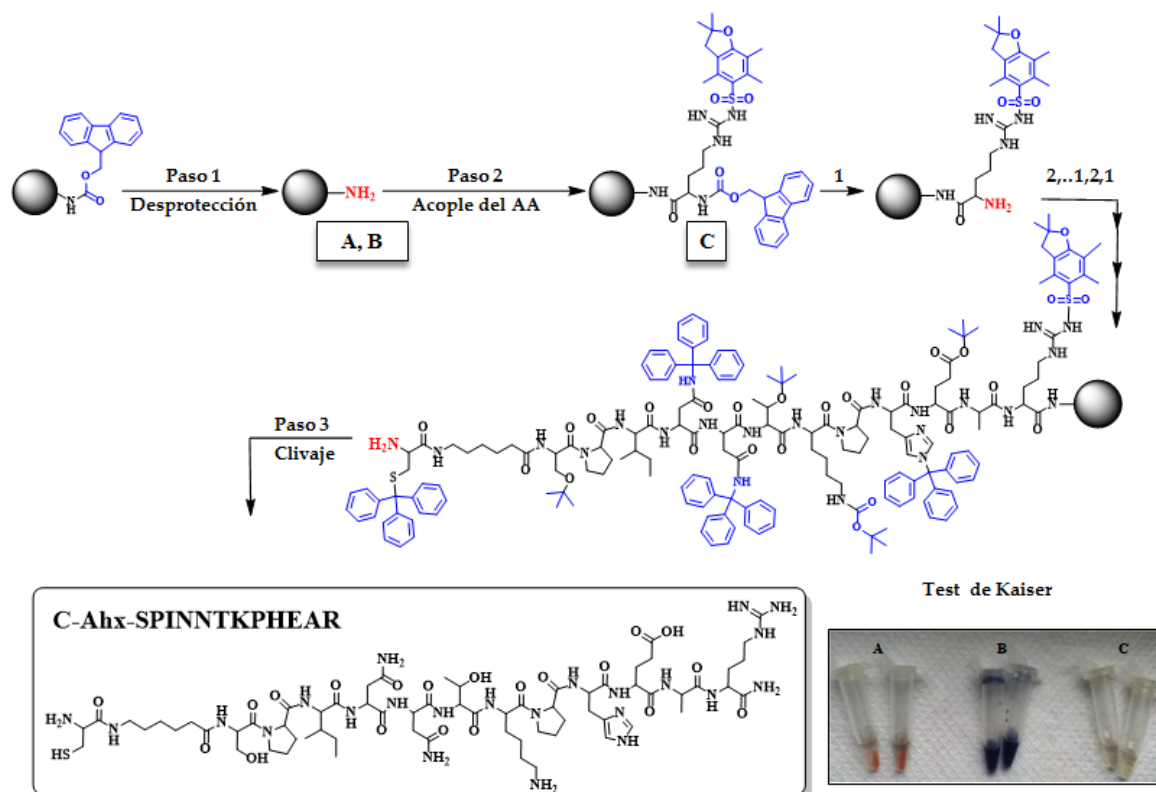
4.2 Obtención de péptidos derivados de la secuencia SPINNTKPHEAR

Los péptidos diseñados para este estudio fueron sintetizados mediante SPPS, empleando la estrategia Fmoc/tBu⁶⁰, esta síntesis se desarrolló según el protocolo establecido en el grupo SAMP, para la obtención manual de péptidos asistida por microondas, los mecanismos de las reacciones involucradas en esta síntesis están reportados en el Anexo D^{61,62}.

La SPPS-Fmoc/tBu involucra reacciones de desprotección, acople y monitoreo que se repiten hasta obtener la secuencia deseada. Los Fmoc-aminoácidos son unidos al soporte sólido y se van incorporando secuencialmente del extremo C-terminal al N-terminal. La resina empleada fue la Rink amida (100 mg, 0,46 meq/g) la cual permite obtener péptidos con terminación amida (C-terminal), esta resina fue sometida a un proceso de hinchamiento con diferentes solventes N,N-dimetilformaamida (DMF) y Diclorometano (DCM). En la Figura 4-2 se muestra el diagrama del proceso de síntesis; el Paso 1 corresponde a la reacción de remoción del grupo Fmoc (desprotección), el Paso 2 es la reacción de formación del enlace peptídico (acople) entre los aminoácidos de la secuencia

y el Paso 3 involucra las reacciones de desprotección de las cadenas laterales y la separación del péptido de la resina (Clivaje). En la desprotección y el acople se emplea como reacción de monitoreo el test de Kaiser⁶³, que permite determinar la presencia de grupos amino libres.

Figura 4-2 Diagrama de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu). Test de Kaiser: Color característico para amina secundaria (A), amina primaria (B) y ausencia de grupos amino-Prueba negativa (C).



El péptido crudo es analizado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), y es purificado por extracción en fase sólida (RP-SPE) con elución por gradiente. El producto purificado es caracterizado por RP-HPLC y por espectrometría de masas MALDI-TOF.

4.2.1 Reacción de remoción del grupo Fmoc: desprotección

Los aminoácidos utilizados en la SPPS/Fmoc-tBu poseen una protección de tipo ortogonal, el grupo α -amino está protegido con el grupo Fmoc y las cadenas laterales de

los aminoácidos tienen grupos protectores que son lábiles al tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA), por ejemplo los grupos tritilo y terbutilo, entre otros. La remoción del grupo Fmoc se realiza por tratamiento con una base débil, esta se lleva a cabo empleando una solución de 4-metilpiperidina⁶² al 25% v/v que contiene tritón al 0,1% v/v, el solvente empleado es DMF (Figura 4-2. Paso 1). La resina es tratada con solución de desprotección asistida por microondas, finalmente, es lavada con DMF, 2-Isopropanol (IPA) y DCM (4×1 minuto con cada solvente) y se realiza el test de Kaiser .

4.2.2 Reacción de activación de los Fmoc-aminoácidos y acople de los mismos a la resina

Para la activación del grupo ácido carboxílico, de los Fmoc-aminoácidos, se emplean diferentes estrategias que conducen a la formación de ésteres; si la reacción de formación del enlace peptídico no es completa es necesario cambiar la estrategia hasta que la reacción sea completa (Figura 4-2C). En este trabajo se empleó la estrategia de éster modificado: Se disuelven Fmoc-aminoácido, DCC, 6-Cl-HOBt (1:1:1); 5 excesos respecto a los mEq de resina, en DMF y se agita la mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción es adicionada a la resina. La reacción es monitoreada por el Test de Kaiser, cuando el test indicó presencia de grupos amino libres, se trató nuevamente la resina con solución del Fmoc-aminoácido activado cambiando el solvente (NMP 0,1% tritón X-100) hasta reacción completa (Figura 4-2. Paso 2).

4.2.3 Reacción de monitoreo (Test de Kaiser)

Para realizar la prueba de Kaiser⁶³, fueron preparadas tres disoluciones: (i) 40 g de fenol disueltos en 10 mL de etanol absoluto; (ii) 0,65 mg de KCN, 1,0 mL de agua y 49,0 mL de Piridina; (Solución B) 1,25 g de Ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto. Las disoluciones (i) y (ii) son mezcladas y almacenadas (Solución A). La Solución B se debe almacenar en la oscuridad. Para realizar la prueba de Kaiser se toma una pequeña cantidad de resina-peptido seca (aproximadamente 1 mg) y se le adicionan las soluciones A y B en

proporción 2:1 (v/v). Luego se homogeniza la mezcla y se somete a calentamiento a 105°C por 7 minutos. Transcurrido este tiempo se observa la coloración de la disolución. Una coloración azul indica prueba positiva para la presencia de grupos aminos primarios libres y una coloración amarilla, prueba negativa. En el caso de la prolina (aminas secundarias), la prueba positiva corresponde a una coloración roja en la resina, y la prueba negativa una coloración amarilla (Figura 4-2 A-C).

4.2.4 Reacción de desprotección de las cadenas laterales y separación del péptido de la resina

Una vez han sido incorporados todos los aminoácidos, se realiza la remoción del grupo Fmoc y la resina-péptido desprotegida se seca, se pesa y se le adiciona una solución de clivaje que contiene TFA/H₂O/EDT/TIPS (92,5/2,5/2,5/2,5% v/v). La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 4 horas (Figura 4-2. Paso 3). Transcurrido este tiempo la disolución es filtrada y el péptido se precipita adicionando éter etílico a -20°C. La disolución se centrifuga a 2500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se desecha, luego se realizan cinco lavados con éter etílico bajo las ~~mismas~~ condiciones descritas anteriormente.

4.3 Caracterización de los péptidos por cromatografía analítica RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF

4.3.1 Análisis por RP-HPLC

Para el análisis de los péptidos (1 mg/mL) por RP-HPLC, se utilizó la fase móvil: Solvente A: 0,05% TFA en agua y Solvente B: 0,05% TFA en ACN. Como fase estacionaria fue empleada una columna monolítica Chromolith® C-18 (50×4,6 mm). Se empleó un gradiente de elución del 5 al 50% de Solvente B en 8 minutos a un flujo de 2,0 mL/min, volumen de inyección 10 µL y 210 nm para la detección. Se empleó un cromatógrafo Agilent Series 1260.

4.3.2 Purificación de los péptidos por extracción en fase sólida (SPE)

Para la purificación de los péptidos se emplearon columnas de RP-SPE de 5g (Tamaño de partícula: 40-60 μm)⁶⁴. El péptido se disolvió en el Solvente A, la muestra fue sembrada y luego se eluyó con soluciones que contenían diferentes porcentajes de Solvente B. Las fracciones que contenían al péptido puro se unieron y se liofilizaron. Los productos finales se almacenaron a -4°C .

4.3.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

El peso molecular de los péptidos fue determinado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (microFlex, Bruker). 1 μL de la solución del péptido purificado (0,5 mg/mL) se mezcló con 18 μL de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 5 mg/mL), luego 1 μL de la mezcla fue sembrada sobre la placa porta muestra. La potencia del láser osciló entre los 2700 y 3000V, y se realizaron 200 disparos del láser.

4.4 Síntesis de un soporte monolítico orgánico de *poli(GMA-co-EDMA)*

La síntesis de los soportes monolíticos orgánicos fue llevada a cabo siguiendo el protocolo reportado por Okanda y colaboradores⁶⁵. El primer paso consiste en la remoción del estabilizante que contienen los monómeros orgánicos y que evita su polimerización mientras se encuentran almacenados, para ello fue utilizada una columna de sílica gel (1 g de sílica por cada 2 mL de monómero). Luego de removido el aditivo, se mezclaron el monómero principal GMA (18,0 % p/p) y el agente entrecruzante EDMA (12,0 % p/p). En otro recipiente se preparó la mezcla de porógenos, ciclohexanol (58,8 % p/p) y dodecanol (11,2 % p/p). Las dos disoluciones fueron mezcladas y se adicionó el iniciador polimérico ABCN, en proporción de 1% con respecto al monómero principal. La mezcla final fue purgada con nitrógeno durante 5 minutos y posteriormente incorporada con una jeringa al molde deseado. El molde fue incubado a 57°C durante 24 horas. Transcurrido este

tiempo el polímero obtenido fue lavado exhaustivamente con metanol y secado en trampa de vacío.

4.5 Funcionalización del *poli(GMA-co-EDMA)* con un péptido derivado de la proteína L1 del VPH

Una vez obtenido el monolito de *poli(GMA-co-EDMA)*, se diseñó la ruta sintética para funcionalizarlo. Se planteó que la modificación de la superficie con un péptido se podría lograr en dos pasos (Figura 4-1, Pasos 2 y 3): (i) La funcionalización de la superficie con el ácido 6-maleimidohexanoico y (ii) la reacción entre el grupo maleimido y el grupo tiol presente en la cisteína (Tabla 4-1).

4.5.1 Funcionalización del *poli(GMA-co-EDMA)* con el ácido 6-maleimidohexanoico

Para llevar a cabo esta reacción fue adaptado un procedimiento de funcionalización del grupo 2,3-epoxipropilo con diferentes ácidos carboxílicos previamente descrito⁶⁶. 1,68 mmol de ácido 6-maleimidohexanoico disuelto en DMF fueron mezclados con 1,68 mmol de cloruro de tetrabutilamonio en DMF, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego esta disolución fue adicionada lentamente a una cantidad de monolito de *poli(GMA-co-EDMA)* correspondiente a 0,33 mmol de GMA. El sistema se dejó en atmósfera de N₂ y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y el sólido fue lavado exhaustivamente con DMF y Etanol. Finalmente, el sólido obtenido, *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*, fue secado con pistola de aire hasta peso constante (Figura 4-1. Paso 2).

4.5.2 Funcionalización del monolito con el péptido sintético

10 mg (0,006 mmol) del péptido C-Ahx-SPINNTKPHEAR fueron disueltos en 1 mL de metanol. A esta disolución se le agregó 5 mg del monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 24 horas y transcurrido este tiempo se

centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se desechó el sobrenadante y el sólido obtenido se lavó exhaustivamente con metanol y éter etílico y se almacenó a temperatura ambiente en un desecador.

4.6 Interacción de inmunoafinidad entre péptidos derivados de la secuencia L1 VPH (1-12) y anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12)

Con el fin de seleccionar el péptido óptimo para unir covalentemente al soporte monolítico, fue evaluada la interacción antígeno anticuerpo de cada péptido con anticuerpos policlonales contra la secuencia SPINNTKPHEAR.

4.6.1 Obtención de los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12)

La obtención de los anticuerpos policlonales utilizados en este proyecto fue realizada por el grupo SAMP siguiendo el protocolo que se describe a continuación¹⁴. 250 μ L de una solución del péptido polimérico $\{CG^1SPINNTKPHEAR^{12}GC\}_n$ (2 mg/mL) fueron mezclados con 250 μ L de adyuvante completo de Freund (primera inmunización) y con adyuvante incompleto de Freund para la segunda, tercera y cuarta inmunización. Los conejos Nueva Zelanda fueron inmunizados intraperitonealmente en la zona inguinal, con 150 μ L de la mezcla emulsionada, en los días 1, 20, 40 y 60. Se realizaron sangrías los días 0 (Preimmune), 39 (Post II) y 59 (Post III) y 79 (Post IV). Los sueros fueron obtenidos por centrifugación 5 min. a 2000 r.p.m. y almacenados.

4.6.2 Protocolo ELISA.

Para el ensayo de ELISA se preparan las siguientes disoluciones:

1. Buffer de fosfatos PBS 10 \times : (pH: 7): 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 11,5 g de Na₂HPO₄ y 2 g de KH₂PO₄ en 1,0 L de agua destilada.
2. PBS 1 \times : Dilución 1:10 (v/v) de la disolución de PBS 10 \times .

3. Disolución de lavado: PBS 1× con Tween 20 al 0,5 %.
4. Disolución de bloqueo: Disolución de lavado con 5% de leche en polvo deslactosada y descremada.
5. Disolución de anticuerpo secundario: Disolución de anti-rabbit IgG (Sigma A0545) acoplado a peroxidasa, 1:5000 (v/v) en disolución de bloqueo.
6. Disolución de revelado: Disolución 1:1 (v/v) de TMB y Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂) al 30%.
7. Disolución de anticuerpo primario: Suero Post IV obtenido en la inmunización de conejos Nueva Zelanda con el polímero L1 VPH (1-12)_n, dilución 1:100 (v/v) en disolución de bloqueo.

El péptido (10 µg/mL) disuelto en PBS 1× es filtrado con una membrana hidrofílica de PTFE de 0,45 µm (Disolución 1), luego se adicionaron 100 µL en cada pozo de una caja multipozos de 96 pocillos (F16 Maxisorp loose nunc-immuno module, Thermo Scientific), se tapó y se incubó a 37°C durante 1 hora. La caja multipozos se dejó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se desechó el contenido de los pozos y se lavó tres veces con disolución de lavado y tres veces con agua destilada, la caja se secó y en cada pozo se agregaron 200 µL de disolución de bloqueo. Se repitió el proceso de incubación, el lavado y secado como se describió anteriormente. Luego de esto se adicionó la disolución de anticuerpo primario y se repitió la incubación, los lavados y el secado. Posteriormente se adicionaron 100 µL de disolución de anticuerpo secundario y se repitió la incubación, los lavados y el secado. Finalmente, se agregaron 100 µL de disolución de revelado a cada pozo y se dejó en reposo en oscuridad durante 5 minutos. La absorbancia de cada pozo fue leída a 620 nm.

4.7 Interacción de inmunoafinidad entre el monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH(1-12)* y anticuerpos policlonales anti- L1 VPH (1-12)

Con el fin de evaluar la interacción antígeno-anticuerpo del monolito funcionalizado con el péptido CX-L1 VPH (1-12), fue llevado a cabo el siguiente protocolo:

1,0 mg de monolito funcionalizado, *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH* (1-12), se mezcló con 200 μL de disolución de bloqueo, la bala se agitó durante 20 segundos y se incubó a 37° C durante una hora. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El sólido se lavó 5 veces con 1 mL de disolución de lavado y 5 veces con 1 mL de agua destilada. En cada lavado se agitó durante 20 segundos y se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos. Finalizados los lavados se adicionaron 100 μL del anticuerpo primario (1:100 v/v) y se incubó a 37°C durante una hora. Después de la incubación, se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se realizaron los lavados de la misma forma descrita. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de anticuerpo secundario (1:5000 v/v) y se repitieron los procesos de incubación y lavados, previamente descritos. Finalmente, se agregaron 500 μL de disolución de revelado, se agitó durante 20 segundos y se centrifugó a 15.000 rpm por 5 minutos. 100 μL del sobrenadante fueron transferidos a un pocillo de una caja multipozos y se leyó la absorbancia a 620 nm.

Los ensayos realizados fueron: (A) monolito de *poli(GMA-co-EDMA)* tratado con suero Post IV, (B) Tubo de microcentrífuga tratado con suero Post IV, Monolito funcionalizado tratado con (C) suero preinmune, (D) suero Post IV.

5. Resultados y discusión

Este trabajo pretende contribuir al desarrollo de técnicas para bioseparaciones, empleando soportes monolíticos funcionalizados con péptidos, que permitan aislar anticuerpos por inmunoafinidad. Como modelo de estudio se escogió una secuencia derivada de la proteína L1 de la cápside del VPH.

Para alcanzar los objetivos se utilizó el diseño experimental que se describe a continuación

Etapa 1. Diseño y obtención de los péptidos. Se seleccionó el péptido L1 VPH (1-12): SPINNTKPHEAR, el cual es reconocido por anticuerpos de pacientes infectadas por VPH, a las cuales les fue diagnosticada lesiones en el cérvix¹⁵. A partir de la secuencia seleccionada, se diseñaron péptidos análogos para establecer si estas secuencias eran reconocidas por los anticuerpos policlonales contra L1 VPH (1-12), con el fin de buscar una secuencia corta más fácil de sintetizar y de unir al soporte monolítico. En todos los péptidos se introdujo una cisteína en el extremo N-terminal o C-terminal y un residuo del ácido 6-aminohexanoico. Los péptidos sintetizados se reportan en la Tabla 4-1.

Etapa 2. Determinación de la interacción antígeno-anticuerpo de los péptidos mediante ensayo de ELISA. En esta etapa se identificaron los péptidos obtenidos que son reconocidos por los anticuerpos policlonales. Basados en esta información y en los resultados de la síntesis química, se seleccionó el péptido para unir al soporte monolítico.

Etapa 3. Obtención del soporte monolítico funcionalizado con el péptido. Se realizó la síntesis del soporte monolítico de poli(GMA-co-EDMA) siguiendo el protocolo de Okanda⁶⁵ y se

funcionalizó con el ácido 6-maleimidohexanoico (*AMhx*). Luego el péptido seleccionado fue unido al monolito modificado, por medio de una adición de Michael (tiol-maleimido). Los monolitos obtenidos fueron analizados mediante espectroscopia Infrarroja, Raman, microscopia electrónica de barrido y análisis elemental.

Etapas 4. Estudio de la interacción del monolito poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-péptido con los anticuerpos policlonales. Utilizando el ensayo de ELISA, con algunas modificaciones, se determinó si el monolito funcionalizado con el péptido atrapaba selectivamente los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12).

Los resultados obtenidos en cada una de las etapas formuladas en el diseño experimental, y la discusión de los mismos se describen de manera detallada a continuación.

5.1 Síntesis, purificación y caracterización de los péptidos derivados de L1 VPH (1-12)

Se sintetizaron seis péptidos análogos de la secuencia SPINNTKPHEAR. Todos los péptidos, a excepción del L1 VPH (1-12)_n, contienen una cisteína en el extremo N-terminal y un residuo del ácido 6-aminohexanoico como espaciador. Los resultados de la caracterización, por cromatografía RP-HPLC y espectrometría de masas de los péptidos se presentan en la Tabla 5-1.

Los péptidos CX-L1 VPH (1-12) y L1 VPH (1-12)-XC, contienen la secuencia SPINNTKPHEAR, el espaciador y la cisteína en el extremo N o C-terminal. Teniendo en cuenta que péptidos cortos requieren menos pasos en la síntesis, reduciendo costos y aumentando la rapidez en la obtención; y que además un péptido corto puede favorecer el anclaje químico al monolito, se diseñaron los péptidos CX-L1 VPH (1-5), CX-L1 VPH (5-9) y CX-L1 VPH (8-12), que contienen la secuencia de la región N-terminal, central y C-terminal del péptido L1 VPH (1-12), y se evaluó el reconocimiento de estas moléculas por los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12).

Tabla 5-1 Caracterización de los péptidos sintetizados.

Código	Secuencia	t_R (min)	Pureza (%)	Masa teórica	m/z
L1 VPH (1-12) _n	-(CGSPINNTKPHEARGC) _n	3,10	95,0	1681,8	1682,7
L1 VPH (1-12)-XC	¹ SPINNTKPHEAR ¹² -Ahx-C	3,24	98,4	1577,8	1580,1
CX-L1 VPH (1-12)	C-Ahx- ¹ SPINNTKPHEAR ¹²	3,24	97,4	1577,8	1579,9
CX-L1 VPH (1-5)	C-Ahx- ¹ SPINN ⁵	3,28	95,8	758,4	752,3
CX-L1 VPH (5-9)	C-Ahx- ⁵ NTKPH ⁹	1,10	90,0	810,4	804,2
C-XL1 VPH (8-12)	C-Ahx- ⁸ PHEAR ¹²	3,00	95,3	823,4	817,3

Los péptidos L1 VPH (1-12)-XC, CX-L1 VPH (1-12) y L1 VPH (1-12)_n no presentaron dificultad en su síntesis y fueron obtenidos con purezas superiores al 95%, determinada por RP-HPLC. A manera de ejemplo en la Figura 5-1 se muestra el análisis del péptido L1 VPH (1-12)-XC, donde se observa que la incorporación de los residuos Arg, Lys e Ile requirieron dos ciclos de reacción de acople, mientras que los demás aminoácidos solo necesitaron un ciclo de reacción (panel B). El perfil cromatográfico del producto puro presenta una especie mayoritaria en $t_R = 3,24$ min (panel C); y el espectro de masas tiene una señal en $m/z = 1580,1$ correspondiente a la especie $[M+H]^+$ del péptido (panel D).

Los péptidos CX-L1 VPH (1-5), CX-L1 VPH (5-9) y CX-L1 VPH (8-12), no presentaron dificultades en el acople de los aminoácidos, pero los productos crudos fueron muy solubles en TFA, lo que dificultó la precipitación de estas moléculas con éter etílico, y esto causó bajos rendimientos. Por otro lado, estos péptidos fueron higroscópicos, y en el caso particular del péptido CX-L1 VPH (5-9), se presentó una baja retención en columnas de C-18, lo que dificultó su purificación. El análisis por MALDI TOF MS de los péptidos cortos también presentó inconvenientes, ya que las señales de m/z obtenidas fueron menores a las calculadas, debido posiblemente a la calibración del equipo, que se hace con péptidos

los péptidos L1 VPH (1-12)-XC y CX-L1 VPH (1-12), se concluye que estos últimos son los mejores candidatos para ser inmovilizados covalentemente en el monolito.

5.2 Estudio de la interacción de antígeno-anticuerpo entre los péptidos sintéticos y anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) por ensayos de ELISA

Basados en los resultados de síntesis, y con el objetivo de identificar una secuencia más corta que pueda ser reconocida por anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12), se construyó una librería de péptidos secuencialmente truncados⁶⁷ (Tabla 5-2). Las librerías de péptidos fueron construidas a partir de las secuencias CX-L1 VPH (1-12) y L1 VPH (1-12)-XC. Como se observa en la Tabla 5-2, se sintetizaron péptidos en los que se removió secuencialmente los aminoácidos del extremo N-terminal para los derivados del L1 VPH (1-12)-XC y del C-terminal para los derivados del CX-L1 VPH (1-12).

En la Tabla 5-2 se muestran los títulos de los anticuerpos obtenidos mediante el ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron los sueros preinmune y Post IV, del conejo inmunizado con el péptido polimérico L1 VPH (1-12)_n (Las gráficas de los títulos de los anticuerpos se pueden consultar en el anexo B). Como se puede apreciar en la tabla, los péptidos que contienen la secuencia ¹SPINNTKPHEAR¹²: L1 VPH (1-12) -XC y CX-L1 VPH (1-12), presentaron un título de 1:25000, igual al presentado por el péptido control, L1 VPH (1-12)_n. El péptido CX-L1 VPH (1-11), en el que se removió la ¹²Arg, presentó un título de 1:12800, menor al presentado por el CX-L1 VPH (1-12). A medida que se remueven los aminoácidos del extremo C-terminal el título de los anticuerpos va decreciendo, no se observa reconocimiento de los anticuerpos por los péptidos CX-L1 VPH (1-7), CX-L1 VPH (1-6), CX-L1 VPH (1-5) y CX-L1 VPH (1-4). La disminución más crítica del reconocimiento de los anticuerpos se da al remover el Glu (E), del CX-L1 VPH (1-10) al CX-L1 VPH (1-9), donde se observa un cambio en el título de 1:6400 a 1:800 lo que sugiere que este aminoácido tiene gran relevancia en la interacción antígeno-anticuerpo.

Tabla 5-2 Péptidos análogos de la secuencia L1 VPH (1-12), título del anticuerpo policlonal determinado mediante ensayo de ELISA.

Código	Secuencia	Título de los anticuerpos
L1 VPH (1-12)n	-(CGSPINNTKPHEARGC)-n	1:25600
CX-L1 VPH (1-12)	C-Ahx - ¹ SPINNTKPHEAR ¹²	1:25600
CX-L1 VPH (1-11)	C-Ahx - ¹ SPINNTKPHEA ¹¹	1:12800
CX-L1 VPH (1-10)	C-Ahx - ¹ SPINNTKPHE ¹⁰	1:6400
CX-L1 VPH (1-9)	C-Ahx - ¹ SPINNTKPH ⁹	1:800
CX-L1 VPH (1-8)	C-Ahx - ¹ SPINNTKP ⁸	1:200
CX-L1 VPH (1-7)	C-Ahx - ¹ SPINNTK ⁷	N.R.
CX-L1 VPH (1-6)	C-Ahx - ¹ SPINNT ⁶	N.R.
CX-L1 VPH (1-5)	C-Ahx - ¹ SPINN ⁵	N.R.
CX-L1 VPH (1-4)	C-Ahx - ¹ SPIN ⁴	N.R.
L1 VPH (1-12) -XC	¹ SPINNTKPHEAR ¹² - Ahx-C	1:25600
L1 VPH (2-12) -XC	² PINNTKPHEAR ¹² - Ahx-C	1:25600
L1 VPH (3-12) -XC	³ INNTKPHEAR ¹² - Ahx-C	1:12800
L1 VPH (4-12) -XC	⁴ NNTKPHEAR ¹² - Ahx-C	1:6400
L1 VPH (5-12) -XC	⁵ NTKPHEAR ¹² - Ahx-C	1:800
L1 VPH (6-12) -XC	⁶ TKPHEAR ¹² - Ahx-C	1:800

N.R. No hay reconocimiento al título de los anticuerpos 1:100.

En forma similar, el reconocimiento de los anticuerpos hacia los péptidos truncados en el extremo N-terminal decrece al remover secuencialmente los aminoácidos. La disminución más crítica en el título se da en la remoción de la primera Asn (del L1 VPH (4-12) -XC al L1 VPH (5-12) -XC) sugiriendo que posiblemente este aminoácido es relevante en el reconocimiento de los anticuerpos.

Los resultados obtenidos permiten inferir que: (i) Los péptidos L1 VPH (1-12) -XC y CX-L1 VPH (1-12) presentaron el mismo título que el péptido L1 VPH (1-12)n sugiriendo que

la incorporación del residuo de cisteína y del ácido aminohexanoico no interfiere con el reconocimiento antigénico, (ii) los péptidos truncados que contienen entre 13 y 11 residuos, presentaron menor reconocimiento antigénico que los péptidos que contenían la secuencia SPINNTKPHEAR, (iii) las secuencias cortas (menores a 10 residuos) tuvieron títulos muy bajos e incluso nulos, en algunos casos y (iv) la secuencias más cortas que fueron reconocidas por los anticuerpos policlonales fueron CX-L1 VPH (1-8) y L1 VPH (6-12)-XC.

De los resultados obtenidos es posible concluir que, a excepción de la serina, todos los residuos presentes en la secuencia SPINNTKPHEAR son importantes para el reconocimiento de los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12). Por tal motivo, y por las condiciones favorables de síntesis y caracterización mencionadas en el numeral 5.1; se seleccionaron los péptidos CX-L1 VPH (1-12) y L1 VPH (1-12)-XC como los mejores candidatos para la funcionalización del soporte monolítico.

5.3 Síntesis del material monolítico orgánico de *poli*(GMA-co-EDMA) funcionalizado con un péptido derivado del L1 VPH (1-12)

5.3.1 Obtención del monolito *poli*(GMA-co-EDMA)

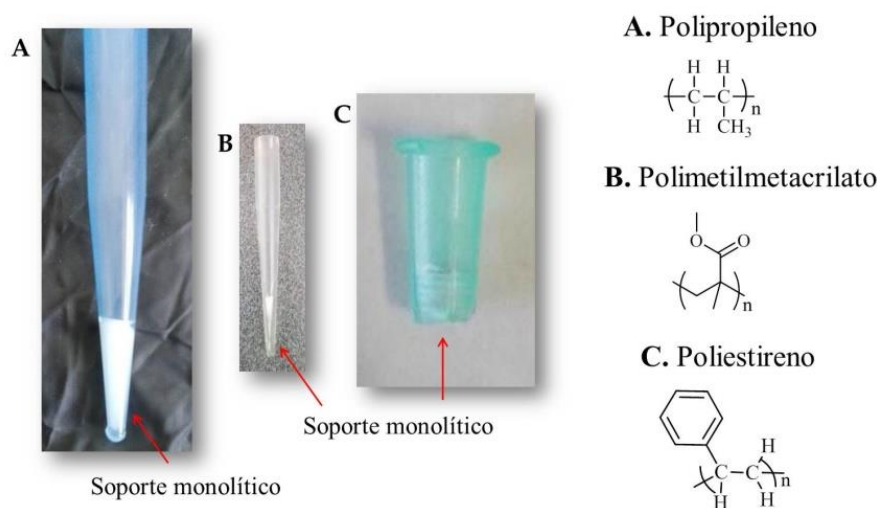
Para obtener un soporte monolítico que retenga selectivamente los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12), el primer paso fue sintetizar el monolito con la superficie químicamente activa que permitiera la posterior modificación con el péptido CX-L1 VPH (1-12) o L1 VPH (1-12)-XC. El monolito de *poli*(GMA-co-EDMA) se obtuvo siguiendo el protocolo reportado por Okanda y colaboradores⁶⁵, tal como se describió en la metodología.

Adicionalmente, fueron evaluados como moldes para contener el soporte monolítico, varios materiales poliméricos orgánicos (polipropileno, polimetilmetacrilato y poliestireno). Para la elección del molde se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

(i) Que la polimerización pueda efectuarse dentro del mismo, (ii) que el soporte monolítico quede adherido física o químicamente a las paredes del molde y (iii) que el material del molde sea estable a las condiciones de polimerización del monolito.

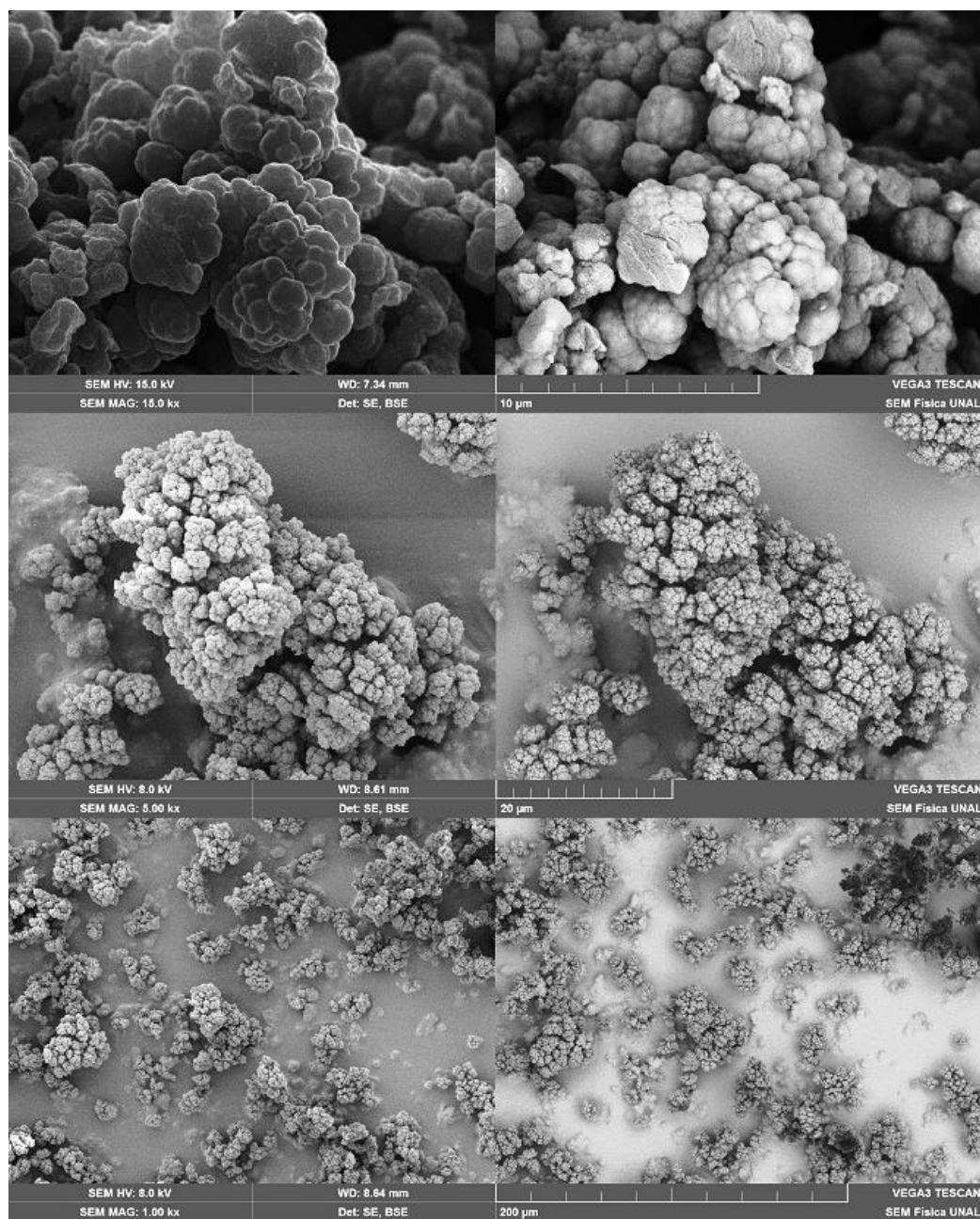
En el caso del polipropileno (Figura 5-2A), la polimerización se efectuó dentro de una punta para micropipeta y se evidenció que el monolito obtenido no se adhirió al molde. Por esta razón, se fabricó otro molde de polimetilmetacrilato (Figura 5-2B), polímero de naturaleza química más similar a la del monolito. En este molde hubo una buena adhesión del monolito a las paredes, sin embargo, no fue posible hacer fluir líquidos a través de la columna. Finalmente, se probó un molde de poliestireno (Figura 5-2 C), el monolito se adhirió a las paredes de este material y se logró hacer fluir líquidos a través de la columna; por esta razón, fue el material escogido como el molde óptimo para contener al *poli*(GMA-*co*-EDMA).

Figura 5-2. Materiales empleados en la fabricación del molde para contener un monolito de *poli*(GMA-*co*-EDMA).



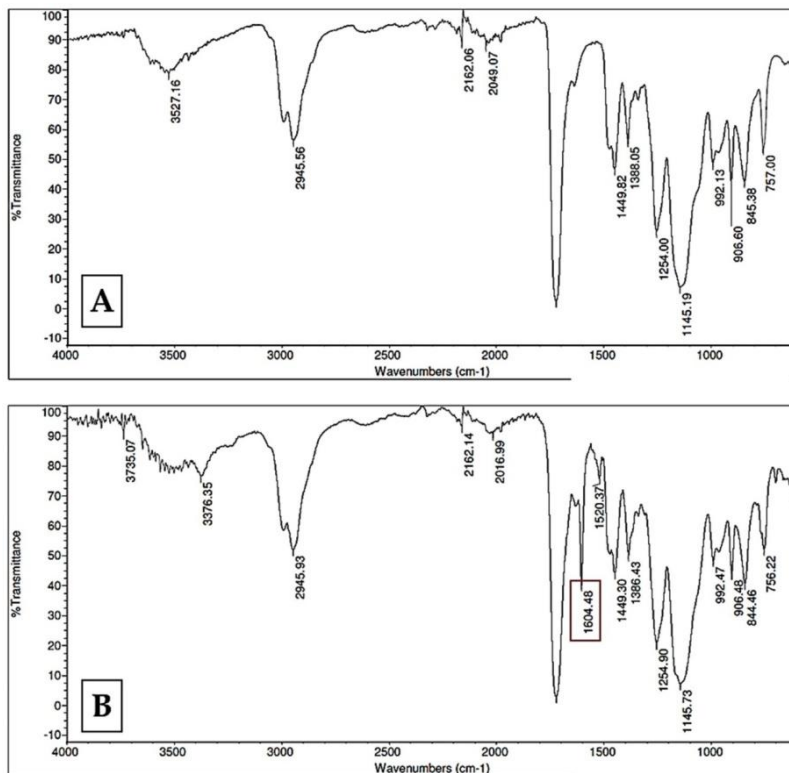
El monolito sintetizado se caracterizó por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Se observa que el material presenta una morfología de tipo granular, probablemente debido a la formación y precipitación de núcleos durante la polimerización, adicionalmente se evidencia la presencia de mesoporosidad y macroporosidad (Figura 5-3); estos resultados están de acuerdo a los reportados por otros autores⁶⁸.

Figura 5-3 Imagen de SEM del polímero de *poli(GMA-co-EDMA)* sintetizado (10, 20 y 200 μm).



El monolito de *poli(GMA-co-EDMA)* obtenido se analizó por espectroscopia infrarroja (Figura 5-4A). El espectro contiene las señales características reportadas en la literatura para polímeros similares, entre estas se encuentran las señales de los carbonilos ($1729,57\text{ cm}^{-1}$), el estiramiento C-O del anillo tensionado ($908,39\text{ cm}^{-1}$) y estiramientos C=C ($2958,85\text{ cm}^{-1}$).

Figura 5-4 Espectro infrarrojo del monolito de *poli(GMA-co-EDMA)* (A) y del monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* (B)



5.3.2 Obtención del monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*

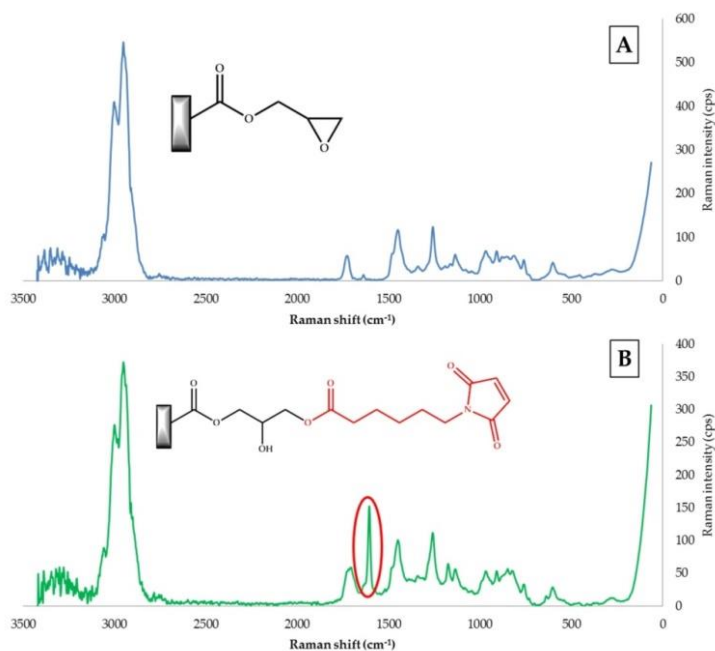
La funcionalización del soporte monolítico fue realizada por reacción entre el grupo 2,3-epoxipropilo y el ácido 6-maleimidohexanoico (*AMhx*), mediante apertura de anillos tensionados y formación del éster para obtener *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*.

En la Figura 5-4B se muestra el espectro IR del monolito después de la funcionalización con el *AMhx*. Como se puede apreciar, el espectro presenta señales similares a las encontradas para el *poli(GMA-co-EDMA)*, sin embargo, después de la funcionalización se observa la aparición de una señal en 1604,48 cm⁻¹, la cual corresponde al estiramiento C=O de imidas y está reportada como señal característica de moléculas que contienen grupos maleimido⁵⁹, lo que sugiere la presencia de estos en el material monolítico.

Los soportes monolíticos *poli(GMA-co-EDMA)* y *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* se analizaron por espectroscopia Raman (Figura 5-5). En el espectro se observa que después

de la funcionalización aparece una señal en $1606,42\text{ cm}^{-1}$ (Panel B), la cual corresponde al enlace C=O del grupo funcional imida que se había observado también en el espectro infrarrojo. Este análisis sugiere que la superficie monolítica fue funcionalizada con el *AMhx*.

Figura 5-5 Espectro Raman del monolito de *poli(GMA-co-EDMA)* (A) y del monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* (B).



Los materiales monolíticos obtenidos fueron analizados por análisis elemental, ya que el soporte monolítico *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* contiene nitrógeno, debido a la presencia del grupo maleimido. Se compararon los dos soportes monolíticos antes y después de la funcionalización y se observó que el porcentaje de nitrógeno para el *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* fue de 0,91 %, que corresponde a una funcionalización del soporte del 12,5 %, mientras que para el *poli(GMA-co-EDMA)* el contenido de Nitrógeno fue del 0% (Tabla 5-3). Se puede evidenciar que el contenido de nitrógeno en el *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* fue menor al esperado (20% Nitrógeno), asumiendo que la funcionalización fuera del 100%. Esto permite concluir que el 37% de los grupos epóxido del soporte quedaron sin reaccionar, debido posiblemente a que algunos grupos reactivos dentro de la red

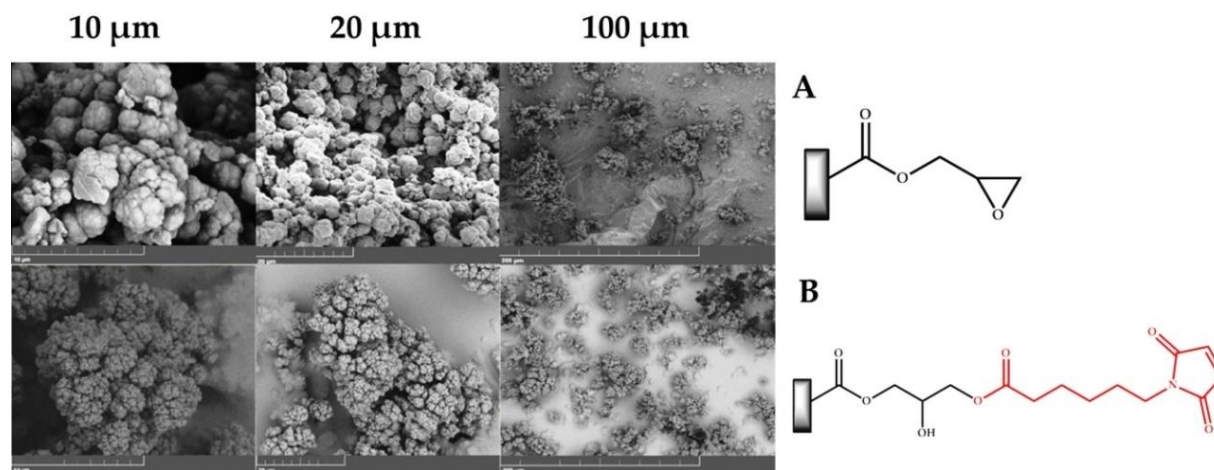
polimérica no están disponibles, lo que impide que el ácido 6-maleimidohexanoico reaccione con estos.

Tabla 5-3 Análisis elemental de los soportes monolíticos *poli(GMA-co-EDMA)* y *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*

	<i>poli(GMA-co-EDMA)</i> % p/p	<i>poli(GMA-co-EDMA)-AMhx</i> % p/p
Nitrógeno	0,00	0,90
Carbono	61,19	58,79
Hidrógeno	7,59	6,90
Ac. 6-maleimidohexanoico	0,00	12,54

El soporte monolítico *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* fue analizado por SEM (Figura 5-6), como se puede observar, el material conserva las mismas propiedades morfológicas que el *poli(GMA-co-EDMA)*, también se aprecia una estructura granular, con la presencia de núcleos y con mesoporosidad y macroporosidad.

Figura 5-6 Caracterización por SEM de de los soportes monolíticos de *poli(GMA-co-EDMA)* (A) y *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* (B)



Como conclusión de los resultados, la aparición de la señal cercana a 1600 cm^{-1} , en espectroscopia infrarroja y Raman, junto con la presencia de nitrógeno, determinado por análisis elemental, indican que la superficie monolítica del *poli(GMA-co-EDMA)* fue

funcionalizada con el ácido 6-maleimidohexanoico. Adicionalmente, la caracterización por SEM muestra que, después de la funcionalización, el soporte presenta propiedades morfológicas y estructurales similares al material sin funcionalizar.

5.3.3 Funcionalización del *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* con el péptido CX-L1 VPH (1-12)

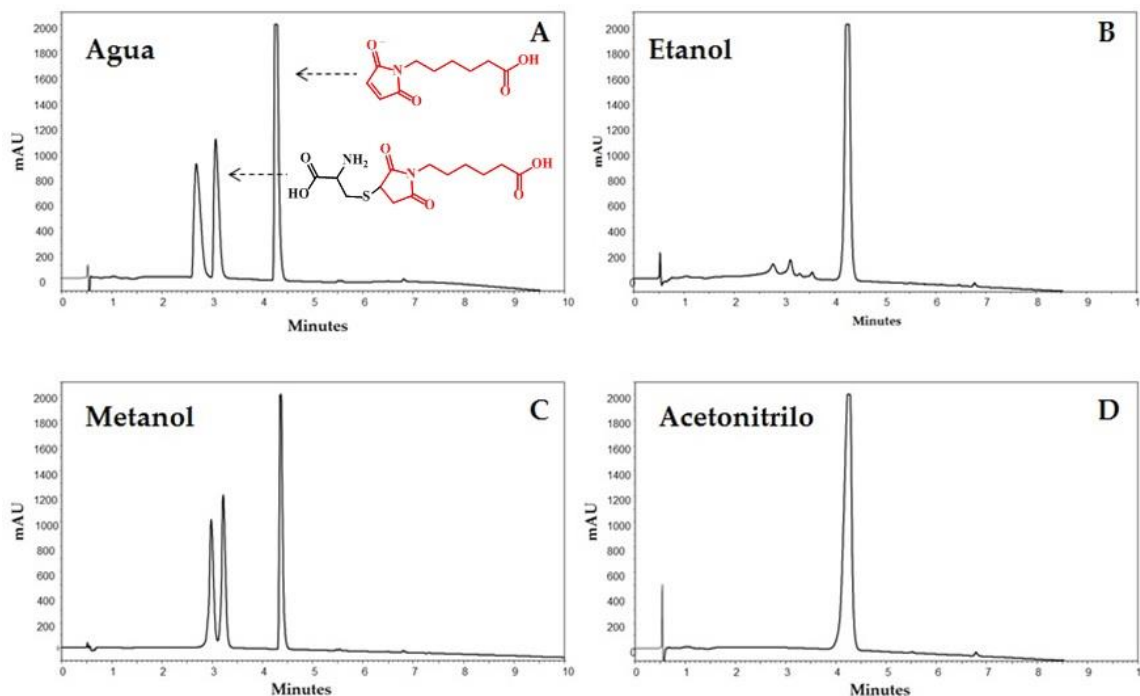
Una vez obtenido el *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*, el siguiente paso fue unir uno de los péptidos seleccionados a este soporte, por reacción entre el grupo maleimido del monolito con el tiol del residuo de cisteína.

La reacción de adición de Michael entre el grupo tiol (Cisteína) y el grupo maleimido (química *click*) se emplea frecuentemente para marcar proteínas⁶⁹, sin embargo, el uso de esta reacción ha sido poco utilizada para funcionalizar materiales poliméricos porosos⁷⁰. Por lo anterior, se decidió hacer primero un estudio de la reacción en solución, para determinar las condiciones experimentales óptimas y a partir de esto funcionalizar la superficie del monolito.

El primer experimento consistió en realizar la reacción entre la L-Cisteína y el ácido 6-maleimidohexanoico en diferentes solventes. Se preparó una solución que contenía 1,20 mg de L-Cys y el ácido 6-maleimidohexanoico (1,5 excesos molares) en (i) etanol, (ii) acetonitrilo, (iii) metanol o (iv) agua. Las mezclas de reacción se agitaron por dos minutos a temperatura ambiente y fueron monitoreadas por RP-HPLC, los resultados se presentan en la Figura 5-7. En todos los perfiles cromatográficos, el pico con $t_R = 4,3$ minutos corresponde al ácido 6-maleimidohexanoico, mientras que la L-Cisteína no se puede detectar por que no absorbe en la región UV. Como se puede observar en la reacción realizada en agua (Panel A) aparecen tres picos, uno en 4,3 min correspondiente al ácido 6-maleimidohexanoico y dos señales en 2,7 y 3,2 min, que corresponden a los productos de reacción. La mezcla de los productos obtenidos fue analizada por ^1H y ^{13}C -RMN y estos resultados sugieren que en la reacción entre el tiol y el maleimido se forman productos diastereoisoméricos y probablemente tautómeros (análisis presentado en el

Anexo C). La reacción en Metanol (Panel C) presenta el mismo comportamiento que el descrito para el agua. Cuando se utilizó Acetonitrilo o Etanol como medio de reacción, no se observó formación significativa de los productos (Panel B y D).

Figura 5-7 Reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y la L-Cisteína empleando diferentes disolventes: Agua (A), Etanol (B), Metanol y Acetonitrilo (D).

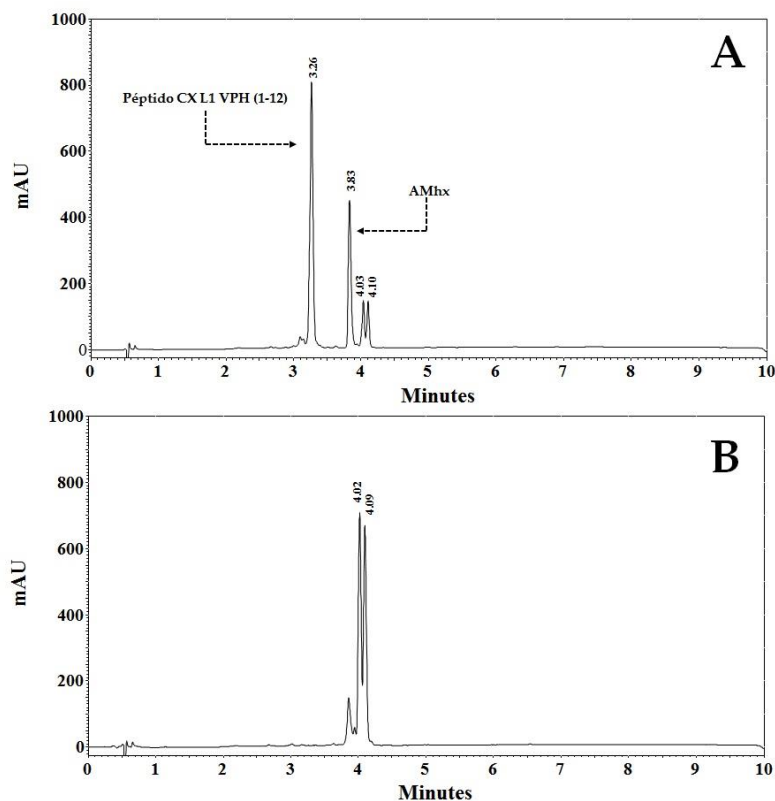


A partir de estos resultados se concluye que la reacción entre el grupo tiol de la cisteína y el grupo maleimido ocurre rápidamente (menos de 2 minutos), y que los mejores disolventes para la funcionalización del monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx*, son el agua o el metanol.

El siguiente ensayo fue realizar la reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y el péptido CX-L1 VPH (1-12) (1:1 eq) en agua, a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por RP-HPLC (Figura 5-8). En el perfil cromatográfico de la reacción en el tiempo cero (panel A) se encuentran señales correspondientes al péptido ($t_R = 3,24$ min) y el *AMhx* ($t_R = 4,30$ min). Después de 24 horas de reacción (panel B), el pico del péptido desaparece completamente y aparecen dos nuevas señales ($t_R = 4,02$ y $4,09$ min). Este resultado muestra que la reacción es cuantitativa y que no hay un solo producto de

condensación entre el péptido y el *AMhx*, comportamiento observado también para la cisteína. La reacción en solución entre el *AMhx* y el péptido L1 VPH (1-12)-XC, fue estudiada y también se observó la presencia de dos señales.

Figura 5-8 Monitoreo por RP-HPLC de la reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y el péptido L1 VPH (1-12) en Agua. Tiempo cero (A), 24 horas de reacción (B).

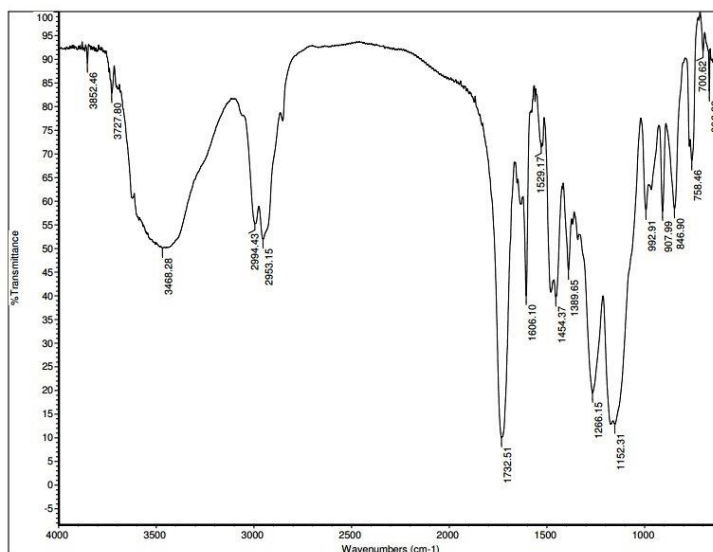


Los resultados indican que la reacción del ácido 6-maleimidohexanoico con los péptidos: (i) Es cuantitativa, (ii) requiere tiempos de reacción largos (24 h) y (iii) se forman dos productos, comportamiento similar al observado para la reacción entre la Cisteína y el *AMhx*.

Para estudiar la funcionalización del *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx* se seleccionó el péptido CX-L1 VPH (1-12) por la cantidad de molécula pura disponible (100 mg). La reacción se realizó en metanol y se monitoreo por RP-HPLC; después de 72 horas no se observó disminución del área del pico correspondiente al péptido. Entonces, el material tratado se

lavó exhaustivamente, se secó y se analizó por espectroscopia IR. En el espectro (Figura 5-9) se evidencia la aparición de una señal ancha alrededor de 3500 cm^{-1} , que puede ser atribuida a estiramientos (N-H) de amidas, y estiramiento (O-H) de la treonina y serina, esta señales son indicativas de la presencia del péptido CX-L1 VPH (1-12) unido al monolito. Para corroborar este resultado, se utilizó la prueba de ELISA sobre el soporte monolítico, ya que esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad

Figura 5-9 Espectro IR del *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH(1-12)*.

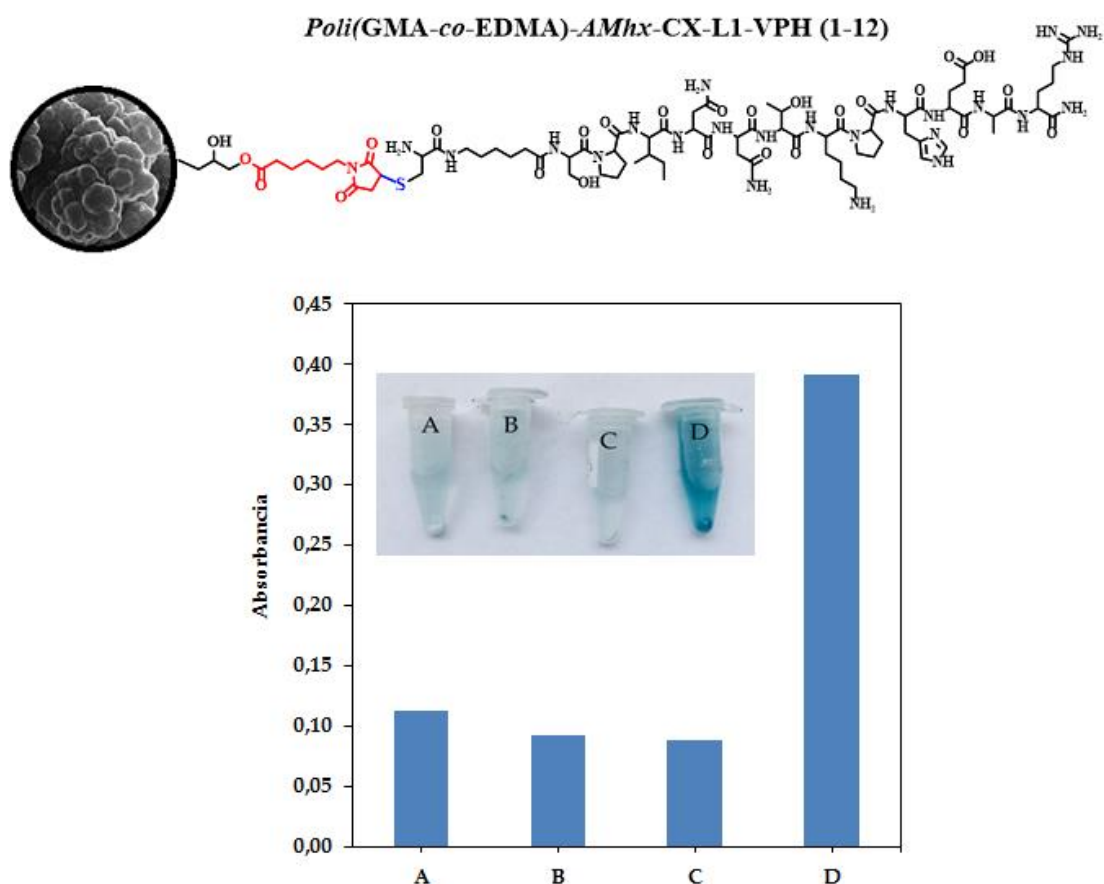


5.4 Interacción antígeno-anticuerpo entre los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) y el monolito *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH (1-12)*

La interacción entre el *poli(GMA-co-EDMA)-AMhx-CX-L1-VPH (1-12)* y los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) fue determinada por ensayos de ELISA, con algunas modificaciones. Para este estudio se realizaron tres controles Figura 5-10: (A) monolito *poli(GMA-co-EDMA)*, blanco empleado para evaluar si hay interacción inespecífica de los anticuerpos policlonales con el material monolítico sin funcionalizar; (B) Tubo de microcentrífuga vacío, con el fin de determinar si existen interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material del tubo (polipropileno) y (C) monolito *poli(GMA-co-EDMA)-*

AMhx-CX-L1-VPH (1-12) tratado con suero preimmune, para determinar interacciones inespecíficas.

Figura 5-10 Estudio de la interacción antígeno-anticuerpo sobre materiales monolíticos. (A) *poli*(GMA-co-EDMA); (B) Ensayo en ausencia de monolito; y (C-D) *Poli*(GMA-co-EDMA)-*AMhx-CX-L1-VPH* (1-12). A, B y D incubados con suero Post IV y C con suero preimmune.

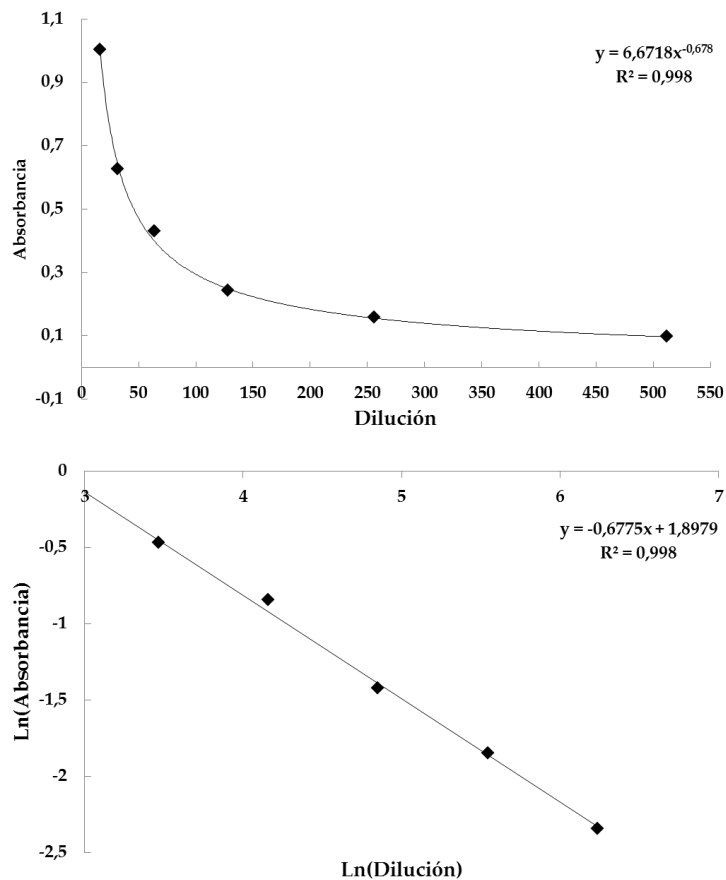


Como se puede apreciar en la Figura 5-10, en el caso de los controles (A, B y C) se obtuvieron valores de absorbancia menores a 0,10. Para el *poli*(GMA-co-EDMA)-*AMhx-CX-L1-VPH*(1-12) incubado con el suero Post IV (D) se observa coloración azul con absorbancia de 0,4. Este resultado indica que los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) reconocen el péptido CX-L1 VPH (1-12) inmovilizado en la superficie del soporte monolítico.

Para determinar de manera preliminar la cantidad de péptido inmovilizado en la superficie monolítica, se construyó mediante ensayo de ELISA, una curva de titulación

(Figura 5-11, absorbancia vs dilución del péptido). Se partió de una concentración de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de péptido y se realizaron diluciones en base 2. Mediante extrapolación se determinó que el monolito contenía 52 μg de péptido por gramo.

Figura 5-11 Curva de calibración para el péptido CX-L1 VPH (1-12) mediante ensayo de ELISA. Eje x: Diluciones partiendo de una concentración de péptido de 1 $\mu\text{g/mL}$.



6. Conclusiones

Mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), empleando la estrategia Fmoc/tBu, se lograron obtener péptidos cuyas secuencias son derivadas de la proteína L1 del VPH. Se evaluó el reconocimiento de anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) hacia péptidos derivados de la secuencia SPINNTKPHEAR, y se determinó que el mayor reconocimiento antigénico se da hacia los péptidos que contienen la secuencia completa.

Los resultados obtenidos en el proceso de síntesis y reconocimiento antigénico, permitieron determinar que las secuencias CX-L1 VPH (1-12): C-*Ahx*-SPINNTKPHEAR y L1 VPH (1-12)-XC: SPINNTKPHEAR-*Ahx*-C son las mejores para anclarla químicamente a un soporte monolítico.

Se determinó que la reacción de química *click*, en solución, entre el ácido 6-maleimidohexanoico y la cisteína o los péptidos que la contienen: (i) Es cuantitativa, (ii) se favorece en solventes como el metanol y el agua y (iii) conduce a la formación de varios productos.

Se obtuvieron y caracterizaron los soportes monolíticos *poli*(GMA-co-EDMA), *poli*(GMA-co-EDMA)-*AMhx*, y *poli*(GMA-co-EDMA)-*AMhx*-CX-L1-VPH(1-12).

El péptido unido químicamente al *poli*(GMA-co-EDMA)-*AMhx*-CX-L1-VPH(1-12) fue reconocido por los anticuerpos policlonales anti-L1 VPH (1-12) y puede ser empleado para capturarlos.

Bibliografía

- (1) Kumar V, Abbas AK, A. J. *Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death.*; 2015.
- (2) Palanisamy, S. K.; Trisciuglio, D.; Zwergel, C.; Del Bufalo, D.; Mai, A. Metabolite Profiling of Ascidian *Styela Plicata* Using LC–MS with Multivariate Statistical Analysis and Their Antitumor Activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32* (1), 614–623.
- (3) Sunkar, S., Sibitha, V., Valli Nachiyar, C., Prakash, P., Renugadevi, K. Bioprospecting Endophytic Fungus *Colletotrichum* Sp. Isolated from *Artocarpus Heterophyllus* for Anticancer Activity. *Res. J. Biotechnol.* **2017**, *12* (2), 46–56.
- (4) Jacob, J., Rajendran, R.U., Priya, S.H., Purushothaman, J., S. A. Enhanced Antibacterial Metabolite Production through the Application of Statistical Methodologies by a *Streptomyces Nogatater* NIIST A30 Isolated from Western Ghats Forest Soil. *PLoS One* **2017**, *12* (4).
- (5) Aristimuño Ficoseco, M. E.; Sequin, C. J.; Aceñolaza, P. G.; Vattuone, M. A.; Catalán, C. A. N.; Sampietro, D. A. Antifungal Metabolites from *Schinopsis Balansae* Engl (Anacardiaceae): Isolation, Identification and Evidences of Their Mode of Action on *Fusarium Graminearum* Schwabe. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *6419* (November), 1–4.
- (6) Damiano, S.; Forino, M.; De, A.; Vitali, L. A.; Lupidi, G.; Tagliatela-Scafati, O. Antioxidant and Antibiofilm Activities of Secondary Metabolites from *Ziziphus*

- Jujuba Leaves Used for Infusion Preparation. *Food Chem.* **2017**, *230*, 24–29.
- (7) Cieslarova, Z.; Lopes, F. S.; do Lago, C. L.; França, M. C.; Colnaghi Simionato, A. V. Capillary Electrophoresis Tandem Mass Spectrometry Determination of Glutamic Acid and Homocysteine's Metabolites: Potential Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Talanta* **2017**, *170* (March), 63–68.
- (8) Thang, L. Y.; Breadmore, M. C.; See, H. H. Electrokinetic Supercharging in Nonaqueous Capillary Electrophoresis for Online Preconcentration and Determination of Tamoxifen and Its Metabolites in Human Plasma. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1461*, 185–191.
- (9) Madrakian, T.; Afkhami, A.; Rahimi, M.; Ahmadi, M.; Soleimani, M. Preconcentration and Spectrophotometric Determination of Oxymetholone in the Presence of Its Main Metabolite (Mestanolone) Using Modified Maghemite Nanoparticles in Urine Sample. *Talanta* **2013**, *115*, 468–473.
- (10) Svec, F. Stellan Hjertén's Contribution to the Development of Monolithic Stationary Phases. *Electrophoresis* **2008**, *29* (8), 1593–1603.
- (11) Cai, J.; Zhu, G. T.; He, X. M.; Zhang, Z.; Wang, R. Q.; Feng, Y. Q. Polyoxometalate Incorporated Polymer Monolith Microextraction for Highly Selective Extraction of Antidepressants in Undiluted Urine. *Talanta* **2017**, *170* (January), 252–259.
- (12) Meseguer-Lloret, S.; Torres-Cartas, S.; Catalá-Icardo, M.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-Martínez, J. M. Extraction and Preconcentration of Organophosphorus Pesticides in Water by Using a Polymethacrylate-Based Sorbent Modified with Magnetic Nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (14), 3561–3571.
- (13) Urquiza Martínez, M. El Papel de La Estructura y Entropía Configuracional Del Péptido En La Generación de Anticuerpos, En La Interacción Péptido Antigénico-Anticuerpo y En La Actividad Biológica Del Péptido, Universidad Nacional de Colombia, Tesis de doctorado, 2009.

-
- (14) Lara Carrillo, J. A.; Fierro Medina, R.; Manríquez Rocha, J.; Bustos Bustos, E.; Insuasty Cepeda, D. S.; García Castañeda, J. E.; Rivera Monroy, Z. J. Design, Synthesis, and Use of Peptides Derived from Human Papillomavirus L1 Protein for the Modification of Gold Electrode Surfaces by Self-Assembled Monolayers. *Molecules* **2017**, *22* (11), 1970.
- (15) Santamaria, H.; Manoutcharian, K.; Rocha, L.; Gonzalez, E.; Acero, G.; Govezensky, T.; Uribe, L. I.; Olguin, a; Paniagua, J.; Gevorkian, G. Identification of Peptide Sequences Specific for Serum Antibodies from Human Papillomavirus-Infected Patients Using Phage Display Libraries. *Clin. Immunol.* **2001**, *101* (3), 296–302.
- (16) HPV CENTRE. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. *Inst. Catalá d' Oncol.* **2017**.
- (17) Apgar, B. S.; Zoschnick, L. The 2001 Bethesda System Terminology. **2003**.
- (18) Waxman, A.G., and Zsmelye, M. M. Preventing Cervical Cancer: The Pap Test and the HPV Vaccine. *Med. Clin. North Am.* **2008**, No. 92, 1059–1082.
- (19) Khan, M. J.; Partridge, E. E.; Wang, S. S.; Schiffman, M. Socioeconomic Status and the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 among Oncogenic Human Papillomavirus DNA-Positive Women with Equivocal or Mildly Abnormal Cytology. *Cancer* **2005**, *104* (1), 61–70.
- (20) Markowitz, L. E.; Dunne, E. F.; Saraiya, M.; Lawson, H. W.; Chesson, H.; Unger, E. R.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Recomm. reports Morb. Mortal. Wkly. report. Recomm. reports* **2007**, *56* (RR-2), 1–24.
- (21) Prathipati, P. K.; Mandal, S.; Destache, C. J. Simultaneous Quantification of

- Tenofovir, Emtricitabine, Rilpivirine, Elvitegravir and Dolutegravir in Mouse Biological Matrices by LC-MS/MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 473–481.
- (22) Oláh, Z.; Kremmer, T.; Vogg, A. T.; Varga, Z.; Szúcs, Z.; Neumaier, B.; Dóczy, R. Novel Ion Exchange Chromatography Method for Nca Arsenic Separation. *Appl. Radiat. Isot.* **2017**, *122*.
- (23) Kühnreich, R.; Holzgrabe, U. High-Performance Liquid Chromatography Evaluation of the Enantiomeric Purity of Amino Acids by Means of Automated Precolumn Derivatization with Ortho-Phthalaldehyde and Chiral Thiols. *Chirality* **2016**, *28* (12).
- (24) Mostafa, M. M.; Al-Ghobashy, M. A.; Fathalla, F. A.; Salem, M. Y. Immunoaffinity Extraction Using Conformation-Dependent Antibodies Coupled to SE-HPLC for the Development of Stability and Potency-Indicating Assay for Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1032*.
- (25) Lee, T. D. *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*; 2011; Vol. 22.
- (26) Guiochon, G. Monolithic Columns in High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1168* (1–2), 101–168.
- (27) OSAKA SODA. CAPCELL PAK C18 IF Type <https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/e/column/if.html> (accessed May 24, 2017).
- (28) Svec, F.; Tennikova, T. B.; Deyl, Z. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*; 2003; Vol. 67.
- (29) Xiong, L.; Zhang, R.; Regnier, F. E. Potential of Silica Monolithic Columns in Peptide Separations. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030* (1–2), 187–194.
- (30) Huertas Méndez, N. Síntesis de Péptidos Derivados de La Lactoferricina Bovina y

- Evaluación de Su Actividad Antibacteriana, Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Maestría, 2016.
- (31) Kubín, M.; Špaček, P.; Chromeček, R. Gel Permeation Chromatography on Porous Poly(Ethylene Glycol Methacrylate). *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1967**, *32* (11), 3881–3887.
- (32) Peters, E. C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Rigid Macroporous Polymer Monoliths. *Adv. Mater.* **1999**, *11* (14), 1169–1181.
- (33) Lynn, T. R.; Rushneck, D. R.; Cooper, A. R. High Resolution-Low Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1974**, *12* (2), 76–79.
- (34) Hjertén, S.; Liao, J.-L.; Zhang, R. High-Performance Liquid Chromatography on Continuous Polymer Beds. *J. Chromatogr. A* **1989**, *473*, 273–275.
- (35) Kiss, I.; Bacskey, I.; Kilar, F.; Felinger, A. Comparison of the Mass Transfer in Totally Porous and Superficially Porous Stationary Phases in Liquid Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (3), 1307–1314.
- (36) Cabrera, K. Applications of Silica-Based Monolithic HPLC Columns. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27* (10–11), 843–852.
- (37) Siouffi, A. M. Silica Gel-Based Monoliths Prepared by the Sol-Gel Method: Facts and Figures. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000* (1–2), 801–818.
- (38) Buchmeiser, M. R. Polymeric Monolithic Materials: Syntheses, Properties, Functionalization and Applications. *Polymer (Guildf)*. **2007**, *48* (8), 2187–2198.
- (39) Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Soga, N.; Tanaka, N. Structure Design of Double-Pore Silica and Its Application to HPLC. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1998**, *13* (1/3), 163–169.
- (40) Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Soga, N.; Tanaka, N. Double Pore Silica Gel

- Monolith Applied to Liquid Chromatography. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1997**, *8* (1–3), 547–552.
- (41) Ute, K.; Yoshida, S.; Kitayama, T.; Bamba, T.; Harada, K.; Fukusaki, E.; Kobayashi, A.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K. Size Exclusion Chromatography of Standard Polystyrenes with a Wide Range of Molecular Weight Up to 7.45×10^6 on Monolithic Silica Capillary Columns. *Polym. J.* **2006**, *38* (11), 1194–1197.
- (42) Groarke, R. J.; Brabazon, D. Methacrylate Polymer Monoliths for Separation Applications. *Materials (Basel)*. **2016**, *9* (6).
- (43) Carrasco-Correa, E. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M. Evaluation of 2,3-Epoxypropyl Groups and Functionalization Yield in Glycidyl Methacrylate Monoliths Using Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1379*, 100–105.
- (44) Ueda, K.; Ishikawa, N.; Tatsuguchi, A.; Saichi, N.; Fujii, R.; Nakagawa, H. Antibody-Coupled Monolithic Silica Microtips for Highthroughput Molecular Profiling of Circulating Exosomes. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6232.
- (45) Svec, F.; Frechet, J. M. J. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules* **1995**, *28* (22), 7580–7582.
- (46) Maniquet, A.; Bruyer, N.; Raffin, G.; Baco-Antoniali, F.; Demesmay, C.; Dugas, V.; Randon, J. Behavior of Short Silica Monolithic Columns in High Pressure Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1460*, 153–159.
- (47) Mao, Z.; Chen, Z. Monolithic Column Modified with Bifunctional Ionic Liquid and Styrene Stationary Phases for Capillary Electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1480*, 99–105.
- (48) Peng, L.; Zheng, Y.; Li, J.; Jin, Y.; Gao, C. Monolithic Neat Graphene Oxide Aerogel for Efficient Catalysis of S \rightarrow O Acetyl Migration. *ACS Catal.* **2015**, *5* (6), 3387–3392.

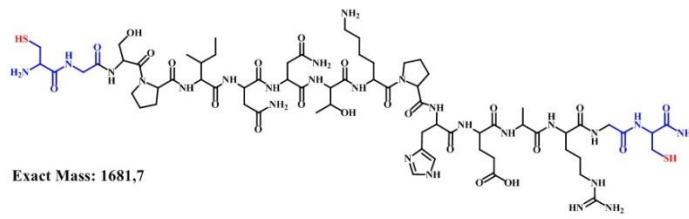
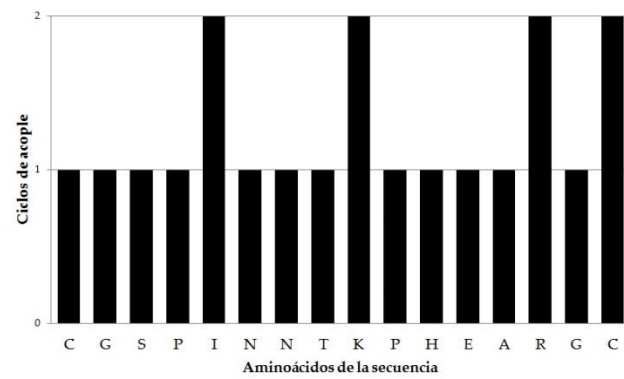
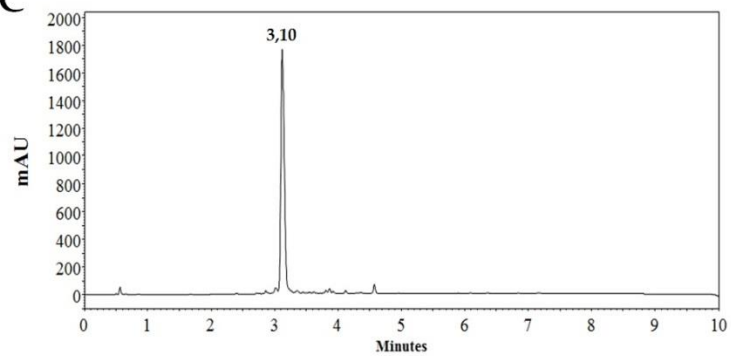
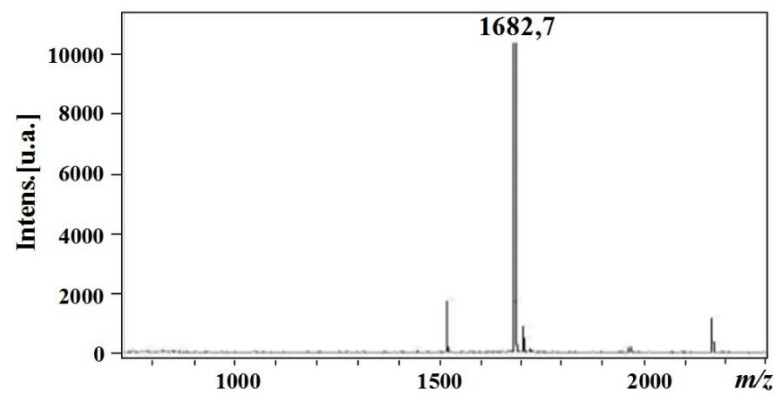
- (49) Candish, E.; Khodabandeh, A.; Gaborieau, M.; Rodemann, T.; Shellie, R. A.; Gooley, A. A.; Hilder, E. F. Poly(Ethylene Glycol) Functionalization of Monolithic Poly(Divinyl Benzene) for Improved Miniaturized Solid Phase Extraction of Protein-Rich Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 2189–2199.
- (50) Jiang, X.; Zhang, D.; Li, X.; Wang, X.; Bai, L.; Liu, H.; Yan, H. Fabrication of a Novel Hemin-Based Monolithic Column and Its Application in Separation of Protein from Complex Bio-Matrix. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 138, 14–21.
- (51) Eeltink, S.; Wouters, S.; Dores-Sousa, J. L.; Svec, F. Advances in Organic Polymer-Based Monolithic Column Technology for High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Profiling of Antibodies, Intact Proteins, Oligonucleotides, and Peptides. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1–14.
- (52) Szumski, M.; Kłodzińska, E.; Jarmalavičiene, R.; Maruška, A.; Buszewski, B. Considerations on Influence of Charge Distribution on Determination of Biomolecules and Microorganisms and Tailoring the Monolithic (Continuous Bed) Materials for Bioseparations. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, 70 (1), 107–115.
- (53) Acquah, C.; Danquah, M. K.; Moy, C. K. S.; Anwar, M.; Ongkudon, C. M. Thermogravimetric Characterization of Ex Situ Polymethacrylate (EDMA-Co-GMA) Monoliths. *Can. J. Chem. Eng.* **2017**, 9999, 1–7.
- (54) Pfaunmiller, E. L.; Paulemond, M. L.; Dupper, C. M.; Hage, D. S. Recent Analytical Applications. **2014**, 405 (7), 2133–2145.
- (55) Magdeldin, S.; Moser, A. Affinity Chromatography: Principles and Applications. *Affin. Chromatogr.* **2012**, 3–29.
- (56) Purut Koc, O.; Bekin Acar, S.; Uyar, T.; Tasdelen, M. A. In Situ Preparation of Thermoset/Clay Nanocomposites via Thiol-Epoxy Click Chemistry. *Polym. Bull.* **2018**.

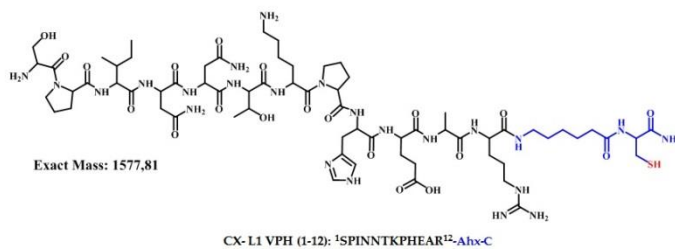
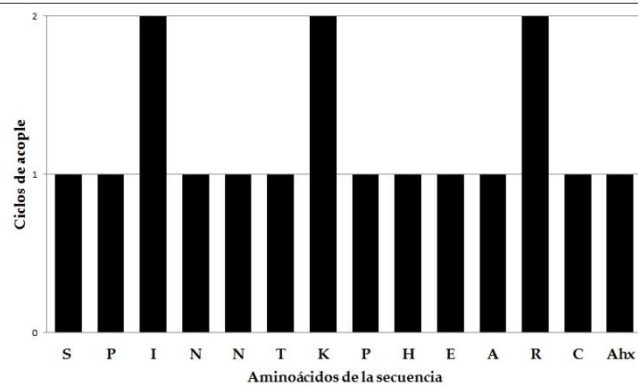
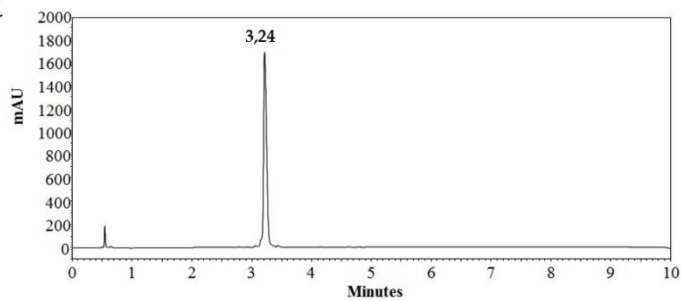
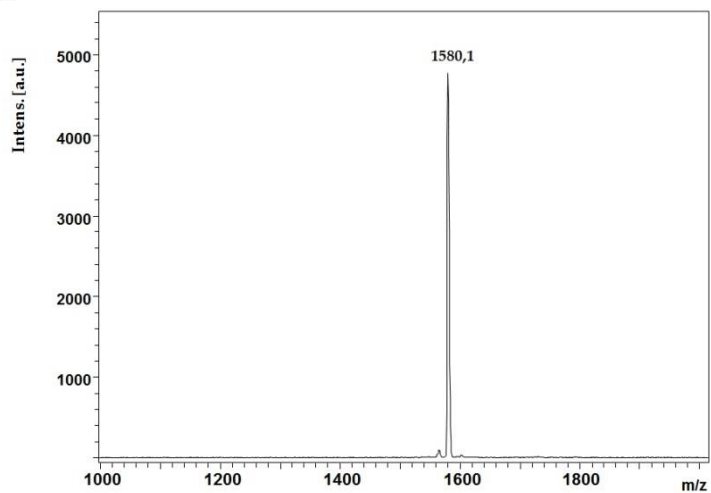
- (57) Nandivada, H.; Jiang, X.; Lahann, J. Click Chemistry: Versatility and Control in the Hands of Materials Scientists. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (17), 2197–2208.
- (58) Chen, Z.; Sun, Q.; Yao, Y.; Zhang, W.; Qian, J. Highly Sensitive Detection of Cysteine over Glutathione and Homo-Cysteine: New Insight into the Michael Addition of Mercapto Group to Maleimide. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 553–559.
- (59) Bai, J.; Ou, J.; Zhang, H.; Ma, S.; Shen, Y.; Ye, M. Synthesis of Polymeric Monoliths via Thiol-Maleimide Polymerization Reaction for Highly Efficient Chromatographic Separation. *J. Chromatogr. A* **2017**.
- (60) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press, 1997.
- (61) León-Calvijo, M. A.; Leal-Castro, A. L.; Almanzar-Reina, G. A.; Rosas-Pérez, J. E.; García-Castañeda, J. E.; Rivera-Monroy, Z. J. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia Coli* ATCC 25922 and *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–8.
- (62) Vergel Galeano, C. F.; Rivera Monroy, Z. J.; Rosas Pérez, J. E.; García Castañeda, J. E. Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *J. Mex. Chem. Soc.* **2014**, *58* (4), 386–392.
- (63) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34* (2), 595–598.
- (64) Kamysz, W.; Okrój, M.; Lempicka, E.; Ossowski, T.; Lukasiak, J. Fast and Efficient Purification of Synthetic Peptides by Solid-Phase Extraction. *Acta Chromatogr.* **2004**, No. 14, 180–186.
- (65) Okanda, F. M.; El Rassi, Z. Affinity Monolithic Capillary Columns for Glycomics/Proteomics: 1. Polymethacrylate Monoliths with Immobilized Lectins

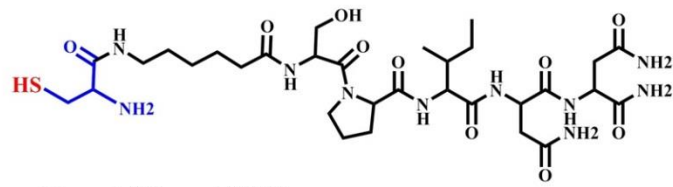
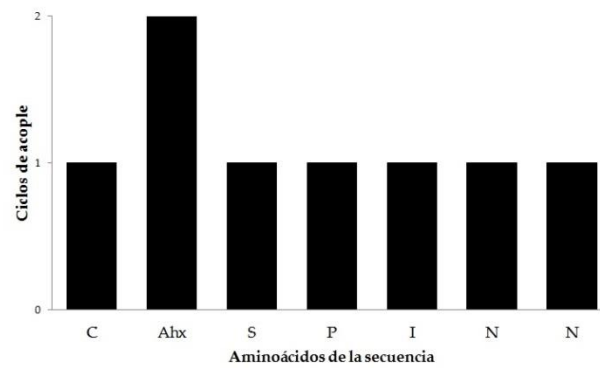
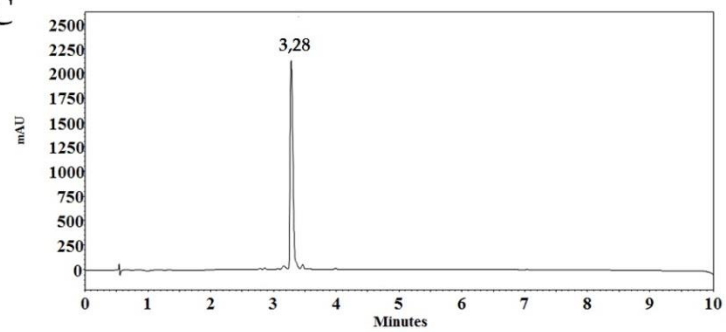
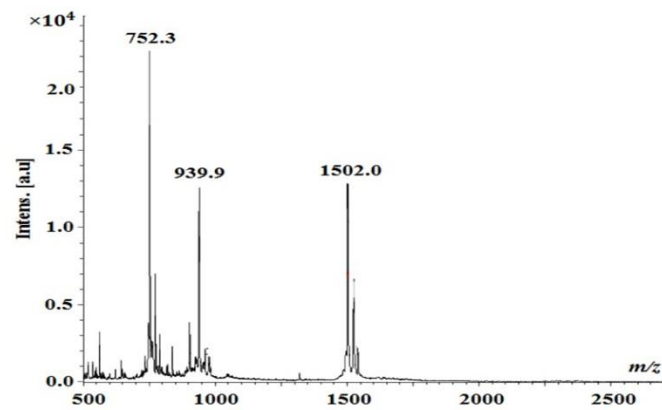
- for Glycoprotein Separation by Affinity Capillary Electrochromatography and Affinity Nano-Liquid Chromatography in Either a Single Column. *Electrophoresis* **2006**, *27* (5–6), 1020–1030.
- (66) Nasirtabrizi, M. H.; Khodabandlou, S.; Zargin, L.; Parchehbaf Jadid, A. Modification of Copolymers Using Nucleophilic Reactions between Glycidyl Methacrylate and 9-Anthracene Carboxylic Acid. *Int. J. Ind. Chem.* **2014**, *5* (1), 1–8.
- (67) Melo Flórez, D. E. Péptidos Derivados de La Proteína L1 Del Virus Del Papiloma Humano (VPH), Análogos de La Secuencia SPINNTKPHEA: Síntesis, Purificación y Caracterización, Universidad Nacional de Colombia, tesis de pregrado, 2017.
- (68) Xu, S.; Mo, R.; Jin, C.; Cui, X.; Bai, R.; Ji, Y. Mesoporous Silica Nanoparticles Incorporated Hybrid Monolithic Stationary Phase Immobilized with Pepsin for Enantioseparation by Capillary Electrochromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *140*, 190–198.
- (69) Rivera-Monroy, Z.; Bonn, G. K.; Guttman, A. Fluorescent Isotope-Coded Affinity Tag 2: Peptide Labeling and Affinity Capture. *Electrophoresis* **2009**, *30* (7), 1111–1118.
- (70) Belbekhouche, S.; Guerrouache, M.; Carbonnier, B. Thiol-Maleimide Michael Addition Click Reaction: A New Route to Surface Modification of Porous Polymeric Monolith. *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, *217* (8), 997–1006.

ANEXO A. Síntesis y caracterización de los péptidos diseñados

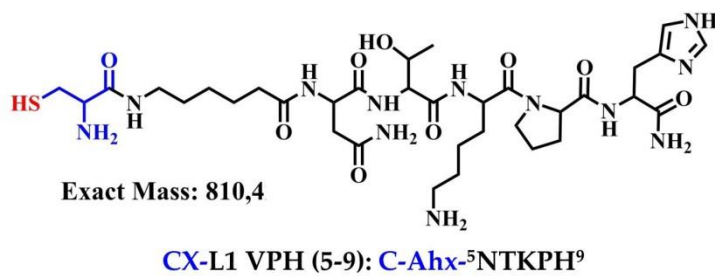
A continuación se muestran los resultados de la síntesis y caracterización de los péptidos obtenidos en esta investigación. La información está distribuida de la siguiente manera: **Panel A.** Código, estructura y secuencia del péptido. **Panel B.** Comportamiento de síntesis, número de ciclos de acoples necesarios en la inserción de cada uno de los aminoácidos presentes en la secuencia. **Panel C.** Perfil cromatográfico del producto obtenido después de su purificación. **Panel D.** Espectro de masas del péptido puro. En la Tabla 5-1, se expone un resumen de la síntesis y caracterización de las secuencias diseñadas.

A**L1 VPH (1-12)n: CG¹SPINNTKPPEAR¹²GC****B****C****D**

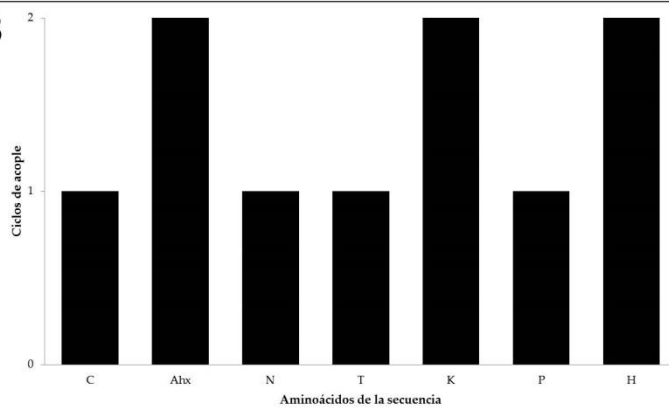
A**B****C****D**

A**Exact Mass: 758,3****CX-L1 VPH (8-12): C-Ahx-¹SPINN⁵****B****C****D**

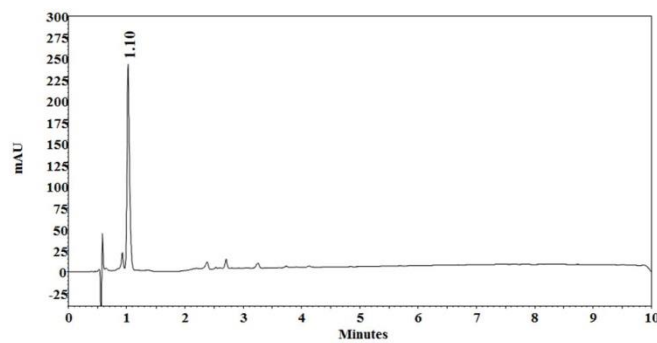
A



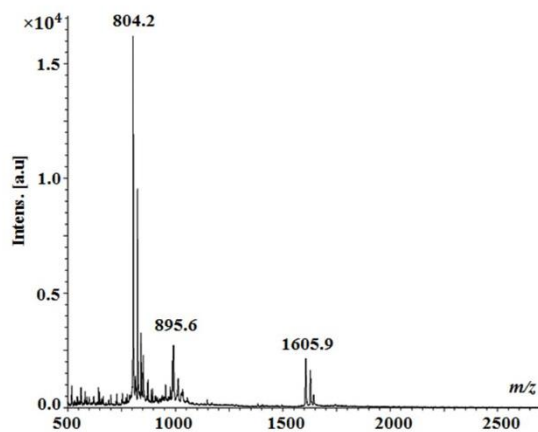
B

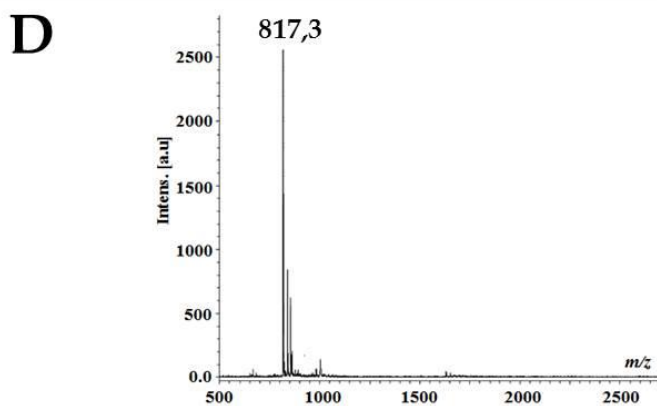
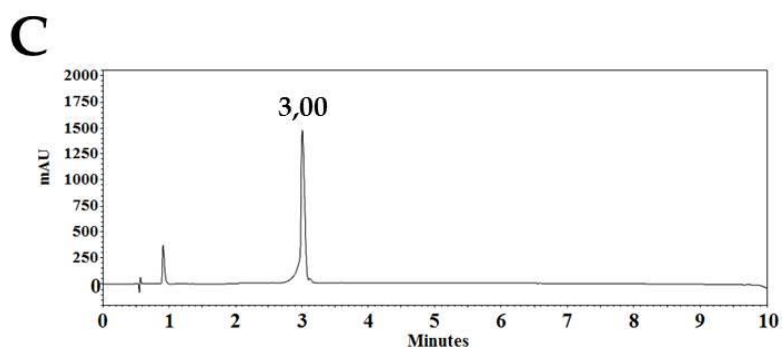
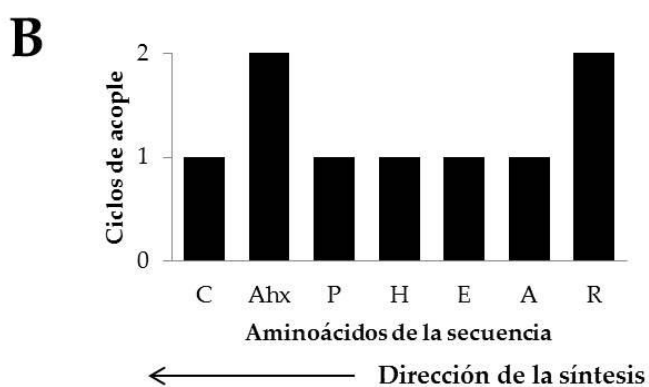
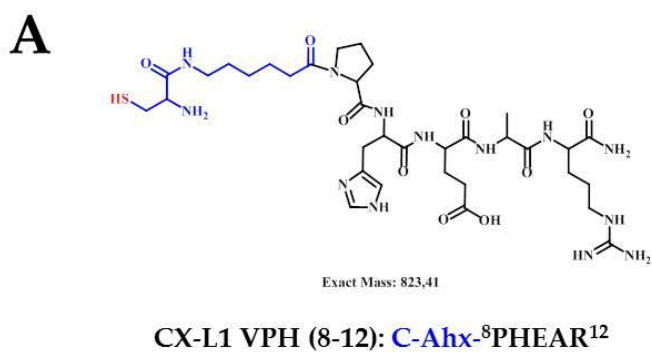


C



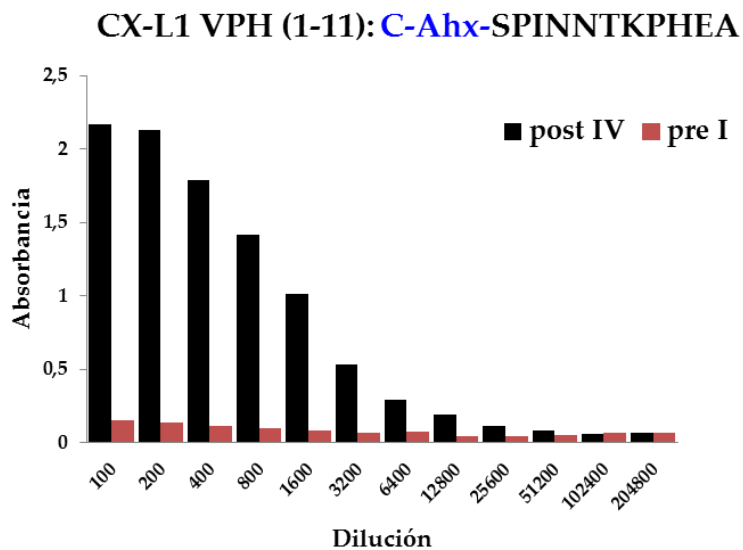
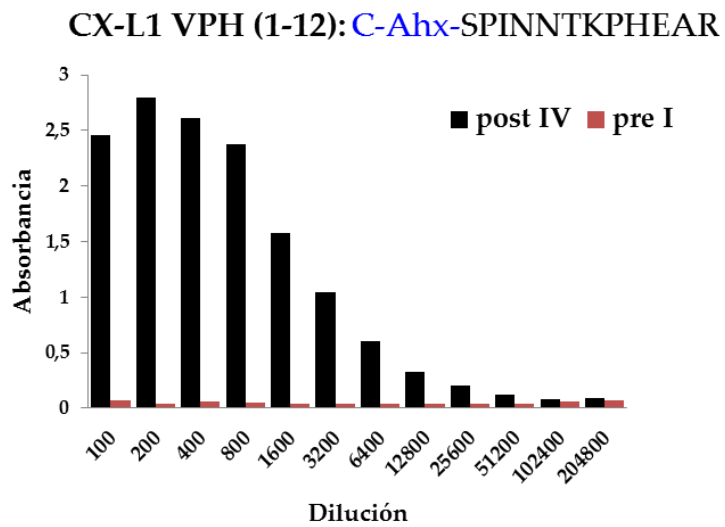
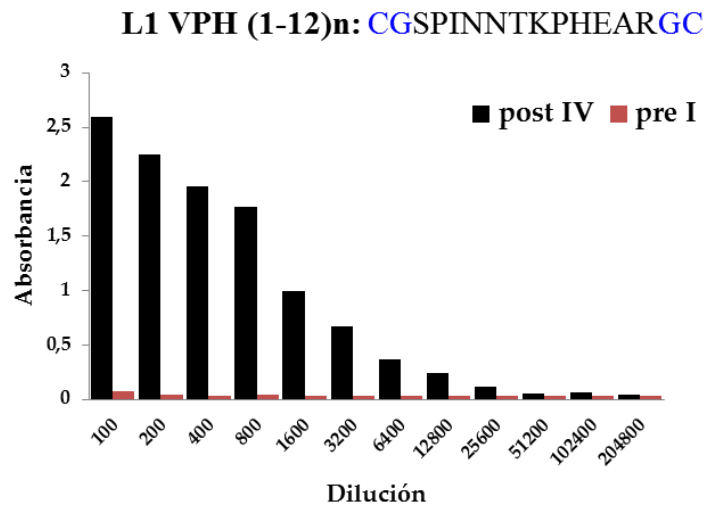
D



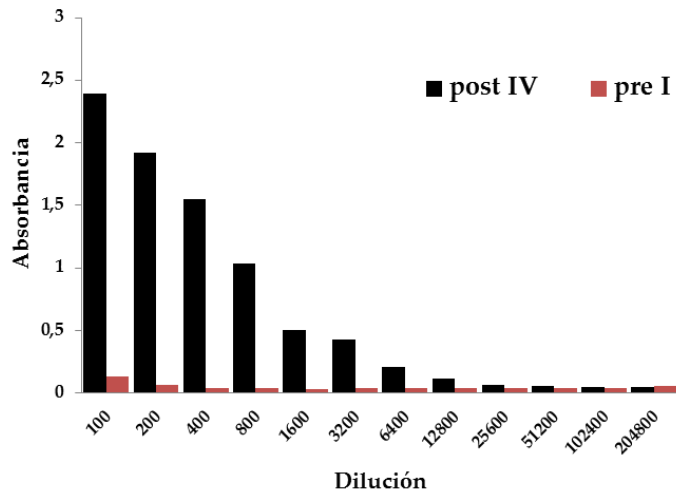


ANEXO B. Determinación del título mediante ensayo de ELISA

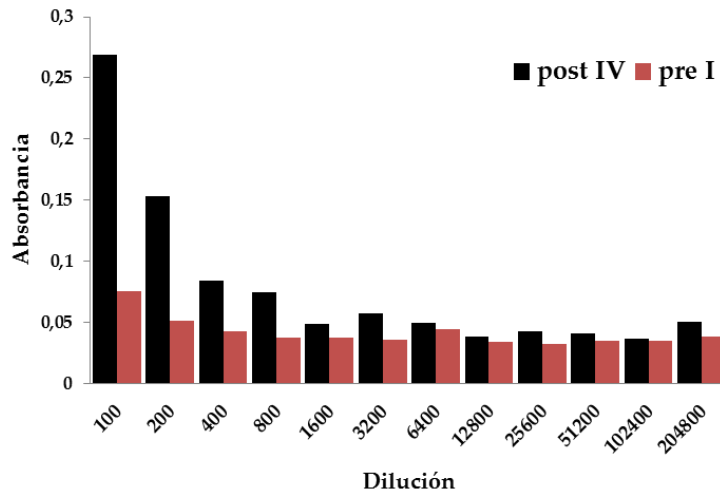
En la Tabla 5-2 se exponen las secuencias peptídicas estudiadas y el título para cada una de ellas. En las gráficas que aparecen a continuación se presenta el código y la secuencia en la parte superior. Las barras de color negro corresponden a la absorbancia para el suero Post IV y las de color rojo corresponden a la absorbancia obtenida para el suero preinmune.



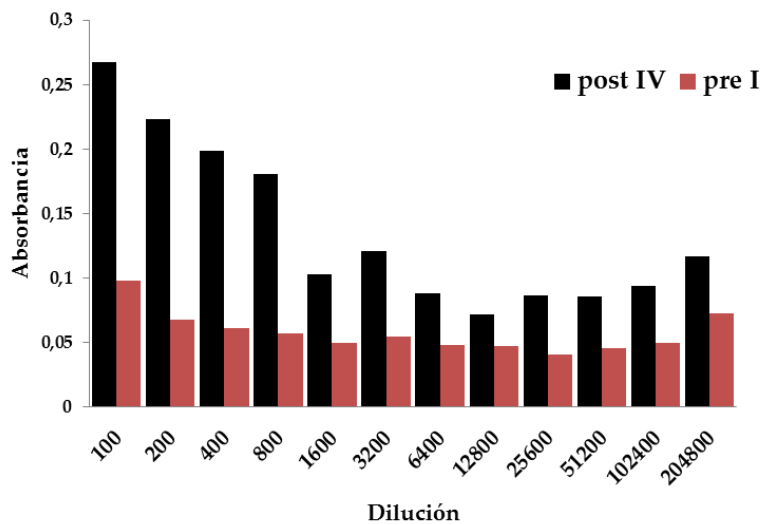
CX L1 VPH(1-10): C-Ahx-SPINNTKPHE

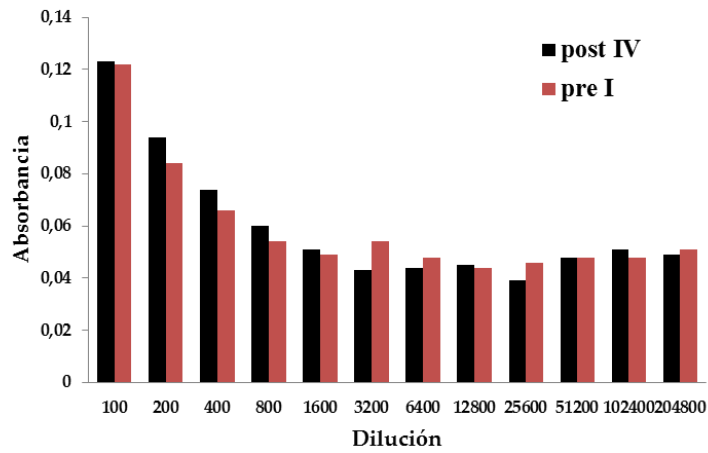
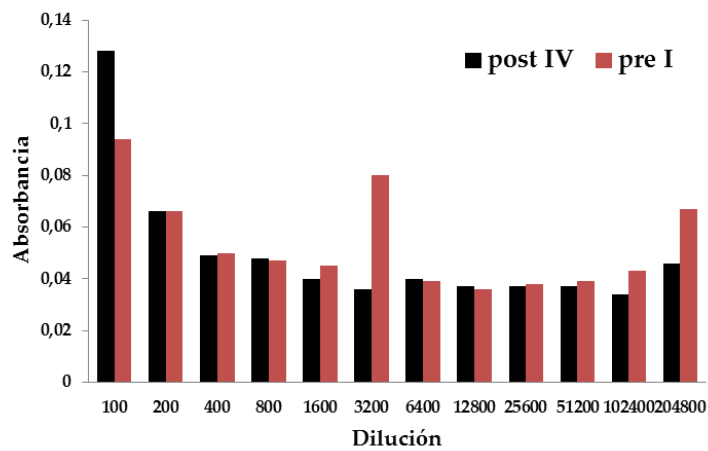
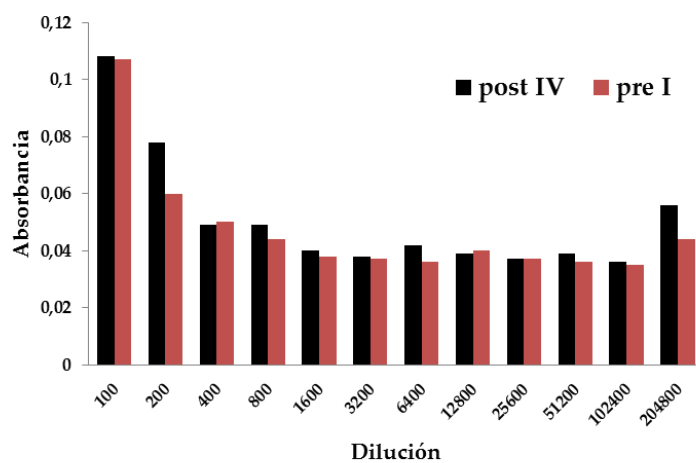


Dilución
CX L1 VPH (1-9): C-Ahx-SPINNTKPH

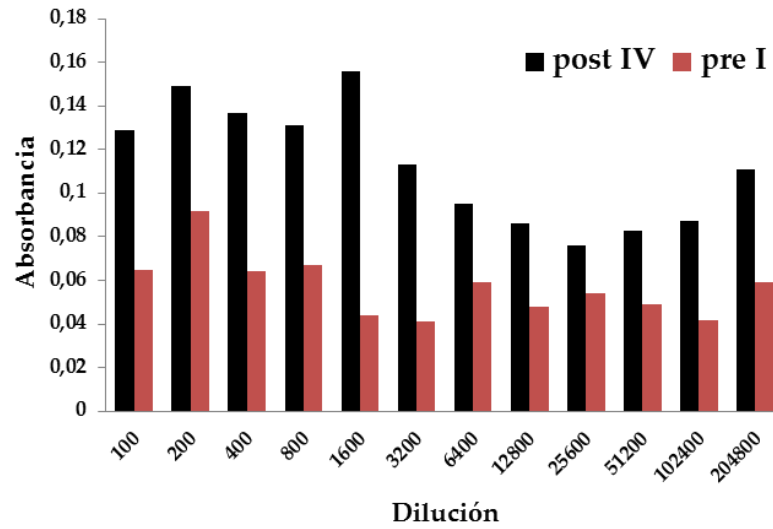


CX L1 VPH (1-8): C-Ahx-SPINNTKP

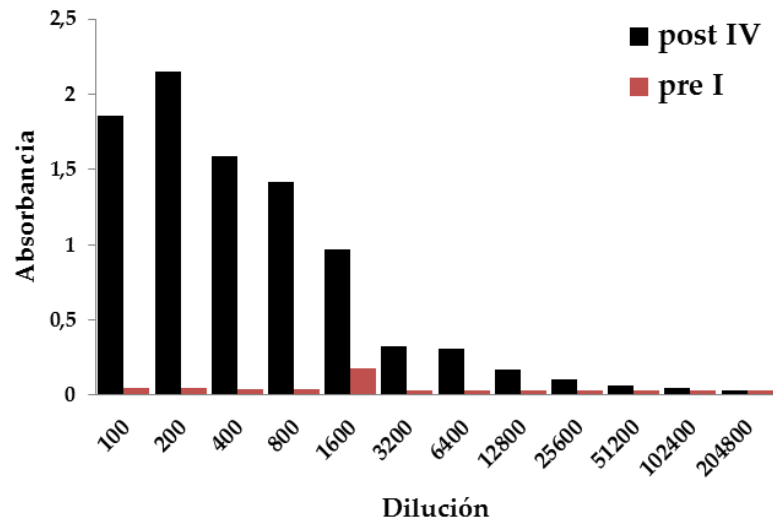


L1 VPH (1-7): C-Ahx-SPINNTK**CX L1 VPH (1-6): C-Ahx-SPINNT****L1 VPH (1-5): C-Ahx-SPINN**

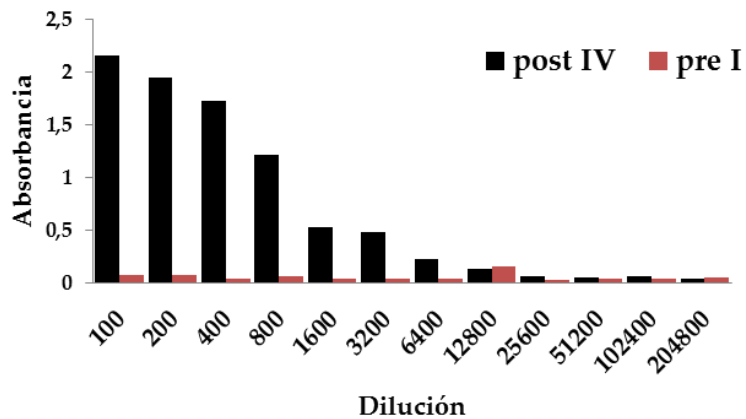
L1 VPH (1-4): C-Ahx-SPIN



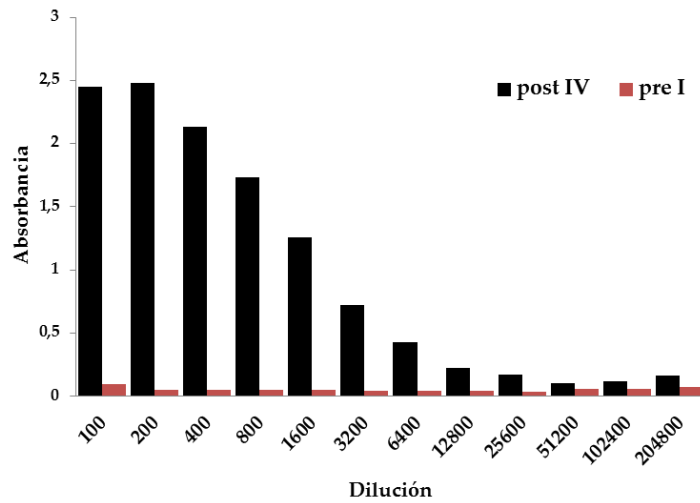
L1 VPH CX (1-12): SPINNTKPHEAR-Ahx-C



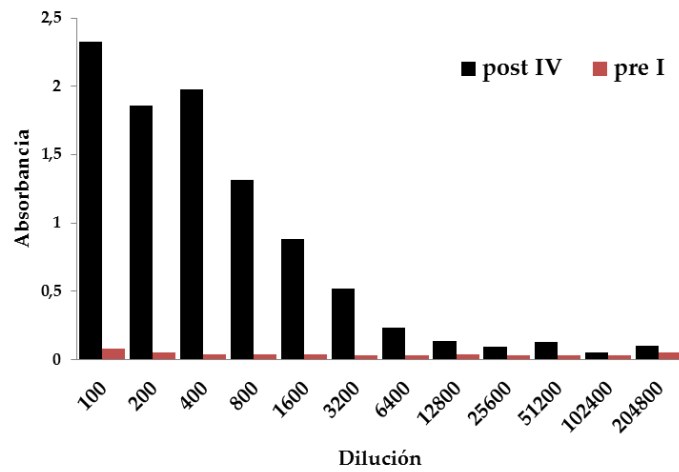
L1 VPH CX (1-11): PINNTKPHEAR-Ahx-C



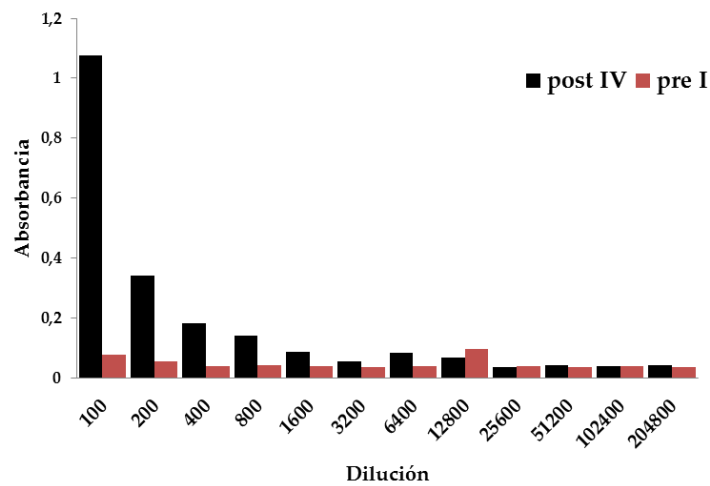
L1 VPH CX (1-10): INNTKPHEAR-Ahx-C

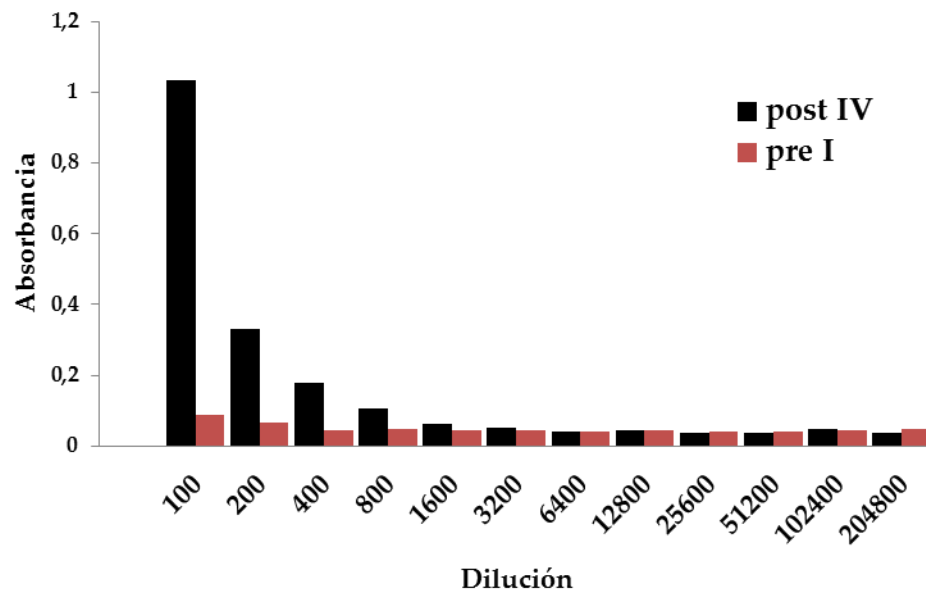


L1 VPH CX (1-9):NNTKPHEAR-Ahx-C



L1 VPH CX (1-8): NTKPHEAR-Ahx-C

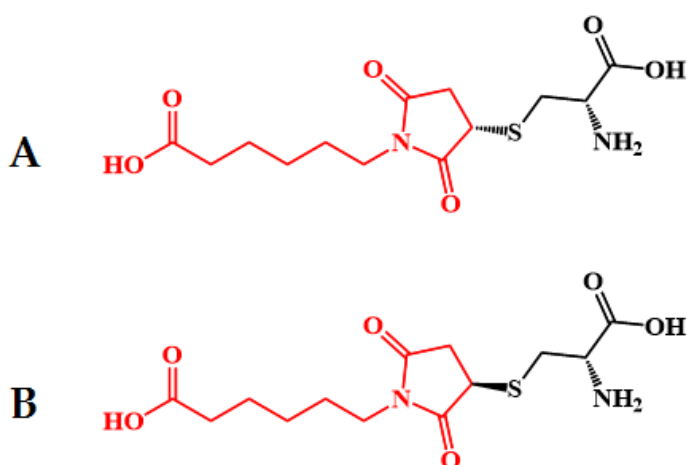


L1 VPH CX (1-7): TKPHEAR-*Abx-C*

ANEXO C. Estudio de la reacción entre el ácido 6-maleimidohexanoico y la L-Cisteína

En el estudio por RP-HPLC de la reacción de adición de Michael (tiol-maleimido) entre el ácido 6-maleimidohexanoico y la L-Cisteína en agua y metanol, se encontró que existe más de un producto (Figura 5-7). Teniendo en cuenta este resultado, se propuso inicialmente que los picos encontrados corresponden a dos diastereoisómeros (Figura Anexo C-1), que se forman dependiendo de la orientación por la que se lleva a cabo el ataque nucleofílico del tiolato al doble enlace α,β -insaturado presente en el anillo del grupo maleimido.

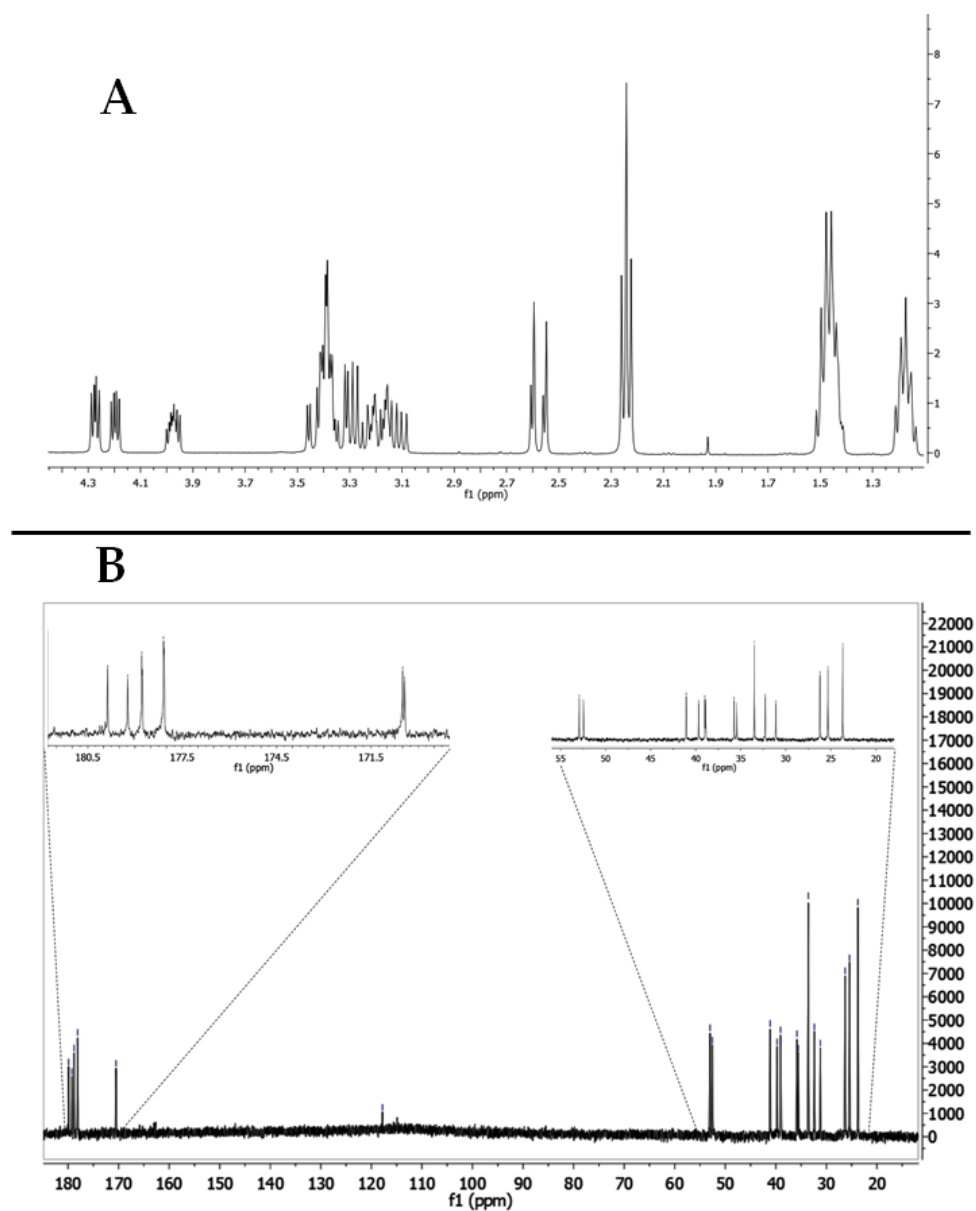
Figura Anexo C-1. Adición de Michael tiol-maleimido. Reacción entre la L-Cys y el ácido 6-maleimidohexanoico (*AMhx*). Productos propuestos.



Para verificar esta hipótesis, la mezcla de reacción fue purificada por RP-SPE, removiendo el *AMhx* que estaba en exceso. La fracción que contenía los dos productos formados se

lioofilizó y disolvió en agua deuterada para su análisis por ^1H y ^{13}C -RMN (Figura Anexo C-2).

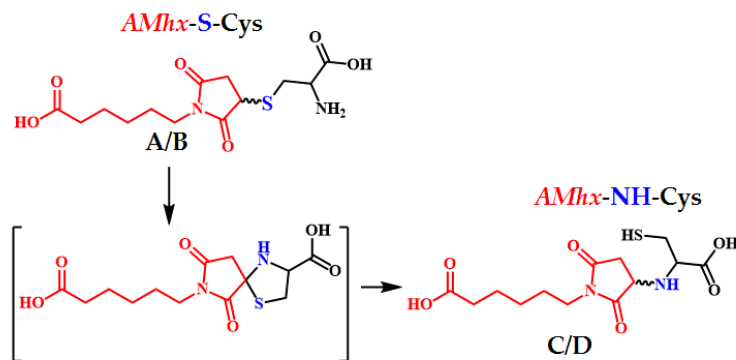
Figura Anexo C-2. Análisis por ^1H -RMN (A) y ^{13}C -RMN (B) de la mezcla de productos obtenidos en la reacción de adición entre la L-Cys y el ácido 6-maleimidohexanoico (*AMhx*)



Como se puede observar, en el espectro ^1H -RMN (Figura Anexo C-2A), aparecen multipletes en la región alifática (1.20, 1.45, 2.25 ppm) como se esperaba. Sin embargo, entre 2.5 y 4.2 ppm se encuentran una gran cantidad de señales difíciles de asignar. En el

espectro de ^{13}C -RMN, se observan en total veinte señales (Figura Anexo C-2B) pero se esperaban trece, ya que no debería ser posible diferenciar los diastereoisómeros propuestos por esta técnica de análisis. Específicamente, en la región de los carbonilos (170-180 ppm) se observan seis señales; si la mezcla correspondiera únicamente a los diastereoisómeros propuestos deberían presentarse sólo cuatro. Este comportamiento puede atribuirse a que los carbonilos presentes en el grupo maleimido presentan diferentes desplazamientos químicos dependiendo del heteroátomo que se encuentre unido al anillo (S o N), lo que explicaría las señales adicionales encontradas. Teniendo en cuenta lo anterior, y el reporte de Chen Z. en el 2017⁵⁸, se propuso que los diastereoisómeros (A/B) formados por la adición de Michael (*AMhx-S-Cys*) pueden sufrir un re-arreglo, en el que el grupo amino de la cisteína ataca el carbono del anillo (que forma el tioeter), pasando por un estado de transición y finalmente dando origen al tautómero (*AMhx-NH-Cys*), como se ilustra en la Figura Anexo C-3.

Figura Anexo C-3. Formación del tautómero *AMhx-NH-Cys* a partir de *AMhx-S-Cys*.

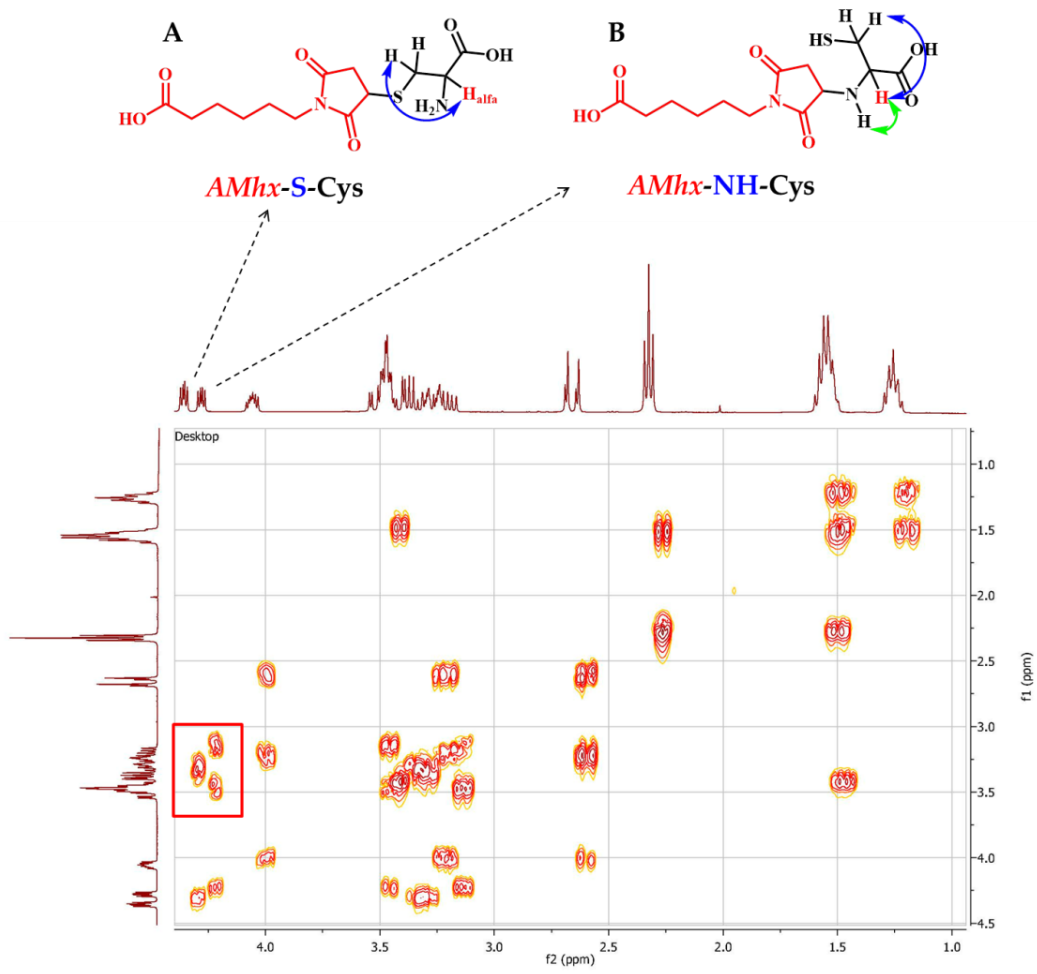


Para verificar la formación del tautómero *AMhx-NH-Cys*, se realizó un ensayo por ^1H - ^1H COSY (Figura Anexo C-4). Como se puede apreciar en el espectro, en la zona donde se esperaba la señal correspondiente al hidrógeno del carbono α (de la Cys), aparecen dos multipletes en 4.25 y 4.30 ppm lo que sugiere que existen dos H_α diferentes en la mezcla de productos. Al observar la conectividad, se puede apreciar que el pico en 4,30 ppm acopla únicamente con un hidrógeno, esto indica que esta señal corresponde al protón α de la cisteína presente en el tautómero *AMhx-S-Cys*, ya que este sólo tiene interacción con

los protones β de la cisteína (Figura Anexo C-4A). Para el caso de la señal en 4.25, correspondiente al protón α de la cisteína presente en el tautómero *AMhx-NH-Cys*, se puede apreciar que existe conectividad con los protones del grupo N-H y los hidrógenos β de la cisteína, en 3.2 y 3.5 ppm (Figura Anexo C-4B).

En conclusión, una mayor cantidad de señales a las esperadas, en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, junto con los acoplamientos en la región donde se esperaba la señal para los Hidrógenos α en el espectro ^1H - ^1H COSY, indican que es probable que los dos picos cromatográficos que aparecen en la reacción de adición entre la L-Cisteína y el ácido 6-maleimidohexanoico, corresponden a una mezcla de los tautómeros *AMhx-S-Cys* y *AMhx-NH-Cys*; sin embargo, es necesario hacer estudios adicionales para verificar esta hipótesis.

Figura Anexo C-4. Espectro ^1H - ^1H COSY de la mezcla de productos obtenidos en la reacción de adición entre la L-Cys y el ácido 6-maleimidohexanoico (*AMhx*).

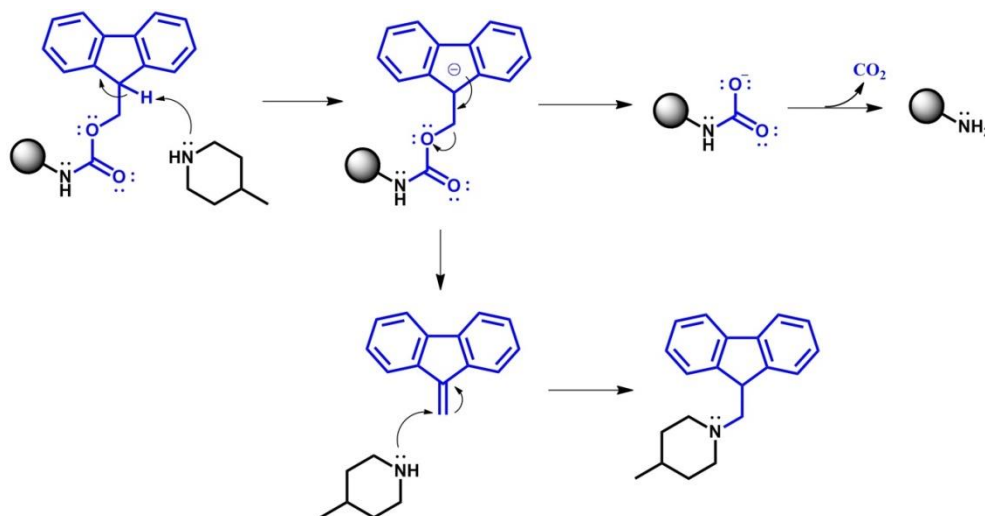


ANEXO D. Mecanismos de reacción involucrados en esta investigación

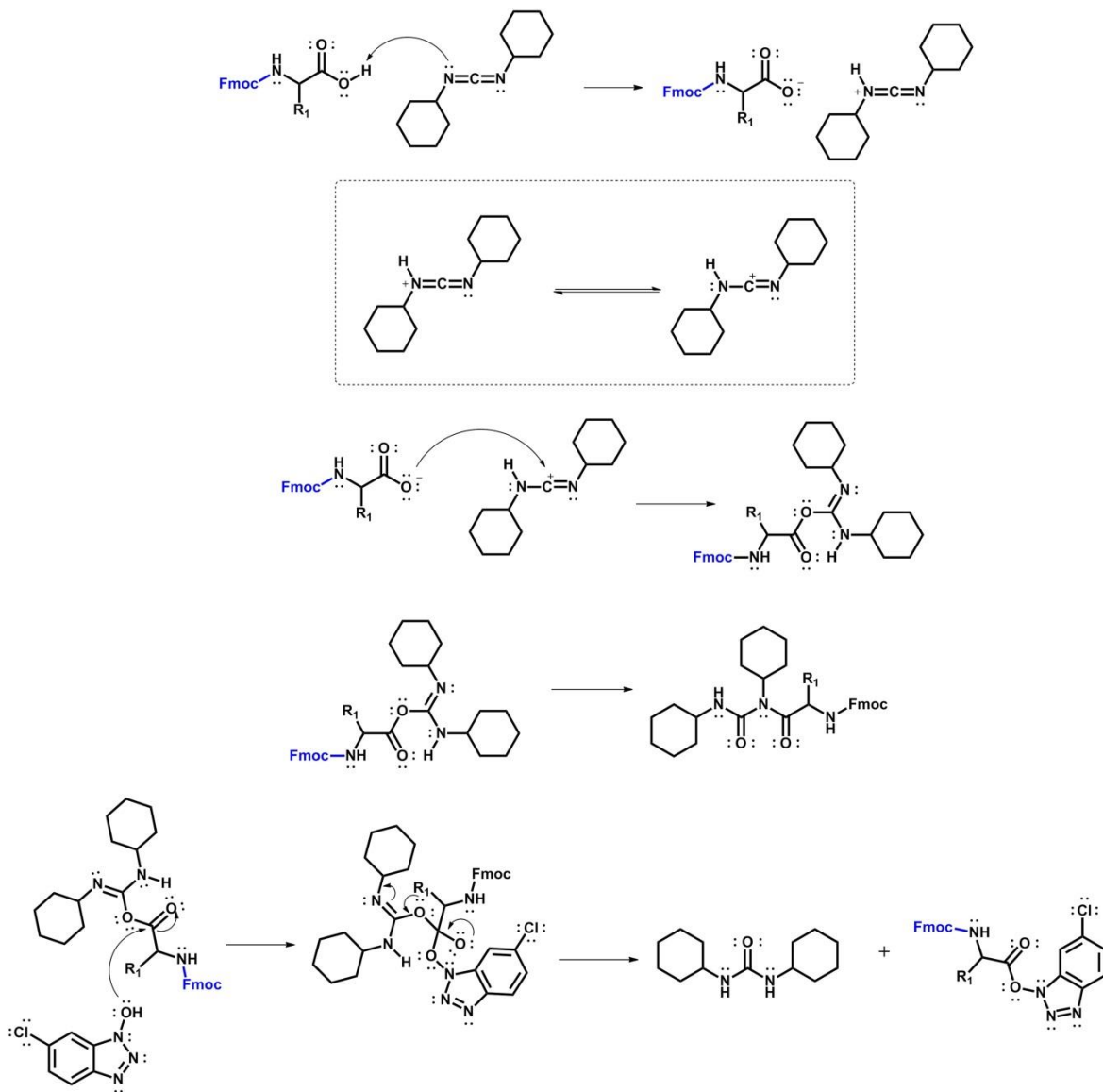
- MECANISMOS DE REACCIÓN INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA EMPLEANDO LA ESTRATEGIA FMOC/TBU

La síntesis de péptidos en fase sólida está conformado por los siguientes pasos: (i) La remoción del grupo Fmoc presente en la resina y en los residuos que se van incorporando a la secuencia peptídica, (ii) La activación del aminoácido por formación de un éster y (iii) El acople del aminoácido activado en la secuencia peptídica creciente. La desprotección y el acople son monitoreados mediante el (iv) test de Kaiser, que es una prueba colorimétrica para determinar la presencia de grupos amina. Los mecanismos más aceptados para cada uno de estos pasos se exponen a continuación.

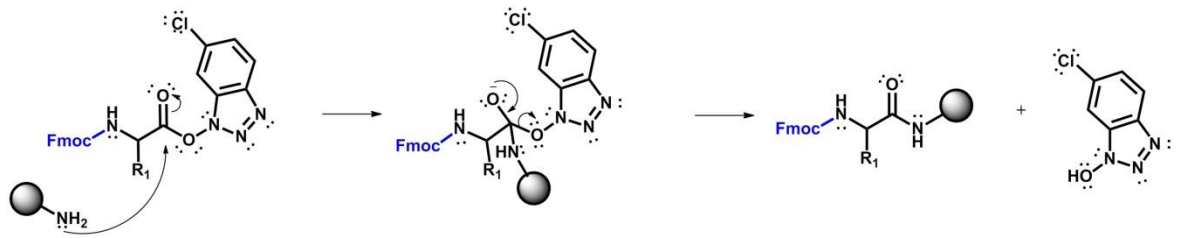
i. Remoción del grupo Fmoc



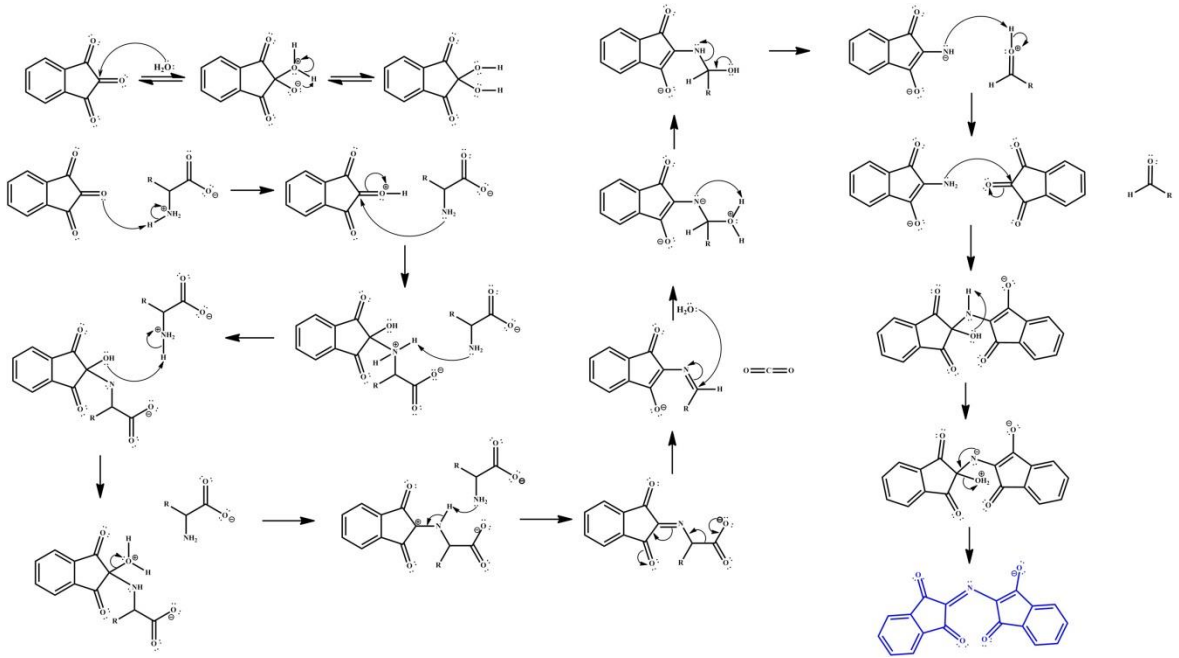
ii. Activación del aminoácido



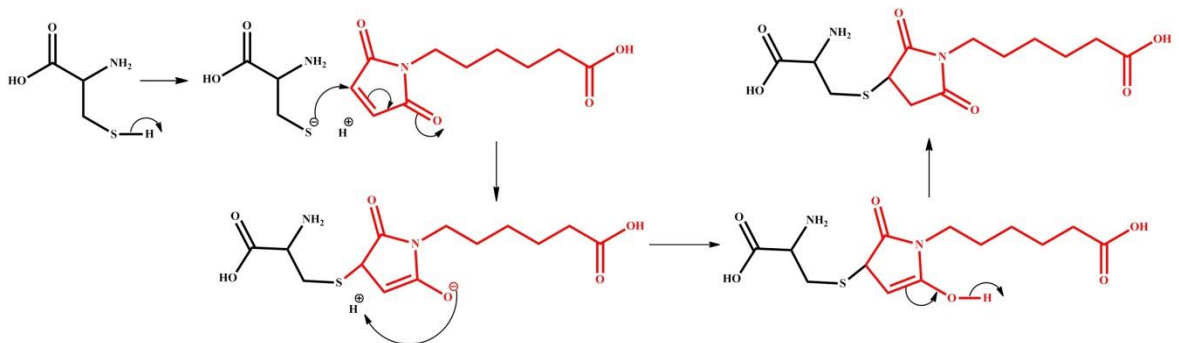
iii. Acople del aminoácido



iv. Test de Kaiser



- MECANISMO DE REACCIÓN PROPUESTO ENTRE LA L-CISTEÍNA Y EL ÁCIDO 6-MALEIMIDOHEXANOICO



- MECANISMO DE POLIMERIZACIÓN VÍA RADICALES LIBRES DEL GLICIDILMETACRILATO

